

2023 Vol. 14 Št. 1

# C S P P

Collectanea Studentium Physiologiae Plantarum



# Zgodba iz naslovnice



**Slika:** Prikaz antagonističnih testov kvasovke *Rhodotorula babjevae* proti izbranim patogenim glivam *Alternaria alternata* (levo zgoraj), *Alternaria infectoria* (desno zgoraj), *Fusarium sporotrichioides* (levo spodaj) in *Fusarium oxysporum* (desno spodaj), po enem tednu sogojenja. Avtorji: Teja Knafelj, Aljaž Nagode, Sergej Praček, Sara Stopar, Sara Žitko

---

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: 2023

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

- 5 UPORABA POTENCIALNO ANTAGONISTIČNE GLIVE *TALAROMYCES PURPUREOGENUS* ZA ZATIRANJE GLIV, IZOLIRANIH IZ ZRNJA AJDE (*FAGOPYRUM ESCULENTUM*)  
Kaja Adamek, Nika Drnovšek, Urša Grohar, Dominika Holc, Saša Kockar
- 11 UPORABA POTENCIALNO ANTAGONISTIČNE GLIVE *TRICHODERMA KONINGII* ZA ZATIRANJE GLIV, IZOLIRANIH IZ ZRNJA NAVADNE AJDE (*FAGOPYRUM ESCULENTUM*)  
Žiga Javornik, Miona Kovachevikj, Ana Kukenberger, Maja Marinčič, Špela Rozman
- 18 UPORABA POTENCIALNO ANTAGONISTIČNE GLIVE *RHODOTORULA BABJEVAE* ZA ZATIRANJE GLIV, IZOLIRANIH IZ ZRNJA AJDE  
Teja Knafelj, Aljaž Nagode, Sergej Praček, Sara Stopar, Sara Žitko
- 24 USE OF THE POTENTIALLY ANTAGONISTIC FUNGUS *AUREOBASIDIUM PULLULANS* TO CONTROL FUNGI ISOLATED FROM BUCKWHEAT GRAINS  
Lana Štangl, Judit Andorrà, David Krisper, Emanuela Žnidaršič
- 31 VPLIV IZVLEČKOV IZ LUŠČIN ZRN NAVADNE AJDE (*FAGOPYRUM ESCULENTUM*) NA RAST IZBRANIH PATOGENIH GLIV  
Michelle Berra, Nuša Golob, Anja Habe, Špela Lepičnik, Daša Šarman
- 37 VPLIV IZVLEČKOV IZ LUŠČIN ZRN Tatarske AJDE (*FAGOPYRUM TATARICUM*) NA RAST IZBRANIH PATOGENIH GLIV  
Tamara Dokmanović, Barbara Domevščik, Simona Katrin Galun, Vid Golič, Mirjam Kerin
- 42 VPLIV IZVLEČKOV NAVADNEGA TOLŠČAKA (*PORTULACA OLERACEA*) NA RAST IZBRANIH PATOGENIH GLIV  
Saša Casar, Vaso Đokić, Samo Grgurevič, Gregor Jazbec
- 49 VPLIV IZVLEČKA IZ SLADKEGA PELINA (*ARTEMISIA ANNUA* L.) NA RAST IZBRANIH PATOGENIH GLIV  
Lana Kuzman, Špela Saje, David Mikolič, Lenart Žežlina, Nik Židan
- 54 VPLIV SUŠE NA RAST, RAZVOJ IN MINERALNO SESTAVO OHROVTA (*BRASSICA OLERACEA* VAR. *ACEPHALA* L.)  
Nika Jagodic, Anja Janežič, Mia Jarc, Karin Kukenberger, Ana Trobec
- 59 ODZIV RASTLIN NAVADNEGA PROSA (*PANICUM MILIACEUM* L.) IN OHROVTA (*BRASSICA OLERACEA* VAR. *ACEPHALA* L.) NA DOGNOJEVANJE S ZNSO<sub>4</sub>  
Neja Golja, Neža Kapelj, Anja Marton, Ena Sanjković, Tim Zaveršek
- 64 VPLIV IZVLEČKOV IZ LISTOV IN STEBEL NAVADNE AJDE (*FAGOPYRUM ESCULENTUM*) NA RAST IZBRANIH PATOGENIH GLIV  
Agata Kokalj Malovrh, Neža Škoda, Eva Žejn, Sara Žitko
- 70 VPLIV IZVLEČKOV ZELENIH DELOV Tatarske AJDE (*FAGOPYRUM TATARICUM*) NA RAST IZBRANIH VRST GLIV  
Julija Horvat, Anja Javornik, Barbara Knez, Anže Nemec
- 75 VPLIV SUBSTRATA NA RAST IN RAZVOJ TER MINERALNO SESTAVO JEČMENA  
Tanita Kranjc, Žiga Oven, Sara Stopar, Lara Šušmelj, Anja Verbanec

81 VPLIV SUBSTRATA NA RAST IN RAZVOJ TER  
MINERALNO SESTAVO KUMAR

Katarina Vodnik<sup>1</sup>, Urša Grohar<sup>2</sup> in Pia  
Pogač<sup>2</sup>

87 VPLIV DELCEV MIKROPLASTIKE NA RAST IN  
RAZVOJ TER MINERALNO PREHRANO KORUZE  
IN SONČNICE

Miha Kitek, Luka Mravlje, Sergej Praček,  
Maša Starman, Jakob Trebše

94 PRIMERJAVA VPLIVA PLAZEMSKE OBDELAVE  
NA MIKROBIOM ZRNJA NAVADNE IN TATARSKE  
AJDE PO ENI RASTNI SEZONI NA POLJU

Sims Tjuša Elizabeth, Suchy Hana in  
Štampar Laura

# Uporaba potencialno antagonistične glive *Talaromyces purpureogenus* za zatiranje gliv, izoliranih iz zrnja ajde (*Fagopyrum esculentum*)

Kaja Adamek, Nika Drnovšek, Urša Grohar, Dominika Holc, Saša Kockar

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

- Namen raziskave je oceniti vpliv glive *Talaromyces purpureogenus* na rast patogenih gliv in njihov vpliv na kalitev in rast ajde (*Fagopyrum esculentum*), za oceno uporabnosti te glive za zatiranje rastlinskih glivnih patogenov.
- Izvedli smo antagonistične teste - glive smo v parih skupaj gojili na istih ploščah in določili njihovo površino v primerjavi s kontrolami. Za oceno vpliva na kalitev in rast ajde smo izvedli kalitvene teste v prisotnosti izbrane glive, izmerili dolžino kalic in določili količino skupnih fenolov v kalicah (za določitev vpliva na sekundarni metabolizem ajde).
- Po 14 dneh kokultivacije je gliva *Talaromyces purpureogenus* negativno vplivala na rast gliv *Alternaria infectoria*, *Fusarium equiseti*, *Alternaria alternata* in *Epicoccum nigrum*. Hkrati gliva *Talaromyces purpureogenus* negativno vpliva na kalitev in dolžino kalic ajde. Prisotnost gliv med kalitvijo semen ni imela statistično značilnega vpliva na delež fenolov v suhi masi v primerjavi s kontrolo.
- Gliva *Talaromyces purpureogenus* ima zaradi antagonističnega delovanja na večino testiranih gliv, potencialno zanimive lastnosti za uporabo kot biokontrolni organizem, vendar v našem poskusu nismo dokazali pozitivnega vpliva te glive na kalitev, rast in količino skupnih fenolov ajde.

**Ključne besede:** patogene glive, antagonizem, biokontrola, skupni fenoli, kalitveni testi

## Uvod

Glive, kot so na primer rodovi *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Helminthosporium* in *Pullularia*, pogosto kolonizirajo zrnje, med drugim tudi ajdo (*Fagopyrum* sp.), še preden žetvijo. Te glive lahko zrna razbarvajo in izsušijo, povzročijo propad semenske zasnove ali embrija, poleg tega lahko tvorijo tudi spojine, ki so strupene za človeka. Po žetvi pa lahko zrno naselijo še druge glive, med katerimi so najpogostejše glive iz rodu *Aspergillus* in *Penicillium*. Te vplivajo na kakovost skladiščenih zrn tako, da zmanjšajo kaljivost, poleg tega pa lahko tudi pokvarijo celoten skladiščen pridelek (Christensen, 1957).

Navadna ajda (*F. esculentum*) je tradicionalna poljščina v Aziji ter srednji in vzhodni Evropi (Pomeranz, 1983). Njena pridelava se je v zadnjem stoletju zmanjšala. Glavni razlog za ta upad je bila nezmožnost samooploditve, ki je povzročila težave pri žlahtnenju. V zadnjih letih pa se je zanimanje za ajdo ponovno povečalo, saj se jo je začelo smatrati kot alternativen pridelek v ekološki pridelavi, poleg tega pa se je začelo podrobneje raziskovati njeno bogato hranilno sestavo (Wijngaard in Arendt, 2006).

Kontaminacija zalog zrnja z glivami predstavlja globalen problem, ki negativno vpliva tako na ekonomijo kot na zdravje ljudi in živali. Jasno je, da je treba razviti nove učinkovite tehnologije preprečevanja glivnih okužb, ki so prijazne tudi za okolje (Střelková s sod. 2021). Ena izmed možnih metod je uporaba antagonističnih mikroorganizmov, pri kateri uporabljamo mikroorganizme, ki proizvajajo antimikrobne učinkovine zoper patogena (Köhl s sod., 2019).

V raziskavi smo preučevali vpliv potencialno antagonistične glive *Talaromyces purpureogenus* na izbrane patogene glivne vrste *Alternaria alternata*, *A. infectoria*, *Fusarium equiseti*, *F. fujikuroi* in endofitsko glivo *Epicoccum nigrum*. Želeli smo preučiti, ali lahko dotično glivo uporabimo kot sredstvo za zatiranje izbranih gliv. Poleg tega smo želeli tudi določiti vpliv, ki ga imajo glivni patogeni na kalitev zrnja navadne ajde ter proizvodnjo sekundarnih metabolitov. Postavili smo si dve hipotezi. Predpostavili smo, da bo gliva *Talaromyces purpureogenus* zavrla rast izbranih patogenih glivnih vrst in hkrati izboljšala kalitev in rast kalic. Predvidevali smo tudi, da bodo izbrane patogene glivne vrste zavrla kalitev in rast kalic.

## Materiali in metode

### Sevi gliv

Kot antagonistično glivno vrsto smo izbrali *Talaromyces purpureogenus* (NA097), patogene vrsto so predstavljale *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium equiseti* in *Fusarium fujikuroi* ter endofitsko vrsto *Epicoccum nigrum*. Glive smo vzgojili v čistih kulturah na ploščah PDA v temi pri dnevni temperaturi 22°C (16h) in nočni 20°C (8h).

### Antagonistični testi

Iz teden dni starih glivnih kultur smo s spatulo izrezali enako velike koščke robnega micelija (5x5 mm). Po dva koščka gliv – en košček z antagonistično glivo (*T. purpureogenus*) in en z eno od patogenih oz. endofitskih gliv (*A. alternata*, *A. infectoria*, *F. equiseti*, *F. fujikuroi* in *E. nigrum*) smo postavili na svežo ploščo

PDA v medsebojnem razmaku 5 cm. Kot kontrolo smo uporabili ploščo s posameznim izsečkom iste glive. Plošče so bile inkubirane v rastni komori v temi pri temperaturi 22°C (16h) in 20°C (8h). Izmerili smo polmer glivne rasti od sredine izsečka do roba rasti glive na gojišču v smeri proti nasproti ležečemu izsečku druge glive 4., 7., 11. in 14. dan po vzpostavitvi testa. Iz izmerjenih vrednosti smo izračunali površino in jo normalizirali glede na povprečno izračunane vrednosti kontrol vsake glive.

### Kalitveni poskus - vpliv inokulacije izbranih gliv na kalitev zrnja ajde

S kalitvenim poskusom smo želeli preučiti vpliv inokulacije z različnimi glivami na delež vzkaljenih zrn navadne ajde in dolžino kalic. Poskus smo opravili po dveh metodah. Pri prvi metodi smo zrnja inokulirali s preraščanjem. Teden dni pred testom smo s spatulo sterilno ob gorilniku vzeli izseček agarja, na katerem je rasla posamezna gliva in ga položili na sredino sveže plošče PDA tako, da je gliva na izsečku gledala navzgor. Na dan testa smo zrna navadne ajde najprej površinsko sterilizirali z namakanjem v 30% raztopini H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> za 15 minut in jih nato dobro sprali z avtoklavirano destilirano vodo. Zrna smo nato umetno kontaminirali z glivami tako, da smo po 10 steriliziranih zrn v enakomernih razmakih postavili okoli micelija sedem dni starih kultur. Naredili smo po pet ponovitev za vsako od glivnih vrst. Kot negativno kontrolo smo vzeli ploščo PDA brez glive in nanjo na enak način postavili 10 steriliziranih semen. Plošče so bile inkubirane v temi pri zgoraj navedenih pogojih. Delež vzkaljenih semen smo prešteli 4., 7. in 14. dan. Zadnji dan smo izmerili tudi dolžino kalic. Pri drugi metodi smo zrnja inokulirali s stresanjem. Po dve žlici zrn površinsko sterilizirane (enako kot zgoraj) navadne ajde smo inokulirali z 20 sekundnim stresanjem v petrijevki, kjer je rasla vsaka posamezna, dva tedna stara glivna vrsta. Nato smo po 20 zrn enakomerno prenesli v posamezno ploščo PDA v treh ponovitvah. Kot negativno kontrolo smo vzeli površinsko sterilizirana neinficirana zrna. Delež vzkaljenih semen smo prešteli 7. in 14. dan, ko smo izmerili tudi dolžino kalic.

### Vpliv inokulacije z izbranimi glivami na sekundarni metabolizem kalic

V kalicah smo določili koncentracijo skupnih fenolov po Folin-Ciocalteu metodi (Kreft s sod., 2013). Preživele kalice obeh metod kalitvenega poskusa smo v terilnici s tekočim dušikom strli v prah. 200 mg prahu kalic ajde smo dodali 10 mL 60% etanola in stresali na stresalniku preko noči ter s tem ekstrahirali sekundarne metabolite. Po centrifugiranju (2000 g, 10 minut) smo 100 µL supernatanta dodali 750 µL destilirane vode in 50 µL Folin-Ciocalteu reagenta ter po treh minutah še 100 µL 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Kot slepi vzorec smo uporabili dH<sub>2</sub>O. Vzorcem smo po eni uri inkubiranja v temi izmerili absorbanco pri 750 nm. Za standard smo uporabili znane koncentracije katehola, s katerim smo naredili umeritveno krivuljo.

### Statistična analiza

Pridobljene rezultate smo obdelali v programu Microsoft Excel z orodjem XLSTAT (<https://www.xlstat.com/en/>) z enosmerno analizo variance (ANOVA) in s Tukeyevim post-hoc testom (razlike so statistično pomembne pri p<0,05).

## Rezultati

### Antagonistični test

V tabeli 1 so prikazane povprečne površine rasti kontrolnih gliv.

**Tabela 1:** Povprečna površina kultur gliv *A. alternata*, *A. infectoria*, *E. nigrum*, *F. equiseti* in *F. fujikuroi* s pripadajočimi standardnimi napakami (n=5) v deležih od kontrole posamezne glive po 4., 7., 11. in 14. dneh inkubacije.

Gliva	Rast po 4 dneh [cm <sup>2</sup> ]	Rast po 7 dneh [cm <sup>2</sup> ]	Rast po 11 dneh [cm <sup>2</sup> ]	Rast po 14 dneh [cm <sup>2</sup> ]
<i>Alternaria alternata</i>	5,1 ± 0,1	20,7 ± 0,6	24,6 ± 1,0	25,3 ± 1,6
<i>Alternaria infectoria</i>	3,8 ± 0,3	21,6 ± 0,5	26,5 ± 2,2	26,6 ± 2,1
<i>Epicoccum nigrum</i>	3,9 ± 0,2	19,1 ± 0,7	24,3 ± 1,4	25,5 ± 2,2
<i>Fusarium equiseti</i>	4,8 ± 0,1	19,7 ± 0,9	21,1 ± 0,8	21,3 ± 0,3
<i>Fusarium fujikuroi</i>	3,3 ± 0,2	18,6 ± 0,6	23,9 ± 1,6	26,3 ± 1,3

Po 4. in 7. dneh od postavitve poskusa je bila rast vrst *A. alternata* in *E. nigrum* kokultiviranih s *T. purpureogenus* statistično značilno manjša od rasti kontrol za približno 22 % oziroma 20 %. Pri drugih antagonističnih testih po 4. in 7. dneh

nismo opazili statistično značilnih razlik (Slika 1a in 1b). Po 11. in 14. dneh od kokultivacije je gliva *T. purpureogenus* uspešno zavrla rast pri vseh testiranih glivah razen *F. fujikuroi* (Slika 1c in 1d). Najbolj je bila rast zavrta pri glivah *A. infectoria*, *E. nigrum* in *F. equiseti* in sicer za približno 40 %, najmanj pa pri glivi *F. fujikuroi* in sicer za približno 19 %.

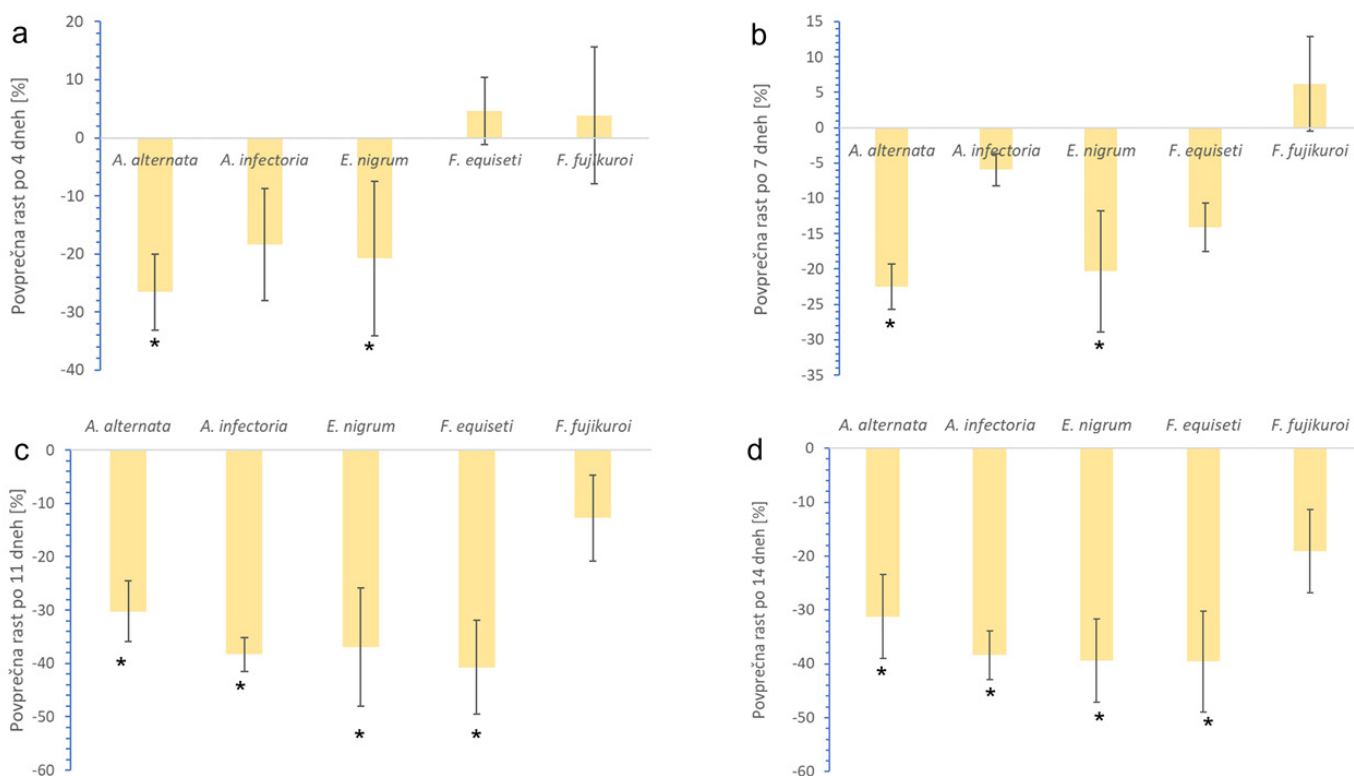
### Kalitveni poskus in dolžina kalic

Pri kalitvenem testu, kjer smo uporabili metodo s preraščanjem, po 4. dneh od postavitve poskusa na kaljivost zrnja ajde niso vplivale glive *A. alternata*, *A. infectoria*, *E. nigrum* in *F. equiseti*, medtem ko je inokulacija zrnja z glivo *T. purpureogenus* kaljivost zrn značilno znižala. Po 14. dneh je gliva *T. purpureogenus* znižala kaljivost zrn v primerjavi z ostalimi glivami, ki niso vplivale na kaljivost zrn (Slika 2).

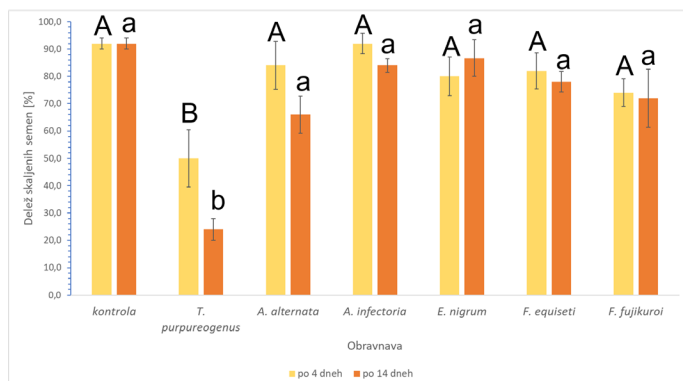
Pri kalitvenem testu, kjer smo uporabili metodo s stresanjem, so po 7. dneh od postavitve poskusa zrnja, inokulirana z glivo *F. fujikuroi*, kalila manj kot kontrolna zrna (Slika 3). Inokulacija z ostalimi glivami po 7. dneh ni imela značilnega vpliva. Po 14. dneh se je znižala kaljivost zrn, ki so bila inokulirana z glivami *F. fujikuroi* in *T. purpureogenus*. Podatki za glivi *A. infectoria* in *F. equiseti* niso prikazani, saj zaradi inokulacije rezultati niso bili zanesljivi.

Pri kalitvenem testu z metodo preraščanja je bila uspešnost infekcije večja pri glivah *A. infectoria*, *F. equiseti* in *E. nigrum*. Pri glivah *T. purpureogenus*, *A. alternata* in *F. fujikuroi* se uspešnost infekcije med metodama ni razlikovala.

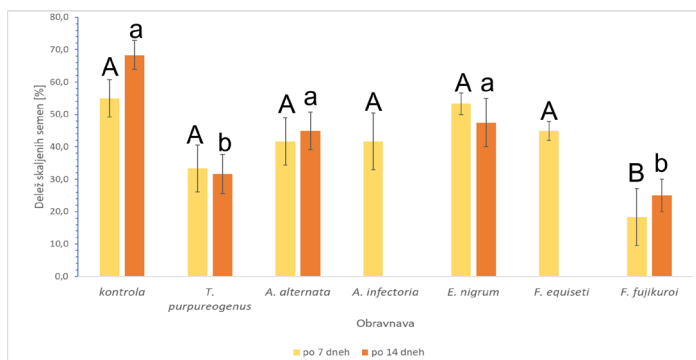
Za preverjanje vpliva inokulacije z glivami na dolžino kalic smo zaradi zadostnega števila vzkaljenih zrn za glive *F. equiseti*, *A. alternata*, *A. infectoria*, *E. nigrum* in *F. fujikuroi* uporabili podatke le iz kalitvenega testa z metodo preraščanja,



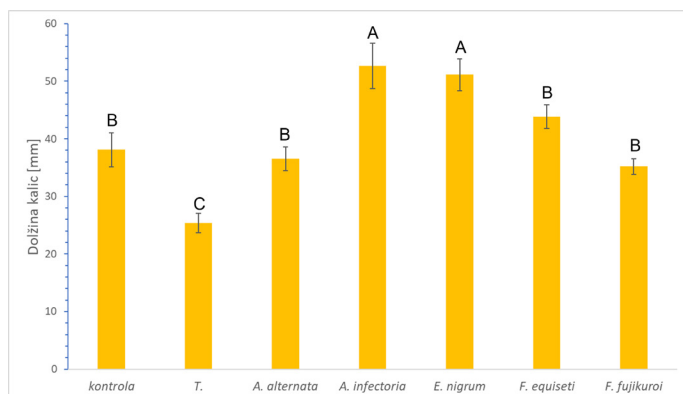
**Slika 1:** Relativna rast (merjeno preko površine kultur) gliv *A. alternata*, *A. infectoria*, *E. nigrum*, *F. equiseti* in *F. fujikuroi* s pripadajočimi standardnimi napakami (n=5) v deležih glede na kontrole posamezne glive po 4. (a), 7. (b), 11. (c) in 14. (d) dneh inkubacije z glivo *T. purpureogenus*. Z zvezdico (\*) so označene statistično značilne razlike v rasti med kontrolno skupino in glivo v antagonističnem testu (enosmerna ANOVA in Tukey post-hoc test pri p<0,05).



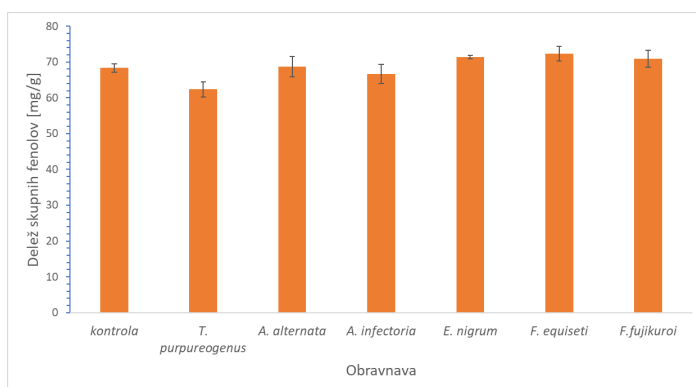
**Slika 2:** Delež skaljenih zrn navadne ajde pri kalitvenem testu z metodo preraščanja po 4. in 14. dnehi pri kontroli in inokulacijami z glivami *T. purpureogenus*, *A. alternata*, *A. infectoria*, *E. nigrum*, *F. equiseti* in *F. fujikuroi*. Prikazana so povprečja ± standardne napake. Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike na posamezen dan (enosmerna ANOVA in Tukey post-hoc test pri  $p < 0,05$ ).



**Slika 3:** Delež skaljenih zrn navadne ajde pri kalitvenem testu z metodo s stresanjem po 7. in 14. dnehi pri kontroli in inokulaciji z glivami *T. purpureogenus*, *A. alternata*, *A. infectoria*, *E. nigrum*, *F. equiseti* in *F. fujikuroi*. Prikazana so povprečja ± standardne napake. Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike na posamezen dan (enosmerna ANOVA in Tukey post-hoc test pri  $p < 0,05$ ).



**Slika 4:** Dolžina kalic navadne ajde po 14 dnehi pri kontroli in ob inokulacijami z glivami *T. purpureogenus*, *A. alternata*, *A. infectoria*, *E. nigrum*, *F. equiseti* in *F. fujikuroi*. Prikazana so povprečja ± standardne napake (kontrola  $n=35$ , *T. purpureogenus*  $n=25$ , *A. alternata*  $n=28$ , *A. infectoria*  $n=22$ , *E. nigrum*  $n=33$ , *F. equiseti*  $n=40$  in *F. fujikuroi*  $n=11$ ). Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA in Tukey post-hoc test pri  $p < 0,05$ ).



**Slika 5:** Delež skupnih fenolov v suhi snovi kalic pri kontroli in ob inokulaciji z glivami *T. purpureogenus*, *A. alternata*, *A. infectoria*, *E. nigrum*, *F. equiseti* in *F. fujikuroi*. Prikazana so povprečja ± standardne napake ( $n=3$ ).

pri kontroli pa smo morali zaradi kontaminacije uporabiti podatke le iz kalitvenega testa z metodo stresanja. Za glivo *T. purpureogenus* smo zaradi boljše reprezentativnosti uporabili združene podatke iz obeh metod. Na dolžino kalic v primerjavi s kontrolo niso imele vpliva glive *A. alternata*, *F. equiseti* in *F. fujikuroi*. Kalice, inokulirane z glivo *T. purpureogenus*, so bile značilno krajše od kontrolnih kalic; kalice, inokulirane z glivama *E. nigrum* in *A. infectoria*, pa celo daljše (Slika 4). Vpliv inokulacije z glivami na sekundarni metabolizem kalic Povprečne količine skupnih fenolov v kalicah so v poskusu gibale med 60 mg/g in 80 mg/g suhe mase. Inokulacija zrnja ajde z glivami med kalitvijo ni imela statistično značilnega vpliva na delež skupnih fenolov v suhi masi kalic pri nobeni od testiranih gliv (Slika 5).

## Diskusija

Rastlinski patogeni povzročajo velike izgube in škodo na pridelku, kar vodi do upada kakovosti in količine kmetijskih proizvodov. Med biokontrolna sredstva za obvladovanje

rastlinskih patogenov spadajo tudi antagonisti gliv, ki se pojavljajo kot obetavna alternativa sintetičnim pesticidom zaradi večje stopnje varnosti in minimalnih negativnih vplivov na okolje (Thambugala s sod., 2020).

Preiskovali smo vpliv antagonistične glivne vrste *T. purpureogenus* na rast izbranih glivnih vrst povzročiteljev bolezni in endofitov pri navadni ajdi (*F. esculentum*). Glive rodu *Talaromyces* proizvajajo več različnih bioaktivnih učinkovin in njihov potencial za biološko kontrolo je bil raziskan že pri večih vrstah (Kakvan s sod., 2013; Kazerooni s sod., 2019; Naraghi s sod., 2010).

Ugotovljeno je bilo, da lahko gliva *T. purpureogenus* inhibira rast glivnega patogena *Sclerotium rolfii* z izločanjem in difuzijo specifičnih sekundarnih metabolitov (Coulibaly s sod., 2022). Poleg tega v kokultivaciji inhibira rast in razvoj vrste *Fusarium oxysporum* s pomočjo izločanja encima, ki razgrajuje celično steno, ter z mehanizmom utišanja genov gostitelja za izgradnjo celične stene (Tian s sod., 2021).

Tudi rezultati naše raziskave so pokazali, da ima *T.*



*purpureogenus* antagonističen vpliv na testirane vrste gliv, saj je bila pri skoraj vseh zaznana zmanjšana rast. Po prvih 4. in 7. dneh kokultivacije je bila inhibirana rast opazna le pri *A. alternata* in *E. nigrum*, kar lahko kaže na potencialno večje antagonistično delovanje proti tema dvema vrstama. Učinek na preostali dve vrsti (*A. infectoria*, *F. equiseti*) se je namreč pokazal šele po daljšem času kokultivacije (11. in 14. dan). Pri glivi *F. fujikuroi* nismo zaznali antagonističnega učinka. Nadaljne študije bi bile potrebne za ugotavljanje mehanizmov s katerimi *T. purpureogenus* inhibira rast izbranih gliv, potrebne pa bi bile tudi raziskave za optimizacijo rastnih pogojev, s katerimi bi lahko dosegli potencialno večjo antagonistično aktivnost.

Različne glive, ki so prisotne na semenih rastlin lahko različno vplivajo tudi na njihovo kalitev in nadaljnji razvoj. Patogene glive v svojo okolico sproščajo mikotoksine, ki zavirajo kalitev rastlin in to predstavlja velik problem v kmetijstvu. V našem primeru, smo preučevali vpliv več patogenih in endofitskih gliv na kalitev semen ajde.

Rezultati, ki smo jih pridobili pri našem poskusu, so pokazali, da sta na kalitev semen ajde negativno vplivali le glivi *T. purpureogenus* in *F. fujikuroi*. Negativni vpliv inokulacije z glivo *T. purpureogenus* na kalitev ajdovih zrn se je izrazilo pokazal šele po 14. dneh.

Naši rezultati se večinoma ujemajo z literaturo. *A. alternata* je patogena gliva, ki okužuje zelo širok spekter rastlinskih vrst in povzroča zmanjšanje količine pridelka. Zanj je značilno, da izloča aflatoksin, tenuazonsko kislino, alternariol, altenuen in druge albertoksine. Vsi ti toksini vplivajo na znižanje amilazne aktivnosti, kar prepreči razgradnjo škroba in povzroči, da ima embrio na voljo premalo saharoze za svojo rast. Prav tako pa ga lahko mikotoksini poškodujejo in s tem znižajo viabilnost kalic (Hasan, 2001). Po literaturi naj bi *A. alternata* vplivala tudi na dolžino kalic (Kovačec s sod., 2016), vendar pri našem poskusu ni prišlo do tega vpliva.

Gliva *T. purpureogenus* je v literaturi opisana kot gliva, ki močno izboljšuje rast kalic. Poskus so izvedli na kumarah, ki so jih inokulirali z različnimi vrstami gliv. *T. purpureogenus* je izločala velike koncentracije sideroforov, indol očetne kisline, prav tako pa je olajšala privzem fosforja za rastlino. (Zhao s sod., 2021). Pri našem poskusu smo dobili rezultate, ki nasprotujejo tem iz literature. Ravno *T. purpureogenus* je izmed vseh gliv najbolj znižala kaljivost semen ajde, prav tako pa je imela negativen vpliv na dolžino kalic. Do razlike v rezultatih med študijo navedeno v članku in našim poskusom je morda prišlo zato, ker gre za različno rastlinsko vrsto. Pri študiji so pokazali pozitiven vpliv na rast kalic kumare, ne pa na rast kalic ajde. Morda je kompatibilnost med glivo *T. purpureogenus* in kalico kumare večja, kot pa med kalico ajde in omenjene glive.

Negativen vpliv na kalitev zrn ajde smo opazili tudi ob inokulaciji z glivo *F. fujikuroi*. Gre za filamentozno patogeno glivo, ki z izločanjem fumosizina, fusarične kisline, fusaproliferina in fusarina negativno vpliva na kalitev semen. Gliva prav tako z apresoriji in infekcijskimi hifami vstopi v seme in embrio intracelularno kolonizira. Vse to upočasnjuje rast in povzroča odmrtje kalic (Abedalred s sod., 2019).

Nasprotno pa je recimo na dolžino kalic je pozitivno vplivala gliva *E. nigrum*. V raziskavah so dokazali, da ta gliva izloča amilaze, pektinaze, celulaze in proteaze. Pri inokulaciji semen bombaža je povečala delež kalitve v primerjavi s kontrolo,

prav tako pa je povečala vigor kalic. Literatura navaja, da gre lahko za oportunističnega patogena, ki kaže znake fakultativne endosimbioze. To pomeni, da lahko v določenih primerih in okoliščinah preide v patogen cikel in povzroči propad rastlin (Ogórek s sod., 2020).

Rastline sintetizirajo velik nabor sekundarnih metabolitov, med drugim fenole. Ti so definirani s prisotnostjo vsaj enega fenilnega obroča v spojini in imajo različne vloge kot so: vloga pri rasti in razvoju (produkcija hormonov, pigmentacija), vloga pri razmnoževanju (pigmentacija, aroma in zaščita sadja), vloga pri obrambi pred stresorji (osmoregulacija, zaščita pred UV svetlobo, antimikrobno delovanje) (Wallis in Galarneau, 2020). Podatki o vsebnosti fenolov v suhi biomasi ajde se razlikujejo. Holasova s sod. (2002) poroča, da ajdina zrna vsebujejo 3303 mg skupnih fenolov/kg suhe mase, oluščena ajdina zrna 3903 mg/kg suhe mase in listi ajde 39514 mg/kg suhe mase, v isti raziskavi pa s statistično analizo povežejo tudi vsebnost polifenolov ter antioksidativno aktivnost vzorcev. Analiza vpliva luščenja zrn na vsebnost fenolov pri kalitvi ajdovih zrn poda podatke med 10,06 - 20,74 mg /g suhe mase za neoluščena zrna ajde in 7,98 - 29,50 mg/g suhe mase za oluščena zrna ajde, pri različnih časovnih meritvah pri kalitvi (Živković s sod., 2021). Rezultati našega poskusa kažejo, da prisotnost glive v primerjavi s kontrolo nima statistično značilnega vpliva na vsebnost fenolov v suhi biomasi, kar se ne ujema z nekaterimi dosedanjimi analizami. V meta-analizi trendov, ki sta jo izvedla Wallis in Galarneau (2020) je kolonizacija s koristnimi glivami spodbudila produkcijo fenolov, medtem ko inokulacija s patogenimi glivami produkcije fenolov ni spodbujala. Količina fenolov pri rastlinah inokuliranih s patogenimi glivami je verjetno povezana s polifenol oksidazno aktivnostjo, ki jo odražajo nekrotrofične glive (Kovačec s sod., 2016).

## Zaključek

S poskusom smo želeli ugotoviti kako gliva *T. purpureogenus* vpliva na patogene seve gliv in na kalitev, rast ter sekundarni metabolizem ajde, da bi lahko ocenili njen potencial kot biokontrolno sredstvo. Rezultati antagonističnih testov nakazujejo, da je gliva *T. purpureogenus* zavirala rast patogenih gliv, in sicer na začetku le rast gliv *A. alternata* in *E. nigrum*, po 14 dneh kultivacije pa rezultati nakazujejo, da je v primerjavi s kontrolo zavirala rast gliv *A. infectoria*, *F. equiseti*, *A. alternata* in *E. nigrum*. Vendar *T. purpureogenus* v našem poskusu ni vplivala pozitivno na kalitev ajde, temveč celo negativno, prav tako pa je negativno vplivala na dolžino kalic ajde. Tako naše prve hipoteze, da bo gliva iz rodu *Talaromyces* zavrla rast izbranih patogenih glivnih vrst in izboljšala kalitev in rast kalic ne moremo v celoti potrditi, saj kljub svoji antagonistični aktivnosti ni izboljšala kalitve in rasti ajde. Tudi druge hipoteze o negativnem vplivu izbranih patogenih glivnih vrst na kalitev in rast kalic ne moremo potrditi, saj večina izbranih patogenih gliv nima vpliva na kalitev (razen *F. fujikuroi* pri drugem kalitevnem testu). Glivi *F. equiseti* in *A. alternata* na rast kalic v primerjavi s kontrolo nimata statistično značilnega vpliva, medtem ko vrsti *E. nigrum* in *A. infectoria* celo pozitivno vplivata na rast kalic ajde. Rezultati našega poskusa kažejo, da inokulacija ajdovih zrn z glivami nima vpliva na vsebnost fenolov v suhi biomasi. Za boljšo oceno *T. purpureogenus* kot potencialni biokontrolni organizem so potrebne nadaljne raziskave.

## Literatura

1. Christensen CM, 1957. Deterioration of stored grains by fungi. The Botanical Review 23:108–134.
2. Coulibaly AE, Pakora GA, Ako AB, Amari GE, N'Guessan CA, Kouabenan A, Kone D, Djaman JA, 2022. Diversity of *Sclerotium rolfsii* antagonist fungi isolated from soils of the rhizosphere of tomato crops and identification of some antifungal compounds. Heliyon 8:2.
3. Estabraq M. A, Waref M. H. I, Rajaa G. A, Mytham A. J. A, 2019. First molecular identification of *Fusarium fujikuroi* causing pollen rot of palm trees (*Phoenix dactylifera* L.) in Iraq and evaluation efficacy of some nanoparticles against it. Earth and Environmental Science 388.
4. Hasan HA, 2001. Phytotoxicity of pathogenic fungi and their mycotoxins to cereal seedling viability. Acta Microbiol Immunol Hung 48:27-37.
5. Holasova M, Fiedlerova V, Smrcinova H, Orsak M, Lachman J, Vavreinova S, 2002. Buckwheat—the source of antioxidant activity in functional foods. Food Research International, 35:207–211.
6. Kakvan N, Heydari A, Zamanizadeh HR, Rezaee S, Naraghi L, 2013. Development of new bioformulations using *Trichoderma* and *Talaromyces* fungal antagonists for biological control of sugar beet damping-off disease. Crop Protection 53:80-84
7. Kazerooni EA, Rethinasamy V, Al-Sadi AM, 2019. *Talaromyces pinophilus* inhibits *Pythium* and *Rhizoctonia*-induced damping-off of cucumber. Journal of Plant Pathology 101:377-383.
8. Köhl J, Kolnaar R, Ravensberg WJ, 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. Frontiers in Plant Science 10: 845.
9. 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.
10. Kreft S, Janeš D, Kreft I, 2013. The content of fagopyrin and polyphenols in common and tartary buckwheat sprouts. Acta Pharmaceutica 63, 4: 553–560.
11. Li S, Zhang Q. H, 2001. Advances in the Development of Functional Foods from Buckwheat. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 41:451–464.
12. Naraghi L, Heydari A, Rezaee S, Razavi M, Jahanifar H, 2010. Study on antagonistic effects of *Talaromyces flavus* on *Verticillium albo-atrum*, the causal agent of potato wilt disease. Crop Protection 29:658-662.
13. Ogórek R, Przywara K, Piecuch A, Cal M, Lejman A, Matkowski K, 2020. Plant-Fungal Interactions: A Case Study of *Epicoccum nigrum* Link. Plants (Basel) 9:1691.
14. Pomeranz Y, Lorenz K, 1983. Buckwheat: Structure, composition, and utilization. C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition 19:213–258
15. Střelková T, Nemes B, Kovács A, Novotný D, Božik M, Klouček P, 2021. Inhibition of Fungal Strains Isolated from Cereal Grains via Vapor Phase of Essential Oils. Molecules (Basel, Switzerland) 26:1313.
16. Thambugala KM, Daranagama DA, Phillips AJL, Kannangara SD, Promputtha I, 2020. Fungi vs Fungi in biocontrol: An Overview of Fungal Antagonists Applied Against Fungal Plant Pathogens. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 10:604923. doi: 10.3389/fcimb.2020.604923: 19 str.
17. Tian Y, Zhao Y, Fu X, Yu C, Gao K, Liu H, 2021. Isolation and Identification of *Talaromyces* sp. Strain Q2 and its Biocontrol Mechanisms Involved in the Control of *Fusarium* Wilt. Frontiers in Microbiology 12:724842. doi: 10.3389/fmicb.2021.724842: 16 str.
18. Zhao L, Zhao W, Deng H, 2021. Effects of *Talaromyces purpureogenus* on Cucumber Growth Promotion and Its Mechanism, Journal of bacteriology and mycology 8:1173.
19. Živković A, Polak T, Cigić B, Požrl T, 2021. Germinated Buckwheat: Effects of Dehulling on Phenolics Profile and Antioxidant Activity of Buckwheat Seeds. Foods, 10: 740.
20. Wallis CM in Galarneau ER-A, 2020. Phenolic compound induction in plant-microbe and plant-insect interactions: a meta-analysis. Frontiers in Plant Science, 11:580753. doi: 10.3389/fpls.2020.580753: 13 str.
21. Wijngaard H. H, Arendt E. K 2006. Buckwheat. Cereal Chemistry Journal 83:391–401.

# Uporaba potencialno antagonistične glive *Trichoderma koningii* za zatiranje gliv, izoliranih iz zrnja navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*)

Žiga Javornik, Miona Kovachevikj, Ana Kukenberger, Maja Marinčič, Špela Rozman

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

- Namen raziskave je bil ugotoviti, kako antagonistična vrsta *Trichoderma koningii* (izolat P002) vpliva na rast patogenih in endofitskih gliv *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum* in *Epicoccum nigrum*, izoliranih iz zrnja navadne ajde. Preučevan je bil tudi vpliv posameznih gliv na kaljivost zrn ajde, rast kalic in količino prisotnih fenolov v kalicah.
- Antagonistične teste smo izvedli z opazovanjem rasti antagonistične glive *Trichoderma koningii* (P002) in ene izmed patogenih gliv na ploščah PDA. Za test vpliva okužbe zrn ajde z glivami smo na preraščeno gojišče z glivo inokulirali sterilizirana zrna ajde in opazovali kalitev ter rast kalic. Okuženim kalicam ajde smo določili koncentracijo skupnih fenolov, po Folin-Ciocalteu metodi.
- V antagonističnem poskusu je gliva *T. koningii* (P002) inhibirala rast vseh patogenih gliv. Antagonistična gliva *T. koningii* je hkrati tudi znižala kaljivost zrn ajde, medtem ko patogene glive niso imele negativnega vpliva na kalivost. Inokulacija zrnja z glivo *A. alternata* je statistično značilno povečala dolžino kalic ajde, inokulacija z glivo *F. graminearum* pa je povzročila hiter propad kalic po kalitvi. V koncentraciji fenolov med kontrolnimi in predhodno inokuliranimi kalicami s glivami ni bilo razlik.

**Ključne besede:** patogene glive, antagonizem, biokontrola, skupni fenoli, kalitveni testi

## Uvod

Ajda je dvokaličnica, ki jo uvrščamo med nepravna žita. Vsebuje visok delež škroba, vlaknin, mineralov, proteinov, bioaktivnih flavonoidov ter druge komponente. Ker ajda ne vsebuje glutena in ima odlične hranilne značilnosti se danes zelo pogosto uporablja v človeški prehrani (Villaluenga in sod., 2020). Po svetu večinoma gojimo tri različne vrste ajde *F. esculentum*, *F. tataricum* in *F. cymosum*, med katerimi je najpogosteje zastopana navadna ajda (*F. esculentum*). Raziskave na ajdi so prav tako pokazale, da naj bi ta imela potencialne koristi za naše zdravje, saj znižuje raven holesterola in glikemični indeks v krvnem serumu. Ajda prav tako vsebuje rutin, ki preprečuje vnetne procese in kožno karcinogenezo. Njene koristne lastnosti lahko v večji meri pripišemo prisotnosti šestih flavonoidov (rutin, kvercetin, orientin, homorientin, viteksin in izoviteksin), katerih koncentracija variira med vrstami ajde (Joshi in sod., 2019). Okužbe ajdovih zrn z mikroorganizmi, predvsem z glivami, ogrožajo samo varnost živila ter povzročajo veliko ekonomsko škodo v prehranski industriji. Okužbe z glivami se lahko pojavijo že na polju, med samo rastjo in razvojem rastline, ali pa med shranjevanjem. Najpogostejše glive, ki okužujejo rastline med rastjo pripadajo rodovom *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium* in *Rhizopus*. Glive rodov *Aspergillus* in *Penicillium* pa se najpogosteje pojavijo med samim skladiščenjem (Christensen, 1957). Najbolj problematično je, če se te glive nahajajo v tleh, saj lahko tako povzročijo gnitje zrn ali pa propad sadik (Kovačec in sod., 2016). Trenutno je poznanih več kot 36 različnih vrst gliv, katere kolonizirajo zrna ajde ter so sposobne producirati mikotoksine. Ti lahko sprožijo zastrupitev, v primeru kronične izpostavitve mikotoksinom pa so ti genotoksični in mutageni ter povzročajo nekatere vrste rakov (Logrieco in sod., 2009). Zaradi problematike z mikotoksini, je potrebno glivične okužbe ajdovih zrn preprečiti. Tradicionalni načini zaščite ajdovih zrn temeljijo na uporabi fungicidov ter ostalih ksenobiotikov (Mravlje in sod., 2021). Za zatiranje glivičnih okužb se najpogosteje uporablja fungicide, ki vsebujejo 1,2,4 - triazolni obroč, saj so ti zelo učinkoviti, se prenašajo sistemsko in imajo širok spekter delovanja. Ti fungicidi zaustavijo sintezo ergosterolov v glivah in tako poškodujejo celično membrano in njeno fluidnost. V raziskavi, ki so jo opravili Jiuyong Xu in sod. (2020) so ugotovili, da lahko ti fungicidi povečajo fiziološke motnje v človeških celicah, zato je dolgotrajna izpostavljenost tem fungicidom odsvetovana. V drugi raziskavi so prav tako ugotovili, da fungicid »Bromuconazole« povzroči poškodbe DNA in motnje v delovanju mitohondrijev (preko oksidativnega stresa), kar vodi v apoptozo človeških celic (Touati in sod., 2022). Zaradi nevarnosti teh fungicidov se danes raziskuje alternativne pristope za preprečevanje glivičnih okužb, ki bi bili okolju prijazni in ekonomsko učinkoviti. Na ta način bi zmanjšali porabo fungicidov ter njihovo potencialno nevarnost za zdravje ljudi in okolja (Mravlje in sod., 2021). Alternativen način zatiranja patogenih glivnih okužb je z uporabo antagonističnih gliv. Eno od uspešnih antagonističnih skupin gliv predstavljajo vrste iz rodu *Trichoderma*, ki jih najdemo tako v tleh zmernege kot tropskega podnebja. Za ta rod gliv je tudi značilno, da kolonizira različna rastlinska tkiva, ima zelo hiter reprodukcijski čas, učinkovit privzem hranil, lahko modificira rizosfero, inducira rast ter imunsko zaščito rastline in ima antagonistični vpliv na patogene glive (Adnan in sod., 2019).

Zaradi že poznanih antagonističnih vplivov gliv iz rodu *Trichoderma* smo v naši raziskavi preučevali kako vrsta *Trichoderma koningii* (izolat P002) vpliva na rast patogenih in endofitskih gliv izoliranih iz zrnja ajde. To smo izvedli z antagonističnimi testi, kjer smo na agarne plošče nacepili skupaj antagonistično in patogeno oziroma endofitsko glivo. Za te glive smo v našem primeru izbrali *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum* in *Epicoccum nigrum*. Poleg antagonističnih testov smo opravili tudi preizkus vpliva določene glive na kaljivost ajdovih zrn in na vsebnost skupnih fenolov v kalicah ajde.

H1: Antagonistična gliva *Trichoderma koningii* (izolat P002), bo zavirala rast vseh izbranih patogenih gliv v poskusu.

H2: Antagonistična gliva *Trichoderma koningii* (izolat P002) bo spodbudila kaljivost ajdovih zrn, medtem ko bodo patogene glive zavirale kaljenje.

H3: Vsebnost skupnih fenolov v kalicah se bo povečala ob prisotnosti glive v primerjavi s kontrolo.

## Materiali in metode

Poskus je bil izveden v časovnem obdobju sedmih tednov. V tem času smo opravili antagonistične teste neposrednih interakcij, vpliv okužbe z glivami na kalitev zrn navadne ajde in vpliv okužbe z glivami na sekundarni metabolizem kalic ajde.

### Rastlinski material

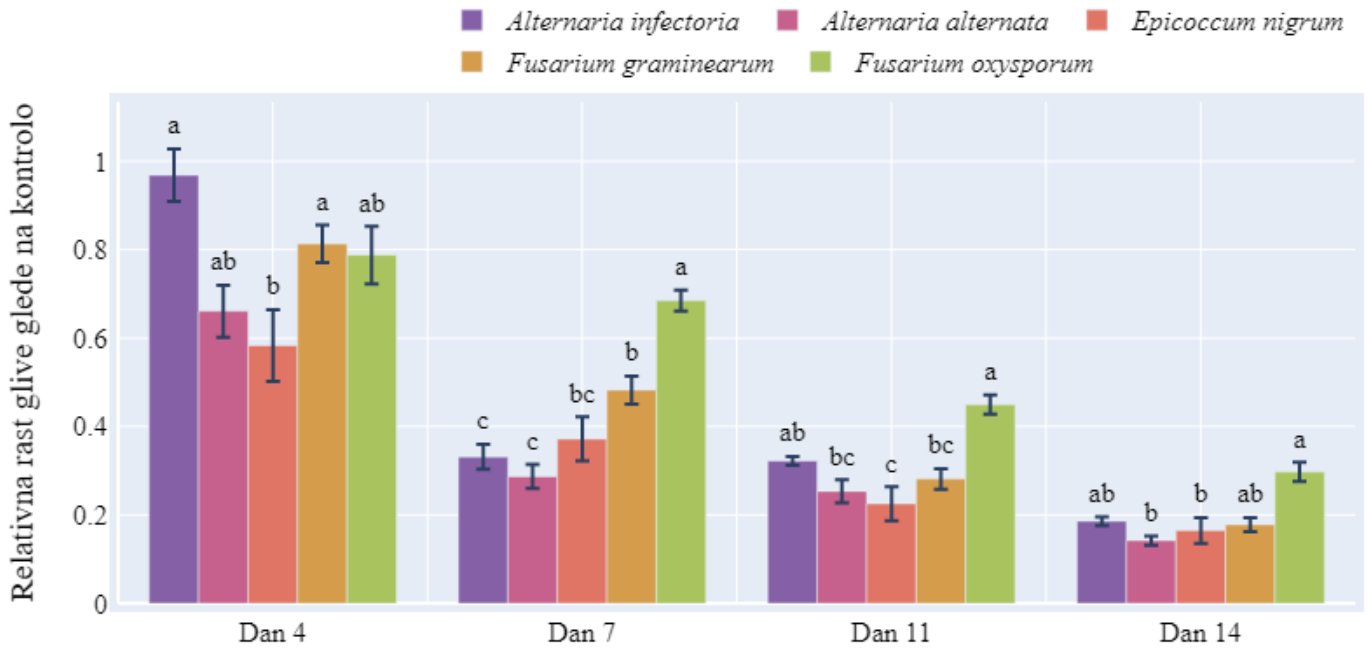
Zrna navadne ajde so bila pridobljena iz Mlina Rangus, Šentjernej, Slovenija.

### Glive

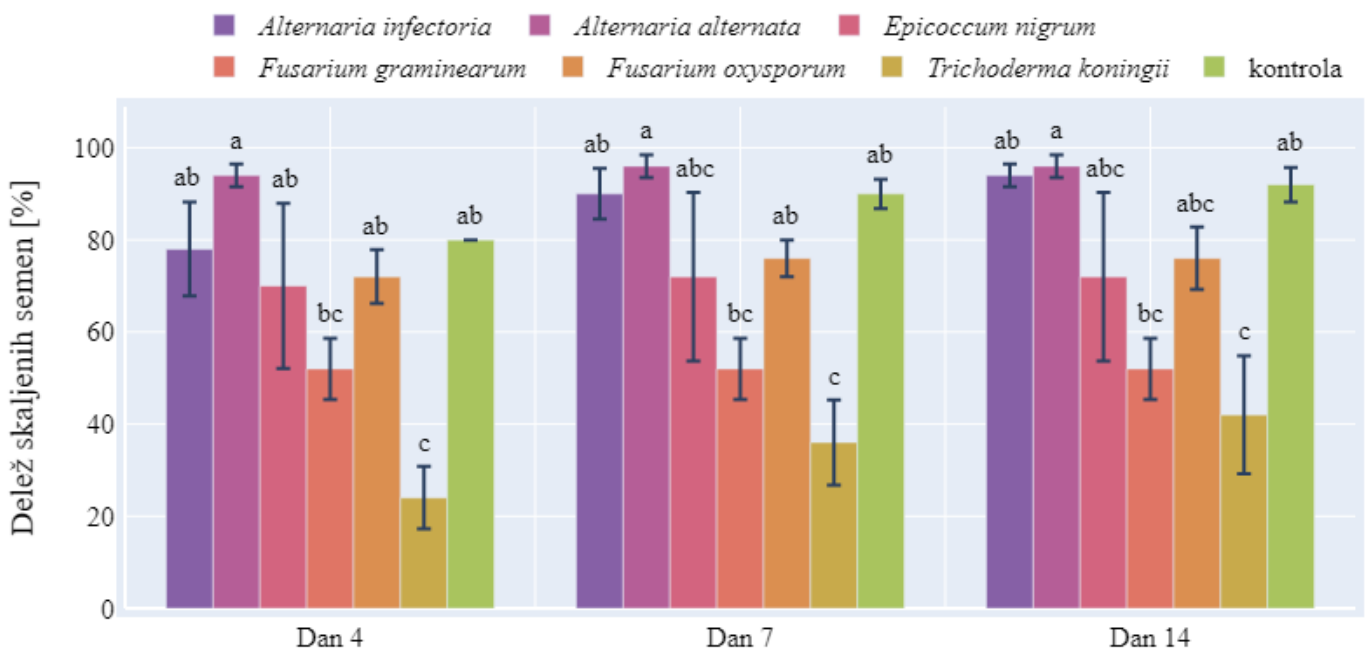
V poskusih je bila uporabljena antagonistična gliva *Trichoderma koningii* (izolat P002) in patogene oziroma endofitske glive *Alternaria alternata*, *A. infectoria*, *Fusarium graminearum*, *F. oxysporum* ter *Epicoccum nigrum*. Vse uporabljene glive so bile pridobljene iz glivne banke Skupine za fiziologijo rastlin, na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete. Pred uporabo v poskusih so bile vzgojene v svežih enotedenskih kulturah na krompirjevih dekstroznih agarških (PDA) ploščah v temi pri 22°C in 60% vlažnosti.

### Antagonistični testi

Za vsak antagonistični test smo iz gojišč PDA, kjer so rasle čiste kulture gliv, izrezali dva koščka glive v velikosti 5 x 5 mm. Prvi izseček je bil antagonistične glive *Trichoderma koningii* (P002) in drugi ene izmed patogenih gliv *Alternaria alternata*, *A. infectoria*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* ali *Epicoccum nigrum*. Izsečka smo postavili na ploščo s svežim gojiščem PDA na medsebojni razdalji 5 cm. Za kontrole smo samostojno inokulirali posamezne izsečke istih gliv. Za vsak test smo naredili po 5 ponovitev. Plošče so bile inkubirane v rastni komori pri temperaturi 22 °C in 60% vlažnosti, v temi. 4., 7., 11. in 14. dan po vzpostavitvi poskusov smo izmerili polmer glivne rasti od sredine izsečka do roba rasti glive na gojišču v smeri proti nasproti ležečem izsečku druge glive. Izmerjene vrednosti smo normalizirali glede na povprečne izmerjene vrednosti kontrol vsake glive.



**Slika 1:** Graf relativne rasti gliv, ki so rastle na gojišču skupaj z glivo *Trichoderma koningii* v primerjavi z glivami, ki so na gojišču rastle same. Prikazane so povprečne vrednosti ( $n=5$ ) +/- standardne napake (SE). Različne črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike med posameznimi glivami na določen dan opazovanja (enosmerna ANOVA, Tukeyev post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



**Slika 2:** Graf povprečja kalitev zrn navadne ajde, ki so bila okužena s posameznimi glivami pri posameznih dneh opazovanja po izvedbi kalitvenega testa (4., 7. in 14. dan). Kontrola so zrna navadne ajde, ki niso bila okužena z nobeno glivo. Prikazane so povprečne vrednosti ( $n = 5$ ) +/- standardne napake (SE). Različne črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike med posameznimi glivami na določen dan opazovanja (enosmerna ANOVA, Tukeyev post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

### Vpliv okužbe zrn navadne ajde z glivami na kalitev

Opazovali smo tudi vpliv okužbe zrn ajde z različnimi glivami na delež skaljenih zrn, rast in razvoj korenin ter poganjka. Za test smo vzeli preraščen izseček agarja z našo glivo in ga postavili na sredino nove plošče PDA in jih inkubirali sedem dni v rastni komori pri temperaturi 22 °C in 60% vlažnosti, v temi. Zrna ajde smo površinsko sterilizirali v 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> za 20 minut in nato sprali z avtoklavirano vodo. Po enem tednu smo na rob micelija enakomerno v krogu postavili po 10 zrn. Za vsako

glivo smo naredili po pet ponovitev. Za kontrolo smo na ploščo PDA v krogu postavili samo zrna, brez izsečka glive. Vse plošče smo inkubirali v temi pri temperaturi 22 °C in 60% vlažnosti. Po 4. in 7. dneh smo opazovali kalitev zrn. Za vzkaljena zrna smo šteli tista, pri katerih je vidno vzkllila radikula. Po 14. dneh smo prešteli zrna, ki so kalila in preživel. Preživelim kalice smo izmerili dolžine in jih strli s tekočim dušikom ter shranili za analize fenolov.

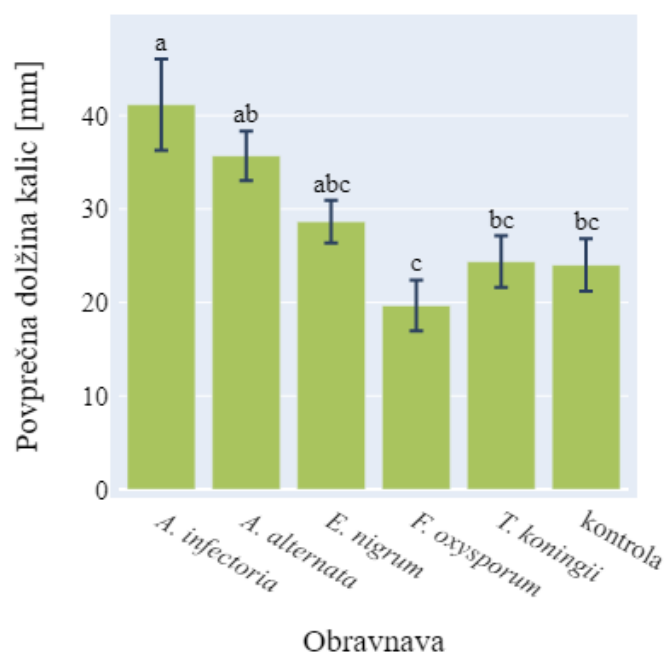
## Vpliv okužbe zrn z glivami na sekundarni metabolizem kalic

Okuženim kalicam ajde smo določili koncentracijo sekundarnih metabolitov - skupnih fenolov, po Folin-Ciocalteau metodi (Kreft in sod., 2013). Najprej smo pridobili ekstrakt kalic tako, da smo k strtim kalicam dodali 10 ml 60 % etanola in stresali na stresalniku čez noč. Ekstrakt smo centrifugirali pri 2000 g 10 minut in odvzeli supernatant, ki je predstavljal naš ekstrakt. K 100  $\mu\text{L}$  ekstrakta smo dodali 750  $\mu\text{L}$  destilirane vode in 50  $\mu\text{L}$  Folin-Ciocalteau reagenta ter po treh minutah še 100  $\mu\text{L}$  20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Za slepi vzorec smo namesto Folin-Ciocalteau reagenta dodali destilirano vodo. Sledila je enourna inkubacija vzorcev v temi. Nato smo izmerili absorbanco pri 750 nm. Kot standard smo uporabili koncentracijsko vrsto katehola.

## Rezultati

### Interakcije gliv z glivo *Trichoderma koningii*

Glive, ki so rastle v interakciji z glivo *Trichoderma koningii* so prerastle manjšo površino petrijevke, kot tiste, ki so v petrijevki rastle same (Slika 1). Na 4. dan po inokulaciji gliv na plošče, lahko opazimo, da je imela gliva *Epicoccum nigrum* v primerjavi s svojo kontrolo, ki ni rastle v interakciji statistično značilno najnižjo površino. Najmanj pa je gliva *T. koningii* vplivala na rast glive *A. infectoria*, ki se na 4. dan ni razlikovala od svoje kontrole. Po enotedenski inkubaciji gliv na ploščah lahko opazimo, da sta imeli glivi *A. infectoria* in *A. alternaria* statistično značilno najmanjšo površino v primerjavi s svojima kontrolama, *F. oxysporum* pa je imela v primerjavi s svojo kontrolo najvišjo relativno površino. Na 11. in 14. dan opazovanja je imela gliva *F. oxysporum* še vedno statistično



**Slika 3:** Dolžine poganjkov pri kontroli in tretmajih, ki so bila okužena s pozamezno glivo (prikazane so povprečne vrednosti +/- standardne napake). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike med posameznimi obravnavami (enosmerna ANOVA, Duncanov post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

značilno največjo relativno površino, izraženo glede na svojo kontrolo, v primerjavi ostalimi testiranimi glivami. Tekom vseh dni lahko opazimo trend padanja relativne rasti vseh gliv v primerjavi z njihovimi kontrolami.

### Vpliv okužbe zrn z glivami na njihovo kalitev

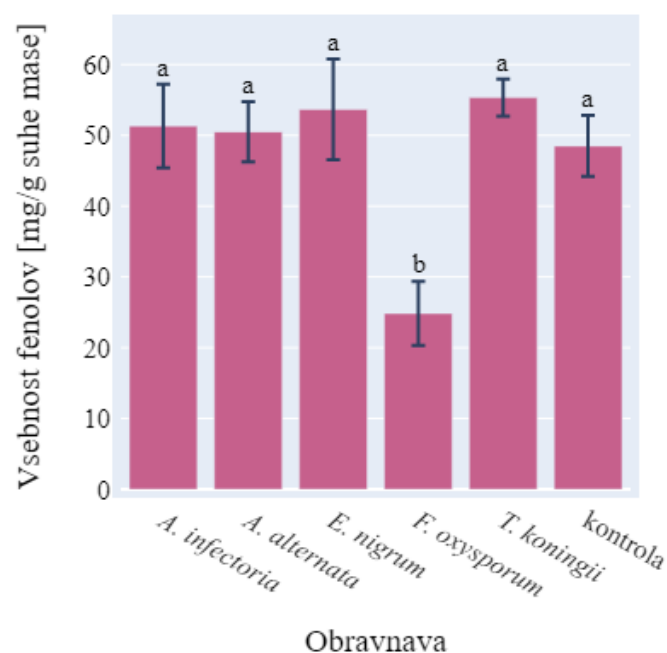
Okužba zrn z različnimi glivami kaže statistično značilne razlike v kaljivosti v primerjavi s kontrolo le v primeru okužbe zrn z glivo *Trichoderma koningii* (Slika 2). Tako na 4., 7. in 14. dan opazovanja po okužbi lahko opazimo statistično značilno manjši delež zrn, ki so kalila. Okužba z glivo *T. koningii* je zavrla kalitev za skoraj 50 % v primerjavi s kontrolo.

### Vpliv okužbe zrn z glivami na rast kalic

Kalicam, katerih semena smo okužili s posameznimi glivami, smo 14 dni po inokulaciji izmerili dolžine. Povprečna dolžina poganjkov je bila v primerjavi s kontrolo statistično značilno višja le pri glivi *A. infectoria* (Slika 3). Semena okužena s *F. graminearum* so sicer kalila, vendar so 4. dan po kalitvi že vsa odmrla zato dolžine kalic ni bilo mogoče izmeriti. Število kalic v posameznem tretmaju se je razlikovalo zaradi njihove različne preživelosti po okužbi z glivami (Tabela 1).

**Tabela 1:** Število preživelih kalic in njihove dolžine (prikazane so povprečne vrednosti +/- standardne napake) pri kontroli in tretmajih, ki so bili okuženi z različnimi glivami. Za posamezno obravnavo smo uporabili 50 semen.

Obravnavava	Število	Povprečna dolžina [mm] $\pm$ SE
<i>A. infectoria</i>	23	41,2 $\pm$ 4,9
<i>A. alternaria</i>	43	35,7 $\pm$ 2,7



**Slika 4:** Vsebnost fenolov na gram suhe mase pri kontroli in kalicah, ki so bile okužene s posameznimi glivami (prikazane so povprečne vrednosti (N=3) +/- standardne napake). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike med posameznimi obravnavami (enosmerna ANOVA, Fisherjev post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

<i>E. nigrum</i>	29	28,7 ± 2,3
<i>F. oxysporum</i>	3	19,7 ± 2,7
<i>T. koningii</i>	11	24,4 ± 2,8
kontrola	23	24,0 ± 2,8

## Koncentracije fenolov

Vsebnost fenolov na gram suhe mase je bila statistično značilno manjša pri kalicah katerih zrna so bila okužena z glivo *F. oxysporum*. Pri ostalih obravnavah ni bilo statistično značilnih razlik med skupinami (Slika 4).

## Diskusija

Interakcije patogenih gliv z glivo *Trichoderma koningii*  
Glive rodu *Trichoderma* so hitro rastoče glive, ki proizvajajo veliko spor in so producenti encimov za razgradnjo celične stene in pomembnih antibiotikov (Vinale in sod., 2008). Zaradi teh lastnosti so ene izmed najbolj raziskovanih gliv za potrebe biokontrolne patogenov (Harman, 2000). Mehanizmi, ki jih *Trichoderma* uporablja za svoje antagonistično delovanje so: produkcija različnih protiglivnih sekundarnih metabolitov in antibiotikov, kompeticija za prostor in hranila, mikoparazitizem, promoviranje rasti rastline in indukcija rastlinskega obrambnega sistema (Howell, 2003). V našem poskusu je gliva *Trichoderma koningii* (P002) uspešno inhibirala rast patogenih gliv *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium oxysporum*, *Epicoccum nigrum* in *Fusarium graminearum*. Po 7 dneh je *T. koningii* statistično značilno najmanj inhibirala *F. oxysporum*. Po 14 dneh je bila rast *A. alternata* (14±1%) in *E. nigrum* (16±3%) statistično značilno bolj inhibirana kot rast *F. oxysporum* (30±2%). *T. koningii* je bila v direktnem kontaktu z vsemi testiranimi glivami, med *T. koningii* in ostalimi glivami nismo opazili cone inhibicije. Tkalenko in sod. (2020) so ugotovili, da ima *T. koningii* antagonistično aktivnost proti *Alternaria cucumerina*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum phomoides*, *Cladosporium fulvum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Penicillium* sp. in *Trichothecium roseum*. Vendar pa so imeli drugi sevi iz rodu *Trichoderma* večjo antagonistično aktivnost (Tkalenko in sod., 2020), zato predvidevamo, da je v literaturi manj študij, ki uporabljajo sev *T. koningii*. Vrsti *T. asperellum* in *T. longibrachiatum* uspešno zavira rast glive *F. oxysporum*, prav tako pa zavirata rast *F. graminearum*, vendar je inhibicija njene rasti manjša kot inhibicija rasti *F. oxysporum* (Tamandegani in sod., 2020). Po 7. dneh kokultivacije je sev *T. harzianum* uspešno inhibiral rast micelija gliv *A. alternata* in *F. oxysporum* (Güçlü in Özer, 2022). Ghosh in sodelavci (2022) so v raziskavah in vitro in in vivo dokazali, da seva *T. harzianum* in *T. asperellum* uspešno inhibirata rast glive *A. alternata*, v in vitro testih sta oba seva rodu *Trichoderma* inhibirala rast micelija patogena, v in vivo študiji pa sta uspešno zmanjšala odstotek pojavnosti bolezni. V drugi študiji so ugotovili, da inkubacija glive *A. alternata* z ekstraktom glive *T. harzianum* zmanjša suho biomaso *A. alternata* za 55 do 85% (Shafique in sod., 2019). V literaturi nismo našli podatkov o antagonističnem delovanju gliv rodu *Trichoderma* proti glivama *Alternaria infectoria* in *Epicoccum nigrum*. Iz naših rezultatov lahko sklepamo, da *T. koningii* deluje antagonistično proti vsem testiranim glivam *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium oxysporum*,

*Epicoccum nigrum* in *Fusarium graminearum*, kar potrjuje našo prvo hipotezo.

## Vpliv na kalitev, rast in koncentracije fenolov

*T. koningii* je sicer uspešno inhibirala rast micelija izbranih gliv, vendar pa je tudi statistično značilno znižala kaljivost ajdovih zrn v primerjavi s kontrolo. Filtrat glive *T. koningii* je imel podoben učinek tudi na semena čebule, radiča in solate (Celar in Valic, 2005). V nasprotju z našo raziskavo, pa so v študiji, ki so jo naredili Delgado-Sánchez in sodelavci (2013), dokazali, da je okužba z glivo *T. koningii* povišala kaljivost semen dveh vrst kaktusov in sicer *Opuntia leucotricha* in *O. streptacantha*. Negativni učinki *T. koningii* na kaljivost so bili predhodno že poročani kot posledica uporabe prevelike količine inokuluma glive, saj je ta znižala kaljivost semen sladkorne pese (Celar in Valic, 2005). Gliva *T. koningii* namreč proizvaja sekundarni metabolit koninginin-A, ki deluje kot toksin in zavira rast koleoptil pšenice (Cutler in sod., 1989). Enako kot *T. koningii* tudi glive rodu *Alternaria* proizvajajo toksine, ki zavirajo kalitev semen korenja (Tylkowska in sod., 2003). Naši rezultati kažejo, da okužba semen navadne ajde z glivo *Alternaria alternata* ne vpliva na kalitev, podobno so tudi Rude in sodelavci (1999) dokazali, da *A. alternata* nima vpliva na kaljivost semen oljne ogrščice (*Brassica rapa*). Okužba semen bazilike s patogeno glivo *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici* je znižala kaljivost semen, vendar pa je predhodno tretiranje semen z antagonistični sevi *F. oxysporum* znižalo učinek patogenega seva (Lopez-Reyes in sod., 2016), torej je očitno efekt glive *F. oxysporum* na kalitev odvisen ne le od rastlinske vrste, ampak tudi od posameznih sevov iste glivne vrste. Vrsta *Fusarium graminearum* v našem primeru sicer ni znižala kaljivost semen ajde, vendar pa v literaturi poročajo, da statistično značilno zniža kaljivost semen pšenice (Gilbert in sod., 2005). Kljub temu, da *F. graminearum* sicer ni značilno vplivala na začetno kaljivost zrnja v primerjavi s kontrolo (saj je skalilo 52±7% vseh zrn ajde), je bil njen vpliv na kalice očitno zelo negativen, saj so vse kalice odmrle v zgodnji fazi razvoja. V naši raziskavi glive *A. alternata*, *A. infectoria*, *E. nigrum*, *F. oxysporum* in *F. graminearum* niso vplivale na začetno kaljivost zrnja navadne ajde v primerjavi s kontrolo, *T. koningii* pa je znižala kaljivost zrnja, s čimer zavračamo našo drugo hipotezo, da bo *T. koningii* povišala kaljivost zrnja, ostale izbrane glive pa jo bodo znižale. Glive iz rodu *Trichoderma* spadajo pod endofitske glive (Baron in Rigobelo, 2022). Okužba rastline z endofitskimi glivami lahko direktno spodbuja rast s povečanjem prevzema hranil in produkcijo fitohormonov, ali pa indirektno s povišanjem tolerance na biotski in abiotski stres (Baron in Rigobelo, 2022). Sev *Trichoderma* 2413 lahko denimo pospeši rast paradiznika, bombaža in tobaka (Adnan in sod., 2019). Pričakovali smo, da bo antagonistična gliva imela pozitiven vpliv na rast navadne ajde, vendar ni imela vpliva, saj nismo opazili nobenih statistično značilnih razlik med kontrolo in kalicami, okuženimi s *T. koningii*. Kalice okužene z glivo *A. infectoria* so bile statistično značilno daljše kot kontrolne. Glive iz rodu *Alternaria* tudi spadajo pod endofitske glive, kar je lahko razlaga za pozitivni vpliv na rast kalic (Baron in Rigobelo, 2022). Manjkajo nam podatki o vplivu glive *F. graminearum* na rast ajde, saj v našem poskusu nobena kalica okužena z ni preživela. Iz literature smo prav tako dobili podatke, da gliva *F. graminearum* znatno inhibira rast kalic navadne ajde (Andrejč in sod., 2022), kar je v skladu z našimi rezultati. Pomembno

je omeniti, da rezultati glede rasti kalic v naši raziskavi niso najbolj primerljivi med seboj zaradi velike razlike v numerusu, saj je bilo število preživelih kalic zelo različno. Pri okužbi z *A. alternata* smo denimo izmerili dolžine 43 kalic, pri *F. oxysporum* pa samo 3 kalice.

V stresnih pogojih rastline producirajo veliko število različnih spojin med katere sodijo tudi fenoli (Wallis in Galarneau, 2020). Fenoli so heterogena skupina rastlinskih sekundarnih metabolitov, ki imajo vlogo pri rasti in razvoju rastline, reprodukciji in obrambi v stresnih pogojih, saj nevtralizirajo proste radikale (Wallis in Galarneau, 2020; Aybeke, 2017). De novo produkcija fenolov je eden od načinov obrambe rastline proti okužbam z insekti, patogenimi bakterijami ali patogenimi glivami (Wallis in Galarneau, 2020). Okužba rastline s patogeno glivo povzroča akumulacijo fenolov na mestu okužbe in s tem znatno povišanje koncentracije celokupnih fenolov (Rajjswari, 2014). Zaradi teh razlogov smo pričakovali da se bo vsebnost skupnih fenolov v kalicah povečala ob prisotnosti glive v primerjavi s kontrolo. Hipotezo smo zavrnil, saj nismo opazili razlike v koncentraciji fenolov med kontrolnimi kalicami in tistimi, katerih zrna so bila predhodno okuženima z glivami *A. alternata*, *A. infectoria*, *E. nigrum* in *T. koningii*. Za kalice okužene z glivo *F. graminearum* nimamo podatkov o koncentraciji fenolov, saj nobena kalica ni preživela. Wallis in Galarneau (2020) so opazili, da kolonizacija rastlin z endofitskimi glivami poveča sintezo fenolov v primerjavi s kontrolo, medtem ko okužba s patogenimi glivami ne povzroča povečanja koncentracije fenolov. Nasprotno od naših pričakovanj pa so rastline okužene s *F. oxysporum* imele statistično značilno nižjo koncentracijo fenolov kot pa kontrola. Podobnih ugotovitev v literaturi nismo opazili, saj v večini virov opažajo višje vsebnosti fenolov v rastlinah, okuženih s *Fusarium oxysporum* - pri rastlinah paradižnika, okuženih s *F. oxysporum* in treniranih s salicilno kislino ali pa *Trichoderma harzianum* pride do kopičenja fenolov (Ojha in Chatterjee, 2012). Po drugi strani pa patogene glive uporabljajo več mehanizmov za premagovanje rastlinskega obrambnega sistema, eden izmed njih je tudi zmanjševanje produkcije fenolov v rastlini (Shalaby in Horwitz, 2015). Nižjo koncentracijo fenolov v rastlinah okuženih s *F. oxysporum* v primerjavi z kontrolo v naši raziskavi, bi lahko pripisali tem mehanizmom.

## Zaključki

Tekom našega poskusa smo ugotovili, da gliva *T. koningii* (izolat P002) uspešno inhibira rast gliv. S tem smo potrdili našo prvo hipotezo, da bo gliva *T. koningii* delovala antagonistično proti vsem izbranim glivam. V drugem delu našega poskusa pa smo raziskovali vpliv patogenih in antagonističnih gliv na kaljivost zrnja ajde. Menili smo, da bo antagonistična gliva *T. koningii* spodbudila kaljivost ajdovih zrn, patogene glive pa bodo zavirale kaljivost. Te hipoteze ne moremo potrditi, saj je gliva *T. koningii* znižala kaljivost ajdovih zrn, prav tako nismo zaznali negativnega vpliva patogenih gliv na kaljivost ajdovih zrn. Na podlagi meritev dolžin kalic smo ugotovili, da gliva *A. infectoria* statistično značilno poveča dolžino ajdovih kalic, medtem ko gliva *F. graminearum* povzroči popoln propad kalic adje kmalu po kalitvi.

Na koncu poskusa smo določili še koncentracijo fenolov v ajdovih kalicah. Predpostavljali smo, da se bo koncentracija fenolov ob prisotnosti gliv v kalicah povečala. Tudi to hipotezo

smo ovrgli, saj v večini primerov nismo zaznali razlik v koncentracijah fenolov med kontrolnimi ter testnimi kalicami, predhodno okuženimi z glivami. V primeru okužbe z glivo *F. oxysporum* smo opazili celo nižjo koncentracijo fenolov v primerjavi s kontrolo.

Naša raziskava je doprinesla k razumevanju, kako antagonistična gliva *T. koningii* vpliva na izbrane patogene in endofitske glive uporabljene v raziskavi. To razumevanje lahko sedaj nadgradimo z nadaljnjimi raziskavami, da bi v prihodnosti lahko zatirali specifične patogene glive z glivo *T. koningii*. Ugotovili smo tudi kako različne glive vplivajo na kaljivost ajdovih zrn in rast kalic. Ta del raziskave bi lahko izboljšali tako, da bi uporabili nižje količine inokuluma gliv. Lahko bi uporabili tudi druge vrste iz rodu *Trichoderma*, ki bi imeli manj intenzivno rast oziroma manj negativen učinek na kalice.

## Literatura

- Adnan M, Islam W, Shabbir A, Khan KA, Ghramh HA, Huang Z, Chen HYH, Lu GD, 2019. Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus. *Microbial Pathogenesis* 29:7-18.
- Andrej K, Bukovič V, Jelenič A, Novljan J, 2022. Medsebojne interakcije glivnih endofitov in njihov vpliv na kalitev semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*). *Collectanea Studentium Physiologiae Plantarum* 13,1:4-9.
- Aybeke M, 2017. *Fusarium* infection causes phenolic accumulations and hormonal disorders in *Orobanche* spp. *Indian Journal of Microbiology* 57, 4:416-421.
- Baron CM, Rigobelo CE, 2022. Endophytic fungi: a tool for plant growth promotion and sustainable agriculture. *Mycology* 13, 1:39-55.
- Celar F, Valic N, 2005. Effects of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium roseum* culture filtrates on seed germination of vegetables and maize. *Journal of Plant Diseases and Protection* 112, 4:343-350.
- Christensen CM, 1957. Deterioration of stored grains by fungi. *The Botanical Review* 23, 2:108-134.
- Cutler HG, Himmelsbach DS, Arrendale RF, Cole PD, Cox RH, 1989. Koningin a: A novel plant growth regulator from *Trichoderma koningii*. *Agricultural and Biological Chemistry* 53, 10:2605-2611.
- Delgado-Sánchez P, Jiménez-Bremont JF, Guerrero-González M de la L, Flores J, 2013. Effect of fungi and light on seed germination of three *Opuntia* species from semiarid lands of central Mexico. *Journal of Plant Research* 126, 5:643-649.
- Ghosh SK, Pal S, Banerjee S, 2022. Identification and pathogenicity of *Alternaria alternata* causing leaf blight of *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. and its biocontrol by *Trichoderma* species in agrifields an ecofriendly approach. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 31, 100406, doi:10.1016/j.jarmap.2022.100406.
- Gilbert J, Woods SM, Turkington TK, Tekauz A, 2005. Effect of heat treatment to control *Fusarium graminearum* in wheat seed. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27, 3:448-452.
- Güçlü T, Özer N, 2022. *Trichoderma harzianum* antagonistic activity and competition for seed colonization against seedborne pathogenic fungi of sunflower. *Letters in Applied Microbiology* 74, 6:1027-1035.
- Harman GE, 2000. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84, 4:377-393.
- Howell CR, 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases - the history and evolution of current concept. *Plant Disease* 87, 1:377-393.
- Joshi DC, Chaudhar GV, Sood S, Kant L, Pattanayak A, Zhang K, Fan Y, Janovska D, Meglič V, Zhou M, 2019. Revisiting the versatile buckwheat - reinvigorating genetic gains. *Planta* 250:783-801.
- 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.
16. Kreft S, Janež D, Kreft I, 2013. The content of fagopyrin and polyphenols in common and tatar buckwheat sprouts. *Acta Pharmaceutica* 63, 4:533-560.
17. Logrieco A, Moretti A, Solfrizzo M, 2009. *Alternaria* toxins and plant diseases: an overview of origin, occurrence and risks. *World Mycotoxin Journal* 2, 2:129-140.
18. Lopez-Reyes JG, Gilardi G, Garibaldi A, Gullino ML, 2016. In vivo evaluation of essential oils and biocontrol agents combined with heat treatments on basil cv Genovese Gigante seeds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *basilici*. *Phytoparasitica* 44, 1:35-45.
19. 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, 5:851 doi:10.3390/plants10050851.
20. Ojha S in Chatterjee CN, 2012. Induction of resistance in tomato plants against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* mediated through salicylic acid and *Trichoderma harzianum*. *Journal of plant protection research* 52, 2:220-225.
21. Rajeswari P, 2014. Role of phenols and antioxidant enzymes in biocontrol of *Fusarium oxysporum* causing fusarium wilt of *Arachis Hypogaea*. L (Groundnut). *International Journal of Agriculture Science and Research* 4, 6:95-104.
22. Rude SV, Duczek LJ, Seidle E, 1999. The effect of *Alternaria brassicae*, *Alternaria raphani* and *Alternaria alternata* on seed germination of Brassica rapa canola. *Seed Science and Technology* 27, 2:795-798.
23. Shafique S, Shafique S, Javed A, Akhtar N, Bibi S, 2019. Analysis of antagonistic potential of secondary metabolites and organic fractions of *Trichoderma* species against *Alternaria alternata*. *Biocontrol Science* 24, 2:81-88.
24. Shalaby S, Horwitz AB, 2014. Plant phenolic compounds and oxidative stress: integrated signals in fungal-plant interactions. *Current Genetics* 61:347-357.
25. Tamandegani PR, Marik T, Zafari D, Balázs D, Vágvölgyi C, Szekeres A, Kredics L, 2020. Changes in peptaibol production of *Trichoderma* species during in vitro antagonistic interactions with fungal plant pathogens. *Biomolecules* 10, 5:730 doi:10.3390/biom10050730.
26. Tkalenko HM, Borzykh OI, Horal S, Barvas-Hremiakova KM, Janse LA, 2020. Screening new *Trichoderma* isolates for antagonistic activity against several phytopathogenic fungi, including *Fusarium* spp. *Agricultural Science and Practice* 7, 3:14-25.
27. Touati KR, Ayed-Boussema I, Hamdi H, Azzebi A, Abid S, 2022. Bromuconazole fungicide induces cell cycle arrest and apoptotic cell death in cultured human colon carcinoma cells (HCT116) via oxidative stress process. *Biomarkers* 27, 7:659-670.
28. Tylkowska K, Grabarkiewicz-Szczesna J, Iwanowska H, 2003. Production of toxins by *Alternaria alternata* and *A. radicina* and their effects on germination of carrot seeds. *Seed Science and Technology* 31, 8:309-316.
29. Villaluenga CM, Peñas E, Ledesma BH, 2020. Pseudocereal grains: Nutritional value, health benefits and current. *Food and Chemical Toxicology* 137 doi:10.1016/j.fct.2020.111178.
30. Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Woo S L, Lorito M, 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 1:1-10.
31. Wallis MC, Galarneau RAE, 2020. Phenolic compound induction in plant-microbe and plant-insect interactions: A meta-analysis. *Frontiers in Plant Science* 11:580753 doi: 10.3389/fpls.2020.580753: 13 str.
32. Xu J, Xiong H, Zhang X, Muhayimana S, Liu X, Xue Y, Huang Q, 2020. Comparative cytotoxic effects of five commonly used triazole alcohol fungicides on human cells of different tissue types. *Journal of Environmental Science and Health part B:438-446*.

# Uporaba potencialno antagonistične glive *Rhodotorula babjevae* za zatiranje gliv, izoliranih iz zrnja ajde

Teja Knafelj, Aljaž Nagode, Sergej Praček, Sara Stopar, Sara Žitko

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

- Namen poskusa je bil preveriti uporabnost glive *Rhodotorula babjevae* za varstvo ajde pred različnimi patogenimi in endofitskimi vrstami gliv.
- Za preverjanje antagonističnega delovanja smo uporabili antagonistične teste direktnega gojenja; s kalitvenimi testi smo preverili vpliv predhodne okužbe z različnimi glivami na kalitev ajde; po Folin–Ciocâlțeu-evi metodi smo preverili vsebnost fenolov v kalicah.
- Ugotovili smo, da *R. babjevae* deluje antagonistično predvsem proti glivnim vrstam rodu *Fusarium*, v manjši meri proti *Alternaria alternata*, ne deluje pa proti *A. infectioria*. Rezultati kažejo tudi na to, da ne deluje proti *Epicoccum nigrum*. Testna gliva *R. babjevae* ne deluje zaviralno na rast kalic, medtem ko *F. oxysporum* in *A. alternata* delujeta zaviralno, *F. sporotrichioides* pa popolnoma prepreči kalitev. Do padca vsebnost skupnih fenolov v kalicah je prišlo ob prisotnosti *R. babjevae*, *E. nigrum* in *F. oxysporum*.
- *R. babjevae* sicer dobro deluje proti nekaterim patogenim vrstam, vendar je zavirala tudi rast kalic ajde ter povzročila zmanjšanje vsebnosti skupnih fenolov v kalicah, kar je lahko pomembna lastnost pri izbiri te glive za varstvo ajde.

**Ključne besede:** endofitske glive, varstvo ajde, antagonistični testi, sekundarni metabolizem

## Uvod

Ajda je zaradi podobnosti plodov in njihove uporabe mnogokrat zmotno uvrščena med žita, čeprav botanično spada v družino dresnovk (Polygonaceae). Že samo ime ajda je v mnogih jezikih povezano s pšenico, npr. angleški izraz zanjo je »buckwheat«. Čeprav ni tako razširjena kot nekatere žitarice, ima ogromno prednosti (Kocjan Ačko, 2015). Te prednosti so med drugim pozitivni učinki na zdravje ljudi, saj je bogata z lizinom in fenoli, dobro raste na revnejših tleh, s svojo sposobnostjo zaviranja rasti plevelov lahko deluje kot naravni herbicid, poleg tega pa ne vsebuje glutena, zato jo lahko uživajo ljudje s celiakijo (Campbell, 1997; Kocjan Ačko, 2015; Mravlje in sod., 2021). Po svetu se večinoma pridelujeta dve vrsti ajde, navadna ajda (*Fagopyrum esculentum* Moench) in tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum* Gaertn). Prva se prideluje predvsem po nižinskih predelih držav, medtem ko se tatarska ajda večinoma prideluje v višje ležečih predelih, saj je odpornejša na zmrzal in druge ekstremne okoljske dejavnike (Campbell, 1997).

Velik problem pri pridelavi ajde predstavlja kontaminacija zrnja z različnimi vrstami gliv, katerih sekundarni metaboliti – mikotoksini – so lahko nevarni tudi za ljudi (Mravlje in sod., 2021). Te patogene glivne vrste so predvsem predstavniki rodov *Fusarium*, *Penicillium* in *Aspergillus* (Koval in sod., 2020). Zaradi povečane potrebe po hrani je potrebno najti nove, okolju prijazne načine za preprečitev glivne kontaminacije semen (Mravlje in sod., 2021). Tu velik potencial predstavljajo endofitske glive, t.j. glive, ki se razširijo v notranjosti rastlinskih tkiv in ne povzročajo simptomov bolezni v gostitelju (Rodríguez in sod., 2009). Ti endofiti sintetizirajo različne molekule, s katerimi lahko manipulirajo gostitelje in druge mikroorganizme. Vrste iz rodu *Rhodotorula* so oljne kvasovke, ki producirajo soforolipide – biosurfaktante, ki destabilizirajo membrano mikroorganizma, zaradi česar pride do povečane prepustnosti le-te, to pa povzroči zmanjšanje površinske in medfazne napetosti spojin (Hipólito in sod., 2020; Sen in sod., 2017).

V naši raziskavi smo želeli preveriti antagonistično sposobnost kvasovke *Rhodotorula babjevae* za varstvo ajde pred petimi različnimi patogenimi oz. endofitskimi vrstami gliv in sicer: *Alternaria alternata*, *A. infectoria*, *Fusarium oxysporum*, *F. sporotrichioides* in *Epicoccum nigrum*. Prav tako smo preverili, kako glive, vključno z *R. babjevae*, vplivajo na kalitev ajde. Zanimalo nas je tudi, kako okužba z glivami vpliva na sekundarni metabolizem ajde, zato smo določili koncentracijo sintetiziranih fenolov pri kalicah ajde, okuženimi z zgoraj naštetimi glivami. Fenoli so namreč izjemnega pomena, saj privabljajo oprasovalce, ščitijo ajdo ter pomagajo pri vzpostavljanju simbiotskih interakcij.

Hipoteze:

- *R. babjevae* bo zavrla rast vseh patogenih gliv: *A. alternata*, *A. infectoria*, *F. oxysporum*, *F. sporotrichioides* in *E. nigrum*.
- *R. babjevae* ne bo vplivala na rast kalic ajde, medtem ko bodo patogene vrste povzročile zmanjšano rast ali bodo kalitev popolnoma zavrle.
- *R. babjevae* ne bo vplivala na sekundarni metabolizem ajde, medtem ko bodo patogene znižale nivo sekundarnega metabolizma ajde.

## Metode in materiali

Naš poskus je potekal v časovnem razmiku šestih tednov. V prvem tednu poskusa smo na gojišča PDA (potato dextrose agar) nacepili sveže kulture gliv, s katerimi smo v drugem tednu nastavili antagonistične teste. Poleg tega smo nacepili glive v sredino na nove plošče za izvedbo kalitvenega testa. V tretjem tednu smo nastavili kalitvene poskuse s semeni ajde. Sledilo je štetje skaljenih semen, merjenje dolžin kalic in trenje le-teh. V šestem tednu smo analizirali sekundarne metabolite v kalicah.

### Gojenje gliv na gojišču PDA

Na gojišča PDA smo pod sterilnimi pogoji, t.j. ob gorilniku, s pomočjo spatule, razkužene z etanolom nad plamenom, odrezali košček gojišča s filamentozno glivo in ga sterilno prenesli na novo gojišče PDA. Kvasovko smo nacepili s pomočjo sterilne eze. Za vsako filamentozno glivo in kvasovko smo naredili po pet paralelk. Glive smo gojili v rastni komori pri temperaturi 22°C, v temi.

### Antagonistični testi

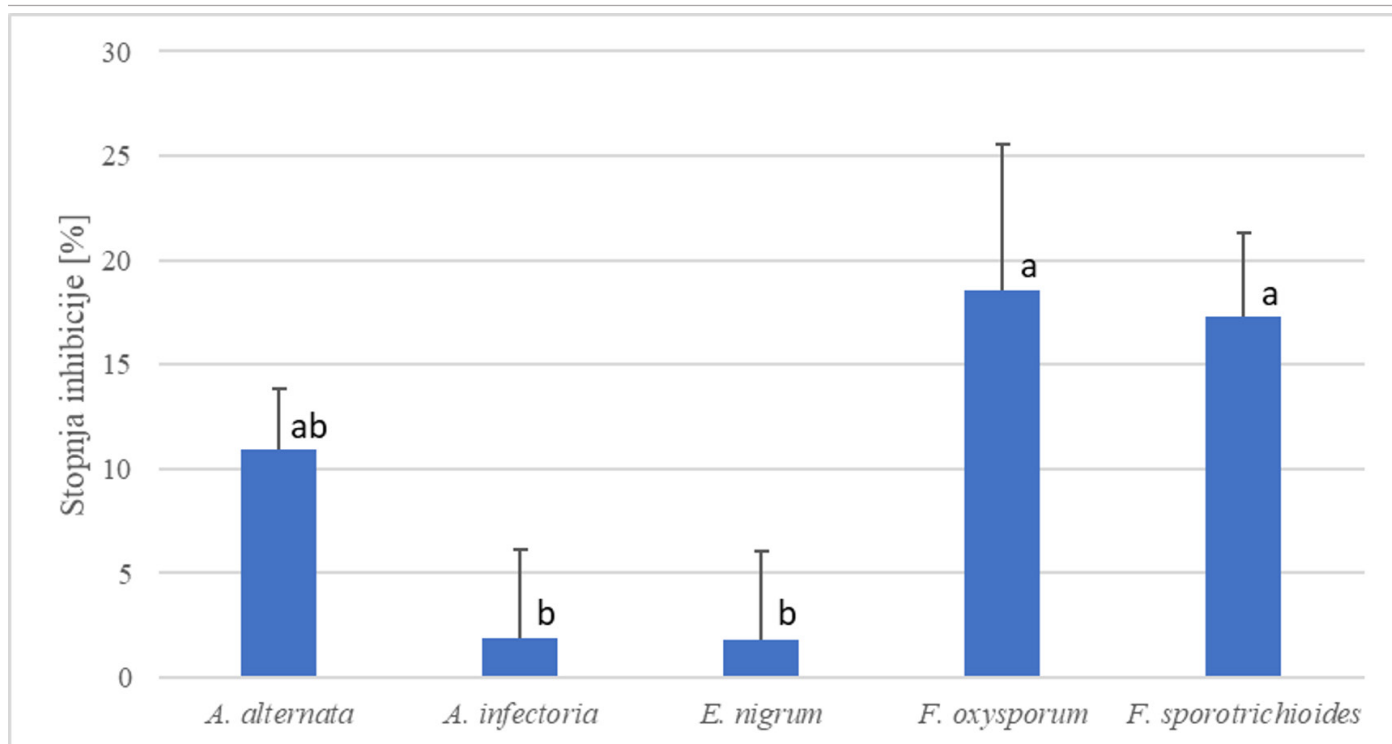
Na gojišča PDA smo s pomočjo šablone začrtali mesta postavitve antagonistične in patogene glive. S pomočjo sterilne spatule smo izrezali po 5x5 mm velik košček filamentozne glive in jih nanegli na označena mesta. Kvasovko smo nanegli s sterilno ezo v obliki ravne črte (dolžine 1 cm), tako da sta bili glivi v medsebojni razdalji 6 cm za vsak antagonistični test smo naredili po šest paralelk. Po dveh tednih smo z merjenjem oz. slikovno analizo v ImageJ - Fiji (Schindelin in sod., 2012) določili površino gliv.

### Kalitveni test

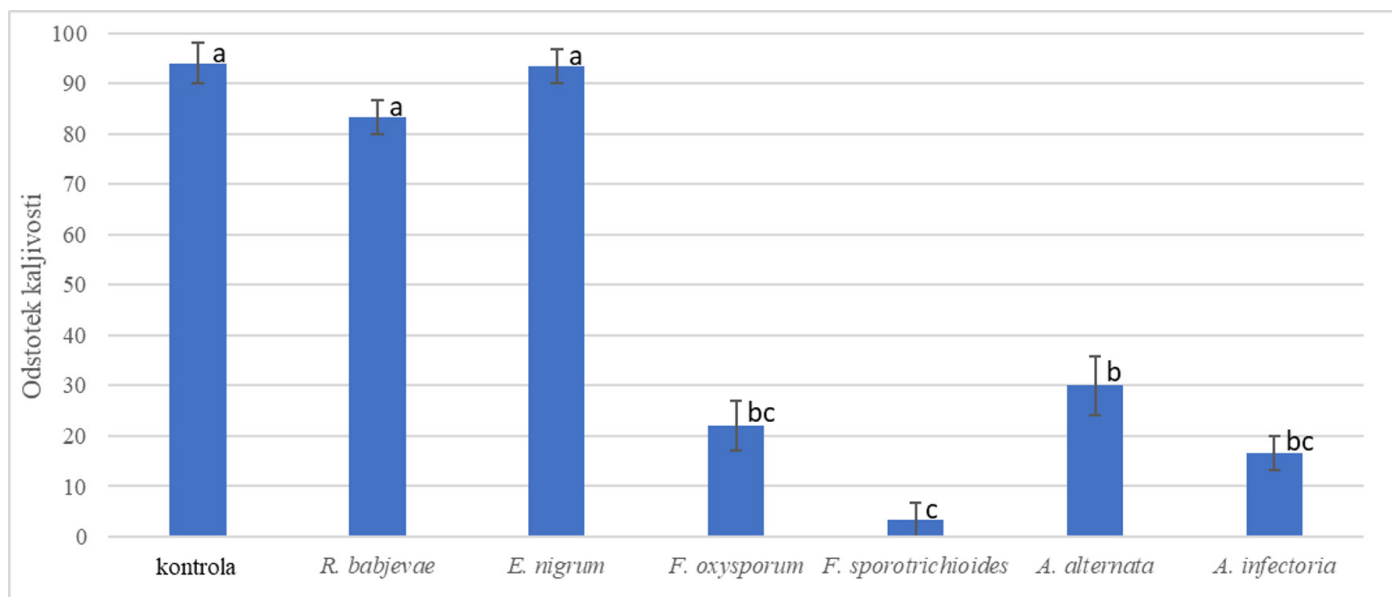
Zrna ajde smo pred nanosom na plošče površinsko sterilizirali za 20 min v 30 % vodikovem peroksidu, nato pa dobro sprali z avtoklavirano bidestilirano vodo. Na vsako gojišče smo pod sterilnimi pogoji enakomerno nanegli po 10 površinsko steriliziranih zrn ajde okrog že razrasle filamentozne glive oz. kvasovke. Vsak test smo izvedli v pet ponovitvah. Po enem tednu smo prešteli število kaljenih zrn. Kalitveni test smo ponovili še enkrat tako, da smo 20 predhodno steriliziranih semen ajde okužili še z 20-sekundnim močnim ročnim stresanjem na enotedenski kulturi glive in jih znova kalili na svežih gojiščih. Iz tega kalitvenega testa smo izločili glivo *Alternaria infectoria*, s katero zrnja nismo uspeli uspešno kontaminirati na ta drug način. Za kontrole smo sterilna zrna nanegli na sterilna gojišča PDA brez glive. Po enem tednu smo kaljena zrna prešteli in jih izmerili dolžine kalic, s pomočjo programa ImageJ - Fiji (Schindelin in sod., 2012).

### Določanje vsebnosti skupnih fenolov

Skupne fenole smo določili po Folin–Ciocâlțeu-evi metodi (Munteanu in sod., 2021). Za določitev skupnih fenolov smo v tekočem dušiku strli po 200 mg kalic ajde. Temu smo dodali 10 ml 6 % EtOH in čez noč pustili na stresalniku. Ekstrakt smo nato centrifugirali pri 2000 g 10 min, supernatantu vsakega vzorca smo dodali po 750 µl dH<sub>2</sub>O in 50 µl Folin–Ciocâlțeu reagenta. Prav tako smo naredili slepo probo, kjer smo supernatantu dodali 800 µl dH<sub>2</sub>O. Po treh minutah smo vsakemu vzorcu dodali še po 100 µl 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in inkubirali 60 min v temi. S spektrofotometrom smo izmerili absorbanco pri 750 nm, kot



**Slika 1:** Stopnja inhibicije testne glive *R. babjevae* na izbrane patogene glive, najdene v zrnih ajde v odstotku glede na kontrolo posamezne glivne vrste. Prikazane so povprečne vrednosti (n=5) +/- standardne napake. Oznaka \* na grafu prikazuje statistično značilno manjšo rast v primerjavi s kontrolo posamezne glive, različne črke (a, b) pa prikazujejo statistično značilne razlike v rasti med različnimi glivnimi vrstami (enosmerna ANOVA, Tukeyev post hoc test,  $p < 0,05$ ).



**Slika 2:** Odstotek kaljivosti zrnja ajde okuženih z različnimi glivami po 14. dnevu, kontrola so neokužene kalice, rastoče na sterilnem gojišču. Prikazane so povprečne vrednosti (n=5) +/- standardne napake. Posamezne črke (a, b, c) prikazujejo statistične razlike med posameznimi skupinami (enosmerna ANOVA, Tukeyev post hoc test,  $p < 0,05$ ).

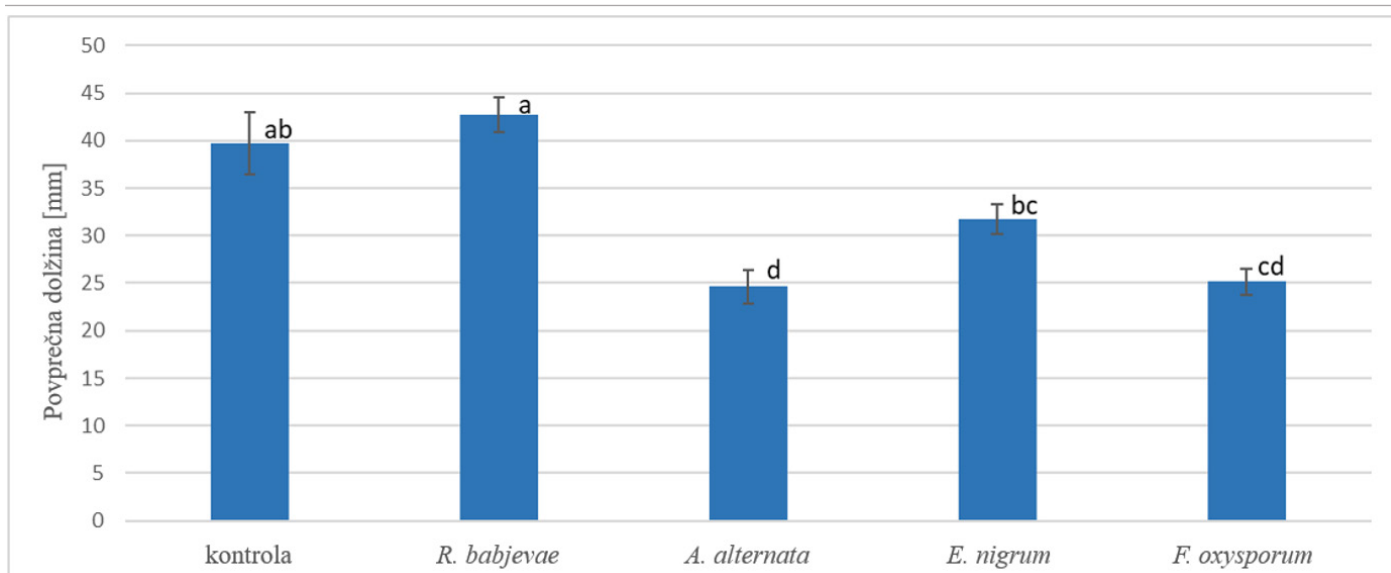
standard smo uporabili založno raztopino katehola.

### Statistična obdelava podatkov

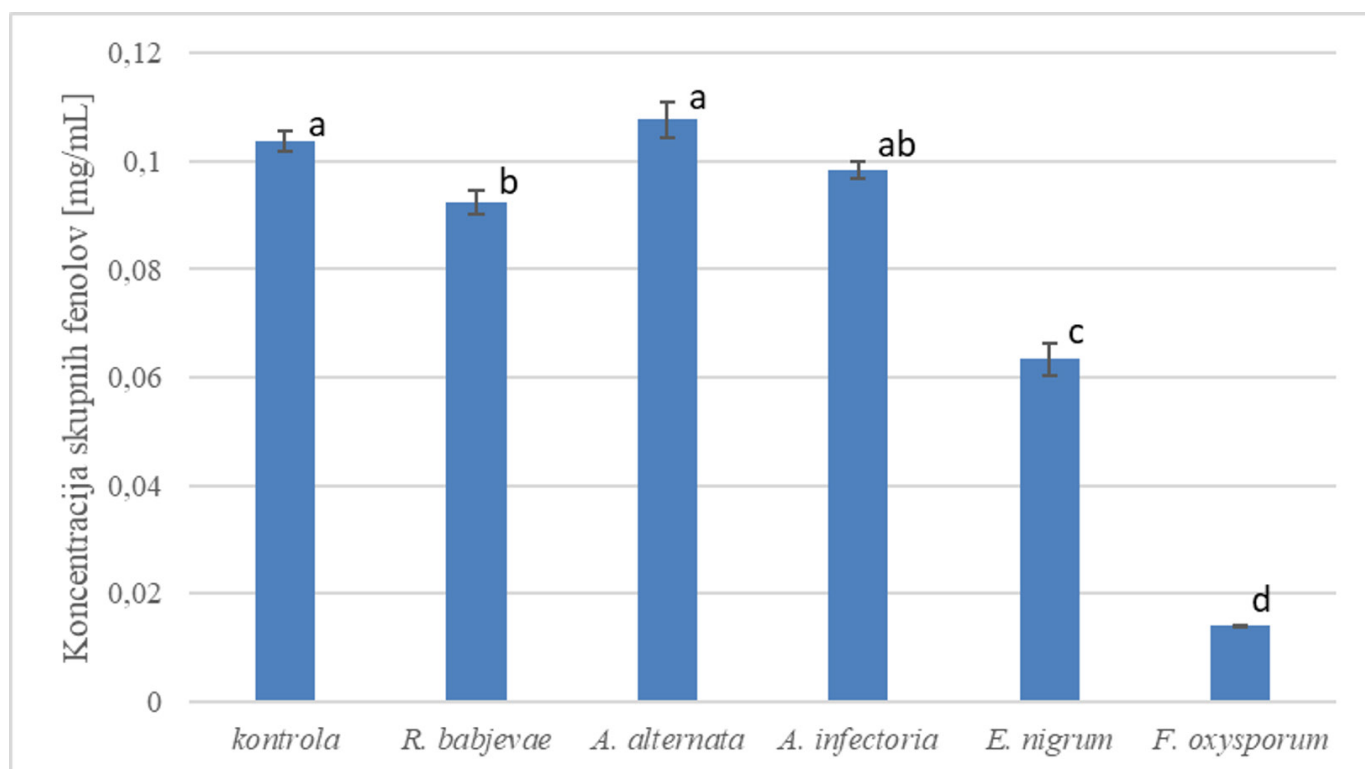
Pridobljene podatke smo obdelali s programom Microsoft Excel, kjer smo izračunali sferični indeks, delež kaljivosti in vsebnost skupnih fenolov. Podatki so bili statistično obdelani v programu R (R Core Team, 2021) z uporabo enosmerne analize variance in Tukeyevim post hoc testom. Rezultate smo prikazali na grafih v programu Microsoft Excel (Microsoft Corporation, 2018).

### Rezultati

Iz slike 1 je razvidno, da gliva *R. babjevae* deluje najbolj inhibitorno proti glivam iz rodu *Fusarium* in sicer v povprečju zavre njihovo rast za približno 18 %. Prav tako gliva *R. babjevae* deluje inhibitorno proti *A. alternata* (11,0 % zavrtje rasti). Medtem gliva *R. babjevae* ne deluje inhibitorno proti *A. infectoria* in *E. nigrum*. Prav tako smo preverili vpliv okužbe zrn z glivami na kalitev in rast kalic ajde. Glivi *R. babjevae* in *E. nigrum* ne delujeta



**Slika 3:** Povprečna dolžina kalic ajde okuženih z različnimi glivami po 14. dnevu, kontrola so neokužene kalice, rastoče na sterilnem gojišču. Prikazane so povprečne vrednosti (n=18) +/- standardne napake. Posamezne črke (a, b, c, d) prikazujejo statistične razlike med posameznimi skupinami (enosmerna ANOVA, Tukeyev post hoc test,  $p < 0,05$ ).



**Slika 4:** Koncentracija skupnih fenolov v 14 dni starih kalicah ajde, okuženimi z izbranimi glivami, kontrola so kalice rastoče na sterilnem gojišču. Prikazane so povprečne vrednosti (n=3) +/- standardne napake. Posamezne črke (a, b, c, d) prikazujejo statistične razlike med posameznimi skupinami (enosmerna ANOVA, Tukeyev post hoc test,  $p < 0,05$ ).

inhibitorno na kaljivost ajde, saj ta ostane nekje med 80 - 95 %, primerljivo kontroli (Slika 2). Ostale glive zavirajo kalitev zrnja ajde. *A. alternata* povzroči padec kalitve na 30 %, *A. infectoria* na 17 %, *F. oxysporum* na 22 %, *F. sporotrichioides* pa na 3%. Zaradi premalo preživelih kalic in s tem premalo pridobljenega rastlinskega materiala sta bili v nadaljnjih testih (analiza skupnih fenolov) glivi *A. infectoria* in *F. sporotrichioides* izpuščeni.

Iz slike 3 je razvidno, da antagonistična gliva *R. babjevae* ne deluje inhibitorno na rast kalic, saj so bile povprečne velikosti kalic ob okužbi s to glivo primerljive kontroli. Po drugi strani

glive *E. nigrum*, *F. oxysporum* in *A. alternata* delujejo zaviralno, saj zmanjšajo dolžino kalic, najbolj gliva *A. alternata* in sicer za 38,0 %.

Analiza fenolov (Slika 4) je pokazala, da okužba z *A. alternata* ne vpliva na koncentracijo skupnih fenolov glede na kontrolo. Po drugi strani *R. babjevae*, *E. nigrum* in *F. oxysporum* statistično značilno znižajo vsebnost fenolov. *R. babjevae* zniža koncentracijo fenolov za 10,9 %, *E. nigrum* za 38,9 % in *F. oxysporum* za 86,6 %.

## Diskusija

Endofitske glive imajo dokazano velik potencial za preprečevanje glivne kontaminacije semen, kar smo tudi sami do neke mere dokazali v naši raziskavi. Pri antagonističnem testu smo opazili najbolj inhibitorno delovanje kvasovke *R. babjevae* proti glivam iz rodu *Fusarium*, kar nakazujejo tudi dosedanje študije (Sen in sod., 2017). Kvasovke iz rodu *Rhodotorula* izločajo soforolipide, ki delujejo kot biosurfaktanti in s tem onemogočajo rast ostalim bakterijam in glivam (Kwak in sod., 2021; Sen in sod., 2021). Do sedaj znana literatura ne nakazuje inhibicije rasti proti glivam iz rodu *Alternaria* (Prendes in sod., 2018), kar potrjuje naš test z glivo *A. infectoria*, presenetilo nas je rahlo inhibitorno delovanje proti glivi *A. alternaria*. Inhibicije rasti proti glivi *E. nigrum* nismo zabeležili, kar je pričakovano, saj je omenjena gliva odporna proti različnim biosurfaktantom (Piegza in sod., 2021). Rezultati nakazujejo na možnost uporabe gliv iz rodu *Rhodotorula* za zatiranje okužb zrnja ajde z glivami iz rodu *Fusarium*. Glede na dobljene rezultate lahko našo prvo hipotezo ovržemo. Pri testu delovanja gliv na viabilnost kalic ajde smo opazili, da *R. babjevae* in *E. nigrum* nimata patogene aktivnosti na kalice ajde, ostale glive pa delujejo patogeno, saj glive iz rodu *Fusarium* in *Alternaria* izločajo ekstracelularne encime, ki lahko povzročijo gnitje kalic ajde (Kovačec in sod., 2016). Najbolj patogeno na kalice ajde deluje gliva *F. sporotrichioides*. Naši kalitveni testi kažejo, da so vse testne glive razen *Rhodotorula babjevae* zmanjšale dolžino kalic ajde. Glive iz rodu *Epicoccum*, *Fusarium* in *Alternaria* izločajo ekstracelularne encime, kamor uvrščamo amilaze, celulaze in polifenol oksidaze, ki povzročijo destabilizacijo membrane in uhajanje topljenca iz citoplazme, kar privede do gnitja korenin in stebel na razvijajoči se rastlini (Kovačec in sod., 2016). Gliva *Fusarium sporotrichioides* je imela najmočnejši inhibitorni učinek na kalitev in rast kalic, saj je njihovo rast popolnoma zavrla. Dolžina kalic ajde je ostala enaka ob okužbi s kvasovko *R. babjevae*. Polifenolne spojine so heterogena skupina rastlinskih sekundarnih metabolitov, ki jih delimo na fenolne kisline, flavonoide, stilbene, lignane ter ostale (Ganesan in Xu, 2017). Sprememba vsebnosti fenolov igra pomembno vlogo pri okužbi z glivami. Povečanje vsebnosti fenolnih spojin omogoči učinkovitejšo odstranitev reaktivnih kisikovih spojin in/ali povečanje vgradnje in navzkrižnega povezovanja fenolnih spojin s celično steno. Flavonoidi pa s svojim antibakterijskim delovanjem ščitijo seme med kalitvijo (Kovačec in sod., 2016). Vrednosti skupnih fenolov so se pri našem poskusu gibale med 7 in 53 mg/g. Od kontrole so se razlikovali vzorci, ki so bili okuženi z *R. babjevae*, *E. nigrum* in *F. oxysporum*, vse so namreč znižale vsebnost fenolov, najbolj gliva *F. oxysporum*. Okužba z *A. alternata* in *A. infectoria* ne povzroči padca koncentracije skupnih fenolov glede na kontrolo. Za glivo *F. sporotrichioides* fenolnega testa nismo izvedli, saj so vse kalice propadle. Za zmanjšano produkcijo polifenolov so najverjetneje odgovorni glivni mehanizmi, ki do neke mere aktivno zmanjšajo produkcijo polifenolov (Shalaby in Horwitz, 2015). Wallis in Galarneau (2020) sta v meta-analizi dokazala, da je kolonizacija rastlin s koristnimi glivami povzročila povišanje sinteze fenolov, medtem ko pri kolonizaciji s patogenimi glivami ta trend ni bil opazen. Rezultati naše raziskave se s tem podatkom ne skladajo.

## Zaključki

Če povzamemo, lahko rečemo, da naša testna gliva *R. babjevae* deluje inhibitorno le na določene vrste glivnih patogenov - najbolj učinkovito zavira rast gliv rodu *Fusarium*. Pri testu učinka glive na rast kalic ajde smo dokazali, da *R. babjevae* ne zavira rasti kalic ajde, kar je razvidno tudi iz samih velikosti kalic okuženih z *R. babjevae*, ki so bile primerljive s kontrolo. To je v smislu uporabe te glive proti patogenom ajde zelo zaželeno, zato bi se potencialno lahko ta gliva uporabljala za varstvo pred omenjenima patogenoma iz rodu *Fusarium*. Zelo pomemben faktor pri izbiri glive za zaščito ajde predstavlja tudi njen vpliv na ajdin sekundarni metabolizem. Zaželeno je, da vsebnost fenolov ob prisotnosti naše glive ne pade, saj so te molekule med drugim tudi močni antioksidanti, ki v našem telesu reducirajo reaktivne kisikove spojine in na ta način ščitijo celice pred stresom. Rezultati so v našem primeru žal pokazali manjši padec skupnih fenolov, kar lahko predstavlja ključni faktor pri izbiri glive *R. babjevae* za biotsko varstvo zrnja ajde.

## Literatura

- Campbell GC. 1997. Buckwheat. *Fagopyrum esculentum* Moench. Bioversity International. Rim.
- Ganesan K, Xu B. 2017. A critical review on polyphenols and health benefits of black soybeans. In *Nutrients* 9 (5), doi.org/10.3390/nu9050455
- Hipólito A, Alves da Silva RA, Caretta T de O, Silveira VAI, Amador IR, Panagio LA, Borsato D, Celligoi MAPC. 2020. Evaluation of the antifungal activity of sophorolipids from *Starmerella bombicola* against food spoilage fungi. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101797, doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101797
- Kocjan Ačko D. 2015. Poljščine: pridelava in uporaba. Kmečki glas, Ljubljana.
- 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, doi.org/10.1016/j.funbio.2016.03.003
- Koval D, Plocková M, Kyselka J, Skřivan P, Sluková M, Horáčková Š. 2020. Buckwheat Secondary Metabolites: Potential Antifungal Agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(42), 11631–11643, doi.org/10.1021/acs.jafc.0c04538
- Kwak MJ, Park MY, Kim J, Lee H, Whang KY. 2021. Curative effects of sophorolipid on physical wounds: In vitro and in vivo studies. *Veterinary Medicine and Science*, 7(4), 1400–1408, doi.org/10.1002/vms3.481
- Microsoft Corporation. 2018. Microsoft Excel, Available at: <https://office.microsoft.com/excel>.
- 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), 851, doi.org/10.3390/plants10050851
- Munteanu IG, Apetrei C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(7):3380. doi.org/10.3390/ijms22073380
- Piegza M, Szura K, Łaba W. 2021. Trichoderma citrinoviride: Anti-Fungal Biosurfactants Production Characteristics. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, doi.org/10.3389/fbioe.2021.778701
- Prendes LP, Merín MG, Fontana AR, Bottini RA, Ramirez ML, Morata de Ambrosini, VI. 2018. Isolation, identification and selection of antagonistic yeast against *Alternaria alternata* infection and tenuazonic acid production in wine grapes from Argentina. *International Journal of Food Microbiology*, 266, 14–20, doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.03

13. R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
14. Rodriguez RJ, White Jr JF, Arnold AE, Redman RS. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2), 314–330, doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x
15. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Cardona A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. doi:10.1038/nmeth.2019
16. Sen S, Borah SN, Bora A, Deka S. 2017. Production, characterization, and antifungal activity of a biosurfactant produced by *Rhodotorula babjevae* YS3. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 95, doi.org/10.1186/s12934-017-0711-z
17. Sen S, Borah SN, Sarma H, Bora A, Deka S. 2021. Utilization of distillers dried grains with solubles as a cheaper substrate for sophorolipid production by *Rhodotorula babjevae* YS3. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4), doi.org/10.1016/j.jece.2021.105494
18. Shalaby S, Horwitz BA. 2015. Plant phenolic compounds and oxidative stress: integrated signals in fungal–plant interactions. *Current Genetics*, 61(3), 347–357, doi.org/10.1007/s00294-014-0458-6
19. Silambarasan S, Logeswari P, Cornejo P, Kannan VR. 2019. Evaluation of the production of exopolysaccharide by plant growth promoting yeast *Rhodotorula* sp. strain CAH2 under abiotic stress conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 55–62, doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.016

# Use of the potentially antagonistic fungus *Aureobasidium pullulans* to control fungi isolated from buckwheat grains

Lana Štangl, Judit Andorrà, David Krisper, Emanuela Žnidaršič

Biotechnical faculty, Study of biotechnology, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- The main aim of this research was to find out the effect of the antagonistic and endophytic fungus *Aureobasidium pullulans* on the growth of the pathogenic fungi *Alternaria alternate*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium sporotrichioides* and endophytic fungus *Epicoccum nigrum*. We investigated the germination ability, the growth of seedlings and the synthesis of polyphenols in buckwheat grains infected with pathogens and endophytes.
- *Aureobasidium pullulans* successfully inhibited the growth of *Epicoccum nigrum* and *Fusarium sporotrichioides* by reducing the surface area of the mentioned fungi.
- *F. sporotrichioides* was the only fungus that had an inhibitory effect on seed germination. The seeds inoculated with *F. proliferatum* had the shortest shoots, followed by *A. pullulans* and *A. alternata* which also had a negative effect on shoot length.
- All of the samples containing the tested fungi showed an increase in polyphenol concentration as a response to stress.

**Keywords:** antagonism, fungi, germination, growth, pathogens



## Introduction

Plant diseases cause between 10 and 15% of global crop losses annually, implying direct economic losses of up to hundreds of millions of dollars. And out of these diseases, it is known that approximately 70-80% are caused by pathogenic fungi (Chatterjee et al., 2016). Fungal infections of seeds and grains have a major impact on food safety, as contamination can occur during or after cultivation. The biggest problem regarding them is mycotoxins, which belong to the secondary metabolites of fungi. In humans and animals, they can cause acute toxicity, act as genotoxic and are mutagenic, leading to cancer (Wild et al., 2010).

As the world's population continues to grow, the need for agricultural production is ever-increasing. The challenge of the 21st century is to ensure the highest possible production efficiency and the lowest possible losses (Giller et al., 2021). Since pesticides and artificial fertilizers are harmful to the environment and human health, causing diseases such as Alzheimer's and Parkinson's disease, endocrine, respiratory, and reproductive disorders, and even cancer, their use should be limited (Mostafalou et al., 2013). Therefore an ecological and sustainable approach to decontamination is needed. Endophytic fungi have their ecological niche and role in agricultural and medicinal plants but are often overlooked (Ganley and Newcombe, 2006). Endophytic microorganisms are microbes that inhabit the internal parts of a plant. They penetrate the plant's seed, leaf, stem and roots and are not harmful to the host plant (Yadav, 2018). Endophytes are numerous, and studies show they are present in many plants; they have become important due to their ability to produce many bioactive metabolites and biotechnologically important enzymes (Khan et al., 2014). In most cases, inoculation with endophytes causes a significant increase in biomass (Santoyo et al., 2016; Shen et al., 2019).

The purpose of the research was to determine the effect of the antagonistic and endophytic fungi *Aureobasidium pullulans* on the growth of some pathogenic and endophytic fungi. As pathogens *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium sporotrichioides* were tested, together with endophytic fungus *Epicoccum nigrum*. We investigated the germination ability, the growth of seedlings and the synthesis of polyphenols in buckwheat grains infected with pathogens and endophytes. Buckwheat is a plant classified as a pseudocereal. It belongs to the Polygonaceae family and is related to rhubarb. It is usually grown for its seeds, which are useful in food. It can also be grown as a green manure, a companion crop, a source of honey, and as a pharmaceutical plant that provides rutin. It is known for its high fiber content, vitamins, and flavonoids with strong antioxidant activity (Mazza in Oomah., 2003). We expect that *A. pullulans* will inhibit the growth of all pathogenic fungi, that the germination ability of buckwheat grains will be improved in the presence of *A. pullulans* and reduced in the presence of pathogenic fungi, and that the total phenolic content of sprouts will be higher when infected with fungi compared to the control.

## Materials and Methods

### Plant material

Buckwheat grains were obtained from the Rangus mill in Šentjernej, SE Slovenia.

### Fungal strains

*Aureobasidium pullulans* used in this study, as well as the following 5 selected fungi *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium sporotrichioides* and *Epicoccum nigrum* were isolated from buckwheat grains and stored in the fungal collection of the Chair of Botany and Plant physiology from the Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana. Fresh cultures of fungi were obtained by cultivating them in darkness and at 22 °C and 60 % humidity to later use them in all tests performed.

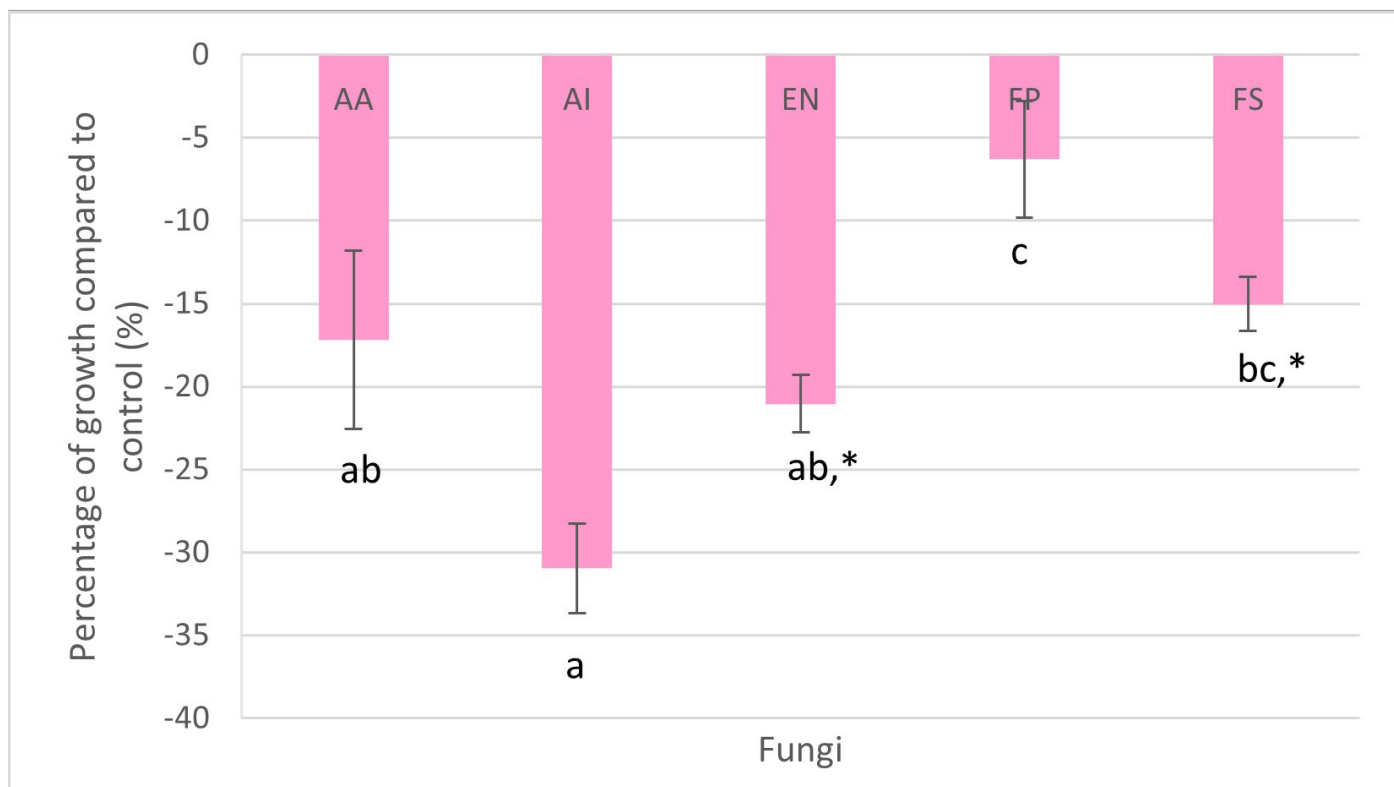
### Antagonistic tests: direct interactions

An in vitro study of the antagonistic effect in the direct confrontation was carried out as a reliable image analysis-based method (Szekeres et al., 2006) for the quantitative evaluation of the antagonistic abilities of the *A. pullulans*. The five selected fungi *A. alternata*, *A. infectoria*, *F. proliferatum*, *F. sporotrichioides* and *E. nigrum* were confronted separately against the antagonist fungus *A. pullulans*.

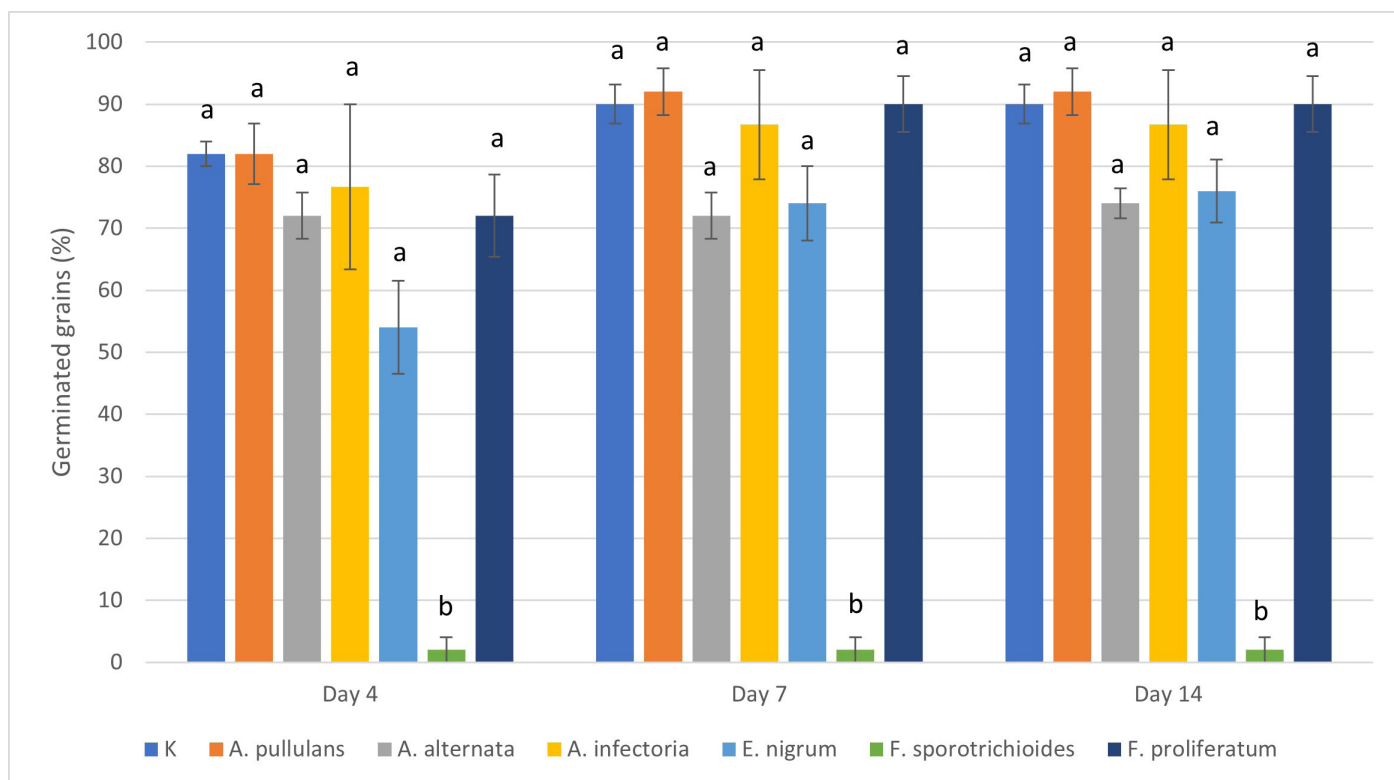
After cultivating in fresh cultures for one week, the inoculations of fungi were performed in 90 mm Petri dishes filled with 2% potato dextrose agarose (PDA) by cutting the mycelial disc cubes from the edge of the same old colonies in a precise pattern (5x5 mm in size). For testing the antagonistic activity, the two mycelial discs of fungi were situated at a distance of 60 mm, based on a paper model placed under each Petri dish during the preparation of the tests. Each test was performed in 5 repetitions. The antagonistic activity was evaluated by taking photographs of the plates with an iPhone11 camera after 14 days of cultivation. The pictures were later analyzed using the ImageJ software (Schneider, 2012) and processed to obtain the results on the inhibitory effect on the fungal surface area.

### Effect of fungi on germination of buckwheat grains and shoot length

The fungal effects on germination and seedling development were analysed according to Kirkpatrick and Bazzaz (1979). To evaluate the effects of fungal contamination on buckwheat grains, each of the six selected fungi was grown for one week. 10 buckwheat grains previously surface sterilized with 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 20 minutes and rinsed with autoclaved water ddH<sub>2</sub>O, were circularly placed on the edges of the grown fungi in each of the 90mm Petri dish plates filled with PDA medium. As a control, 10 surface sterilized grains were placed on a PDA medium without fungus. Each test was performed in 5 replicates. On days 4, 7, and 14 of cultivation, the number of germinated seeds was counted and the lengths of shoots and roots of all germinated seeds were measured on the 14th day of cultivation using a metric ruler.



**Figure 1:** The graph shows the percentage of growth of pathogenic fungi grown on a culture medium with *A. pullulans* compared to their controls, grown in the absence of *A. pullulans* (mean  $\pm$  standard error). Measurements were recorded on the 14th day of observation. AA represents *A. alternata*, AI *A. infectoria*, EN *E. nigrum*, FP *F. proliferatum* and FS *F. sporotrichioides*. The different letters above represent statistically significant differences between the fungi, and an asterisk indicates statistically significant differences between the fungus and its control (oneway ANOVA, Holm-Sidak posthoc test,  $p < 0,05$ ).



**Figure 2:** Shown here is the percentage of germinated buckwheat grains, inoculated with each fungi on days 4, 7, and 14 (means  $\pm$  standard error). K represents control, AP *A. pullulans*, AA represents *A. alternata*, AI *A. infectoria*, EN *E. nigrum*, FP *F. proliferatum* and FS *F. sporotrichioides*. The different letters above represent statistically significant differences between groups on different days of observation (oneway ANOVA, Holm-Sidak posthoc test,  $p < 0,05$ ).

## Effect of fungi on secondary metabolism of seedlings

Buckwheat sprouts were crushed to powder in liquid nitrogen, and 10 ml of 60% ethanol was added to 200 milligrams of sprout powder. The secondary metabolites were extracted overnight on a rotatory shaker (180 rpm) at room temperature. The extract was centrifuged at 2000 g for 10 minutes, and the clear supernatant was used for further analyses. We made three replicates and two blanks for each sample. 100 µl of the supernatant was pipetted into a microcentrifuge tube, and 750 µl of dH<sub>2</sub>O and 50 µl of FC reagent were added to the sample. 800 µl of dH<sub>2</sub>O and no FC was added to the sample blank. After 3 minutes, 100 µL of 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was added to each sample and blank. This was followed by 60-minute incubation in the dark, and then the absorbance at 750 nm was measured. We used stock solutions of catechol as a standard for calibration. Concentrations of 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.125 mg/ml, 0.05 mg/ml and 0.01 mg/ml were used (Kreft et al., 2013). Before each set of measurements for the different fungi, a blank sample was measured in order to calibrate the spectrophotometer.

The concentration of polyphenols in mg/mL was recalculated into mg/g using the following formula:

$$c \text{ (mg/g)} = c \text{ (mg/mL)} * 100 \text{ mL} / 0,2 \text{ g}$$

In the following formula the  $c$  (mg/mL) represents the total concentration of polyphenols in mg/mL, 100 mL is the amount of ethanol used to freeze the shoots and roots, 0,2 g is the weight of the calyx used in the experiment.

## Statistical analysis

All the data were statistically analyzed using the Microsoft Excel (2016) XL Toolbox (Kraus, 2014), using one-way ANOVA and Holm-Sidak posthoc tests. The results were statistically significant at  $p < 0,05$ .

## Results

### Antagonistic tests

The antagonistic tests were analyzed after 14 days of cultivation. Originally, each combination (antagonistic fungus *A. pullulans* + selected tested fungi) had 5 technical repetitions, but due to infection, some of the samples were not analyzed.

All fungi grown in the presence of *A. pullulans* overgrew a smaller area of the petri dish compared to their control. On day 14, we can see that *A. pullulans* had a statistically significant effect on the growth of *F. sporotrichioides* and *E. nigrum*. When analyzing *A. infectoria* we detected no statistically significant differences compared to the control, probably due to low number of repetitions.

### Effect of fungal contamination on buckwheat grains

Figure 2 shows that there were statistically significant differences in the percentage of germinated grains in the case of inoculation with the fungus *F. sporotrichioides*. On the 4th, 7th and 14th days of observation, the proportion of germinated grains infected with *F. sporotrichioides* was lower,

compared to the control and grains contaminated with the other fungi.

On the 14th day after inoculation, the length of the shoots was measured. There were statistically significant differences in groups contaminated with *A. pullulans*, *A. alternata* and *F. proliferatum*, where the length of shoots was smaller compared to the control, as seen on Figure 3. There were no statistically significant differences detected for samples inoculated with *A. infectoria* and *E. nigrum*. The data for the length of shoots of seeds inoculated with *F. sporotrichioides* was not included in the statistical analysis because we had an insufficient number of shoots available and their size was too small.

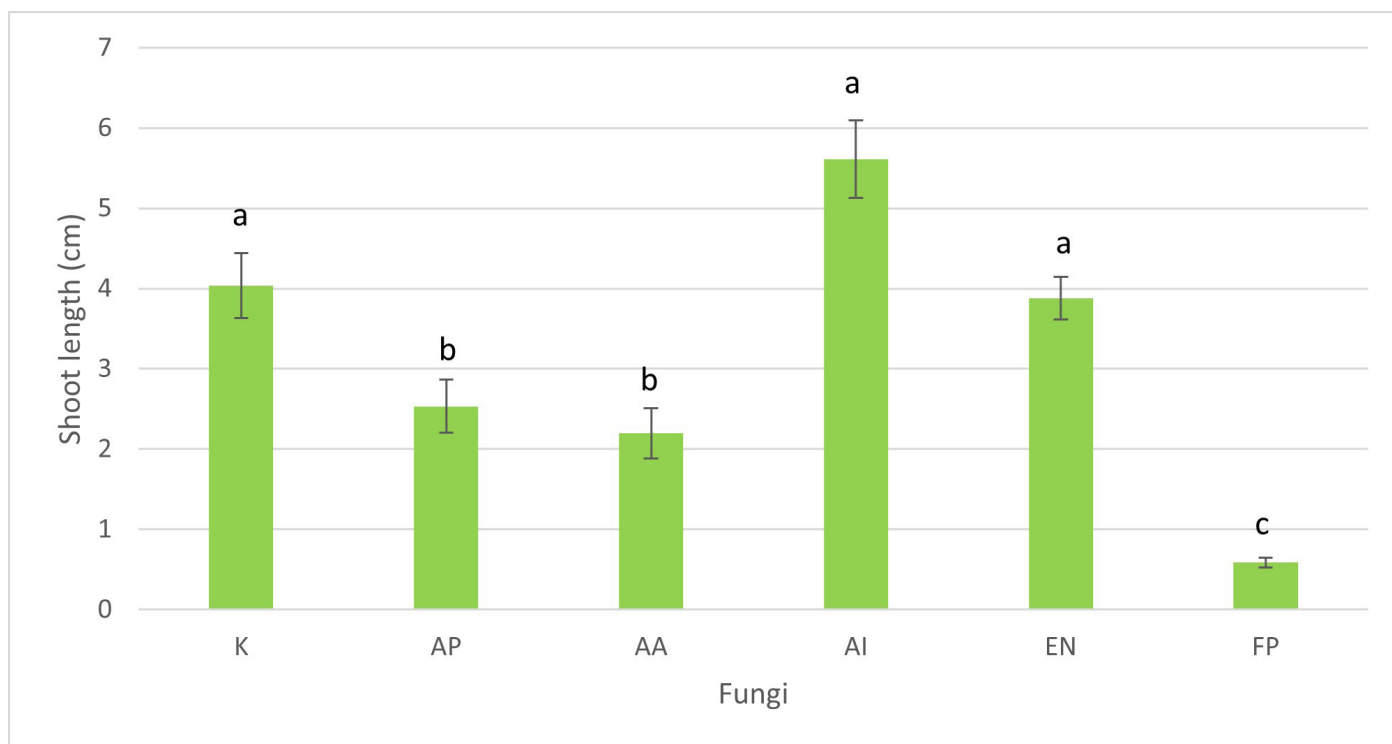
### Effect of fungal contamination on secondary metabolism of seedlings

We found higher concentrations of total phenols in all groups of shoots inoculated with fungi, compared to the control shoots (Figure 4). Groups inoculated with *A. pullulans*, *A. alternata*, *A. infectoria* and *E. nigrum* had the highest concentrations of total phenols, followed by *F. proliferatum*. We did not include the data for the total phenolic concentration of the *F. sporotrichioides* in the statistical analysis because we had an insufficient amount of the shoots available.

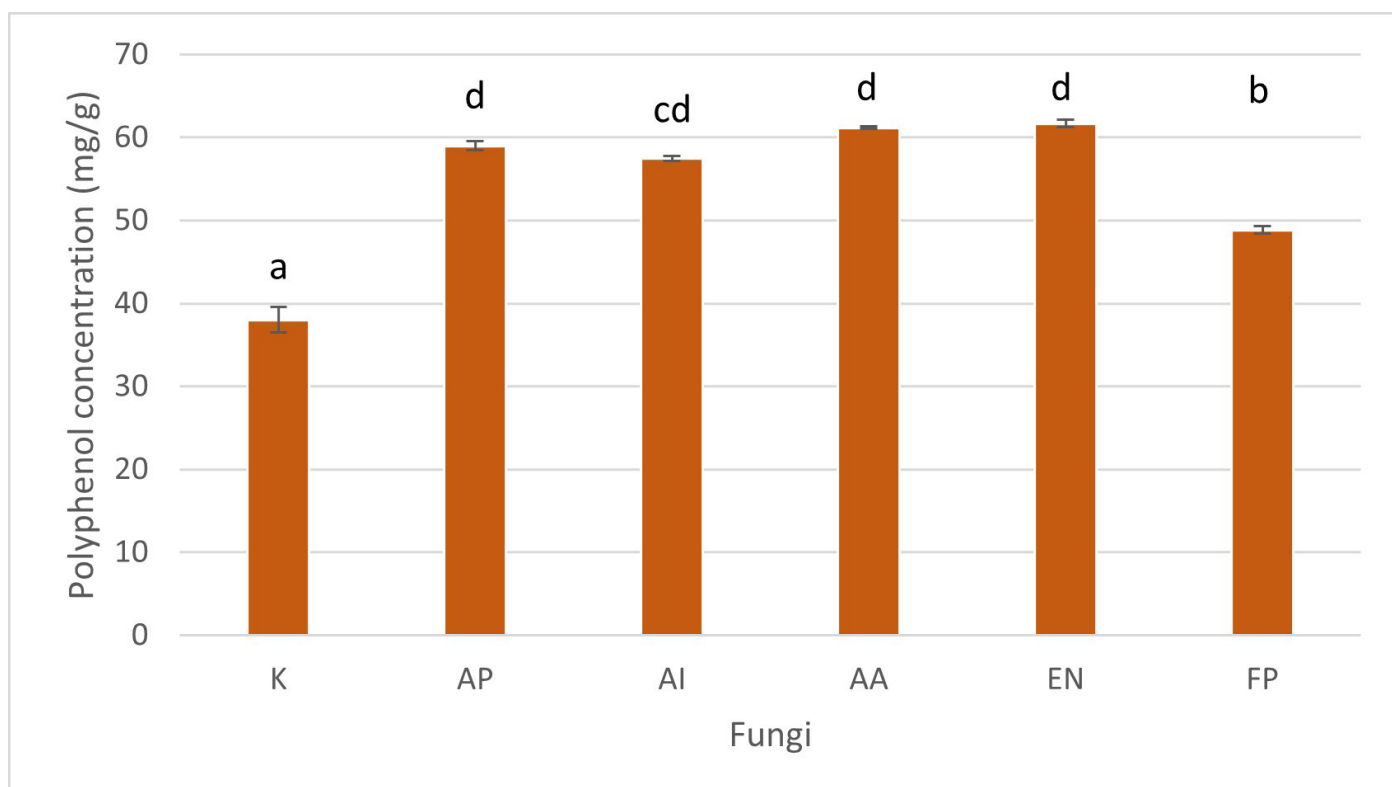
## Discussion

*A. pullulans* is a yeast-like fungus often isolated from the phyllosphere and carposphere of fruit and vegetable crops (Barata et al., 2012). It is associated with the population of endophytes of many plant species with high antagonistic activity (De Curtis et al., 2012). The antagonistic property of the fungus can be attributed to competition for nutrients and space, parasitism on fungal pathogens, secretion of antifungal compounds, attachment and biofilm formation, production of volatile organic compounds, and induction of host plant resistance (Liu et al., 2013). Although statistically significant differences compared to the control were only found in *E. nigrum* and *F. sporotrichioides*, the results of our experiment show that *A. pullulans* still probably has a mild inhibitory effect on the growth of all pathogenic fungi included in the experiment, although not statistically significant due to low number. Similarly, Lima et al. (1997) confirmed the antagonistic activity of *A. pullulans* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer*. It also has an inhibitory effect on the growth of *Monilinia laxa* and *Penicillium expansum* (Zhang et al., 2010), and Wachovska et al. (2014) confirmed the antagonistic effect of *A. pullulans* on *F. culmorum*. The antagonistic effect against *A. alternata* was also confirmed by Yalage Don et al. (2020).

*F. sporotrichioides* is considered one of the causative agents of Fusarium Head Blight (FHB) in wheat and barley, which greatly reduces the quality and quantity of the crop by affecting the seed germination (McMullen et al., 1997). We also showed that *F. sporotrichioides* greatly reduced germination of buckwheat grains. The hypothesis that all pathogenic fungi will inhibit germination cannot be confirmed because *F. sporotrichioides* was the only one to reduce seed germination. Although the literature also reports the inhibitory effects of *F. proliferatum* on the germination of centennial onion



**Figure 3:** Length of control and fungus-inoculated shoots on the 14th day (means  $\pm$  standard error). K represents control, AP *A. pullulans*, AA represents *A. alternata*, AI *A. infectoria*, EN *E. nigrum*, FP *F. proliferatum* and FS *F. sporotrichioides*. The different letters above represent statistically significant differences between the fungi (oneway ANOVA, Holm-Sidak posthoc test,  $p < 0,05$ ).



**Figure 4:** The graph shows concentrations of total phenols (in mg/g of DW) measured at 750 nm (mean  $\pm$  standard error,  $n=3$ ). K represents control, AP *A. pullulans*, AA represents *A. alternata*, AI *A. infectoria*, EN *E. nigrum*, FP *F. proliferatum* and FS *F. sporotrichioides*. The different letters above represent statistically significant differences between the groups (oneway ANOVA, Holm-Sidak posthoc test,  $p < 0,05$ ).

(*Allium fistulosum*) seeds (Alberti et al., 2018), in our case, *F. proliferatum* did not affect germination of buckwheat grains. Perello et al. (2013) reported the inhibitory effects of *A. alternata* and *A. infectoria* on seed germination in wheat, and

Ogorek et al. (2020) reported the inhibitory effect of *E. nigrum* on the germination of cress seeds. We did not observe the negative effect of above-mentioned fungi on the germination of buckwheat grains in our study. *A. pullulans* did not increase

the proportion of germinated grains, so we cannot confirm the hypothesis that this fungus will have a beneficial effect on seed germination.

*A. pullulans*, *A. alternata* and *F. proliferatum* reduced the length of the shoots. We predicted that *A. pullulans* would have a beneficial effect on shoot growth, but the hypothesis was not supported by our data. That is in contrast to the findings of Trancesco et al. (2021), where they confirmed the stimulatory effects on shoot growth in beans and soybeans. We could not include the data for *F. sporotrichioides* in the analysis because we had too few shoots surviving to do a statistical analysis. In general, the results regarding shoot growth are not the most comparable in between due to the large difference in numerus.

Polyphenols are plant-based secondary metabolites which play a part in defense against ultra-violet radiation or pathogen aggression (Pandey and Rizvi, 2009). Looking at our data, we can see that there was a higher concentration of total phenols when the grains were exposed to fungi compared to the control, which was not inoculated with fungi. In all tests where shoots were previously infected with the fungi listed above, there is an increase in total phenol production, which means the seedlings had probably experienced stress. Higher levels of stress can be linked to a higher synthesis of phenols as a defense mechanism against the infecting fungi. All fungi mentioned above are known plant pathogens and produce secondary metabolites known as mycotoxins. These toxins are synthesized as polyketides, terpenes, indole terpenes, peptides, alkaloids or siderophores and play a role in plant infection (Perincherry et al., 2019). We correctly assumed that the synthesis of total phenols would be increased during fungal infections and can therefore confirm our hypothesis.

## Conclusion

In this study we investigated the effect of the selected antagonistic and endophytic fungi *Aureobasidium pullulans* on the growth of the pathogenic fungi *Alternaria infectoria*, *Alternaria alternata*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium sporotrichioides*. *Aureobasidium pullulans* successfully inhibited the growth of *Epicoccum nigrum* and *Fusarium sporotrichioides* by reducing the surface area of the mentioned fungi. We have also investigated the germination ability in the presence of all tested fungi and observed *F. sporotrichioides* had the most significant and radical effect. As well as the most negative effect on the growth of seedlings is by *F. proliferatum*, followed by *A. alternata* and *A. pullulans*. Finally, we have also observed increased production of total phenols in buckwheat grains infected with pathogenic and endophytic fungi, probably linked with the plants' reaction to the stress produced by the release of mycotoxins by fungi during the process of infection.

Our research, therefore, contributes to a better understanding of interactions between fungi and buckwheat in an artificial environment.

## Literature

- Alberti I., Prodi A., Montanari M. et al. 2018. First report of *Fusarium proliferatum* associated with *Allium fistulosum* L. in Italy. *Journal of Plant Diseases and Prot* 125:231-233.
- Barata A., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V. 2012. The Microbial Ecology of Wine Grape Berries. *International Journal of Food Microbiology* 153:243-259.
- Barrows J. N., Jameson G. B. Pope M. T. 1985. Structure of a Heteropoly Blue, The Four-Electron Reduced  $\beta$ -12-Molybdophosphate Anion. *Journal of American Chemical Society* 107, 6:1771-1773.
- Chatterjee S., Kuang Y., Splivallo R., et al. 2016. Interactions among filamentous fungi *Aspergillus niger*, *Fusarium verticillioides* and *Clonostachys rosea*: fungal biomass, diversity of secreted metabolites and fumonisin production. *BMC Microbiology* 16:83 doi: 10.1186/s12866-016-0698-3.
- De Curtis F., de Felice D. V., Ianiri G., De Cicco V., Castoria R. 2012. Environmental factors affect the activity of biocontrol agents against ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* on wine grape. *International Journal of Food Microbiology* 159, 1:17-24.
- Di Francesco A., Di Foggia M., Corbetta M. et al. 2021. Biocontrol Activity and Plant Growth Promotion Exerted by *Aureobasidium pullulans* Strains. *Journal of Plant Growth Regulation* 40:1233-1244.
- Ganley R. J., Newcombe G. 2006. Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. *Mycological Research* 110, 3:318-327.
- Giller K. E., Delaune T., Silva J. V. et al. 2021. The future of farming: Who will produce our food?. *Food Security* 13:1073-1099.
- Khan A. L., Waqas M., Kang S. M. et al. 2014. Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. *Journal of Microbiology* 52:689-695.
- Kirkpatrick B. L., Bazzaz F. A. 1979. Influence of Certain Fungi on Seed Germination and Seedling Survival of Four Colonizing Annuals. *Journal of Applied Ecology* 16, 2: 515-527.
- Kraus, D. 2014. Consolidated data analysis and presentation using an open-source add-in for the Microsoft Excel spreadsheet software. *Medical Writing* 23: 25-28
- Kreft S., Janeš D. and Kreft I. 2013. The content of fagopyrin and polyphenols in common and tartary buckwheat sprouts. *Acta Pharmaceutica* 63, 4: 553-560.
- Lima G., Ippolito A., Nigro F., Salerno M. 1997. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. *Postharvest Biology and Technology* 10:169-178.
- Magalhães L. M., Segundo M. A., Reis S., Lima J. L. 2008. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta* 613, 1:1-19.
- Mazza G., Oomah B. D. 2003. Buckwheat. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*.
- McMullen M., Jones R, Gallenberg D. 1997. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact, *Plant Diseases* 81, 12:1340-1348
- Mostafalou S., Abdollahi M. 2013. Pesticides and human chronic diseases: evidence, mechanisms, and perspectives. *Toxicology Applied Pharmacology* 268, 2:157-177
- Ogórek R., Przywara K., Piecuch A., Cal M., Lejman A., Matkowski K. 2020. Plant-Fungal Interactions: A Case Study of *Epicoccum nigrum* Link. *Plants (Basel)* 9, 12:1691 doi: 10.3390/plants9121691.
- Pandey K. B., Rizvi S. I. 2009. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2, 5:270-278.
- Perello A. E., Larran S. Nature and effect of *Alternaria* spp. complex from wheat grain on germination and disease transmission. 2013. *Pakistan Journal of Botany* 45: 1817-1824
- Perincherry L., Lalak-Kańczugowska J., Stępień Ł. 2019. *Fusarium*-Produced Mycotoxins in Plant-Pathogen Interactions. *Toxins (Basel)* 11, 11:664 doi: 10.3390/toxins11110664.
- Santoyo G., Moreno-Hagelsieb G., Orozco-Mosqueda C., Glick B. R. 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research* 183:92-99
- Schneider C. A. 2012. Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". *Nature Methods* 9: 671-675.
- Shen F. T., Yen J. H., Liao C. S., Chen W. C., Chao Y. T. 2019. Screening of rice endophytic biofertilizers with fungicide tolerance

- and plant growth-promoting characteristics. Sustainability 11:1133 doi 10.3390/su11041133.
25. Szekeres A., Leitgeb B., Kredics L., Manczinger L., Vágvölgyi C. 2006. A novel, image analysis-based method for the evaluation of in vitro antagonism. Journal of Microbiological Methods 65, 3: 619-622.
26. Wachowska U., Głowacka K., Mikołajczyk K. K. 2016. Biofilm of *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans* on winter wheat kernels and its effect on other microorganisms. Microbiology 85, 5: 523-530
27. Wild C. P., Gong Y. Y. 2010. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. Carcinogenesis, 31, 1: 71-82
28. Yadav A. N. 2018. Biodiversity and biotechnological applications of host-specific endophytic fungi for sustainable agriculture and allied sectors. Acta Scientific 1, 44 doi: 10.31080/ASMI.2018.01.0044
29. Yalage Don S. M., Schmidtke L. M., Gambetta J. M., Steel C. C. 2020. *Aureobasidium pullulans* volatiliome identified by a novel, quantitative approach employing SPME-GC-MS, suppressed *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* in vitro. Scientific reports 10, 1:4498 doi: 10.1038/s41598-020-61471-8
30. Zhang D. P., Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M. L. 2010. Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. Biological Control 54:172-180

# Vpliv izvlečkov iz luščin zrn navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*) na rast izbranih patogenih gliv

Michelle Berra, Nuša Golob, Anja Habe, Špela Lepičnik, Daša Šarman

Študij molekularne in funkcionalne biologije, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Namen poskusa je bil ugotoviti, ali imajo izvlečki iz luščin semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench) protiglivno aktivnost in preveriti morebiten vpliv na rast različnih vrst gliv (*Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum* in *Aspergillus flavus*).
- Uporabili smo sledeče metode: priprava metanolnega, etanolnega in vodnega izvlečka iz luščin semen navadne ajde; priprava kontrolnih gojišč in gojišč s testnimi izvlečki; nacepljanje gliv na gojišča; Folin-Ciocalteu metoda za določanje vsebnosti skupnih fenolov in spektrofotometrična analiza; statistična analiza podatkov (analiza fotografij, analiza variance in primerjave med tretmaji).
- Ugotovili smo, da je vsebnost fenolov v vodnem izvlečku najmanjša (< 7 mg/g luščin), pri etanolnih in metanolnih izvlečkih pa približno enaka (cca 14 mg/g luščin). Ugotovili smo, da je rast glive *A. alternata* v tretmaju z metanolnim izvlečkom zavrta v primerjavi s kontrolo, rast glive *F. graminearum* pa je v tretmaju z metanolnim in etanolnim izvlečkom celo pospešena.

**Ključne besede:** navadna ajda, patogene glive, izvlečki, fenolne spojine

## Uvod

Navadna ajda (*Fagopyrum esculentum* Moench) je dvokaličnica, ki spada v družino dresnovk in ne v družino žit, v katero jo pogosto zmotno uvrščamo. (Vombergar s sod. 2017). Zaradi velike vsebnosti kakovostnih proteinov, mineralov, vlaknin in ogljikovih hidratov je postala zelo cenjena v prehrani ljudi (Kovačec s sod., 2016). Vsebuje namreč številne bioaktivne komponente, kot so maščobne kisline in flavonoidi. (Huda s sod. 2021). Slednji so v prehrani ljudi pomembni predvsem zaradi antioksidativnega delovanja oz. vezave prostih radikalov v telesu, pa tudi protivnetnega delovanja (Kim s sod., 2014).

Patogeni rodovi gliv, kot so npr. *Penicillium*, *Fusarium* in *Aspergillus* (Le Lay s sod. 2016 in Chitarrini s sod. 2014), lahko kontaminirajo zrna navadne ajde bodisi na polju, bodisi med skladiščenjem. Patogene glive lahko sintetizirajo mikotoksine, ki so lahko škodljivi za zdravje ljudi in živali. (Kovačec s sod., 2016). Eden bolj problematičnih je aflatoksin B1, ki ga sintetizira *Aspergillus flavus*, saj deluje kot potencialna rakotvorna spojina. (Chitarrini s sod. 2014). Takšne okužbe z glivami so problematične, saj so razlog, da se med shranjevanjem zavrže do 60% žitaric. (Kumar in Kalita 2017). Cawoy s sod. 2009 omenja relativno enostavno vzgojo ajde, ki jo med drugim omogoča njena odpornost na številne patogene mikroorganizme, kot so glive, bakterije in virusi, ki med seboj interagirajo. (Kumar s sod., 2017). Razlog naj bi bile fenolne spojine, ki rastlino zaščitijo pred napadi mikroorganizmov. (Vombergar s sod. 2017). Naravni izvlečki, ki vsebujejo fenolne spojine, pa tudi druge lipofilne molekule, bi bili bolj ekološki in zdravju prijazni od fungicidov, ki se uporabljajo za dolgotrajno shranjevanje žitaric. (Nobili s sod. 2019).

Fenolne spojine so sekundarni metaboliti, ki v rastlinah nastanejo iz primarnih metabolitov. Poznamo preko 10 000 različnih fenolnih spojin, ki so med seboj kemijsko izredno raznolike in rastlinam omogočajo zaščito pred napadi virusov, bakterij, rastlinojedih organizmov, pa tudi sončnimi žarki (Vombergar s sod. 2017). Za ajdo je najbolj značilen bioflavonoid rutin, ki ima pomembno zaščitno funkcijo in je močan antioksidant (Vombergar 2010).

Topnost fenolnih spojin je odvisna od njihovih polarnih lastnosti. Polifenoli so tako zaradi svojih lastnosti velikokrat bolj topni v organskih topilih, ki so manj polarni kot voda. Poleg tega je učinkovita ekstrakcija polifenolnih spojin v ustreznih topilih odvisna od temperature in mehanskega mešanja, ki omogočata ustrezen izkoristek polifenolov (Kim s sod. 2001). Za ekstrakcijo fenolnih spojin rastlinskih materialov se je velikokrat za najboljšega izkazal metanol (Haminiuk s sod. 2014).

Oksidativni stres in reaktivne kisikove spojine so pri glivah pomemben dejavnik v biosintetski poti mikotoksinov, vpliva pa tudi na preostale metabolne procese in rast glive. Zanimivo je, da polifenoli in lipofilne molekule, katere v znatnih koncentracijah najdemo tudi v zrnih ajde, zmanjšujejo oksidativni stres v celicah gliv, s čimer se zmanjša sinteza mikotoksinov ter zavira rast patogenih gliv (Nobili s sod. 2019).

Pri našem poskusu nas je zanimalo, ali imajo izvlečki iz luščin zrnja navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench) protiglavno aktivnost in s tem vpliv na rast in razvoj patogenih in endofitskih gliv.

Hipoteze:

- Izbrane vrste gliv bodo na ploščah z dodanimi izvlečki rasle počasneje v primerjavi s kontrolami.
- Etanolni in metanolni izvlečki bodo vsebovali večji delež fenolov napram vodnim izvlečkom.
- Dvakrat koncentrirani metanolni ali etanolni izvleček bo vseboval dvakrat večjo koncentracijo fenolov in bo bolj učinkovito zavrl rast kot nekoncentrirani.

## Materiali in metode

### Priprava izvlečkov iz zrnja navadne ajde

Z mlinčkom zmlete luščine zrn navadne ajde smo do delcev premera < 1 mm dodatno strli v terilnici. Trikrat po 40 g suhega materiala luščin smo zatehtali v tri 500 ml erlenmajerice, kamor smo dodali 400 ml izbranega topila - destilirano avtoklavirano vodo, 96 % etanol ali metanol. Pripravljeno mešanico smo na stresalniku pri 175 obratih na minuto stresali 24 ur in jo nato prefiltrirali prek filtrirnega papirja, centrifugirali in obdržali supernatant. Po 2 ml vsakega supernatanta smo posušili na urnem steklu in mu določili izkoristek po enačbi (yield, %) =  $(W1-W2)*100$ , kjer je W1 masa pred sušenjem in W2 masa po sušenju. Naknadno smo delu izvlečka (etanolnega in metanolnega) s pomočjo rotavaporja izparili topilo do polovičnega volumna in s tem izvlečka dvakrat koncentrirali.

### Priprava gojišč z izvlečki in glivni testi

Po 100 µl izbranega izvlečka smo nanесли in enakomerno razmazali po celotni površini predhodno pripravljene gojišču 2 % PDA (krompirjev dekstrozni agar) s končno koncentracijo kloramfenikola (Cm) 50 mg/L (tako da smo dodali 15 g PDA, 35 mg Cm in 700 ml dH<sub>2</sub>O) ter nanje nacepili izbrane vrste gliv *Alternaria alternata* (AA), *Alternaria infectoria* (AI), *Fusarium oxysporum* (FO), *Fusarium graminearum* (FG) in *Aspergillus flavus* (AF), ki smo jih predhodno vzgajali v svežih enotedenskih kulturah prav tako na 2 % gojišču PDA. Za vsako vrsto glive smo pripravili 5 ponovitev za dotični izvleček ter 5 kontrolnih plošč z ustreznim topilom. Za kontrolo smo na gojišča PDA nanесли in razmazali po 100 µl izbranega topila (destilirano avtoklavirano vodo, 96 % etanol ali metanol) brez dodanega izvlečka. Na sredino vsake plošče smo postavili 5x5 mm velik izseček glive in jih smo inkubirali 10 dni v rastni komori pod stalnimi pogoji (16/8h dnevno-nočna ritmika, pri temperaturi 23/20 °C, v temi). V tem času smo izvedli tri meritve glivne rasti in sicer tretji, sedmi in deseti dan.

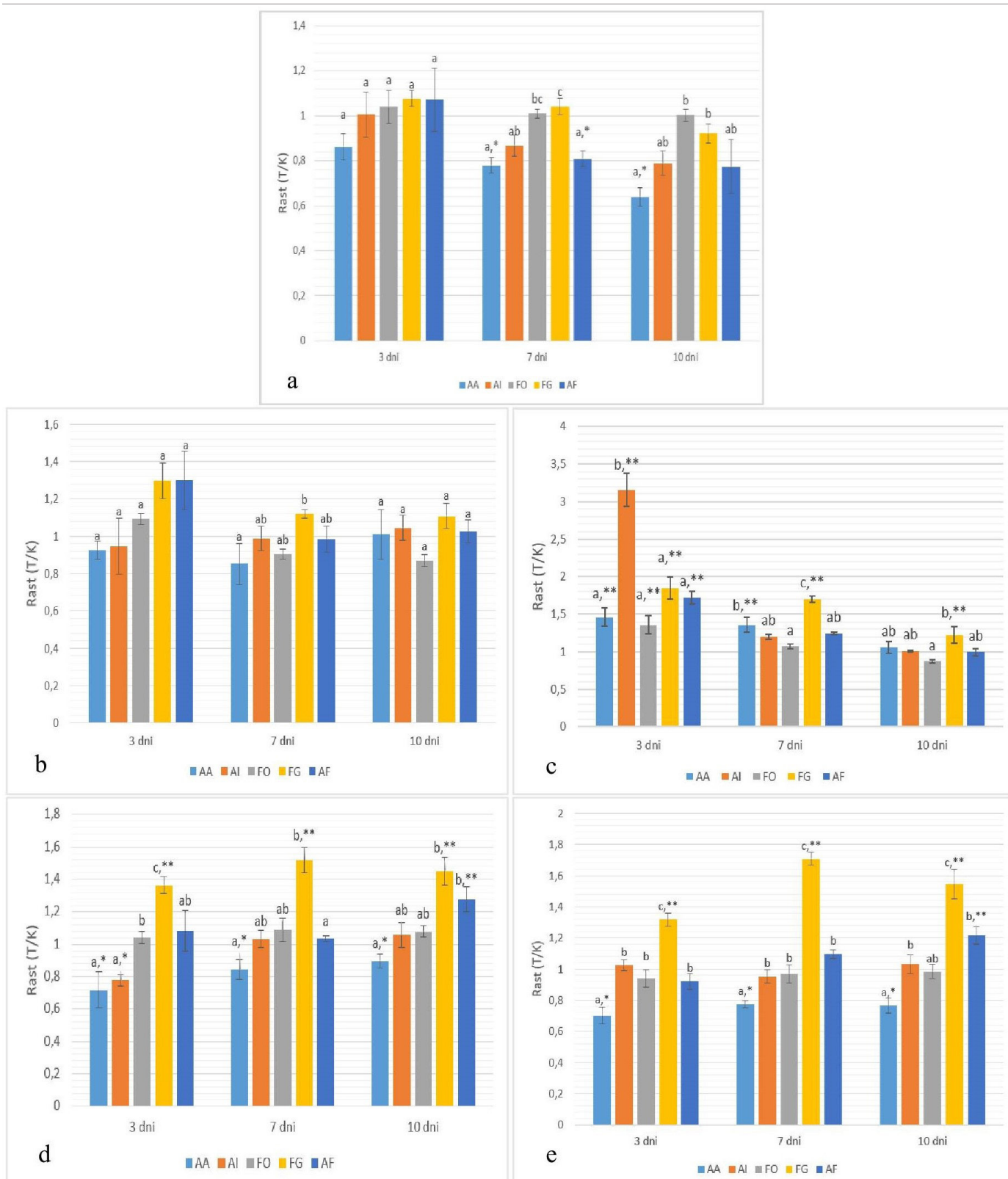
### Karakterizacija izvlečka

V pripravljenih izvlečkih smo določili vsebnost skupnih fenolov po Folin Ciocâlteau (FC) metodi (Kovačec s sod., 2016; prirejeno po Kreft s sod., 2013). Izvlečke smo centrifugirali 10 min in uporabili supernatant za nadaljnjo analizo. Da smo

**Tabela 1.** Povprečje (yield, %) in standardne napake (+/- SE) izkoristkov izvlečkov zrn navadne ajde z izbranimi topili. Pri vseh izvlečkih velja n = 3.

Vodni [mg g <sup>-1</sup> ]	Etanolni [mg g <sup>-1</sup> ]		Metanolni [mg g <sup>-1</sup> ]	
	1x	2x	1x	2x
0,69 ± 0,08	1,39 ± 0,07	1,42 ± 0,07	1,34 ± 0,04	1,46 ± 0,04

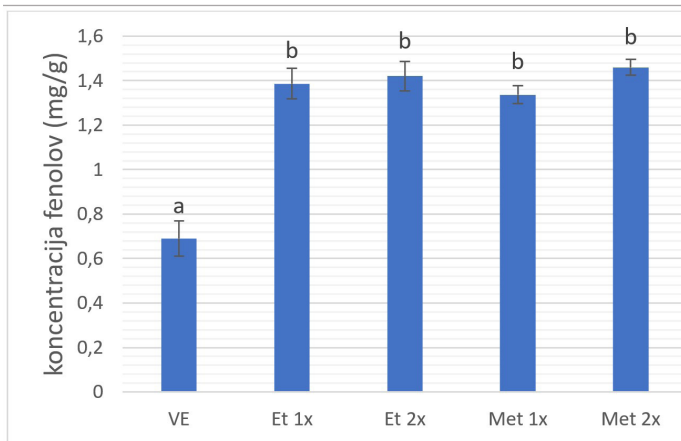




**Slika 1.** Primerjave povprečne relativne rasti (povprečje rasti posameznih gliv na gojišču z izvlečkom preračunano na povprečje rasti na kontrolnih gojiščih (test/kontrola; T/K) in standardne napake (+/- SE) gliv vrst *Alternaria alternata* (AA), *Alternaria infectoria* (AI), *Fusarium oxysporum* (FO), *Fusarium graminearum* (FG) in *Aspergillus flavus* (AF) pri z različnimi izvlečki tretiranih ploščah PDA: (a) vodni izvleček (VE), (b) etanolni izvleček, (c) 2x koncentriran etanolni izvleček, (d) metanolni izvleček in (e) 2x koncentriran metanolni izvleček. S črkami so prikazane statistično značilne razlike med rastjo posameznih gliv, z \* so prikazane statistično značilno zavrte rast glive na pram njeni kontroli, z \*\* pa so prikazane statistično značilno boljše rast glive na pram njeni kontroli.

vzorcem ustrezno sprektrofotometrično pomerili absorbanco, smo 100  $\mu$ l izbranega izvlečka dodali 750  $\mu$ l destilirane vode in 50  $\mu$ l FC reagenta v treh ponovitvah. V slepo probi smo

poleg 100  $\mu$ l izvlečka dodali 800  $\mu$ l destilirane vode. Po treh minutah smo dodali 100  $\mu$ l 20% natrij-karbonatnega puфра –  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , ter reakcijsko mešanico inkubirali 60 min v temi pri



**Slika 2:** Primerjava učinkovitostjo ekstrakcije fenolov v različnih topilih in standardne napake (+/- SE). Fenoli, raztopljeni v vodi, so označeni kot vodni izvleček (VE), v etanolu, etanolni izvleček (Et 1x) ter 2x koncentriran etanolni izvleček (Et 2x) in v metanolu, metanolni izvleček (Met 1x) ter 2x koncentriran metanolni izvleček (Met 2x). S črkami so prikazane statistične značilne razlike v koncentraciji fenolov med izvlečki.

sobni temperaturi. Vsebnost fenolov smo določili z merjenjem absorbance pri 750 nm.

Umeritveno krivuljo smo pripravili iz založne raztopine katehola in ustrezne redčitvene vrste, kjer smo posameznim koncentracijam z volumnom 100  $\mu$ l dodali 750  $\mu$ l destilirane vode in 50  $\mu$ l FC reagenta, po treh minutah inkubacije pa še 100  $\mu$ l 20% natrij-karbonatnega pufra. Po 60 minutni inkubaciji v temi pri sobni temperaturi smo pomerili absorbanco pri 750 nm.

### Obdelava in statistična analiza podatkov

S programom ImageJ (Schneider s sod., 2012) smo izmerili in izračunali površino micelija posamezne glive, čemur je sledil izračun povprečne površine rasti kontrole in preračun relativne rasti vsake glive iz posameznega tretmaja glede na ustrezno kontrolo. Z Excel-ovim dodatkom XL Toolbox NG (Kraus, 2014) smo izvedli analizo variance za posamezen tretma, izračunali povprečno vrednost in standardno napako, nato pa smo s programskim jezikom R paketoma "lsmeans" (Russell, 2016) in "multcomp" (Hothorn s sod, 2008) izvedli še multiple primerjave med posameznimi glivami v tretmaju (post hoc test). Za posamezne glive smo izvedli t-test, s katerim smo primerjali rast glive na ploščah s tretmajem in rast glive na kontrolnih ploščah. S pridobljenimi podatki smo pripravili stolpične diagrame.

Iz izmerjene absorbance različnih izvlečkov smo z Excel-ovim dodatkom XL Toolbox NG pripravili analizo variance (Tabela 1), iz povprečij in standardne napake pa stolpični diagram.

### Rezultati

Pri tretiranju gliv z vodnim izvlečkom (Slika 1a) s povprečno učinkovitostjo ekstrakcije fenolov 0,69 mg/g (Slika 2) po 3. dneh ne opazimo razlik v rasti posameznih vrst. Pri glivah AA in AF opazimo po 7. dneh zavrto rast (vrednost razmerja rasti na pram kontroli se giblje okrog 0,8). Pri tretmaju z nekoncentriranim etanolnim izvlečkom s povprečno učinkovitostjo ekstrakcije fenolov 1,39 mg/g ni bilo opaznih razlik v rasti gliv po 3. dneh (Slika 1b). Pri tretmaju gliv s koncentriranim etanolnim izvlečkom s povprečno vrednostjo

fenolov 1,42 mg/g opazimo po 3. dneh močno pospešeno rast glive AI (3x več kot kontrola). Prav tako pa so bile pospešene tudi rasti pospešene pri ostalih glivah in se gibljejo okrog vrednosti 1,5 (Slika 1c). Po 7. dneh opazimo pospešeno rast FG (1,75 x več kot kontrola) in AA (1,3 x več kot kontrola), pri čemer se trend pri FG ohrani tudi po 10 dneh, na rast ostalih gliv pa izvleček ni imel značilnega vpliva glede na kontrolo. Pri tretiranju gliv z metanolnim izvlečkom (Slika 1d) s povprečno vsebnostjo fenolov 1,34 mg/g in koncentriranim metanolnim izvlečkom (Slika 1e) s povprečno vsebnostjo fenolov 1,46 mg/g opazimo zelo podoben trend, in sicer je bila skozi celoten čas opazovanja rast glive AA zavrta (stagnira okrog vrednosti 0,8 pri enkratnem metanolnem izvlečku in okrog vrednosti 0,75 pri dvakratnem metanolnem izvlečku), rast glive FG pa močno pospešena (približno 1,4 x na pram kontroli pri enkratnem metanolnem izvlečku in še nekoliko večja (do 1,7) pri dvakratnem metanolnem izvlečku). AF je imela v obeh metanolnih tretmajih po 10h dneh nekoliko pospešeno rast na pram kontroli (1.2x bolje).

### Diskusija

V etanolnem in metanolnem izvlečku je bila učinkovitost ekstrakcije fenolov okoli 1,4 mg/g luščin, rezultati med vsebnostjo fenolov v obeh izvlečkih (koncentriranem in nekoncentriranem) se niso statistično značilno razlikovali. vodnem izvlečku je bila učinkovitost ekstrakcije fenolov le 0,69 mg/g luščin, kar je še enkrat manj kot pri ostalih izvlečkih. To nakazuje, da so se fenoli bolje ekstrahirali v etanolu in metanolu, kar potrjuje našo hipotezo, saj so fenoli zaradi svojih kemijskih lastnosti pogosto bolj topni v organskih topilih kot v vodi (Kim s sod. 2001). Zi in sod. (2007) so ugotovili, da je topnost rutina, ki je ena izmed fenolnih substanc v naših izvlečkih, v metanolu in etanolu tudi do 100 x boljša kot v vodi. Vidimo, da 2-krat koncentrirani izvlečki nimajo 2-krat večje koncentracije, s čimer nasprotujemo naši hipotezi. Razlog bi bil lahko v tem, da izvlečkov pred meritvijo nismo ustrezno premešali, lahko, da se je izvleček oboril po stenah, lahko je bil razlog nelinearna povezanost na spektrofotometru (npr. previsoka koncentracija), ali pa je bila absolutna koncentracija fenolov v izvlečkih previsoka in naša umeritvena krivulja ni bila ustrezna.

Veliko raziskav kaže, da antioksidativne lastnosti fenolov inhibirajo rast gliv (Kumar s sod., 2017, Chitarrini s sod., 2014, Keriene s sod., 2020). Ajda vsebuje različne fenolne spojine, med katerimi so glavne fenolne kisline, flavonoidi (rutin in kvercetin), tanini, lignani in stilbeni. Fenolne spojine naj bi vzpostavljale hidrofobne interakcije s celično steno glive. To povzroči uhajanje ionov in posledično inhibicijo njene rasti (Koval s sod., 2020). Predvidevali smo, da bo zaradi vsebnosti fenolov v izvlečkih ter njihovega protimikrobnega delovanja rast vseh vrst gliv zavrta. V nasprotju s pričakovanji pa smo dobili statistično značilno zavrto rast le pri AA, v primeru FG je bila rast celo močno pospešena v primerjavi s kontrolo (pri koncentriranem metanolnem izvlečku 1,7x boljša kot pri kontroli).

Nobeden izmed izvlečkov, ni imel statistično značilnega vpliva na rast FO. Zabka in Pavela (2013) sta v svoji raziskavi karakterizirala inhibicijo rasti gliv pod vplivom fenolov in ugotovila 50 % inhibicijo FO v primerjavi s kontrolo, česar mi nismo uspeli ponoviti. Razlog je verjetno manjša koncentracija fenolov v izvlečkih. Zabka in Pavela (2013) sta poročala tudi

o rahli inhibiciji glive AF, mi pa smo z eksperimenti pokazali ravno obraten trend, saj je bila rast micelija glive AF pri tretmajih z metanolnimi izvlečki celo boljše kot pri kontroli (1,2x po 10 dneh). Razlog je morda v tem, da naši izvlečki poleg fenolov vsebujejo še več drugih snovi, ki jih omenjena avtorja nista merila. V članku Kalinove in Radove (2009) je denimo omenjeno, da lahko AF razgradi rutin s pomočjo ekstracelularnih encimov ter ga uporablja kot vir ogljika. Pri meritvi 3. dne, v koncentriranem etanolnem izvlečku pri glivi AI, opazimo izrazit vrh, ki nakazuje na močno pospešeno rast glive tako glede na ostale glive, kot v primerjavi s kontrolo. Sklepamo, da gre najverjetneje za naključje pri meritvah kot posledica majhnega števila vzorcev. Za zanesljivejše sklepanje bi morali opraviti še več ponovitev. Izvlečki iz luščin zavrejo rast glive *Alternaria alternata*. Pri glivi AA opazimo značilno zavrto rast pri obeh metanolnih, vodnem in nekoncentriranem etanolnem izvlečku. Pri slednjem sicer vidimo zavrto rast le pri 7 dneh, pri 2-kratnem pa se rast s časom počasi upočasnjuje, dokler ne doseže približno enake kontroli in se giblje okrog vrednosti 1. Pri vodnem in obeh metanolnih izvlečkih opazimo približno 20 % zavrto rast AA v primerjavi s kontrolo. V raziskavi Kalinove in Radove (2009) rutin ni vplival na rast AA, vendar pa se je pokazalo, da drugi flavoni lahko delujejo protiglivično. Sklepamo, da luščine ajde vsebujejo še druge fenole (npr. flavone), ki lahko zavirajo rast AA.

Pri glivi FG pa opazimo obraten trend. Rast je glede na kontrolo pospešena, in sicer v etanolnem izvlečku po 7. dneh ter v metanolnem izvlečku vse dni opazovanja. Poleg flavonoidov in drugih fenolov najdemo v navadni ajdi tudi druge snovi (Džafić & Oručević Žuljević, 2022) kot so proteini, vitamini, izopreni, fagopiritoli, fitosteroli, iminosladkorji idr., ki bi jih glive lahko uporabile za rast, saj je bilo fenolov, ki bi njihovo rast inhibirali, očitno premalo. V raziskavi so opazili, da sta rutin in kvercetin (dva izmed fenolov v ajdi) v nižjih koncentracijah (0,001, 0,01 in 0,1 mg/g) pozitivno vplivala na rast micelija nekaterih gliv iz rodu *Fusarium*, vključno s FG (Schönenberg s sod., 2018). Uspešnejša rast FG v metanolnem izvlečku je v nasprotju z raziskovalnim člankom Keriene s sod., 2020, kjer so opazili slabšo rast FG glede na kontrolo. V njihovem primeru je bila vsebnost fenolov  $12,8 \pm 2,1$  mg/g, kar je skoraj 10 x več kot pri nas. Vzrok za boljše rast ob prisotnosti fenolov razlagajo s tem, da naj bi šlo pri nižjih vrednostih za subletalne koncentracije, ki naj bi imele manjši inhibični oz. celo pospeševalni efekt na rast micelija (Keriere s sod., 2020).

## Zaključki

Zaradi boljše topnosti fenolov v etanolu in metanolu je bilo tam raztopljenih približno 2x več fenolov kot v vodnem izvlečku. Razlika med količino raztopljenih fenolov v etanolu ter metanolu ni bila statistično značilna, torej bi lahko sklepali, da se fenoli podobno raztapljajo v obeh navedenih topilih. Vidimo tudi, da 2x koncentrirana topila niso vsebovala 2x večje koncentracije fenolov v primerjavi z nekoncentriranimi. Najbolj so nas presenetili rezultati glive *Fusarium graminearum*, ki je v tretmaju z metanolnim ter etanolnim izvlečkom rastla bolje v primerjavi s kontrolo. To je verjetno posledica sub-letalnih koncentracij fenolov, ki imajo namesto inhibitornega lahko celo ugoden učinek na rast te glive. Po pričakovanjih pa smo pri glivi *Alternaria alternata* opazili zavrto rast v tretmaju z metanolnim izvlečkom, kar nakazuje

na določene protiglivične lastnosti v izvlečkih zrnja navadne ajde. Ostale glive so imele na vseh izvlečkih podobno rast kot njihove kontrole. Razlog je verjetno manjša koncentracija fenolov kot bi bila potrebna za protiglivično delovanje. V nadaljnjih študijah bi bilo smiselno povečati koncentracijo fenolov ter analizirati tudi vsebnost toksinov, ki jih glive izločajo, saj sama zavrta rast glive ne dokazuje tudi nujno njene nižje proizvodnje toksinov.

## Literatura

1. 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.
2. Chitarrini G, Nobili C, Pinzari F, Antonini A, De Rossi P, Del Fiore A, Procacci S, Tolaini V, Scala V, Scarpari M, Reverberi M. 2014. Buckwheat achenes antioxidant profile modulates *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. Int J Food Microbiol. 2014;189:1-10.
3. Džafić, A, & Oručević Žuljević, S. 2022. The Importance of Buckwheat as a Pseudocereal: Content and Stability of Its Main Bioactive Components. In Pseudocereals. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.102570>
4. Haminiuk CW, Plata-Oviedo MS, de Mattos G, Carpes ST, Branco IG, 2014. Extraction and quantification of phenolic acids and flavonols from *Eugenia pyriformis* using different solvents. Journal of food science and technology, 51(10), 2862–2866.
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. Kalinova, J, Radova, S. 2009. Effects of rutin on the growth of *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Fusarium solani*. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica, 44, 1: 39–47.
7. [doi.org/10.1556/APhyt.44.2009.1.5](https://doi.org/10.1556/APhyt.44.2009.1.5)
8. Keriene, I, Mankeviciene, A., Blazyte, J. 2020. The effect of antifungal extracts on the contamination of grain with microfungi. Food Science & Nutrition, 8, 3: 1375–1382. [doi.org/10.1002/fsn3.1384](https://doi.org/10.1002/fsn3.1384)
9. Kim DO, Lee CY, 2001. Extraction and isolation of polyphenolics. Current Protocols in Food Analytical Chemistry: John Wiley & Sons, Inc
10. Kim HS, Quon MJ, Kim JA, 2014. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. Redox biology 2, 187–195.
11. 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
12. Kumar D, Kalita P, 2017. Reducing Postharvest Losses during Storage of Grain Crops to Strengthen Food Security in Developing Countries. Foods 6:1-22.
13. Kraus, D, 2014. Consolidated data analysis and presentation using an open-source add-in for the Microsoft Excel® spreadsheet software. Medical Writing, 23, 25-28. DOI: 10.1179/2047480613Z.00000000181
14. Le Lay C, Coton E, Le Blay G, Chobert JM, Haertlé T, Choiset Y, Van Long NN, Meslet-Cladière L, Mounier J. 2016. Identification and quantification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria and propionibacteria. Int J Food Microbiol. 239:79-85.
15. Nobili C, De Acutis A, Reverberi M, Bello C, Leone GP, Palumbo D, Natella F, Procacci S, Zjalic S, Brunori A, 2019. Buckwheat Hull Extracts Inhibit *Aspergillus flavus* Growth and AFB1 Biosynthesis. Front Microbiol. 10:1997.
16. Russell VL, 2016. Least-Squares Means: The R Package lsmeans. Journal of Statistical Software, 69(1), 1-33. [doi:10.18637/jss.v069.i01](https://doi.org/10.18637/jss.v069.i01)

17. Schneider, C. A, Rasband, W. S, & Eliceiri, K. W, 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. doi:10.1038/nmeth.2089
18. Schöneberg, T, Kibler, K, Sulyok, M, Musa, T, Bucheli, T. D, Mascher, F, Bertossa, M., Voegelé, R. T., Vogelgsang, S, 2018. Can plant phenolic compounds reduce *Fusarium* growth and mycotoxin production in cereals?. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35, 12: 2455–2470. doi.org/10.1080/19440049.2018.1538570
19. Taiz L, Zeiger E, 2006. *Plant physiology*. Fourth Edition. Sunderland Massachusetts.
20. Hothorn H, Bretz F, Westfall P, 2008. Simultaneous Inference in General Parametric Models. *Biometrical Journal* 50(3), 346--363.
21. Vombergar B, 2010. Rutin v frakcijah zrn navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench) in tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.). Biotehniška fakulteta. Oddelek za agronomijo. Univerza v Ljubljani. Ljubljana. Doktorska disertacija, 147 str.
22. 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.
23. Zi J, Peng B, Yan W, 2007. Solubilities of rutin in eight solvents at T = 283.15, 298.15, 313.15, 323.15, and 333.15 K. *Fluid Phase Equilibria* 261(1-2), 111-114.
24. Zabka, M, Pavela, R, 2013. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. *Chemosphere*, 93, 6: 1051–1056. doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.076

# Vpliv izvlečkov iz luščin zrn tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum*) na rast izbranih patogenih gliv

Tamara Dokmanović, Barbara Domevščik, Simona Katrin Galun, Vid Golič, Mirjam Kerin

Študij molekularne in funkcionalne biologije, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Namen dela je bil preučiti vpliv izvlečkov iz luščin zrnja tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum*) na rast izbranih patogenih gliv. Pričakovali smo, da bodo izvlečki upočasnili rast gliv in da bosta metanolna izvlečka pri tem najbolj učinkovita.
- Z namakanjem luščin zrna tatarske ajde v izbranih topilih, smo pripravili etanolni, metanolni in vodni izvleček ter iz etanolnega in metanolnega nato pripravili še 2-krat koncentriran izvleček. V vseh smo določili skupne fenole z uporabo Folin-Ciocalteu metode. Za analizo delovanja izvlečkov na izbrane vrste patogenih gliv smo izvedli protiglivne teste na gojiščih PDA z dodanim izvlečkom in spremljali njihovo rast na 3., 7. in 10. dan.
- Najvišja vsebnost fenolov je bila v koncentriranem metanolnem in etanolnem izvlečku. Metanolni in koncentrirana etanolni in metanolni izvlečki tatarske ajde so imeli najmočnejši učinek na glivo *Fusarium oxysporum*, saj so uspeli statistično značilno zavreti njeno rast v primerjavi s kontrolo. Vodni izvleček je statistično značilno zmanjšal rast glive *Alternaria infectoria* glede na kontrolo.
- Iz dobljenih rezultatov ni mogoče potrditi ali ovreči naših hipotez, saj razlike med vplivi različnih izvlečkov na rast patogenih gliv niso bile statistično značilne. Vseeno smo uspeli dokazati nekaj statistično značilnih razlik pri rasti posameznih gliv glede na njihovo kontrolo, zato bi bilo smiselno poskus ponoviti z nekaj izboljšavami, posebej pri pripravi izvlečkov.

**Ključne besede:** fenoli, rutin, protiglivni test, *Alternaria*, *Fusarium*

## Uvod

V današnjem svetu je veliko pozornosti usmerjeno v reševanje okoljskih problemov in iskanje trajnostnih rešitev. Eno izmed glavnih tegob predstavlja zagotavljanje oskrbe s hrano, saj kar 30 % pridelka zavržemo zaradi okužb in bolezni, večinoma kot posledica okužb s patogeni. Sintetični pesticidi so zelo obremenjujoči za okolje in imajo določene negativne vplive na zdravje ljudi - povečano tveganje za nastanek raka, respiratorne in reproduktivne motnje itd. (Nobili in sod., 2019). Fungicidi so na splošno znani kot bolj varni v primerjavi z ostalimi vrstami pesticidov, vendar novejša raziskava kažejo na ravno obratno sliko. Ostanki kemikalij iz fungicidov se kopičijo, kar predstavlja veliko breme za okolje (Mesnage in sod., 2014). Tako se pojavlja velika potreba po alternativnih izdelkih za preprečevanje glivnih okužb. Eno takšnih možnosti predstavljajo naravne molekule izolirane iz rastlinskega tkiva, na primer bioaktivne učinkovine iz tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.).

Tatarska ajda spada v družino dresnovk (Polygonaceae). Skupaj z drugimi vrstami ajde jo uvrščamo med psevdožita in je poleg navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench) pomembno živilo v prehrani ljudi. Največje pridelovalke tatarske ajde so azijske države: Kitajska, Butan, Nepal in Indija, manjše količine pa jo pridelujejo tudi evropske države: Nemčija, Luksemburg in Belgija (Bonafaccia in sod., 2003).

Fitokemijske študije v zadnjih letih razkrivajo pomembno vlogo sekundarnih metabolitov tatarske ajde, saj imajo ti pozitivne učinke na zdravje ljudi (Zou in sod., 2021). Prav različna sestava in koncentracija sekundarnih metabolitov predstavljata glavne razlike med navadno in tatarsko ajdo. Okus tatarske ajde je v primerjavi z navadno bolj grenak, saj vsebuje višjo koncentracijo flavonoidov (Fabjan in sod., 2003). Med njimi najvišji odstotek zaseda rutin, katerega je v zrnih tatarske ajde lahko do 81 mg/g, medtem ko ga je v navadni ajdi približno 0,2 mg/g (Wijngaard in Arendt, 2006).

Namen raziskave je bil preučiti vpliv metanolnega, etanolnega in vodnega izvlečka iz luščin zrn tatarske ajde na rast izbranih patogenih gliv. V okviru raziskave smo testirali naslednje hipoteze: i) Vodni, etanolni, koncentriran etanolni, metanolni in koncentriran metanolni izvleček iz luščin tatarske ajde upočasnijo rast patogenih gliv. ii) Metanolni izvleček iz luščin tatarske ajde je učinkovitejši pri upočasnjevanju rasti patogenih gliv od vodnih in etanolnih izvlečkov.

## Materiali in metode

### Priprava in karakterizacija izvlečkov

Luščine semen tatarske ajde smo zmelili v kavnem mlinčku in jih nato še dodatno strli v terilnici. Po 40 g luščin smo namočili v 400 mL pripravljene topila (96 % etanol, metanol in destilirana avtoklavirana voda). Vse tri mešanice smo vpeli v stresalnik za 24 h (175 obratov/min, 25°C). Izvlečke smo grobo prefiltrirali skozi filter papir. Iz izvlečka etanola in metanola smo pripravili še 2-kratno koncentracijo izvlečka, in sicer tako, da smo izvleček skoncentrirali na rotacijskem uparjalniku. Postopek je prikazan na Sliki 1.

Izkoristek izvlečka smo določili tako, da smo stehali prazno urno stekelce (X1), nanj nanesti 2 mL izvlečka in po sušenju ponovno stehali urno steklo s posušenim izvlečkom (X2) ter z odštevanjem (X2-X1) dobili maso izvlečka. Nato smo izračunali

izkoristek izvlečka oz. Yield (v %) po formuli  $\text{Yield (\%)} = (W1 \times 100) / W2$ .

V pripravljenih izvlečkih smo z metodo povzeto po E. Kovačec in sod. (2016), določili skupne fenole z uporabo Folin-Ciocalteu reagenta in izmerili absorbanco pri 750 nm.

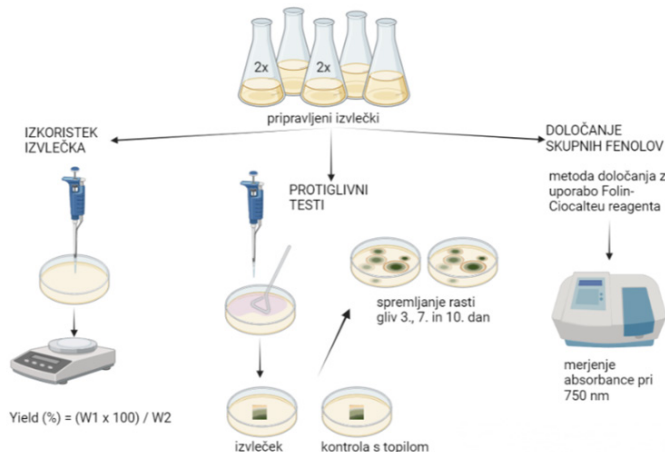


**Slika 1:** Shema priprave etanolnega, metanolnega, vodnega ter koncentriranega etanolnega in metanolnega izvlečka.

### Protiglivi testi

Na gojiščih PDA smo vzgajali sveže enotedenske kulture gliv *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* in *Aspergillus flavus*. Za protiglivične teste smo uporabili pripravljen izvleček etanola, koncentriran izvleček etanola, izvleček metanola, koncentriran izvleček metanola in vodni izvleček. Pripadajoče kontrole smo naredili s pripadajočimi topili in sicer: 96 % etanolom, metanolom in na gojišču PDA brez dodatkov (za vodni izvleček). Po 100 µL izvlečka ali topila smo nanesti na gojišče PDA in ga razmazali s stekleno Drigalski spatulo. Nato smo iz gojišča s svežo kulturo prenesli 5x5 mm kos glive in ga položili na sredino gojišča z razmazom. Postopki karakterizacije izvlečkov in nanosa izvlečkov na gojišča so prikazani na Sliki 2. Vse izpostavitve in kontrole so bile narejene za vsako glivo v 5 ponovitvah.

Rast gliv smo spremljali 3., 7. in 10. dan.



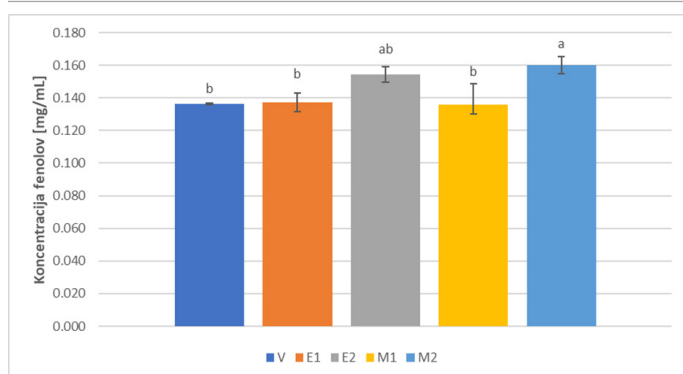
**Slika 2:** Shema izvedbe karakterizacije izvlečkov in protiglivnih testov.

### Obdelava podatkov in statistična analiza

Plošče z glivami smo slikali, podatke o rasti obdelali v programu ImageJ in jih statistično analizirali v R studiu in MS Excelu z uporabo XL-toolbox.

### Rezultati

Na Sliki 3 so prikazani rezultati ekstrakcije fenolov v posameznih izvlečkih, iz katerih je razvidno, da smo najvišji izkoristek ekstrakcije fenolov dosegli v primeru koncentriranega metanolnega izvlečka, in sicer 0,160 mg/mL izvlečka ter koncentriranega etanolnega izvlečka z izkoristkom



**Slika 3:** Povprečne koncentracije fenolov v vodnem izvlečku (V), etanolnem izvlečku (E1), koncentriranem etanolnem izvlečku (E2), metanolnem izvlečku (M1) in koncentriranem metanolnem izvlečku (M2) luščin tatarske ajde. Prikazane so povprečne vrednosti ( $n=3$ ) +/- standardne napake. Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike med posameznimi skupinami.

0,155 mg/mL izvlečka.

Na Sliki 4 so v deležih prikazani rezultati rasti posamezne glivne vrste glede na njej pripadajočo kontrolo. Na Sliki 4a vidimo, da je površina glivnega micelija vseh izbranih gliv na gojišču z etanolnim izvlečkom primerljiva ali pa celo večja od kontrole (večja od 100 %), torej nekoncentriran etanolni izvleček ni zavrl rasti opazovanih gliv. Na Sliki 4b vidimo, da je površina micelija glive *F. oxysporum* na 10. dan opazovanja na gojišču s koncentriranim etanolnim izvlečkom statistično značilno manjša (za 12 %) od kontrole. Pri ostalih glivah na 10. dan ni opažene zavrtje rasti. Gliva *F. graminearum* je po 10-ih dneh inkubacije rastla celo približno 2,5-krat bolje v primerjavi s kontrolo. Na gojiščih z metanolnim izvlečkom (Slika 4c) vidimo, da je statistično značilno zmanjšana rast glive *F. oxysporum* pri vseh opazovanih dneh glede na kontrolo. Na 10. dan je njena rast statistično značilno zmanjšana za 17 % v primerjavi s kontrolo. Ostale glive na 10. dan ne kažejo zmanjšane rasti. Koncentriran metanolni izvleček (Slika 4d) je na 10. dan statistično značilno zmanjšal rast glive *F. oxysporum* za 14 %. Hkrati pa je izboljšal rast glive *A. alternata* za skoraj 2-krat v primerjavi z njeno kontrolo na 10. dan opazovanja. Iz grafa rasti gliv na vodnem izvlečku (Slika 4e) je razvidno, da je rast vseh opazovanih gliv na 10. dan statistično značilno zmanjšana v primerjavi z njihovimi kontrolami. Največja razlika je bila pri glivi *A. infectoria*, pri kateri je bila rast v primerjavi s kontrolo za 30 % manjša, vendar pa med različnimi glivami nismo opazili statistično značilnih razlik v rasti na 10. dan opazovanja.

## Diskusija

Rutin predstavlja glavno fenolnih spojin v zrnju tatarske ajde (Koval in sod., 2020). Z metodo po Folin-Ciocalteu smo določili, da je bila najvišja vsebnost fenolov v koncentriranem metanolnem izvlečku, ki je vseboval 0,160 mg fenolov v mL izvlečka ter v koncentriranem etanolnem izvlečku z 0,155 mg fenolov na mL izvlečka. Krewson in Naghski (1952) sta ugotovila, da ima rutin boljšo topnost v metanolu (55.0 mg/mL) kot v etanolu (5.5 mg/mL), vendar v našem primeru nismo dokazali višje vsebnosti skupnih fenolov v metanolnem izvlečku. Vsi trije izvorni izvlečki (vodni, etanolni in metanolni) so vsebovali približno 0.135 mg/mL fenolov, kar sicer ustreza točki nasičenja za vodni izvleček rutina.

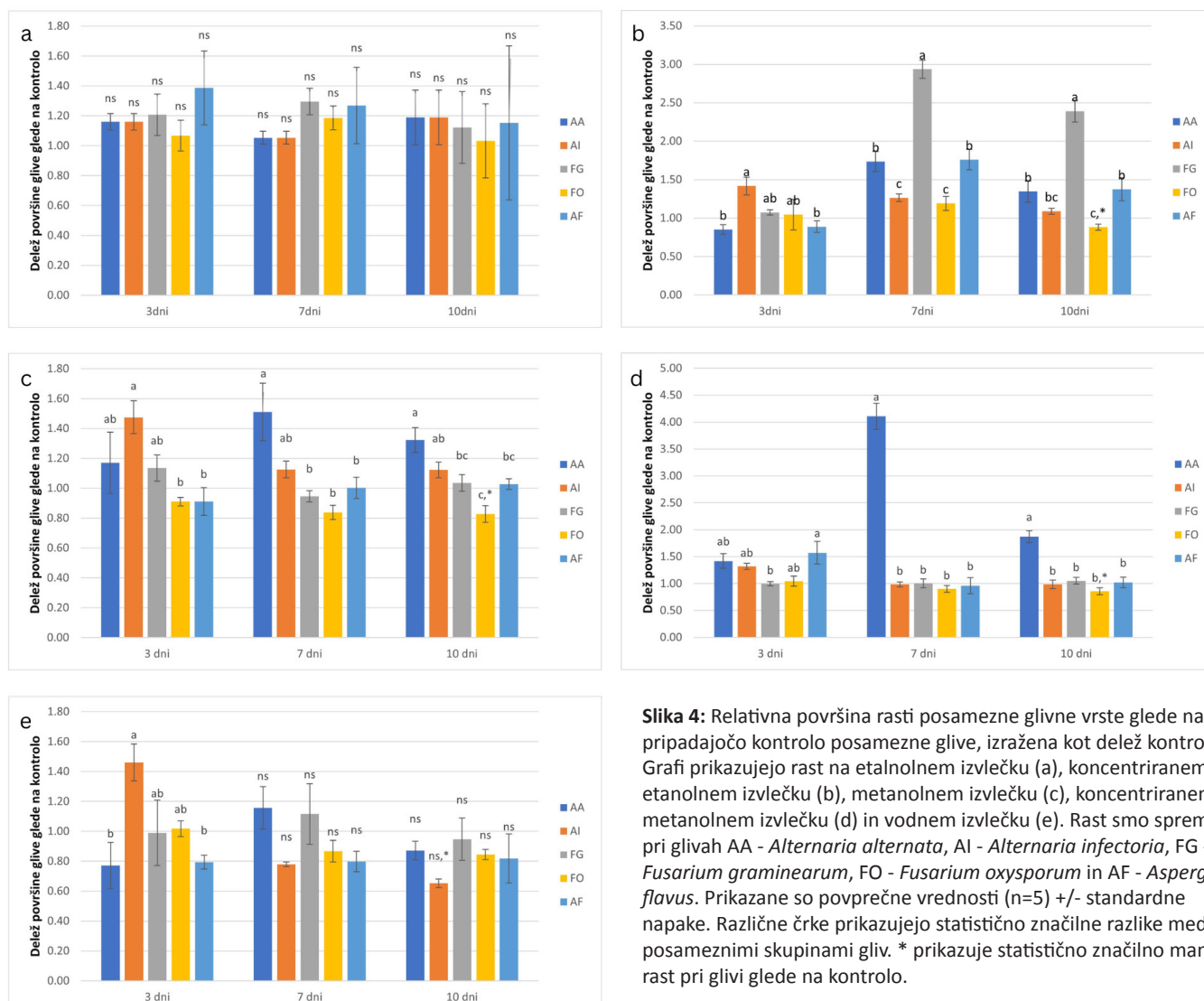
Ne glede na to, da smo izvorni metanolni izvleček 2-krat skoncentrirali z uparevanjem na rotacijskem uparjalniku, je bila končna koncentracija fenolov le 15 % višja kot pri izvornem. Ta vrednost predstavlja odklon od pričakovane vrednosti, saj bi koncentracija morala biti 2-krat višja. Razlog za to bi lahko bila oksidacija fenolov zaradi dolgotrajnega segrevanja. Folin-Ciocalteu reagent temelji na redukcijski sposobnosti fenolov, ti pa oksidirajo v prisotnosti kisika in lahko tako popačijo rezultate. V primeru rutina se reducirajo hidroksilne skupine v ketonske, vendar je rutin odpornejši na oksidacijo kot njegov aglikon kvercetin, zaradi saharida na 3' poziciji (Buchner in sod., 2006). Koncentriranje izvlečkov bi lahko v bodoče izvedli pri nižji temperaturi in nižjem tlaku. Samo ekstrakcijo pa bi bilo smiselno izvesti tudi v pogojih brez kisika.

Naši rezultati kažejo na to, da imajo izvlečki tatarske ajde najmočnejši učinek na glivo *F. oxysporum*, saj so trije (metanolni, koncentriran metanolni in koncentriran etanolni) uspeli statistično značilno zavreti njeno rast. Do zavrtja je pri etanolnem izvlečku prišlo že 3. dan, v ostalih dveh primerih pa po po 10-ih dneh. Poleg omenjenih izvlečkov pa je vodni statistično značilno zmanjšal rast vseh opazovanih gliv glede na njihove kontrole. Pri glivi *A. infectoria* smo opazili največjo razliko s kontrolo. Na podlagi teh rezultatov sklepamo, da je interakcija med komponentami izvlečka in glivo kompleksnega značaja. Pomemben dejavnik, ki bi lahko vplival na inhibicijo, je prehod aktivnih komponent čez celično steno (Oliveira in sod., 2016). Nekateri izvlečki so celo pospešili rast gliv. Menimo, da je to posledica sestave samih izvlečkov, saj so se poleg fenolov ekstrahirali še sladkorji in druga hranila, ki bi lahko pospešila rast gliv.

Na podlagi naših rezultatov ne moremo trditi, da so fenoli odgovorni za fungicidno delovanje izvlečkov, saj se učinek inhibicije rasti ni povečal z naraščajočo vsebnostjo fenolov. Učinek izvlečka bi torej lahko bila posledica delovanja drugih učinkovin, ki so se ekstrahirale poleg fenolov. Študije so v preteklosti pokazale, da kvercetin zavira oksidativno fosforilacijo in inhibira sintezo nukleinskih kislin (Aboody in sod., 2020). Ta je sicer prisoten v *F. tataricum*, vendar v nekajkrat nižji koncentraciji kot njegov glikoziliran derivat rutin. Te ugotovitve podpirajo tudi nekatere raziskave na drugih glivah, ki so pokazale, da kvercetin in rutin sama po sebi nimata fungicidnih učinkov, vendar pa delujeta sinergično z ustaljenimi fungicidi (Oliveira in sod., 2016). To je posledica slabega prehajanja preko membrane in tako za svoje delovanje potrebuje prisotnost snovi, ki jo perforira in omogoči prehod v celico. Pretekle študije na temo fungicidnih učinkov različnih vrst ajde tudi nakazujejo, da je prisotnih več vrst agensov. Tako so poleg flavanoidov prisotne še beljakovine, fenolne kisline in lipofilne molekule (Ruan in sod., 2011; Koval in sod., 2020), ki pa so bolj topne v metanolu in etanolu kot v vodi.

## Zaključki

Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko zaključimo, da izbira topila ni bistveno vplivala na učinkovitost ekstrakcije skupnih fenolov (ki smo jih določili z uporabo metode po Folin-Ciocalteu). Najvišjo vsebnost fenolov smo sicer določili v koncentriranem metanolnem izvlečku in koncentriranem etanolnem izvlečku. Zavrtje rasti v primerjavi s kontrolo smo opazili pri glivi *F. oxysporum* na gojiščih s koncentriranim in ne koncentriranim metanolnim izvlečkom in na gojišču s koncentriranim etanolnim izvlečkom ter pri glivi *A. infectoria*



**Slika 4:** Relativna površina rasti posamezne glivne vrste glede na pripadajočo kontrolo posamezne glive, izražena kot delež kontrole. Grafi prikazujejo rast na etanolnem izvlečku (a), koncentriranem etanolnem izvlečku (b), metanolnem izvlečku (c), koncentriranem metanolnem izvlečku (d) in vodnem izvlečku (e). Rast smo spremljali pri glivah AA - *Alternaria alternata*, AI - *Alternaria infectoria*, FG - *Fusarium graminearum*, FO - *Fusarium oxysporum* in AF - *Aspergillus flavus*. Prikazane so povprečne vrednosti (n=5) +/- standardne napake. Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike med posameznimi skupinami gliv. \* prikazuje statistično značilno manjšo rast pri glivi glede na kontrolo.

v primeru vodnega izvlečka. Iz dobljenih rezultatov ni mogoče potrditi ali ovreči naših hipotez, saj razlike niso bile statistično razvidne. Pri tem se je potrebno vprašati o pomembnosti vloge rutina in ostalih fenolov pri protiglavnem delovanju ter o možnosti vpliva ostalih spojin v izvlečku. Preden pridemo do zaključka, da fenoli ne delujejo fungicidno, bi v etanolu in metanolu verjetno lahko raztopili še nekajkrat več fenolov, če bi izboljšali način ekstrakcije z uporabo drugačnega razmerja med luščinami in topilom (več topila) in z bolj fino mehansko obdelavo luščin. Smiselno bi bilo uporabiti tudi bolj koncentrirane izvlečke (recimo 4-krat skoncentriran metanolni izvleček). Sklepamo namreč, da bi višja končna koncentracija fenolnih učinkovin statistično značilno zmanjšala rast gliv. Prav tako je potrebno poudariti, da je možen vpliv človeške napake, še posebej pri nanašanju izvlečkov na gojišče. Smiselno bi bilo ponoviti raziskavo z vmešanim izvlečkom v gojišče, pri čemer bi se le-ta bolj enakomerno razporedil po gojišču. Poleg tega bi bilo koristno povečati število ponovitev, kar bi izboljšalo natančnost rezultatov.

## Literatura

1. Aboody MS in Mickymaray S, 2020. Anti-fungal efficacy and mechanisms of flavonoids. *Antibiotics* 9:2.
2. Bonafaccia G, Gambelli L, Fabjan N, Kreft I, 2003. Trace elements in flour and bran from common and tartary buckwheat. *Food Chemistry* 83, 1:1-5.
3. Buchner N, Krumbein A, Rohn S, Kroh LW, 2006. Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* : RCM 20, 21:3229–3235.
4. Fabjan N, Rode J, Kosir IJ, Wang Z, Zhang Z, Kreft I, 2003. Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a source of dietary rutin and quercitrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 22:6452–6455.
5. Kovačec E, Likar M, Regvar M, 2016. Temporal changes in fungal communities from buckwheat seeds and their effects on seed germination and seedling secondary metabolism. *Fungal Biology* 120, 5:666-678.
6. Koval D, Plocková M, Kyselka J, Skřivan P, Sluková M, Horáčková Š, 2020. Buckwheat secondary metabolites: potential antifungal agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68, 42:11631–11643.
7. Kreft I, Germ M, Golob A, Vomberger B, Vollmannová A, Kreft S, Luthar Z, 2022. Phytochemistry, bioactivities of metabolites, and traditional uses of *Fagopyrum tataricum*. *Molecules* 27, 20:7101.
8. Krewson CF in Naghski J, 1952. Some physical properties of rutin. *Journal of the American Pharmaceutical Association* 41, 11:582–587.
9. Mesnage R, Defarge N, Spiroux De Vendômois J, Seralini GE, 2014. Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. *BioMed Research International* 1:13-27.
10. Nobili C, de Acutis A, Reverberi M, Bello C, Leone GP, Palumbo D, Natella F, Procacci S, Zjalic S, Brunori A, 2019. Buckwheat hull extracts inhibit *Aspergillus flavus* growth and AFB1 biosynthesis. *Frontiers in Microbiology* 10:13-23.



12. Oliveira VM, Carraro E, Auler ME, Khalil NM, 2016. Quercetin and rutin as potential agents antifungal against *Cryptococcus* spp. *Brazilian Journal of Biology* 76, 4: 1029–1034.
13. Ruan JJ, Chen H, Shao JR, Wu Q, Han XY, 2019. An antifungal peptide from *Fagopyrum tataricum* seeds. *Peptides* 32, 6:1151–1158.
14. Wijngaard HH, Arendt EK, 2006. Buckwheat. *Cereal Chemistry* 83, 4:391–401.
15. Zou L, Wu D, Ren G, Hu Y, Peng L, Zhao J, Garcia-Perez P, Carpena M, Prieto MA, Cao H, Cheng KW, Wang M, Simal-Gandara J, John OD, Rengasamy KRR, Zhao G, Xiao J, 2021. Bioactive compounds, health benefits, and industrial applications of Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 3:1-17.

# Vpliv izvlečkov navadnega tolščaka (*Portulaca oleracea*) na rast izbranih patogenih gliv

Saša Casar, Vaso Đokić, Samo Grgurevič, Gregor Jazbec

Študij molekularne in funkcionalne biologije, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Da bi potencialno zmanjšali izgube hrane zaradi glivnih okužb zrn smo v tem članku preverili možnost proti glivnega delovanja različnih izvlečkov navadnega tolščaka.
- Za pripravo rastlinskih izvlečkov smo uporabili različna topila in sicer metanol, etanol in vodo. Vsebnost fenolnih spojin v različnih izvlečkih smo določili z uporabo metode Folin-Ciocalteu reagenta.
- Največjo vsebnost sekundarnih metabolitov smo izmerili v dvakrat koncentriranem metanolnem izvlečku. Koncentracija fenolov je bila z izjemo vodnega izvlečka med izvlečki podobna.
- Pokazali smo, da je rast gliv na izvlečkih kompleksen pojav. Kljub temu smo pokazali statistično značilno nižjo rast glive *Fusarium graminearum* na vseh izvlečkih. Tudi nekatere druge glive se statistično značilno slabše rastle na nekaterih gojiščih z izbranim izvlečkom, kot npr. gliva *Fusarium oxysporum* na vodnem izvlečku.

**Ključne besede:** antimikotik, glive, izvleček, polifenoli

## Uvod

Navadni tolščak (*Portulaca oleracea*) je zelnata enoletnica polegla do pokončne rasti, ki se pojavlja v zmernih klimatih Evrope, ZDA, Kanade, Nove Zelandije, Avstralije in Indije (Martinčič s sod., 2010; Masoodi s sod., 2011). V Sloveniji se pojavljata dve podvrsti, *P. oleracea*, ki je splošno prisotna po celotni državi in *P. oleracea sativa*, ki je ponekod gojena in podivjana (Martinčič s sod., 2010).

Navadni tolščak je zaradi svojih farmakoloških lastnosti pogosto uporabljen v zdravilstvu po vsem svetu (Zhou s sod., 2015). Banerjee in Mukherjee (2002) sta ugotovila, da vodni izvleček navadnega tolščaka zavira rast glive *Fusarium sp.*, in da etanolni izvleček iste rastline zavira rast glive *Rhizopus artocarpus*. Prav tako naj bi etanolni izvleček navadnega tolščaka zaviral rast glive vrste *Trichophyton mentagrophytes* (Oh s sod., 2000). Kontaminacija z glivnimi patogeni namreč vodi do izgub pridelka in kakovostnih sprememb zrnja med rastjo in/ali skladiščenjem pridelka (Wokorach s sod., 2021). Nekateri patogeni gliv, ki se prenašajo s semeni, proizvajajo mikotoksine, ki povzročijo poslabšanje kakovosti zrn, slabšo kalitev ter zmanjšano odpornost kalic (Goko s sod., 2021).

Mikotoksini so sekundarni metaboliti, ki jih proizvajajo nekatere filamentozne glive in lahko povzročijo resne bolezni pri ljudeh in živalih. Mikotoksigene glive na splošno niso agresivni povzročitelji bolezni, vendar so pogosto dobro prilagojene na rast na substratih z nizko vsebnostjo vlage in se lahko naselijo v skladiščenih semenih (Martín s sod., 2022). Preprečevanje glivnih okužb na semenih oziroma zrnih je torej ključno za reševanje problema globalne oskrbe s hrano.

Polifenoli so sekundarni metaboliti višjih rastlin, ki igrajo vlogo pri prilagajanju rastline na spremembe v abiotičnih dejavnikih okolja in pri obrambi pred patogeni ali herbivori (Daglia, 2012). Med drugim so mnoge polifenolne spojine učinkovite v zaviranju rasti različnih vrst gliv (Yang in Jiang, 2015; Liu s sod., 2021; Khanzada s sod., 2021). Posledično smo se odločili, da bi bilo smiselno preveriti vsebnost polifenolov v naših vzorcih suhih rastlin. V literaturi (Fernández-Poyatos s sod., 2021) poročajo, da je metanol najprimernejši za ekstrakcijo fenolnih spojin. Navadni tolščak je sicer bogat s polifenoli, ki vključujejo fenolne kisline in flavonoide. Do zdaj so že identificirali spojine kot so kofeinska kislina, ferulinska kislina, kemferol, kvercetin in rutin, med sekundarnimi metaboliti pa v zadnjem času namenjajo več pozornosti razredu alkaloidov, imenovanim ciklo-dopa amini ali oleraceini – gre za spojine, ki kažejo podobno močne ali še močnejše

antioksidativne lastnosti kot jih imajo nekateri naravni antioksidanti na primer vitamin C in vitamin E (Fernández-Poyatos s sod., 2021). Naš cilj je bil, da poskušamo potrditi protiglivne lastnosti različnih izvlečkov posušenega nadzemnega dela rastline navadnega tolščaka. Za ta namen smo izbrali pet glivnih vrst, ki so pomembne kot povzročitelji ekonomske škode na poljščinah (npr. rod *Fusarium*), ali pa v določenih pogojih povzročajo zdravstvene težave pri ljudeh (Sanchez in Bush, 2001; Schuster s sod., 2002; Fravel s sod., 2003; Goswami in Kistler, 2004; Amaike in Keller, 2011). Pri tem smo predvidevali, da bo vsaj pri kakšni vrsti glive rast relativno manjša glede na kontrolo ob uporabi določenega izvlečka navadnega tolščaka.

Predvidevali smo tudi, da se bodo učinkovitosti med izvlečki razlikovale pri posameznih vrstah gliv.

## Materiali in metode

### Priprava izvlečkov

Predhodno posušene nadzemne dele navadnega tolščaka smo zmleli v terilnici in 10 gramov prahu stresli v erlenmajerico in dodali 100 mL pripadajočega topila (bidestilirane avtoklavirane vode, etanola, metanola). Mešanico smo stresali 24 h na stresalniku. Tako smo pridobili vodni, etanolni in metanolni izvleček. Nato smo del etanolnega in metanolnega izvlečka še 2x skoncentrirali z izhapevanjem na rotavaporju. Suho maso snovi v izvlečku smo določali tako, da smo 2 ml izvlečka na objektum stekelcu posušili v sušilniku (na 55 °C) do suhega oz. z izhapevanjem do suhega preko noči (Tabela 1).

### Določanje vsebnosti sekundarnih metabolitov (fenolov) v izvlečkih navadnega tolščaka.

Vsebnost fenolnih spojin smo določili z uporabo metode (Kovačec s sod., 2016; prirejeno po Kreft s sod., 2013) z uporabo Folin-Ciocalteu reagenta. 100 µL vzorčnega izvlečka smo dodali 750 µL destilirane vode in 50 µL FC reagenta. Po treh minutah inkubacije smo vsakemu vzorcu dodali 100 µL 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Raztopino smo inkubirali še 60 minut v temi, nato smo vzorcem pomerili absorbanco pri 750 nm.

### Glivni testi

Izbrane sveže kulture gliv vrst *Alternaria alternata* (AA), *Alternaria infectoria* (AI), *Aspergillus flavus* (AF), *Fusarium graminearum* (FG) in *Fusarium oxysporum* (FO) smo najprej 10 dni gojili na 2 % (m/v) gojiščih PDA (potato dextrose agar) z dodanim antibiotikom kloramfenikolom pri 22 °C. 2 % gojišče PDA smo pripravili po naslednjem protokolu: zatehtali smo 15g PDA, dodali 35 mg kloramfenikola (za pripravo koncentracije 50 mg/L) in dolili 700 mL destilirane vode ter avtoklavirali in nato razlili v 90 mm plastične petrijevke. Gojišča so bila pred inokulacijo z glivo prepojena s 100 µl izvlečka navadnega tolščaka raztopljenega v vodi, etanolu ali metanolu. Izvlečke smo v gojišča vtirli z razmazom s spatulo Drigalski do suhega.

**Tabela 1.** Meritve uspešnosti prve ekstrakcije

	Razlika v masi (sušilnik) na 100 mL raztopine [g]	Razlika v masi (zrak) na 100 mL raztopine [g]	Povprečna razlika v masi [g]	Suha masa [%]
Vodni izvleček	1,7	2,24	1,97	19,7
Etanolni izvleček	0,51	0,72	0,615	6,15
Etanolni izvleček (2x koncentriran)	1,35	/	/	13,5
Metanolni izvleček	1,15	/	/	11,45
Metanolni izvleček (2x koncentriran)	1,99	/	/	19,88

Na kontrolna gojišča smo dodali 100  $\mu$ l pripadajočega topila (etanola, metanola oz. brez dodatka za vodno kontrolo). Inokulati gliv so bili pridobljeni iz predhodno pridobljenih čistih kultur na 2% PDA gojiščih. Svež inokulat smo pripravili z enakomernimi 5x5 mm velikimi izsečki micelija glive, ki smo ga prenesli na sredino pripadajočega gojišča. Za vsako glivo smo pripravili 5 ponovitev testnih plošč (z izbranim izvlečkom) in 5 ponovitev kontrolnih plošč.

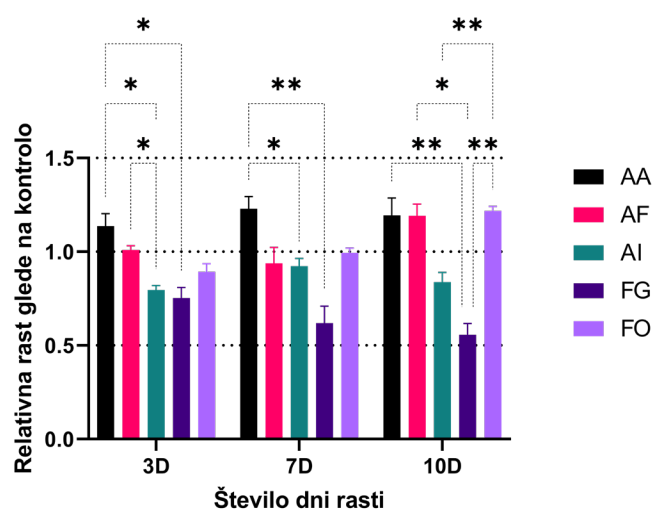
## Statistična analiza

Podatke o rasti gliv smo pridobili z merilnim orodjem v programu ImageJ (Fiji). Pridobljene meritve rasti gliv smo zbrali in normalizirali na kontrole v programu MS Excel. Enosmerne in Dvosmerne ANOVA analize (z zaporednimi ali brez zaporednih meritev) z Geisser-Greenhouse popravki (za dvosmerne ANOVA analize) in pripadajočimi Tukeyevimi post hoc testi so bile narejene v programu GraphPad Prism ver. 9.5.0 za OS Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com). Kot statistično pomembno razliko (alfa vrednost) smo privzeli 0,05 (interval zaupanja 95%).

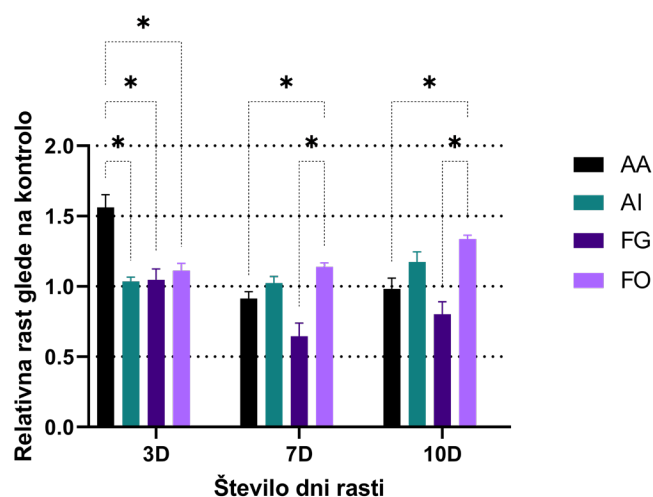
## Rezultati

### Relativna rast gliv glede na kontrolo

Dvosmerne analize ANOVA z zaporednimi meritvami (repeated measures) je za vse posamezne izvlečke (slike 1-5) pokazala, da ima čas rasti značilno različno vpliv na relativno rast posamezne vrste (interakcija časa rasti in vrste glive). Pri vseh tretmajih je P vrednost za interakcijo faktorjev  $< 0,0001$  (ekstremno značilna interakcija) razen v primeru etanalnega izvlečka, kjer je P vrednost 0,02 (značilna interakcija). Ker je interakcija tako značilna, najverjetneje pomeni da so razlike med vrstami gliv in njihova interakcija z izvlečkom preko časa bolj kompleksne, zato je težko iz nadaljnje analize težko izpeljati natančne zaključke. Ker je pri etanolnem izvlečku interakcija manjša, lahko sklepamo, da ima etanolni izvleček bolj konsistenten vpliv na različne vrste gliv. Pri vodnem, etanolnem in koncentriranem etanolnem izvlečku na 3. dan (slike 1-3) opazimo značilne razlike v rasti med AA in ostalimi glivami z izjemo AF. AA v primerjavi z ostalimi glivami (izjema AF) na 3. dan raste relativno bolje ne glede na izvleček. Za vse tretmaje je analiza pokazala, da je vrsta glive ekstremno značilen dejavnik za relativno rast glede na kontrolo. Za čas kot dejavnik je dvosmerne analize razen v primerih koncentriranega etanalnega izvlečka ( $P < 0,001$ ) in vodnega izvlečka ( $P = 0,005$ ) pokazala, da ta nima zelo značilnega vpliva na relativno rast glede na kontrolo ( $P = 0,06 - 0,19$ ). V primeru vodnega izvlečka in koncentriranega etanalnega izvlečka se torej najverjetneje preko časa spreminja proti glivna učinkovitost tretmaja. Po desetih dneh je glede na kontrolo najslabše rasla FG v metanolnih in vodnem izvlečku. FO slabše od kontrole raste z majhno standardno napako v vodnem izvlečku, vendar rast ni statistično različna od kontrole. Glede na kontrolo na deseti dan značilno bolje raste FO na etanolnih izvlečkih in AF na koncentriranem metanolnem izvlečku. Ujemanje (matching) je bilo za analizo z zaporednimi meritvami učinkovito samo za metanolni izvleček in koncentriran metanolni izvleček. To nakazuje, da so bile meritve znotraj posamezne glivne vrste med seboj zelo nekonsistentne. Razen za metanolni in koncentriran

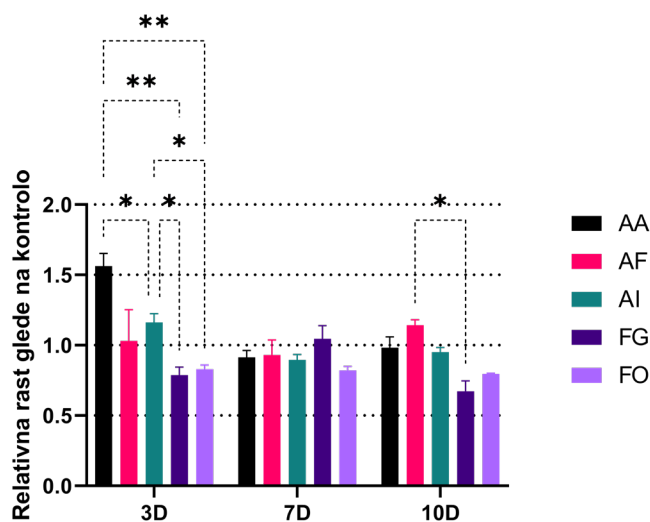


**Slika 1:** Primerjava relativne rasti gliv na gojiščih z dodatkom etanolnega izvlečka navadnega tolščaka, glede na kontrolno po dnevih (3., 7. in 10. dan meritev). AA - *Alternaria alternata*, AF - *Aspergillus flavus*, AI - *Alternaria infectoria*, FG - *Fusarium graminearum*, FO - *Fusarium oxysporum*. Zvezdice prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami podatkov: (\*\*\*) $P < 0,001$  (\*\*) $P < 0,01$  (\*) $P < 0,05$ . Brki predstavljajo standardno napako povprečij (SEM).

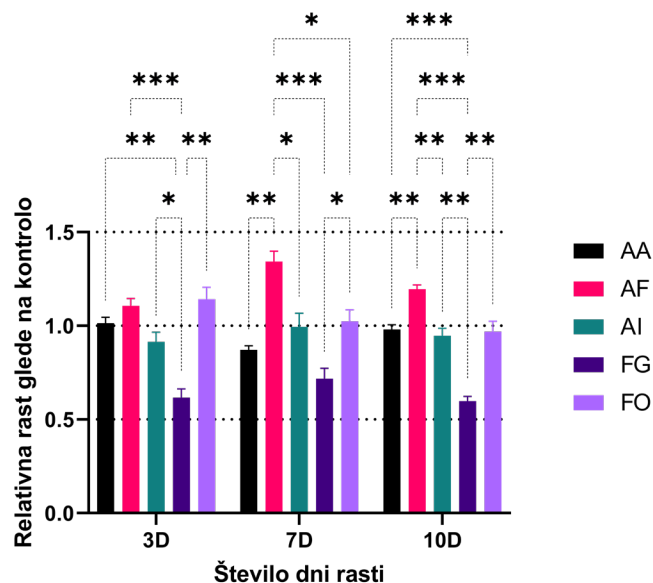


**Slika 2:** Primerjava relativne rasti gliv na gojiščih z dodatkom 2x etanolnega izvlečka navadnega tolščaka, glede na kontrolno po dnevih (3., 7. in 10. dan meritev). AA - *Alternaria alternata*, AF - *Aspergillus flavus*, AI - *Alternaria infectoria*, FG - *Fusarium graminearum*, FO - *Fusarium oxysporum*. Zvezdice prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami podatkov: (\*\*\*) $P < 0,001$  (\*\*) $P < 0,01$  (\*) $P < 0,05$ . Brki predstavljajo standardno napako povprečij (SEM). AF odstranjen zaradi pomanjkanja meritev in preveč odstopajočih vrednosti.

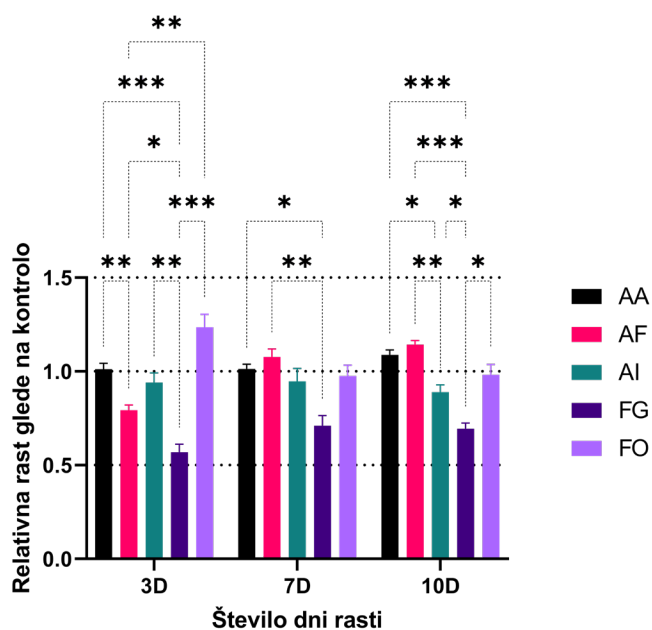
metanolni izvleček so bila števila vzorcev torej premajhna za zanesljivo analizo. Pri vseh tretmajih lahko med vrstami gliv pri določeni časovni točki zasledimo značilne razlike, razen pri vodnem izvlečku 7. dan (slika 3). Največje razlike so bile pri metanolnem in koncentriranem metanolnem izvlečku (sliki 4, 5). Tam se na 3. in 10. dan opazi zelo značilno razliko v relativni rasti glede na kontrolo med FG in vsemi ostalimi vrstami gliv (FG ima manjšo relativno rast v primerjavi z ostalimi vrstami na isti dan). Na 7. dan so bile razlike med vrstami pri nekoncentriranem metanolnem izvlečku manjše.



**Slika 3:** Primerjava relativne rasti gliv na gojiščih z dodatkom vodnega izvlečka navadnega toliščaka, glede na kontrolno po dnevih (3., 7. in 10. dan meritev). AA - *Alternaria alternata*, AF - *Aspergillus flavus*, AI - *Alternaria infectoria*, FG - *Fusarium graminearum*, FO - *Fusarium oxysporum*. Prikazane so povprečne vrednosti +/- SE. Zvezdice prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami podatkov: (\*\*\*) $P < 0,001$  (\*\*) $P < 0,01$  (\*) $P < 0,05$ . Brki predstavljajo standardno napako povprečij (SEM).



**Slika 5:** Primerjava relativne rasti gliv na gojiščih z dodatkom 2x metanalnega izvlečka navadnega toliščaka, glede na kontrolno po dnevih (3., 7. in 10. dan meritev). AA - *Alternaria alternata*, AF - *Aspergillus flavus*, AI - *Alternaria infectoria*, FG - *Fusarium graminearum*, FO - *Fusarium oxysporum*. Zvezdice prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami podatkov: (\*\*\*) $P < 0,001$  (\*\*) $P < 0,01$  (\*) $P < 0,05$ . Brki predstavljajo standardno napako povprečij (SEM).



**Slika 4:** Primerjava relativne rasti gliv na gojiščih z dodatkom metanalnega izvlečka navadnega toliščaka, glede na kontrolno po dnevih (3., 7. in 10. dan meritev). AA - *Alternaria alternata*, AF - *Aspergillus flavus*, AI - *Alternaria infectoria*, FG - *Fusarium graminearum*, FO - *Fusarium oxysporum*. Zvezdice prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami podatkov: (\*\*\*) $P < 0,001$  (\*\*) $P < 0,01$  (\*) $P < 0,05$ . Brki predstavljajo standardno napako povprečij (SEM).

pri ostalih izvlečkih se konsistentno pri večini časovnih točk meritev pojavlja vzorec, da so značilne predvsem razlike med FG in ostalimi vrstami gliv. FG je torej očitno najbolj občutljiva vrsta na vse izvlečke v primerjavi z ostalimi vrstami gliv. Dvosmerna analiza (brez zaporednih meritev) pri posamezni časovni točki (slike 6-8) je pokazala, da vrsta glive nima enakega vpliva pri različnih tretmajih (interakcija med vrsto glive in vrsto izvlečka). P vrednost za interakcijo faktorjev je  $< 0,0001$  za vse časovne točke. Tako kot že prej omenjeno, to nakazuje na kompleksne interakcije. Vrsta glive je pri vseh časovnih točkah ekstremno značilen dejavnik za relativno rast glede na kontrolno.

Iz rezultatov je razvidno, da so vsi izvlečki najbolj zavrli rast glive FG, saj je bila njena rast na 10. dan opazovanja zavrtja v primerjav v povprečju za 25 do skoraj 50 % glede na kontrolno. Prav tako je razvidno, da je imela gliva FO v vodnem izvlečku pri vseh časovnih točkah meritev nižjo relativno rast glede na kontrolno, v povprečju okoli 25 %.

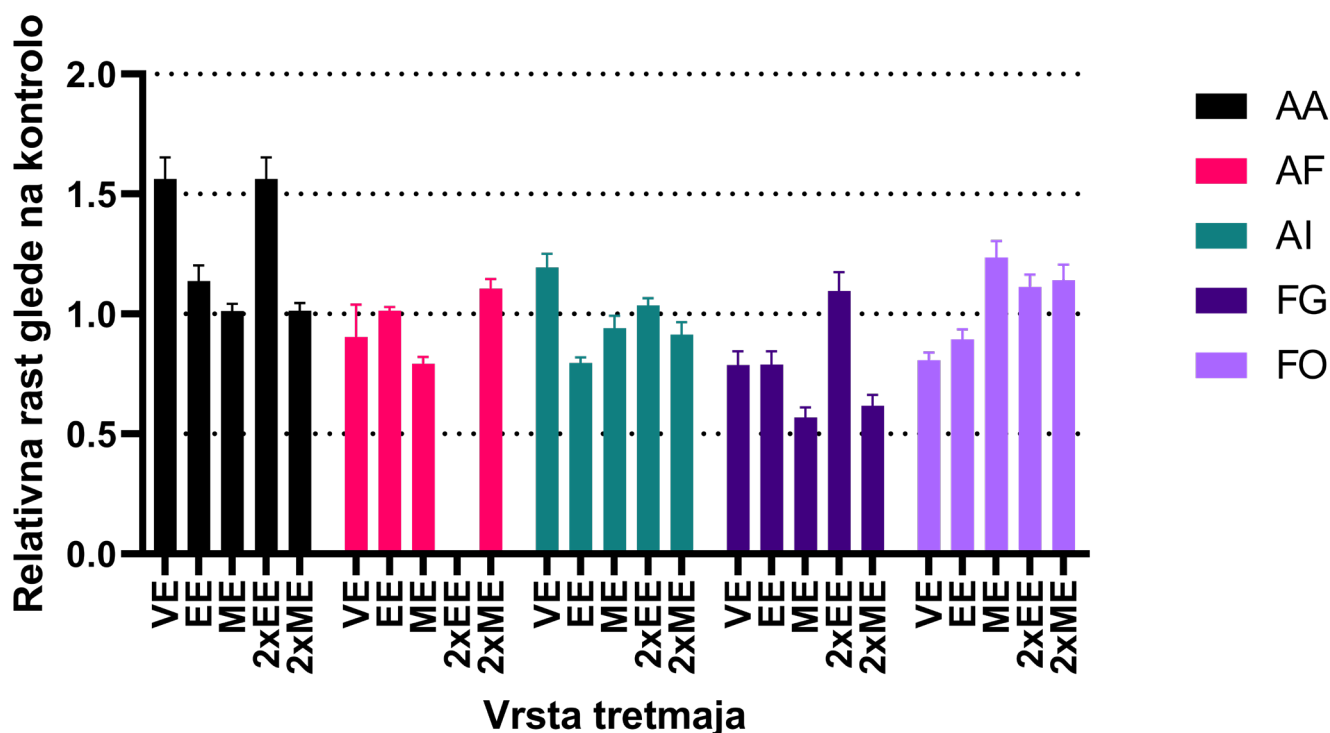
### Analiza koncentracije fenolov

Največjo koncentracijo fenolov smo izmerili v etanolnem, dvakrat koncentriranem etanolnem in dvakrat koncentriranem metanolnem izvlečku, najmanjšo vsebnost fenolov pa v vodnem izvlečku (Slika 9). Statistično značilno razliko opazimo le med VE in koncentriranim EE. Standardna napaka je pri koncentriranih ekstraktih visoka.

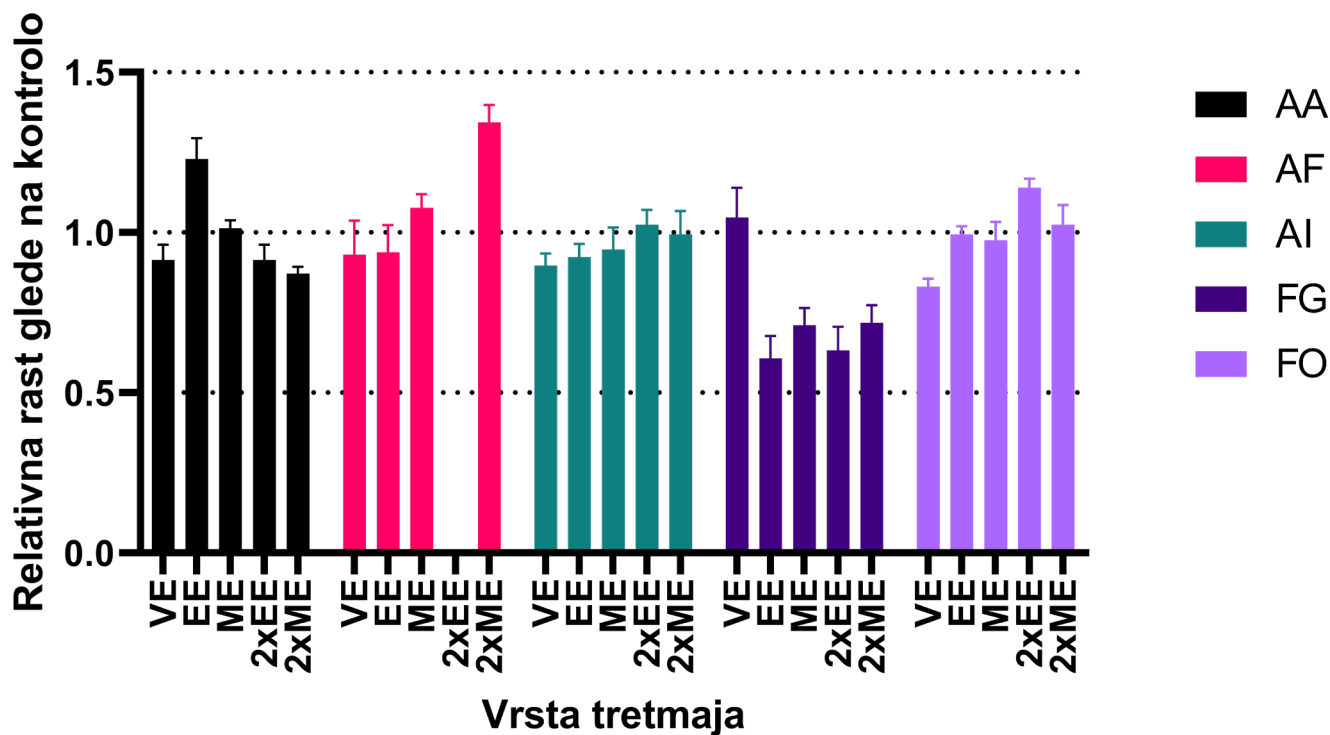
### Diskusija

Iz naših rezultatov je razvidno, da so skoraj vse glive rastle primerljivo dobro oziroma celo bolje na gojiščih z dodanimi različnimi izvlečki navadnega toliščaka, kot pa na kontrolnih gojiščih. Izjemo predstavlja gliva *F. graminearum*, za katero

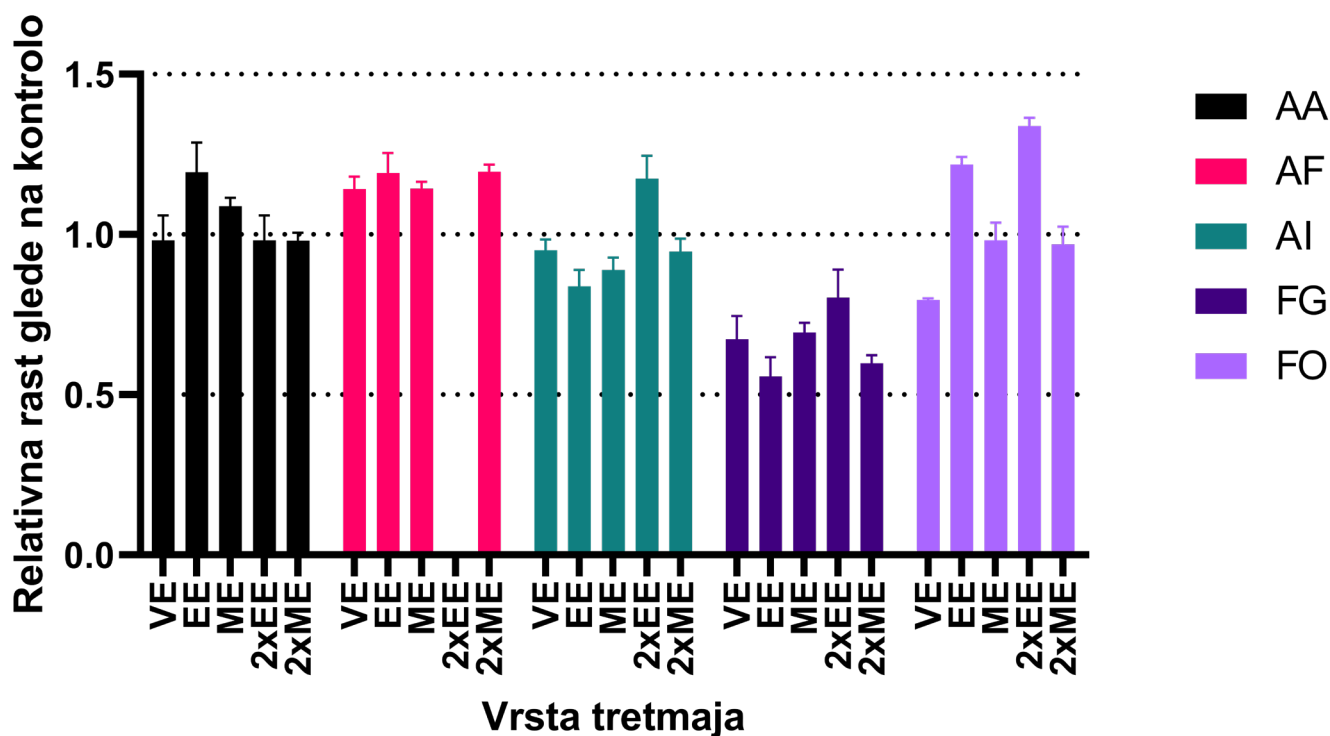
(slika 4), medtem ko so bile pri koncentriranem metanolnem izvlečku (slika 5) predvsem opazne razlike v rasti ostalih gliv v primerjavi z AF, največja razlika je bila med AF in FG. Tudi



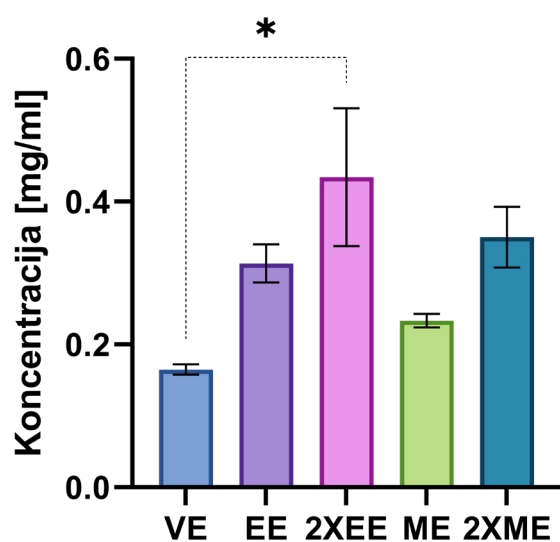
**Slika 6:** Primerjava relativne rasti gliv na gojiščih z dodatkom različnih izvlečkov navadnega toliščaka na tretji dan rasti, glede na kontrolno. AA - *Alternaria alternata*, AF - *Aspergillus flavus*, AI - *Alternaria infectoria*, FG - *Fusarium graminearum*, FO - *Fusarium oxysporum*. VE – vodni izvleček, EE – etanolni izvleček, 2XEE koncentriran metanolni izvleček, ME – metanolni izvleček, 2XME – koncentriran metanolni izvleček Za P vrednosti glej rezultate analize oz. znotraj posamezne vrste izvlečka v določenem dnevu rasti (slike 1-5). Brki predstavljajo standardno napako povprečij (SEM). AF 2xEE odstranjen zaradi pomanjkanja meritev in preveč odstopajočih vrednosti.



**Slika 7:** Primerjava relativne rasti gliv na gojiščih z dodatkom različnih izvlečkov navadnega toliščaka na sedmi dan rasti, glede na kontrolno. AA - *Alternaria alternata*, AF - *Aspergillus flavus*, AI - *Alternaria infectoria*, FG - *Fusarium graminearum*, FO - *Fusarium oxysporum*. VE – vodni izvleček, EE – etanolni izvleček, 2XEE koncentriran metanolni izvleček, ME – metanolni izvleček, 2XME – koncentriran metanolni izvleček Za P vrednosti glej rezultate analize oz. znotraj posamezne vrste izvlečka v določenem dnevu rasti (slike 1-5). Brki predstavljajo standardno napako povprečij (SEM). AF 2xEE odstranjen zaradi pomanjkanja meritev in preveč odstopajočih vrednosti.



**Slika 8:** Primerjava relativne rasti gliv na gojiščih z dodatkom različnih izvlečkov navadnega tolščaka na 10. dan rasti, glede na kontrolno. AA - *Alternaria alternata*, AF - *Aspergillus flavus*, AI - *Alternaria infectoria*, FG - *Fusarium graminearum*, FO - *Fusarium oxysporum*. VE – vodni izvleček, EE – etanolni izvleček, 2XEE koncentriran metanolni izvleček, ME – metanolni izvleček, 2XME – koncentriran metanolni izvleček. Za P vrednosti glej rezultate analize oz. znotraj posamezne vrste izvlečka v določenem dnevu rasti (slike 1-5). Brki predstavljajo standardno napako povprečij (SEM). AF 2xEE odstranjen zaradi pomanjkanja meritev in preveč odstopajočih vrednosti.



**Slika 9:** Primerjava koncentracij fenolov v različnih topilih. VE – vodni izvleček, EE – etanolni izvleček, 2XEE koncentriran etanolni izvleček, ME – metanolni izvleček, 2XME – koncentriran metanolni izvleček. Zvezdica prikazuje statistično značilne razlike med skupinami podatkov: (\*) $P < 0,05$ . Brki predstavljajo standardno napako povprečij (SEM).

se kaže, da vse različice izvlečkov zavirajo njeno rast pri večini časovnih točk (določene izjeme). Tudi *F. oxysporum* je imela pri dodatku vodnega izvlečka zavrto rast, vendar podobnega učinka nismo zasledili pri ostalih topilih. Podobno sta za glive iz rodu *Fusarium* ugotovila Banerjee in Mukherjee (2002), in sicer, da že 0,25% vodni izvleček zavira rast *Fusarium* sp., vendar za razliko od nas nista pokazala, da izvlečki v etanolu zavirajo rast gliv (samo za FG). Zavrto rast sta pokazala tudi pri koncentracijah nad 1% v heksanu. Dejstvo, da pri drugih glivnih vrstah nismo mogli potrditi proti glivnega delovanja, oz. smo pokazali celo višjo rast v primerjavi s kontrolno, morda kaže na biološko dostopnost sekundarnih metabolitov npr. polifenolov za določene vrste gliv kot posledica razlik med metabolizmi gliv, spremembi dostopnosti ob izpostavitvi sekundarnih metabolitov določenemu topilu, ki topljenec potencialno denaturira oz. kombinaciji obeh ali še dodatnih pojavov. Možno je tudi, da izvleček navadnega tolščaka enostavno nima proti glivnega vpliva na ostale preizkušene vrste. Potrebna bi bila tudi več kot ena biološka ponovitev z več vzorci znotraj skupin za bolj zanesljive rezultate. Kot smo omenili že v rezultatih, smo pokazali, da je relativna rast pri določenem tretmaju tako preko časa kot pri določeni časovni točki kompleksen pojav, ki bi ga morda lahko bolje determinirali z več ponovitvami in bolj enakomernim cepljenjem gliv. Iz naših rezultatov bi lahko sklepali, da sama koncentracija fenolov ni vplivala na rast gliv. Z izjemo vodnega izvlečka, ki se je izkazal za statistično značilno različen le od koncentriranega etanolnega izvlečka, nismo pokazali nobenih statistično značilnih razlik med ekstrakti. Tudi razlika med vodnim in koncentriranim etanolnim izvlečkom je vprašljiva zaradi velike standardne napake znotraj primerjave etanolnih izvlečkov. Dopuščamo možnost, da koncentracija

fenolov sicer vpliva na rast, vendar bi za potrditev takšne predpostavke (ob upoštevanju zgoraj navedenih izboljšav) morali narediti trosmerno ANOVA analizo, ki bi kot parameter vključevala še koncentracijo fenolov. Trenutna količina podatkov je zagotovo prenizka za takšno analizo.

## Zaključek

Iz rezultatov je razvidno, da je rast gliv na izvlečkih kompleksen pojav. Kljub temu smo pokazali slabšo rast glive *Fusarium graminearum* na vseh izvlečkih pri različnih časovnih točkah. Pokazali smo tudi, da koncentracija fenolov verjetno ne vpliva na rast gliv. Nekatere glive slabše rastejo zgolj na gojiščih z dodatkom določenega ekstrakta, npr. *Fusarium oxysporum*, ki slabše raste na vodnem izvlečku. S tem smo potrdili, da določeni izvlečki navadnega tolščaka zavirajo rast nekaterih vrst gliv, vendar pa na podlagi rezultatov ne moremo zanesljivo zaključiti, da obstaja vrsta tretmaja z izvlečkom navadnega tolščaka, ki bi uspešno zavirala širok spekter ekonomsko pomembnih gliv.

## Literatura

1. Amaike S., Keller N.P. 2011. *Aspergillus flavus*. Annual Review of Phytopathology, 49: 107–133.
2. Banerjee G., Mukherjee A. 2002. Biological activity of a common weed - *Portulaca oleracea* L. II. antifungal activity. Acta Botanica Hungarica, 44: 205–208.
3. Daglia M. 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. Current opinion in biotechnology, 23: 174–181.
4. Fernández-Poyatos M. D. P., Llorent-Martínez E. J., Ruiz-Medina A. 2021. Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of *Portulaca oleracea*: Influence of the Steaming Cooking Process. Foods, 10, 1, 94.
5. Fravel D., Olivain C., Alabouvette C. 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. New Phytologist, 157: 493–502.
6. Goko M. L., Murimwa J. C., Gasura E., Rugare J. T., Ngadze E. 2021. Identification and Characterisation of Seed-Borne Fungal Pathogens Associated with Maize (*Zea mays* L.). International Journal of Microbiology. 2021: 702856
7. Goswami R.S., Kistler H.C. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. Molecular Plant Pathology, 5, 6: 515–525.
8. Khanzada B., Akhtar N., Okla M.K., Alamri S.A., Al-Hashimi A., Baig M.W., Rubnawaz S., Abdelgawad H., Hirad A.H., Haq I.U., Mirza B. 2021. Profiling of antifungal activities and in silico studies of natural polyphenols from some plants. Molecules, 26, 23: 7164.
9. Kovačec E., Likar M., in Regvar M. 2016. Temporal changes in fungal communities from buckwheat seeds and their effects on seed germination and seedling secondary metabolism. Fungal Biology, 120(5): 666–678.
10. Liu Y., Benohoud M., Galani Yamdeu J.H., Gong Y.Y., Orfila C. 2021. Green extraction of polyphenols from citrus peel by-products and their antifungal activity against *Aspergillus flavus*. Food Chemistry: X, 12: 100144.
11. Martín I., Gálvez L., Guasch L., Palmero D. 2022. Fungal Pathogens and Seed Storage in the Dry State. Plants, 11, 22: 3167
12. Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Podobnik A., Turk B., Vreš B., Ravnik V., Frajman B., Strgulc Krajšek S., Trčak B., Bačič T., Fischer M. A., Eler K., Surina B. 2010. Mala flora Slovenije, ključ za določevanje praprotnic in semenk. (T. Rejc, ured.) Tehniška založba Slovenije (2. izdaja). Ljubljana.
13. Masoodi M., Ahmad B., Showkat R.M., Zarger B., Tabasum N. 2011. *Portulaca oleraceae* L. a review. Journal of Pharmacy Research, 4, 9: 3044–3048.
14. Oh K.B., Chang I.M., Hwang K.J., Mar W. 2000. Detection of antifungal activity in *Portulaca oleracea* by a single-cell bioassay system. Phytotherapy Research, 14: 329–332.
15. Sanchez H., Bush R.K. 2001. A review of *Alternaria alternata* sensitivity. Revista Iberoamericana de Micología, 18: 56–59.
16. Schuster E., Dunn-Coleman N., Frisvad J., van Dijck P. 2002. On the safety of *Aspergillus niger* - a review. Applied Microbiology and Biotechnology, 59: 426–435.
17. Wokorach G., Landschoot S., Audenaert K., Echodu R., & Haesaert, G. 2021. Genetic Characterization of Fungal Biodiversity in Storage Grains: Towards Enhancing Food Safety in Northern Uganda. Microorganisms, 9, 2, 383.
18. Yang X., Jiang X. 2015. Antifungal activity and mechanism of tea polyphenols against *Rhizopus stolonifer*. Biotechnology Letters, 37: 1463–1472.
19. Zhou Y.X., Xin H.L., Rahman K., Wang S.J., Peng C., Zhang H. 2015. *Portulaca oleracea* L.: A review of phytochemistry and pharmacological effects. BioMed Research International, 2015: 11.



# Vpliv izvlečka iz sladkega pelina (*Artemisia annua* L.) na rast izbranih patogenih gliv

Lana Kuzman, Špela Saje, David Mikolič, Lenart Žežlina, Nik Židan

Študij molekularne in funkcionalne biologije, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Namen poskusa je bil ugotoviti ali ima izvleček sladkega pelina, ki vsebuje učinkovino artemizinin, biocidno aktivnost in ali ta zavira rast izbranih patogenih/endofitnih gliv: *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria* in *Fusarium fujikuroi*.
- Pripravili smo plošče s šestimi različnimi obravnavami (5 %, 10 % in 20 % izvleček, hidrolat ter kontroli 98 % etanol in voda) in nanje nacepili izbrane glive. Plošče smo inkubirali pod stalnimi ravnimi pogoji. Po 4, 6, 8, 11 in 15 dneh smo plošče pregledali in slikali. Iz slik smo izmerili površino zraslih gliv in jih primerjali med obravnavami. Poskus smo ponovili dvakrat.
- Pri vseh treh vrstah gliv smo dobili statistične razlike v površini plošč med kontrolami in 20 % izvlečkom sladkega pelina.
- Rast gliv na ploščah obdelanih z izvlečkom sladkega pelina se je statistično značilno razlikovala od kontrolnih plošč, kar kaže na inhibitorni učinek izvlečka.

**Ključne besede:** artemizinin, biocidna aktivnost, inhibicija rasti

## Uvod

Sladki pelin (*Artemisia annua* L.) je enoletna rastlina iz družine nebinovk. V tradicionalni azijski in afriški medicini se pripravek iz sladkega pelina, v obliki čaja ali iztisnjene soka, že vrsto let uporablja za zdravljenje malarije in povišane telesne temperature. Sladki pelin vsebuje več bioaktivnih metabolitov. Najbolj preučevan je artemizinin, laktonski seskviterpenski endoperoksid, ki deluje kot antimalarik (Septembre-Malaterre s sod., 2020).

Malarija je nalezljiva tropska bolezen, ki predstavlja enega glavnih izzivov v zdravstvu, saj letno prizadene več milijonov ljudi v podsaharski Afriki in jugovzhodni Aziji (Soni s sod., 2022). Bolezen povzroča parazit *Plasmodium* spp., ki je sčasoma razvil odpornost proti najpogosteje uporabljenim antimalarikom (kinin, klorokin). Odkritje artemizina je tako pomenil velik napredek pri zdravljenju malarije. Skupina raziskovalcev je artemizinin odkrila leta 1972, kitajska znanstvenica Tu Youyou pa je za odkritje leta 2015 prejela Nobelovo nagrado na področju medicine in fiziologije (Yang J s sod., 2020). Kombinirane terapije na osnovi artemizina (ACTs) so najučinkovitejša razpoložljiva oblika zdravljenja proti malariji.

Poleg aktivnih spojin ima sladki pelin tudi zanimiv prehranski profil s prisotnostjo aminokislin, vitaminov in mineralov ter osnovnih elementov za zdravje. Od odkritja je bil sladki pelin predmet obsežnih raziskav o njeni kemični sestavi. V celotni rastlini je bilo identificiranih več kot 600 sekundarnih metabolitov, vključno z več seskviterpenoidi, triterpenoidi, monoterpenoidi, steroidi, flavonoidi, kumarini, alkaloidi in benzenoidi, ki imajo protitumorske, antioksidativne, protiglivne, protivnetne in imunomodulatorne lastnosti. Opisano je tudi, da ima sladki pelin antihiperlipidemične, antiplazmodialne, antikonvulzivne, antiholesterolemične in protivirusne lastnosti. Vsa raziskana dejstva potrjujejo potencial sladkega pelina kot kandidata za živilsko, medicinsko, farmacevtsko, kozmetično in nutricevtsko industrijo (Soni s sod., 2022).

Naš namen je bil ugotoviti, ali ima izvleček sladkega pelina biocidno aktivnost in ali ta zavira rast izbranih patogenih gliv: *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria* in *Fusarium fujikuroi*.

## Materiali in metode

### Priprava izvlečkov in inkubacija izbranih gliv

Poskus smo izvedli v dveh tednih v dveh ponovitvah. Za poskus smo pripravili 6 obravnjav: 98 % etanol in voda (kontrola), hidrolat, 5 %, 10 % ter 20 % izvleček. Za pripravo izvlečkov smo 100 g svežega materiala (sladkega pelina) namočili v 2 L 98 % etanola. To smo nato skoncentrirali na 0,5 L, ter tako dobili 20 % izvleček. Za pripravo 10 % izvlečka smo vzeli 5 mL 20 % izvlečka in mu dodali 5 mL etanola. Za pripravo 5 % izvlečka smo vzeli 2 mL 20 % izvlečka in mu dodali 8 mL etanola. Hidrolat smo pripravili z destiliranjem sladkega pelina v vodi, pri čemer smo nato prestregli in kondenzirali ter zbrali paro, ki je nastala.

Za poskus smo izbrali tri vrste gliv in sicer *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi*. Glive smo teden pred začetkom izvedbe poskusa precepili na nova PDA (potato dextrose agar) gojišča in jih inkubirali v rastni komori pod stalnimi pogoji (16/8 h dnevno/nočna ritmika, 23/20 °C).

Te glive smo nato uporabili tudi v poskusu. Izvirne vrste smo dobili že nacepljene na gojišču PDA.

### Priprava gojilnih plošč in nanos na gojilne plošče

Gojilne plošče smo pripravili tako, da smo na posamezno ploščo odpipetirali po 200 µL posameznega izvlečka oz. etanola ali vode, ga razmazali s spatulo Drigalski, ter plošče pustili, da se posušijo oz. da je etanol izhlapel. Plošče smo pripravljali v laminariju, ob gorilniku, da bi preprečili kontaminacije. Na pripravljene plošče smo nacepili izbrane glive. Za vsako obravnavo smo pripravili po 8 ponovitev za posamezno glivo, torej smo vse skupaj pripravili 144 plošč PDA. Nacepljene plošče smo obdali s parafilmom.

### Spremljanje rasti gliv

Pripravljene plošče smo inkubirali v rastni komori pod stalnimi pogoji (16/8 h dnevno/nočna ritmika, 23/20 °C). Plošče smo pregledovali in slikali po 4, 6, 8, 11 in 15 dneh.

### Merjenje površine gliv z Image J

Površino zraslih gliv na ploščah smo izmerili s pomočjo programa Image J (Rasband, 2018). Slike gliv (.jpg formata) smo odprli v programu Image J in jih najprej spremenili v 8-bitne. Nato smo naredili kalibracijo, kjer smo programu določili merilo tako že znano velikost plošče (premer plošče je znašal 9 cm). S pomočjo funkcij v programu smo izmerili površine zraslih gliv in podatke zapisali v Excel tabelo (Priloga 1).

Ko so bili podatki zbrani, smo naredili analizo ANOVA in post-hoc za določitev statističnih razlik med skupinami obravnjav. Analiza je bila narejena v programih RStudio in Excel.

### Merjenje koncentracije artemizina

Koncentracija artemizina je bila izmerjena spektrofotometrično po metodi iz članka Sreevidya in Narayana (2008). Izmerili smo koncentracijo artemizina v 20 % izvlečku sladkega pelina, nato pa smo preračunali še vrednosti za koncentraciji artemizina za 5 % in 10 % izvleček sladkega pelina.

## Rezultati

### Izbrane glive

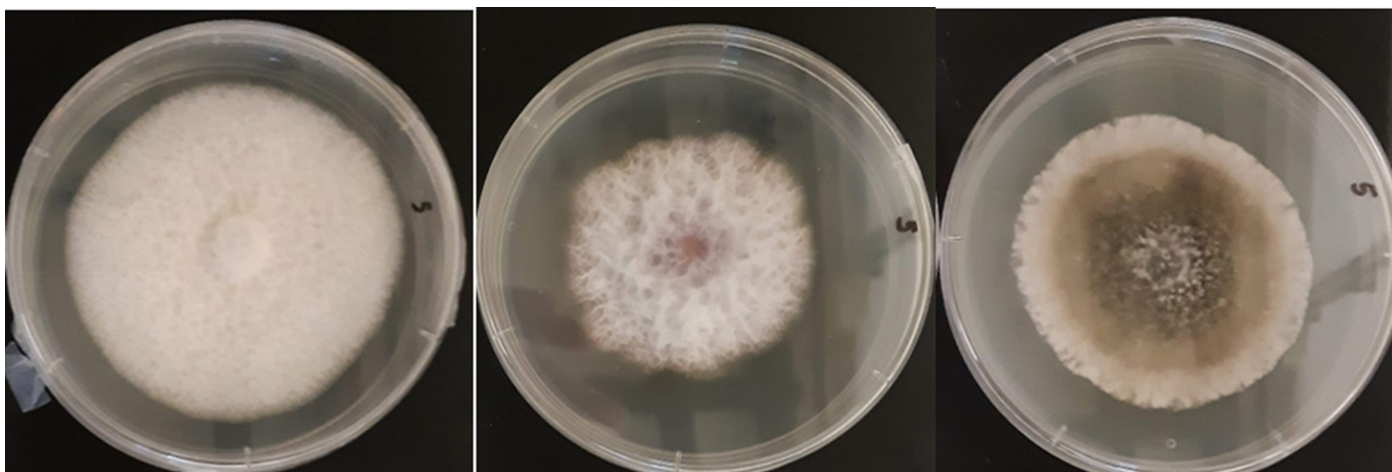
Za poskus smo izbrali tri vrste gliv: *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi* in *Alternaria alternata*. Morfološki izgled gliv je prikazan na Sliki 1.

### Površina gliv in analiza podatkov

Iz grafa (Slika 2) je razvidno, da je bila površina gliv, obravnavanih z izvlečki pelina v večini primerov manjša od gliv, obravnavanih z vodo in etanolom (kontrola). Najučinkovitejše je rast glive zatiral 20 % izvleček pelina (20 % PE). Površine gliv tekom poskusa linearno naraščajo.

### Analiza podatkov

Pri glivi *Alternaria alternata* nam analiza varianc prikaže, da je po 4, 6, 8 in 11 dneh rasti povprečna površina pri obravnavi z 20 % in tudi 10% izvlečkom sladkega pelina statistično različna



**Slika 1:** *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi* in *Alternaria alternata* (od leve proti desni)

od kontrol (voda in etanol), kar je razvidno na Sliki 2-AAT. Pri hidrolatu pride do statistične razlike v primerjavi s kontrolo pri merjenju rasti po 4 dneh, vendar ta kaže povečano rast (Slika 2-AAT).

Analiza varianc pri glivi *Alternaria infectoria* je pokazala, da pride do razlik v rasti glive že po 4 dneh rasti. Na Sliki 2-AI vidimo, da sta povprečni površini gliv po 4 dneh od poskusa pri obravnava z 20 % in 10 % izvlečkom statistično različni od povprečij površin pri ostalih štirih obravnava. Po 6 dneh rasti gliv se stanje spremeni, vendar je povprečna površina glive pri obravnava z 20 % izvlečkom še vedno statistično različna od preostalih obravnava. Obravnava, kjer smo glivo nacepili na 20 % izvleček ostane statistično različna od ostalih obravnava tudi po 8 in 11 dneh rasti. Povprečna površina glive je tu nižja kot pri ostalih obravnava. Pri glivi *Alternaria infectoria* se iz grafa vidi značilna razlika med kontrolo, t.j. vodo in 20% izvlečkom sladkega pelina. Prav tako opazimo razliko pri hidrolatu v primerjavi z kontrolo (Slika 2-AI).

Analiza pri glivi *Fusarium fujikuroi* nam pokaže, da pride tudi pri tej glivi do statistične razlike med kontrolami (voda in etanol) in 20 % izvlečkom sladkega pelina (Slika 2-FF). Po 11 dneh je precejšnja razlika tudi med kontrolo z vodo ter kontrolo z etanolom. Pri glivah, ki so rasle na 5 % izvlečku ni statistične razlike od kontrol (Slika 2-FF).

### Koncentracija artemizina v izvlečku

Spektrofotometrična meritev koncentracije artemizina v sladkem pelinu je pokazala, da imamo v 20 % izvlečku 8 mg artemizina na mL. Izračunana vrednost za 10 % izvleček je 4 mg/mL in 1,6 mg/mL za 5 % izvleček sladkega pelina.

**Tabela 1:** Koncentracije artemizina v izvlečkih

Obravnava	Konc. artemizina (mg/mL)
5% izvleček	1,6
10% izvleček	4
20% izvleček	8

### Diskusija

Ob izvedbi je prišlo do kontaminacije nekaterih plošč, zato niso bile vključene v obdelavo podatkov. Kontaminirana je

bila tudi voda, ki smo jo uporabili pri pripravi kontrolnih plošč. Kontaminacija vode ni vplivala na rast gliv, zato smo podatke uporabili pri analizi.

Razlike med površinami gliv so največje po 6. in 8. dnevu od postavitve poskusa. Po 14 dneh od cepitve na ploščo so kontrole že prerastle petrijevko. Pri vseh treh vrstah je rast gliv potekala najpočasneje pri ploščah, obravnava z 20 % izvlečkom pelina. Počasnejša rast je bila prisotna tudi pri ploščah s 5 % in 10 % izvlečkom pelina.

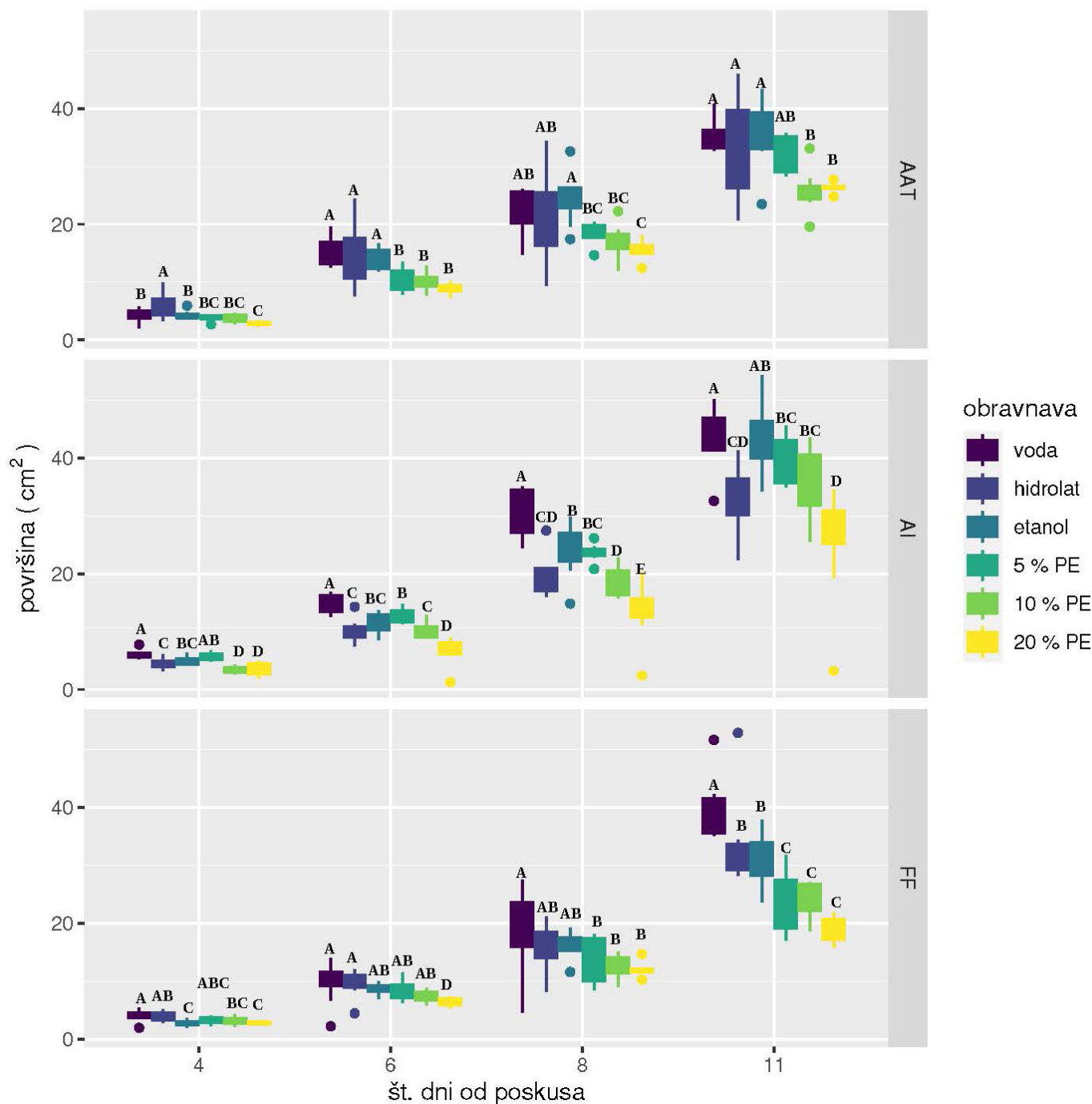
Glede na rezultate iz Slike 2 in Tabele 1 vidimo, da je bila statistična razlika med kontrolo etanola in izvlečkom pri koncentraciji artemizina 8 mg/mL. Pri 5 % izvlečku, kjer je koncentracija artemizina 1,6 mg/mL, ni prišlo do statističnih razlik.

Površine gliv na ploščah, obravnava z hidrolatom, so bile primerljive s kontrolnimi ploščami, iz česar lahko sklepamo, da se ob pripravi hidrolata bioaktivna snov, odgovorna za zaviranje rasti gliv, ni izolirala. V študiji, ki sta jo izvedla van der Kooy in Verpoorte (2011) so odkrili, da artemizinin pri ekstrakciji nad 115°C razpade, kar bi lahko bil razlog, da ni prišlo do inhibicije rasti na hidrolatu. Po 11 dneh je precejšnja razlika tudi med kontrolo z vodo ter kontrolo z etanolom (Slika 2), upoštevajoč, da so izvlečki na osnovi alkohola, bi lahko pri zmanjšani rasti šlo le za vpliv etanola.

V izvlečku sladkega pelina so poleg artemizina, še druge spojine, ki imajo protimalarične, protibakterijske, protivnetne in protitumorske učinke, ter uravnavajo rast rastlin (Bhakuni s sod., 2001). Znano je tudi protiglavno delovanje izvlečka pelina, saj so Li s sod. (2019) odkrili tudi druge spojine, ki inhibirajo rast gliv. Tudi za metanolni izvleček sladkega pelina je znano, da deluje protiglavno in se v nekaterih delih sveta uporablja kot naravno sredstvo proti bolezenskem gnitju korenin (Ma s sod., 2019).

Študija, ki jo je izvedel Septembre-Malaterre s sod. (2020) je pokazala, da ima kumarinski derivat, prisoten v sladkem pelinu, širok spekter protiglavnih lastnosti in je aktiven proti nekaterim patogenim glivam, ki povzročajo veliko škodo v kmetijstvu. Glavna kumarina v alkoholnih izvlečkih sladkega pelina sta skopolin in skopoletin.

Glavni problem uporabe artemizina je visoko povpraševanje in slaba dostopnost sladkega pelina. Vsebnost artemizina v sladkem pelinu znaša med 0,22 in 0,40 %, odvisno od načina izolacije. V sorodnih vrstah sladkega pelina je artemizina bistveno manj. Biotehnoška sinteza artemizina je daleč od



**Slika 2:** Graf površin gliv (povprečje  $\pm$  standardna napaka; vrisani so tudi osamelci, izpostavljenih različnim obravnavam v odvisnosti od časa. Obravnave: voda (kontrola), etanol (kontrola), hidrolat, 5 % izvleček pelina (5 % PE), 10 % izvleček pelina (10 % PE) in 20 % izvleček pelina (20 % PE). Za meritve površin po 4, 6, 8 in 11 dnevu je vsakemu povprečju dodana še vrednost post-hoc testa.

optimalne, saj ima nizek izkoristek (Nusantara s sod., 2019).

## Zaključki

Na osnovi izmerjenih rezultatov lahko sklepamo, da dovolj visoka koncentracija izvlečka sladkega pelina zavira rast določenih fitopatogenih gliv. Ne moremo zagotovo trditi, ali gre za vpliv artemizina ali katerih drugih bioaktivnih snovi, ki jih ekstrakt vsebuje, kljub temu, pa je razvidno, da je izvleček relativno učinkovit inhibitor rasti gliv z potencialno uporabo kot naravno protiglivično sredstvo.

## Literatura

1. Bhakuni RS, Jain DC, Sharma RP, Kumar S, 2001. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. *Current Science*, 80(1), 35–48. <http://www.jstor.org/stable/24105552>
2. Li KM, Dong X, Ma YN, Wu ZH, Yan YM, Cheng YX, 2019. Antifungal coumarins and lignans from *Artemisia annua*. *Fitoterapia*, 134, 323–328.
3. Ma YN, Chen CJ, Li QQ, Xu FR, Cheng YX, Dong X, 2019. Monitoring Antifungal Agents of *Artemisia annua* against *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani*, Associated with *Panax notoginseng* Root-Rot Disease. *Molecules*, 24(1), 213.
4. Nusantara AD, Bertham YH, Siswanto U and Andani A. Biomass and Artemisinin Production of *Artemisia annua* L. on Several Altitudes.

- International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology, vol. 9, no. 2, pp. 428-433, 2019. <http://dx.doi.org/10.18517/ijaseit.9.2.2023>.
5. Rasband WS. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018.
  6. Soni R, Shankar G, Mukhopadhyay P, Gupta V, 2022. A concise review on *Artemisia annua* L.: A major source of diverse medicinal compounds. *Industrial Crops and Products*, 184, April: 115072
  7. Septembre-Malaterre A, Lalarizo Rakoto M, Marodon C, Bedoui Y, Nakab J, Simon E, Hoarau L, Savriama S, Strasberg D, Guiraud P, Selambarom J, Gasque P, 2020. *Artemisia annua*, a Traditional Plant Brought to Light. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(14), 4986.
  8. Sreevidya T V, Narayana B, 2008. Spectrophotometric determination of artemisinin and dihydroartemisinin. *Indian Journal of Chemical Technology*, 15(1), 59–62.
  9. Van der Kooy F, Verpoorte R, 2011. The Content of Artemisinin in the *Artemisia annua* Tea Infusion. *Planta Medica*, 77(15), 1754–1756. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1271065>
  10. Yang J, He Y, Li Y, Zhang X, Wong YK, Shen S, Zhong T, Zhang J, Liu Q, Wang J. Advances in the research on the targets of anti-malaria actions of artemisinin. *Pharmacol Ther.* 2020 Dec;216:107697. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107697

# Vpliv suše na rast, razvoj in mineralno sestavo ohrovta (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.)

Nika Jagodic, Anja Janežič, Mia Jarc, Karin Kukenberger, Ana Trobec

Študij molekularne in funkcionalne biologije, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Novo znanje o vplivu pomanjkanja vode na morfološke, fiziološke in biokemijske lastnosti ohrovta bi lahko uporabili (na aplikativnem kot tudi bazičnem nivoju) pri žlahtnenju kultivarjev z višjo toleranco na sušo in bi nam tako lahko pomagalo pri spopadanju s čedalje obsežnejšimi in pogostejšimi pojavi suše po svetu.
- Namen poskusa je bil preveriti vpliv dveh različnih intenzitet suše (50 in 150 g/L PEG) na fitnes rastlin ohrovta. Rastlinam smo tedensko merili višino, po treh tednih pa še fotokemično učinkovitost s fluorometrom, svežo in suho maso, elementno sestavo z rentgensko fluorescenčno spektrometrijo in določili s pomočjo spektrofotometra še fotosintezne pigmente.
- Najvišja obravnava je pomembno zmanjšala koncentracije klorofilov in karotenoidov v suhi masi ohrovta. Trend rasti je bil pri vseh treh obravnavah pozitiven, povprečne vrednosti posameznih obravnav so bile vse bolj različne, vendar ne statistično značilne. Opazili smo upadanje sveže in suhe mase in koncentracije elementov, prav tako statistično neznačilno. Razlik v fotokemični učinkovitosti med obravnavami ni bilo.
- Največja proučevana intenziteta suše se je izkazala za deloma omejujoč dejavnik v rasti, razvoju ter mineralni sestavi ohrovta, z značilnim negativnim vplivom na koncentracijo fotosinteznih pigmentov (klorofilov in karotenoidov).

**Ključne besede:** vodni stres, PEG, fotosintezni pigmenti, fotokemična učinkovitost, mineralni elementi, klimatske spremembe

## Uvod

Razpoložljivost vode je v kmetijstvu pogosto opisana kot glavni omejujoči dejavnik za rast rastlin. Količina padavin, temperatura, CO<sub>2</sub> in ostala atmosferska nihanja za rastline predstavljajo abiotični stres in vplivajo ne samo na privzem vode, ampak tudi na privzem mineralov (D'Oria s sod. 2022). Takšen pridelek je tako manj mineralno bogat, kar izziva načelo prehranske varnosti, ki pravi, da mora biti razpoložljiva hrana tudi dovolj hranljiva. Zaradi hitrega naraščanja svetovnega prebivalstva se močno povečuje potreba po produkciji poljščin. Če prištejemo še potencialen vpliv podnebnih sprememb, med drugim sušo zaradi pomanjkanja ali pa le občasnega dežja, bo optimizacija pridelkov in iskanje novih rešitev še toliko bolj nujna. Eden izmed vidikov, ki lahko pripomore nadaljnjim raziskavam, je boljše poznavanje odziva rastlin na sušo. Pri ohrovtu (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.) iz družine križnic (Brassicaceae) so že opazili različno toleranco na sušo (Ashraf in Mehmood 1990).

Pomanjkanje vode inducira kopičenje abscizinske kisline, ki spodbudi zapiranje listnih rež, posledično se zmanjša izmenjava plinov, fotosintezna aktivnost in proizvodnja biomase (Taiz s sod. 2015, D'Oria s sod. 2022). Rastline pod vodnim stresom izkazujejo zmanjšano vsebnost vode, dehidracija pa naj bi s podaljševanjem dobe stresa postajala čedalje bolj resna. Suša povzroči tudi povečano količino reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), torej vodi v oksidativni stres celic, ki v rastlinah povzročata denaturacije makromolekul ter oksidacije beljakovin in lipidov. Tako vodni stres še po tej poti zavira rast in razvoj celic ter vpliva na spremembo aktivnosti encimov, skupaj z drugimi presnovnimi dogodki, kot je prerazporejanje asimilatov, akumulacija topljencev in sinteza antioksidantov (Jamshidi Goharrizi s sod. 2019, D'Oria s sod. 2022). Pomanjkanje vode vpliva tudi na privzem mineralov, saj le ti v suhi zemlji postanejo manj dostopni za korenine (Barber in Müller 2021), po drugi strani pa zmanjšan nivo transpiracije vodi v zmanjšan masni tok od korenin proti poganjkom. Poleg tega morajo rastline ob vodnem stresu ohraniti svoj turgor in stabilizirati membransko permeabilnost preko osmotskih prilagoditev, kar lahko deloma dosežejo tudi preko sprememb v privzemu mineralov in njihovi distribuciji (D'Oria s sod. 2022). V naši raziskavi smo sušo simulirali s polietilen glikolom (PEG), ki so neionske, inertne molekule ( $M_r \geq 6000$ ), ki se jih pogosto uporablja za indukcijo vodnega stresa in za vzdrževanje enakomernega vodnega potenciala skozi eksperiment. Molekule PEG so dovolj velike, da jih rastline ne morejo absorbirati, a hkrati dovolj majhne, da lahko inducirajo spremembo osmotskega potenciala. Ker PEG ne more vstopiti v apoplast, celice izgubijo vodo in na ta način lahko simuliramo sušno zemljo (Jamshidi Goharrizi s sod. 2019). S pomočjo PEG-a smo v lončnem poskusu ocenili odziv ohrovtu na sušo.

## Materiali in metode

### Priprava rastlinskega materiala

Semena ohrovtu smo vzkli v vermikulitu, nato pa po 20 rastlin prenesli v šest loncev velikosti 19 × 17 cm, ki so bili napolnjeni z omočenim komercialnim substratom Plantella Premium, zemlja za okrasne rastline (Unichem d.o.o., Vrhnika, Slovenija). Rastline smo vzgajali v rastni komori, kjer so bile izpostavljene 16/8 h in 20/18 °C dnevno/nočnim pogojem. Rastlinam smo

5 dni dovolili, da so se ukoreninile v nov substrat in preživele šok presajanja, nato pa smo jih dvakrat na teden zalili s 100 mL bidestilirane vode (kontrola) oziroma z eno od izbranih PEG koncentracij in sicer 50 g/L oz. 150 g/L. Vsaka od obravnav je imela dve ponovitvi. Med poskusom smo večkrat spremenili pozicijo loncev in tako izničili vpliv lokacije lonca na končni rezultat.

### Analize rastlinskega materiala

V razponu 26 zaporednih dni od začetka poskusa (0. dan) smo opravili 5 meritev višine (na 0., 5., 13., 19. in 26. dan) rastlin v vseh loncih. Ob zaključku poskusa smo s prenosnim fluorometrom PAM-2500 (Walz, Effeltrich, Nemčija) izmerili dejansko fotokemično učinkovitost na osvetljenih listih in potencialno fotokemično učinkovitost na zatemnjenih listih v skladu z navodili proizvajalca. Naredili smo po 3 meritve na posamezen lonec. Nadzemnim delom smo določili svežo maso tako, da smo iz vsakega lonca pridobili po dva podatka ( $n=4$  na posamezno obravnavo). Rastline smo zamrznili v tekočem dušiku, jih liofilizirali pri -97 °C in 0,001 mbar (CoolSafe, LaboGene, Allerød, Danska) štiri dni in jim določili suho maso. Posušen rastlinski material smo uprašili v terilnicah in pripravili tabletko s pomočjo hidravlične stiskalnice. Določili smo koncentracijo fosforja (P), žvepla (S), klora (Cl), kalija (K), kalcija (Ca), mangana (Mn), železa (Fe) in cinka (Zn) z rentgensko fluorescenčno spektrometrijo (XRF) kot opisujejo Nečemer in sod. 2008. V liofiliziranem materialu smo tudi določili koncentracijo fotosinteznih pigmentov kot je opisano v članku Lichtenthaler in Buschmann (2001) in sicer s spektrofotometrom (Agilent UV-1800, Shimadzu, Japonska) pri treh različnih valovnih dolžinah (664 nm, 647 nm, 470 nm).

### Analiza podatkov

Podatke smo uredili v programu Microsoft Excel (Microsoft



**Slika 1:** Lonec z rastlinami ohrovtu ob drugem zalivanju s 50 g/L PEG.

Corporation, 2018), kjer smo izračunali vzorčno srednjo vrednost, za izračun standardne napake (SN) pa smo uporabili Excelovo funkcijo  $\text{stdev}/\sqrt{n}$ . Podatke smo nato analizirali v programu Rstudio (RStudio 2022.02.3). Testirali smo predpostavke (normalnost porazdelitve in homogenost variance), izvedli smo enosmerno analizo variance (ANOVA) in Tukey HSD post hoc test pri  $\alpha = 0.05$ , kadar je bil rezultat ANOVA testa statistično značilen.

## Rezultati

Od nastavljenih 40 rastlin vsake skupine je v poskusu preživelo 37 kontrolnih rastlin ohrovtu, 38 rastlin pri obravnavi 50 g/L PEG in 29 rastlin pri obravnavi 150 g/L PEG (od 40 iz dveh različnih loncev). Na Sliki 1 vidimo enega od loncev po drugem zalivanju.

Povprečno je velikost rastlin s časom naraščala pri vseh obravnavah. Do 13. dne rastline v različnih obravnavah rastejo razmeroma enakomerno hitro, kasneje se rast pri vseh skupinah upočasni, pojavijo pa se tudi večje razlike v povprečnih vrednostih posameznih obravnav. Pri zadnji meritvi so bile rastline povprečno visoke  $10,81 \pm 0,21$  cm. Rastline iz obravnav se niso statistično značilno razlikovale v dejanski fotokemični učinkovitosti ( $p=0.5503$ ) niti v potencialni fotokemični učinkovitosti ( $p=0.7429$ ). Povprečna dejanska fotokemična učinkovitost za vse rastline je bila  $0,662 \pm 0,02$ , medtem ko je bila potencialna fotokemična učinkovitost  $0,815 \pm 0,01$ . Ne sveža ( $p=0.0634$ ), ne suha ( $p=0.5136$ ) masa posameznih rastlin ohrovtu se med obravnavami ni statistično značilno razlikovala. Povprečna sveža masa ene rastline vseh obravnav skupaj je znašala  $1,20 \pm 0,13$  g, in povprečna suha masa  $0,24 \pm 0,02$  g. Pri večini elementov je bila koncentracija najvišja pri obravnavi 150 g/L PEG, kar pripisujemo koncentriranju elementov zaradi upadanja sveže mase tekom poskusa, zato smo izračunali vsebnost elementov. Tudi v tem primeru ANOVA ni identificirala statističnih razlik med obravnavami. Vsebnosti elementov so prikazane v Tabeli 1.

**Tabela 1:** Vsebnost (mg v suhi snovi) kalcija (Ca), klora (Cl), železa (Fe), kalija (K), mangana (Mn), fosforja (P), žvepla (S) in cinka (Zn) v nadzemnih delih štiri tedne starega ohrovtu. Prikazana so povprečja in standardne napake (SN,  $n=4$ ). Gre za povprečja vseh treh obravnav, saj med njimi ni statističnih razlik.

Element	Povprečje [mg]	SN [mg]
P	3,22	0,24
S	4,61	0,48
Cl	27,4	3,94
K	44,26	3,35
Ca	32,28	2,84
Mn	0,09	0,01
Fe	0,26	0,02
Zn	0,08	0,01

S povečevanje koncentracije PEG pa smo opazili statistično značilen upad koncentracije klorofilov in karotenoidov (Slika 2).

## Diskusija

Trend rasti je bil v našem poskusu pri vseh treh obravnavah

(0, 50 in 150 g/L PEG) pozitiven. Pri ANOVA testu ni bilo statistično značilnih razlik, zaradi česar ne moremo zaključiti, da je tretiranje s PEG vplivalo na višino rastlin. Robin s sod. (2021) govorijo o 14% zmanjšani višini rastlin, tretiranih s PEG. V našem primeru je bila višina rastlin, tretiranih s 50 g/L PEG povprečno za 4,7% nižja od kontrolne skupine, višina rastlin, tretiranih s 150 g/L PEG pa povprečno 16,4% nižje od kontrolne skupine.

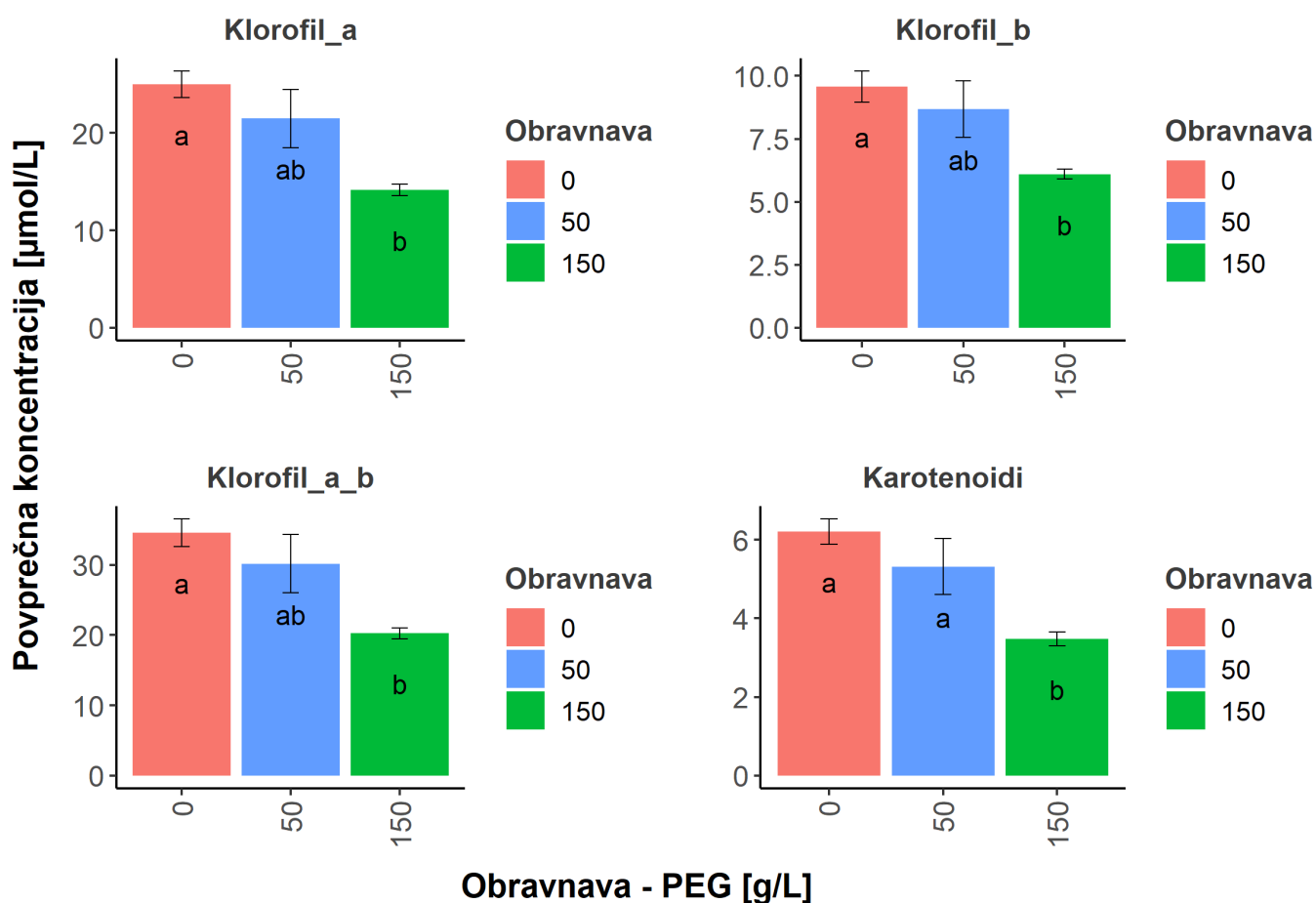
Vodni stres vpliva tako na fotosistem I, kot tudi na fotosistem II (PSI in PSII). Oba fotosistema se nahajata na tilakoidnih membranah, vendar pa je PSII bolj občutljiv na dehidracijo kot PSI (Macar in Ekmeççi, 2008). Basal in sod. (2020) so v članku opisali zmanjšanje fotokemične učinkovitosti PSII ob povečanju koncentracije PEG, s katero so tretirali rastline. Iz rezultatov naših meritev ni razvidnega očitnega trenda padanja ali zviševanja fotokemične učinkovitosti. Pri vseh treh obravnavah je fotokemična učinkovitost približno enaka. Rezultat se ne sklada z našimi pričakovanji in dejstvom, da smo potrdili statistično značilen upad koncentracije fotosintetskih pigmentov, ki v PS absorbirajo svetlobo. Razlog za to bi lahko bil v tem, da je fotosintetska aktivnost prizadeta šele pri visokih intenzitetah vodnega pomanjkanja, saj je za rastlino pomembno, da vzdržuje transport elektronov in vsebnost reduktantov (Lawlor in Tezara 2009), takšnih intenzitet in dolžine stresa pa v našem poskusu verjetno še nismo dosegli, poleg tega, da je to tudi sama intrinzična lastnost naše rastlinske vrste.

Pri meritvah sveže in suhe mase nismo zaznali statistično značilnih razlik. Barber in Müller (2021) sta v poskusu na isti rastlinski vrsti v enaki ontogenetski fazi ugotovila, da v sušnih pogojih (15% vsebnost vode) rastline proizvedejo pol manjšo biomaso poganjkov v primerjavi s kontrolo. Poročala sta tudi o rezultatih na štirih drugih vrstah rodu Brassica, kjer naj bi *B. carinata* (od testiranih najbolj tolerantna vrsta na sušo), izkazovala tako nižjo biomaso kot nižjo vsebnost vode (kot v našem poskusu), medtem ko so *B. napus*, *B. campestris* in *B. juncea* izkazale nižjo biomaso, ne pa tudi zmanjšane vsebnosti vode, kar pojasnjujeta z zmanjšano mero transpiracije kot posledic zapiranja listnih rež med vodnim stresom. Poskus je bil izveden zelo podobno, na enaki vrsti, vendar se njihovi rezultati od naših precej razlikujejo, zato sklepamo, da bi bilo dobro naš poskus ponoviti. Kljub opaženim razlikam v izmerjeni sveži in suhi masi, le-te niso bile statistično značilno različne.

Predvidevali smo, da bo vsebnost posameznih elementov pri rastlinah tretiranih s PEG nižja kot pri kontroli. Poročali so, da so pri Brassica napus v bolj drastičnih sušnih pogojih zaznali znižanje koncentracije vseh elementov, ki smo jih preiskovali mi, z izjemo K. Največje zmanjšanje koncentracije so zaznali pri Fe, Mn in Zn (D'Oria s sod. 2022). V našem poskusu ne opazimo statistično značilnega upada pri nobenem elementu. Kar nekaj člankov govori o zmanjšanju koncentracije klorofila po tretiranju rastlin s PEG (Spyropoulos in Mavrommatis 1978, Basal in sod. 2020), kar se sklada z našimi ugotovitvami (Slika 2). Ashraf in Harris (2013) sicer poročata o opažanjih pri katerih se vsebnost klorofila poveča med izpostavljenostjo suši, vendar pravita, da naj bi to variiralo med vrstami zaradi razlik v sintezi klorofila. Pri koncentracijah karotenoidov smo opazili statistično značilen negativen vpliv pri najvišji PEG obravnavi v intenziteti suše v primerjavi s kontrolo in nižjo PEG obravnavo. To bi lahko kazalo na to, da se koncentracija karotenoidov bolj drastično spremeni šele pri višji intenziteti vodnega stresa



## Povprečna koncentracija pigmentov - ohrovt



**Slika 2:** Koncentracija pigmentov pri štiri tedne starem ohrovtu, ki smo jih zalivali z različnimi koncentracijami polietilen glikola (PEG). Prikazana so povprečja  $\pm$  SN ( $n=4$ ). Različne črke označujejo statistično značilne razlike med obravnavami (Tukey post-hoc test pri  $\alpha = 0,05$ ).

in da so torej karotenoidi bolj odporni na manjše intenzitete vodnega stresa kot pa klorofili. Razlog za to bi lahko bil v tem, da karotenoidi med drugim branijo klorofil in membrane pred razpadom, saj sta v času pomanjkanja vode še posebej ranljiva zaradi povečane vsebnosti ROS. Sicer so poročila o vplivu suše na koncentracijo karotenoidov nekonsistentna, saj v literaturi poročajo o dvigu koncentracije karotenoidov (Spyropoulos in Mavrommatis, 1978; Mohammadkhani in Heidari, 2007), o padcu koncentracije karotenoidov (Spyropoulos in Mavrommatis, 1978; naša raziskava) in o nespremenjenih koncentracijah karotenoidov po vodnem stresu (Macar in Ekmekçi, 2008).

Odgovor na vodni stres je odvisen predvsem od rastlinske vrste, intenzivnosti in trajanja stresa (D’Oria s sod. 2022, Ciríaco da Silva 2011) ter od faze razvoja rastline (Ciríaco da Silva 2011). Zaradi tega bi bilo v nadaljnjih raziskavah dobro preveriti tudi odziv ohrovta in drugih rastlinskih vrst na večje razlike v intenziteti vzpostavljenih suše. Poleg tega pa bi bil poskus še bolj natančen, če bi analizirali še maso in elementno sestavo korenin, saj predvidevamo, da je masa korenin glede na kontrolo večja. Namreč korenine ob pomanjkanju še bolj intenzivno iščejo nove vire vode in mineralov tako, da vlagajo svojo energijo v izgradnjo le teh (Taiz s sod. 2015), hkrati pa tudi prerazporejajo svoje nutrienete. Npr. v poskusu z *Brassica napus* so v sušnih pogojih pokazali, da se Ca, S in Mn v večjih

koncentracijah nahajajo v koreninah kot v poganjkih (D’Oria s sod. 2022).

### Zaključki

Najvišji vodni stres (150 g/L PEG) je imel v primerjavi s kontrolo statistično značilen vpliv na zmanjšanje koncentracije klorofila a, klorofila b in seštevka klorofila a in b, medtem ko je bila pri karotenoidih statistično značilna razlika tudi med obravnavama 50 in 150 g/L. To nakazuje na to, da se koncentracija karotenoidov bolj drastično spremeni šele pri višji intenziteti vodnega stresa in da so torej karotenoidi nekoliko bolj odporni na manjše intenzitete vodnega stresa kot klorofili. Pri ostalih meritvah (višina, masa, elementna sestava, fotokemična učinkovitost) nismo zaznali statistično značilnih razlik med obravnavami in kontrolno skupino.

### Literatura

- Ashraf M, Harris PJ, 2013. Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica* 51:163–190.
- Ashraf M, Mehmood S, 1990. Response of four *Brassica* species to drought stress. *Environmental and Experimental Biology* 30: 93-100.
- Barber A, Müller C, 2021. Drought and subsequent soil flooding affect the growth and metabolism of savoy cabbage. *International*

- Journal of Molecular Sciences 22(24):13307.
4. Basal O, Szabó A, Veres S, 2020. Physiology of soybean as affected by PEG-induced drought stress. *Current Plant Biology* 22:100135.
  5. Bauer N, Tkalec M, Major N, Talanga Vasari A, Tokić M, Vitko S, Ban D, Ban SG, Salopek-Sondi B, 2022. Mechanisms of kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*) tolerance to individual and combined stresses of drought and elevated temperature. *International Journal of Molecular Sciences* 23:11494.
  6. Ciríaco da Silva E, Mansur Custódio Nogueira RJ, Almeida da Silva M, Albuquerque M, 2010. Drought stress and plant nutrition. *Plant Stress* 5 (Special Issue 1):32-41.
  7. D’Oria A, Courbet G, Billiot B, Jing L, Pluchon S, Arkoun M, Maillard A, Roux C, Trouverie J, Etienne P, 2021. Drought specifically downregulates mineral nutrition: Plant ionic content and associated gene expression. *Plant Direct* 6(8):e402. <https://doi.org/10.1002/pld3.402>
  8. Goharrizi JK, Moosavi SS, Amirmahani F, Salehi F, Nazari M, 2019. Assessment of changes in growth traits, oxidative stress parameters, and enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense mechanisms in *Lepidium draba* plant under osmotic stress induced by polyethylene glycol. *Protoplasma* 257(2):459–473.
  9. Lawlor DW, Tezara W, 2009. Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Annals of Botany* 103(4):561–579.
  10. Lichtenthaler HK, Buschmann C, 2001. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* 1(1):F4.3.1-F4.3.8.
  11. Macar TK, Ekmekçi Y, 2008. PSII photochemistry and antioxidant responses of a chickpea variety exposed to drought. *Journal of Biosciences* 63(7-8):583–594.
  12. Microsoft Corporation. Microsoft Excel. <https://office.microsoft.com/excel> (28. dec. 2022)
  13. Mohammadkhani N, Heidari R, 2007. Effects of water stress on respiration, photosynthetic pigments and water content in two maize cultivars. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10(22):4022–4028.
  14. 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: Atomic Spectroscopy* 63:1240-1247.
  15. Robin AHK, Ghosh S, Shahed MA, 2021. PEG-induced osmotic stress alters root morphology and root hair traits in wheat genotypes. *Plants* 10(6):1042. <https://doi.org/10.3390/plants10061042>
  16. RStudio Team. RStudio: Integrated Development for R. RStudio. PBC, Boston. <http://www.rstudio.com/> (28. dec. 2022)
  17. Spyropoulos CG, Mavrommatis M, 1978. Effect of water stress on pigment formation in *Quercus* species. *Journal of Experimental Botany* 29(2):473–477.
  18. Taiz L, Zeiger E, Moller IM, Murphy A, 2015. *Plant Physiology and Development*. 6th Edition, Sinauer Associates, Sunderland

# Odziv rastlin navadnega prosa (*Panicum miliaceum* L.) in ohrovta (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.) na dognojevanje s $ZnSO_4$

Neja Golja, Neža Kapelj, Anja Marton, Ena Sanjković, Tim Zaveršek

Študij molekularne in funkcionalne biologije, Biotehniška fakulteta, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

- Pomanjkanje cinka (Zn) v tleh je problem s katerim se sooča kmetijstvo, saj ima za posledico slabšo rast in razvoj rastlin in negativno vpliva na količino pridelka. Pomanjkanje Zn v človekovi prehrani je tudi zaskrbljujoč problem, saj lahko povzroča težave s kožo in negativno vpliva na delovanje imunskega, skeletnega, centralnega ter živčnega sistema.
- V kontroliranih pogojih smo v lončnem poskusu navadno proso (*Panicum miliaceum* L.) in ohrovt (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.) zalivali z različnimi koncentracijam cinkovega sulfata ( $ZnSO_4$ ) in spremljali višino rastlin tekom treh tednov rasti. Po treh tednih rasti smo izmerili fotokemično učinkovitost rastlin s prenosnim fluorometrom. Rastlinam smo določili svežo in suho maso, koncentracijo fotosinteznih pigmentov s spektrofotometrom in koncentracijo elementov s pomočjo rentgenske fluorescenčne spektrometrije.
- Ugotovili smo, da imajo rastline obeh vrst, ki smo jih zalivali z izbranimi koncentracijami  $ZnSO_4$ , povečano koncentracijo Zn v poganjkih, medtem ko se ostali spremljani parametri, ki nakazujejo uspešnost rasti preiskovanih rastlin, niso spremenili pomembno.
- Glede na naše rezultate sklepamo, da je uporaba  $ZnSO_4$  v koncentracijah do 15 mM primerna za dognojevanje ohrovta in navadnega prosa, če želimo povečati koncentracijo Zn v njihovih poganjkih brez izgube pridelka.

**Ključne besede:** cinkov sulfat, rentgenska fluorescenčna spektroskopija, fotosintezni pigmenti, biofortifikacija, pomanjkanje cinka

## Uvod

Pomanjkanje cinka (Zn) predstavlja omejitvev tal, s katero se sooča kmetijstvo, saj ima pomembno vlogo pri številnih fizioloških procesih. Zn se v rastlinah veže na beljakovinske ali organske kisline, sodeluje pri tvorbi klorofila, pretvorbi škroba v sladkorje, ter zaščiti pred nizkimi temperaturami (Bloodnick, 2022). Pomembno vlogo predstavlja pri tvorbi avksinov, ki pomagajo pri uravnavanju rasti in podaljševanju stebela. V visokih koncentracijah lahko poškoduje rastline, zaradi česar postanejo rumene barve (Boone s sod. 2012).

V človekovi prehrani je Zn pomemben, saj je vključen pri zaznavanju vonja, okusa in ohranjanju kognitivnih funkcij človeškega telesa, sodeluje pri delovanju imunskega sistema, celjenju ran, sintezi beljakovin in DNA ter pri presnovi ogljikovih hidratov, maščob in beljakovin. Pomaga pa uravnati tudi krvni sladkor. Cink aktivira več kot 300 katalitičnih metaloproteinov, prav tako je od Zn odvisnih več kot 2000 transkripcijskih faktorjev, ki sodelujejo pri sintezi posameznih proteinov (Rabinovich in Smadi, 2022). Pomanjkanje Zn pri ljudeh je posledica zmanjšane vnosa Zn s hrano, kar predstavlja velik svetovni problem. Pomanjkanje Zn je še posebej pogosto v razvijajočih se državah z nizkimi dohodki, kjer se ljudje lahko zanašajo predvsem na osnovna živila z nizko vsebnostjo Zn. Prav tako je pogostejši pri populacijah, ki imajo omejen dostop do raznolike in hranljive prehrane. Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije (WHO, 2023) pomanjkanje Zn prizadeva približno dve milijardi ljudi po vsem svetu in je glavni vzrok obolevnosti in umrljivosti, zlasti pri majhnih otrocih. Pomanjkanje le-tega povzroča problematično kožo in vpliva na delovanje imunskega, skeletnega, centralnega ter živčnega sistema (Siwek s sod. 2013).

Strategije za reševanje pomanjkanja Zn vključujejo izboljšanje dostopa do raznolike in hranljive prehrane, spodbujanje uporabe živil, bogatih s Zn, in zagotavljanje dodatkov s Zn ali obogatitev živil s Zn. Eden od pristopov je izboljšanje dostopa do raznolike in hranljive prehrane, ki vključuje vire Zn. Dobri viri Zn so meso, morski sadeži, fižol, oreščki in cela zrna. Prav tako je pomembno spodbujati uživanje živil, bogatih s Zn, kot so obogatena žita, jajca in mlečni izdelki (Prahara s sod. 2021). Problem pomanjkanja Zn se predvsem rešuje z agronomsko biofortifikacijo, ki poveča pridelek in zagotovi več Zn v prehrani z uporabo mineralnih gnojil v kombinaciji z žlahtniteljskimi sortami s povečano sposobnostjo pridobivanja mineralnih elementov (White in Broadley, 2009).

White in sodelavci (2018) so predvidevali, da bi uporaba Zn kot gnojila, lahko znatno povečala vnos Zn s hrano, kar bi pomembno vplivalo na problem pomanjkanja Zn v prehrani človeške populacije. Cilj poskusov je bil določiti mejo biofortifikacije z Zn, z uporabo Zn gnojil, na primeru zelja in brokolija. Študije so pokazale, da je mogoče doseči večje koncentracije v listnati zelenjavi, kot v semenih, gomoljih ali v koreninah. Povprečna izmerjena koncentracija Zn, pri dognojevanju z Zn gnojili, se je povečala za 3,8-21,3 % brez izgube količine pridelka.

Navadno proso (*Panicum miliaceum* L.) spada v družino Poaceae. Izvira s Kitajske, danes pa ga gojimo po celotnem svetu. Gojenje je dokaj enostavno, saj je proso dobro prilagojeno na različne podnebne in talne razmere, z nizko potrebo po vodi. Zaradi visoke vsebnosti beljakovin in mineralov predstavlja pomemben vir teh hranil v prehrani

(Hebiyaremye s sod. 2017). Ohrovt (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.) spada v družino Brassicaceae, iz katere je poleg ohrovt vzrejenih veliko kultivarjev, kot so zelje, brokoli, cvetača in brstični ohrovt. Izvira iz obalne južne in zahodne Evrope. Je trdoživa rastlina z visoko toleranco na sol. Gre za pomembno rastlino v prehrani ljudi, saj ima veliko vsebnost hranil in vitamina C (Stansell s sod., 2018).

Cinkov sulfat ( $ZnSO_4$ ) je anorganska spojina, ki se običajno uporablja kot herbicid za zatiranje mahu (Boone s sod. 2012). Tretiranje rastlin s  $ZnSO_4$  izboljša odziv na stres, ki ga povzroči prekomerna slanost tal. Uporaba ustrezne koncentracije vpliva na povečan privzem Zn, spodbuja rast in izboljša vsebnost klorofila ter morfoloških lastnosti rastlin, medtem ko povišane koncentracije delujejo strupeno (Zafar s sod., 2021). Namen našega poskusa je testirati ali lahko z dognojevanjem  $ZnSO_4$  povečamo koncentracije Zn v delih ohrovt in navadnega prosa, namenjenih za prehrano. Zato pričakujemo, da bodo rastline po treh tednih obravnavanja s  $ZnSO_4$ , vsebovale večjo koncentracijo Zn brez spremembe biomase. Predvidevamo, da bodo rastline s  $ZnSO_4$  rasle bolje in imele višjo vsebnost fotosinteznih pigmentov v primerjavi s kontrolno skupino.

## Materiali in metode

Za izvedbo poskusa smo uporabili tri tedne stare sadike ohrovt in navadnega prosa. Sadike smo zalivali z različnimi koncentracijama  $ZnSO_4$  (5 mM in 15 mM), kot kontrola pa nam je služilo zalivanje z destilirano vodo pri enakih pogojih gojenja. Za vsako obravnavo smo lonec, premera 19 cm in višine 17 cm, napolnili s komercialnim substratom Plantella Premium, zemlja za okrasne rastline (Unichem d.o.o., Vrhnika, Slovenija) in vanj posadili dvajset sadike in poskus izvajali v dveh ponovitvah. Rastline smo dvakrat tedensko zalili s 100 mL raztopine različnih koncentracij  $ZnSO_4$  oz. z destilirano vodo in jih tri tedne gojili v rastlinski komori s 16-urno fotoperiodo dnevno/nočni pri temperaturi 18/20 °C. Vsak teden smo izmerili višino rastlin. Po treh tednih smo izmerili njihovo fotokemično učinkovitost s prenosnim fluorometrom PAM-2500 (Walz, Effeltrich, Nemčija). Potencialno fotokemično učinkovitost smo merili na zatemnjenih listih (nanje smo pripeli zaponko vsaj 15 minut pred merjenjem), dejansko pa na osvetljenih listih. Liste smo nato pobrali, jih stehtali (sveža masa), jih zamrzili v tekočem dušiku ter jih posušili v liofilizerju pri -97 °C in 0,001 mbar (CoolSafe, LaboGene, Allerød, Danska). Posušene vzorce smo nato ponovno stehtali (suha masa), in vzorce v terilniku strli v prah in jih tako pripravili za nadaljnje analize. Analizo fotosinteznih pigmentov smo izvajali po metodi po Monni in sod. (2001). V steklene centrifugirke smo zatehtali 30 mg uprašenega liofiliziranega rastlinskega materiala, dodali 5 mL 80 % acetona, premešali na vibracijskem mešalniku ter vzorce pustili čez noč v hladilniku pri 4 °C. Naslednji dan smo na spektrofotometru pomerili absorbance pri treh različnih valovnih dolžinah ter z izračunom povzetem po Lichtenthaler in Buschmann (2001) izračunali koncentracije pigmentov. Koncentracije fosforja (P), žvepla (S), klora (Cl), kalija (K), kalcija (Ca), mangana (Mn), železa (Fe) in Zn v poganjkih smo izmerili z rentgensko fluorescenčno spektrometrijo (XRF), kot so opisali Nečemer in sod. (2008). Za analizo koncentracije elementov z metodo XRF smo uprašen liofiliziran rastlinski material stisnili s pomočjo hidravlične stiskalnice, ter tako izdelali do štiri tabletko za obravnavo.

Podatke smo obdelali in vizualizirali v programskem okolju



**Slika 1:** Sadike navadnega prosa (*Panicum miliaceum* L.) in ohrovta (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.) v lončnem poskusu po 2,5 tednih obravnavanja s  $ZnSO_4$ .

**Tabela 1:** Višina rastlin ob vzorčenju na 16. dan obravnave (cm), sveža in suha masa (g), fotokemična učinkovitost (FU), koncentracija (mg/kg v suhi masi) fotosinteznih pigmentov in esencialnih elementov v poganjkih ohrovta in prosa iz poskusa. Rastline so bile zalivane z destilirano vodo, 5 mM  $ZnSO_4$  oziroma 15 mM  $ZnSO_4$  tri tedne v kontroliranih pogojih, vendar med obravnavami ni bilo statistično pomembnih razlik. Prikazana so povprečja  $\pm$  standardna napaka (n=12).

	Ohrovt		Proso	
Višina	9,68 $\pm$	1,89	10,15 $\pm$	3,13
Sveža masa	8,51 $\pm$	2,16	2,71 $\pm$	1,07
Suha masa	1,70 $\pm$	0,40	0,34 $\pm$	0,11
Dejanska FU	0,71 $\pm$	0,05	0,38 $\pm$	0,10
Potencialna FU	0,82 $\pm$	0,06	0,62 $\pm$	0,06
Klorofil a	1,75 $\pm$	0,37	2,96 $\pm$	0,13
Klorofil b	0,73 $\pm$	0,16	1,56 $\pm$	0,31
Klorofil a+b	2,48 $\pm$	0,53	4,52 $\pm$	0,43
Karotenoidi	1,65 $\pm$	0,28	3,33 $\pm$	0,30
P	1723 $\pm$	358	2524 $\pm$	388
S	4669 $\pm$	1451	1985 $\pm$	331
Cl	10130 $\pm$	3453	9230 $\pm$	1149
K	24017 $\pm$	5024	48955 $\pm$	3429
Ca	13364 $\pm$	2974	4560 $\pm$	455
Fe	127 $\pm$	23,7	215 $\pm$	30,6
Mn	43 $\pm$	8,52	30 $\pm$	5,59

R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Statistično pomembne razlike smo ocenili s pomočjo enosmerne analize variance (pri  $p < 0,05$ ) in Holm-Sidak post hoc testom v primeru parametričnih vhodnih podatkov, ter s pomočjo Kruskal-Wallis in Wilcoxonovega testa v primeru neparametričnih podatkov.

## Rezultati

Po treh tednih obravnave z  $ZnSO_4$  smo dobili dovolj velike rastline za nadaljnje poskuse (Slika 1).

Ugotovili smo da rastline, ki smo jih zalivali z bodisi 5 mM ali 15 mM  $ZnSO_4$ , niso imele statistično značilno večje sveže mase, suhe mase, višine ali koncentracije fotosinteznih pigmentov v primerjavi s kontrolno skupino, kjer smo rastline zalivali z enako količino destilirane vode. Ti rezultati veljajo tako za navadno proso, kot za ohrovt: povprečne koncentracije teh parametrov so podane v Tabeli 1. Podobno nismo našli značilnih razlik v koncentraciji spremljanih elementov (P, S, Cl, K, Ca, Mn, Fe; povprečja so podana v Tabeli 1) z izjemo Zn. Pri ohrovту je bila koncentracija Zn v suhi snovi rastlin, ki smo jih zalivali z  $ZnSO_4$  pomembno večja v primerjavi s kontrolo (Slika 2A). Prav tako je bila količina Zn v suhi masi rastlin navadnega prosa, ki smo jih zalivali s 15 mM  $ZnSO_4$  pomembno večja v primerjavi s kontrolno skupino in skupino, kjer smo rastline zalivali s 5 mM  $ZnSO_4$  (Slika 2B). Pri ohrovту smo v povprečju bolj vplivali na koncentracijo Zn (povečanje do 16,75-krat), kot pri prosu (povečanje do 6,5-krat).

## Diskusija

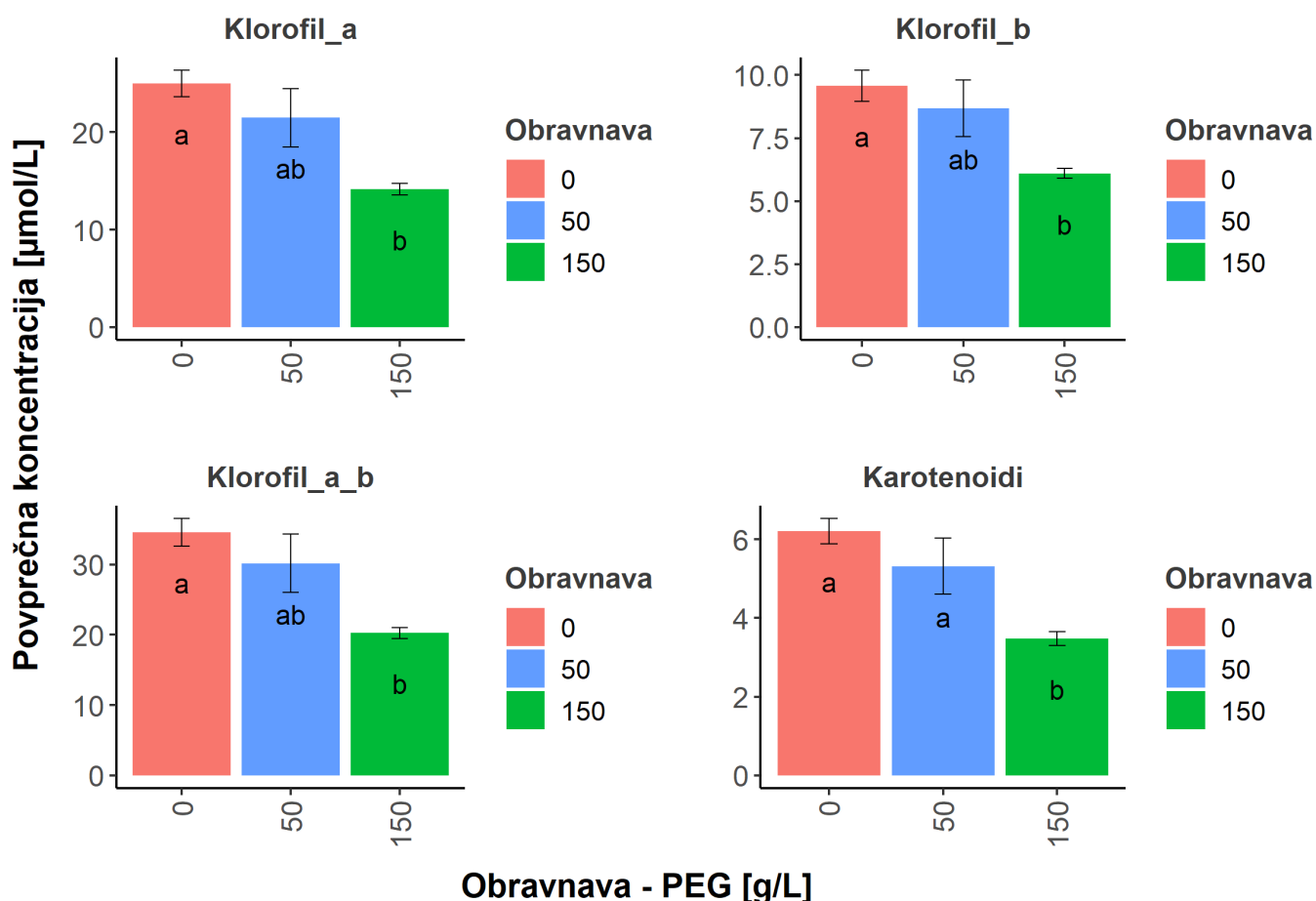
Cink je pomemben rastlinski mikroelement, saj služi kot kofaktor za pravilno delovanje številnih encimov, je vključen v metabolizem ogljikovih hidratov, sintezo proteinov in sintezo indol očetne kisline (Abay in Pirlak, 2017). Njegove koncentracije se v listih gibljejo med 15 in 30 mg/kg, pogosto pa so zaželeno višje koncentracije, predvsem v povezavi s kvaliteto prehransko pomembnih rastlin.

Abay in Pirlak (2017) so na primeru češnje (*Prunus avium*) ob tretiranju samo z  $ZnSO_4$  opazili višjo vsebnost Zn v rastlini, zmanjšano površino listov, višino poganjka in premer poganjka, medtem ko se je v enem izmed dveh ponovitev količina klorofila v listih povečala, v drugem pa zmanjšala. Salama in Amro (2015) so opazili povišano vsebnost klorofilov po tretiranju pomaranč (*Citrus sinensis*) z  $ZnSO_4$ . V našem poskusu nismo opazili razlik kar se tiče vsebnosti fotosinteznih pigmentov ali višine rastlin, smo pa prav tako opazili močno povišano koncentracijo Zn v rastlinah zalivanih s  $ZnSO_4$ . Morda bi bila razlika pri ostalih spremljanih parametrih bolj opazna ob uporabi višje koncentracije  $ZnSO_4$  in ob večjem številu ponovitev.

To, da ni dognovanje z  $ZnSO_4$  v koncentracijah do 15 mM pomembno vplivalo na rast rastlin, je pa hkrati pomembno povečalo koncentracijo Zn v poganjkih, pomeni, da bi lahko  $ZnSO_4$  v teh koncentracijah uporabili za biofortifikacijo navadnega prosa in ohrovta, bodisi v človeški hrani ali v krmi kmetijsko pomembnih živali, zlasti na področjih, kjer ljudem primanjkuje Zn v prehrani.

Med rezultate, kjer nismo opazili pomembnih razlik, sodijo tudi podatki o višini rastlin. Po izvedenem poskusu smo ugotovili, da je ta parameter nekoliko neoptimalen, zlasti v primeru ohrovta, kjer zaradi razvejanosti rastline in velikosti listov višina

## Povprečna koncentracija pigmentov - ohrovt



**Slika 2:** Koncentracija cinka (Zn) v suhi masi poganjkov ohrovta (A) in prosa (B), ki smo ga tri tedne zalivali z različnimi koncentracijami cinkovega sulfata ( $ZnSO_4$ ). Različne črke prikazujejo statistično pomembno razliko med obravnavami (Kruskal-Wallis test in Wilcoxonov test v primeru ohrovta in ANOVA ter Holm-Sidak post hoc test za navadno prosa pri  $p < 0,05$ ). Stolpci prikazujejo povprečno vrednost podatkov  $\pm$  standardno napako ( $n=4$ ).

ne predstavlja zadovoljive korelacije z biomaso. Imeli smo težave zaradi kontaminacije rastlin z gosenicami in listnimi ušmi. Škodljivci so nenadzorovana spremenljivka, ki je potencialno neenakomerno prizadela rastline in tako vplivala na rezultate raziskave, sploh kar se tiče končne biomase rastlin.

### Zaključek

Ugotovili smo, da z dognovanjem z  $ZnSO_4$  lahko povečamo koncentracije Zn v delih ohrovta in navadnega prosa, namenjenih za prehrano. Potrdili smo tudi, da so rastline po treh tednih dognovanja z  $ZnSO_4$ , vsebovale večjo koncentracijo Zn brez spremembe biomase. Vendar pa rastline z  $ZnSO_4$  niso rasle bolje oz. imele višje vsebnosti fotosinteznih pigmentov v primerjavi s kontrolno skupino. Poskus bi bilo smiselno ponoviti še z višjimi koncentracijami  $ZnSO_4$  in večjim številom ponovitev. Visoka koncentracija Zn v rastlinah je pomembna za vzdrževanje in zlasti izboljšanje prehranskega statusa pridelkov.

### Literatura

1. Abay S, Pirlak L, 2014. Effects of iron sulfate, zinc sulfate, iron chelate, powder sulphur and humic acid applications on vegetative

growth of sweet cherry (*Prunus avium* L.). Erwerbs-Obstbau 59: 71–75.

- Boone C, Bond C, Buhl K, Stone D, 2012. Zinc sulfate general fact sheet. <http://npic.orst.edu/factsheets/zns04gen.html> (26. dec. 2022)
- Bloodnick E, 2022. Role of zinc in plant culture. <https://www.pthorticulture.com/en/training-center/role-of-zinc-in-plant-culture/> (22. dec. 2022)
- Lichtenthaler HK, Buschmann C, 2001. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. Current Protocols in Food Analytical Chemistry, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey.
- Monni S, Uhlig C, Junttila O, Hansen E, Hynynen J, 2001. Chemical composition and ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to aboveground element application. Environmental Pollution, 112, 3: 417-426.
- Nečemer M, Kump P, Ščančar J, Jačimović R, Simčič J, Pelicon P, Budnar M, Jeran Z, Pongrac J, 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.
- 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.

8. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. 2022. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
9. Rabinovich D, Smadi Y, Zinc. 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547698/> (22. dec. 2022)
10. Salama A, 2015. Effect of algae extract and zinc sulfate foliar spray on production and fruit quality of orange tree cv. Valencia. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 8: 51-62.
11. Siwek M, Szewczyk B, Dudek D, Styczeń K, Sowa-Kućma M, Młyniec K, Siwek A, Witkowski L, Pochwat B, Nowak G, 2013. Zinc as a marker of affective disorders. *Pharmacological Reports*, 65, 6: 1512-1518.
12. Stansell Z, Hyma K, Fresnedo-Ramírez J, Sun Q, Mitchell S, Björkman T, Hua J, 2018. Genotyping-by-sequencing of *Brassica oleracea* vegetables reveals unique phylogenetic patterns, population structure and domestication footprints. *Horticulture Research*, 5, 38: 1-10.
13. White PJ, Broadley MR, 2009. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *The New phytologist*, 182, 1: 49-84.
14. White PJ, Pongrac P, Sneddon CC, Thompson JA, Wright G, 2018. Limits to the biofortification of leafy brassicas with zinc. *Agriculture*, 8, 32: 1-14.
15. World Health Organization. 2022. <https://www.who.int/home/search?indexCatalogue=genericsearchindex1&searchQuery=zincwords&Mode=AllWords> (28. dec. 2022)
16. Zafar S, Hasnain Z, Perveen S, Iqbal N, Zafar A, 2021. Deciphering physio-biochemical characteristics of ZnSO<sub>4</sub> primed wheat (*Triticum aestivum* L.) plants grown under salt stress. *Pakistan Journal of Botany*, 53, 6: 1943-1952.

# Vpliv izvlečkov iz listov in stebel navadne ajde (*Fagopyrum esculentum*) na rast izbranih patogenih gliv

Agata Kokalj Malovrh, Neža Škoda, Eva Žejn, Sara Žitko

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

- Cilj raziskave je bil preučiti vpliv izvlečkov listov in stebel navadne ajde v različnih koncentracijah na rast patogenih gliv *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* in endofitske glive *Epicoccum nigrum*.
- Rezultate smo pridobili z merjenjem površine gliv na gojišču (program ImageJ), določanjem vsebnosti skupnih fenolov (Folin-Ciocalteu metoda) in rutina (metoda z  $AlCl_3$ ) ter s spremljanjem rasti gliv. Za obdelavo pridobljenih podatkov smo uporabili program R, kjer smo izvedli enosmerno ANOVO in Tukey post hoc test ( $p < 0,05$ ).
- Rezultati so pokazali, da izvlečki stebel in listov ajde na nobeno testirano glivo ne delujejo zaviralno, temveč v primerjavi z glivami na kontrolnih gojiščih rast celo spodbujajo.
- Poleg tega je imela pomembno vlogo tudi koncentracija izvlečkov listov in stebel. Pokazalo se je, da višja kot je bila koncentracija izvlečka, bolj je bila rast spodbujena v primerjavi s kontrolami. Rezultati analize vsebnosti fenolov in flavonoidov pa so pokazali, da je bila tako vsebnost skupnih fenolov kot vsebnost flavonoidov v listih navadne ajde višja kot v njenih steblih.

**Ključne besede:** protiglivni učinek, spodbuda rasti, biokemijska analiza, bioaktivne snovi, fenoli



## Uvod

Navadna ajda (*Fagopyrum esculentum*) je rastlina iz družine dresnovk (Polygonaceae), ki se že stoletja uporablja v prehrani in tradicionalni medicini (Stibilj in sod., 2004). Pripišemo ji lahko številne pozitivne lastnosti, kot so na primer njena prehranska vrednost, saj je bogata z beljakovinami, vlakninami, vitamini (še posebej vitamini skupine B) in minerali (magnezij, mangan, cink in železo) (Huda in sod., 2021). Ker ne vsebuje glutena, je primerna za ljudi s celiakijo ali občutljivostjo na gluten (Amador in sod., 2014). Poleg tega ima blagodejen vpliv na zdravje ljudi, saj dokazano pomaga uravnati raven sladkorja v krvi (Ruan in sod., 2022), je bogata z aminokislino lizinom, ki je bistvenega pomena za zdravje kosti, proizvodnjo kolagena, absorpcijo kalcija in delovanje imunskega sistema (Lv in sod., 2022) ter vsebuje bioaktivno snov rutin, ki pomaga zmanjšati tveganje za srčno-žilne bolezni (Luthar in sod., 2021). Še ena pomembna lastnost navadne ajde pa je njena okolju prijazna pridelava, saj je rastlina, ki dobro uspeva na revnejših tleh in je manj zahtevna glede gnojenja (Martinez in sod., 2022). Posledično njena pridelava zahteva manjšo uporabo pesticidov in umetnih gnojil, kar omogoča okolju prijazno kmetijsko prakso.

Poleg navadne ajde se po svetu prideluje tudi tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum*). Navadna ajda ima bele ali rožnate cvetove in zrnje pravilne trikotne oblike, tatarska ajda pa ima manjše cvetove zeleno rumene barve in majhna, zgrbančena semena. Za razliko od navadne ajde, tatarska ajda uspeva predvsem na višje ležečih območjih, saj je bolj odporna na zmrzal in druge ekstremne okoljske razmere (Campbell in sod., 1997).

Velik problem pri pridelavi ajde predstavlja kontaminacija zrnja z različnimi vrstami gliv, ki proizvajajo številne sekundarne metabolite, med drugim mikotoksine. Zato so te glive nevarne tako za rastline (pri njih povzročajo številne bolezni) kot tudi za živali in ljudi, ki te rastline uživamo kot del naše prehrane (Mravlje in sod., 2021). Namen naše raziskave je bil ugotoviti ali imajo izvlečki iz listov in stebel navadne ajde protiglivo aktivnost oz. vpliv na rast izbranih patogenih gliv: *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* in endofitske glive *Epicoccum nigrum*. Poleg testiranja rasti izbranih gliv pa je bila opravljena tudi biokemijska karakterizacija izvlečkov ajde, s katero smo pridobili podatke o vsebnosti skupnih fenolov in rutina – bioaktivnih snovi, ki naj bi vplivale na rast omenjenih gliv.

### Hipoteze:

- Hipoteza 1: Izvlečki iz listov in stebel navadne ajde bodo zavirali rast izbranih patogenih gliv.
- Hipoteza 2: Učinek izvlečkov iz ajde na patogene glive bo odvisen od koncentracije izvlečka.
- Hipoteza 3: Učinek izvlečkov iz ajde na patogene glive bo odvisen od vrste izvlečka.
- Hipoteza 4: Izvlečki iz listov in stebel navadne ajde bodo vsebovali različne koncentracije fenolov in flavonoidov.

## Metode in materiali

### Priprava izvlečka

Za poskus smo najprej pripravili izvlečke iz listov in stebel navadne ajde. Posušili smo liste in stebela ajde in jih zmleli v

fin prah. V erlenmajerici smo pripravili mešanico 50 g prahu listov ali stebel ajde s 400 mL 70% etanola. Pripravili smo 2 erlenmajerici s prahom listov in dve erlenmajerici s prahom stebel. Mešanica se je 24 ur stresala na stresalniku. Primarni izvleček smo prefiltrirali skozi filtrirni papir in izparili etanol na rotavaporju. Stehtali smo dobljeno suho snov. Suh prah smo ponovno raztopili v 70 % etanolu v znani koncentraciji (stebela: 0,2 g/mL in listi: 0,4 g/mL) in mešanico kasneje v primernih koncentracijah dodali gojiščem.

### Gojenje gliv na gojišču PDA

Pripravili smo gojišča PDA z izvlečki listov in stebel ajde. Koncentracije izvlečkov stebel so bile 1 g/L gojišča in 2 g/L gojišča in koncentracije izvlečkov listov so bile 2 g/L gojišča in 4 g/L gojišča. V kontrolna gojišča smo dodali ustrezen ekvivalent etanola (14 mL). Pod sterilnimi pogoji, v laminariju, ob gorilniku, smo s pomočjo spatule prenesli 5mm širok in 5mm dolg košček gojišča z enotedensko svežo kulturo glive na novo gojišče PDA. Nacepili smo patogene glive *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* in endofitsko glivo *Epicoccum nigrum*. Za vsako glivo na vsakem od gojišč smo naredili po 6 ponovitev. Glive smo gojili pri temperaturi 22°C v temi. 10 dni smo spremljali rast gliv na posameznem gojišču.

### Določanje skupnih fenolov

Za določanje skupnih fenolov smo uporabili metodo s Folin-Ciocalteu reagentom. Najprej smo naredili 100-kratne in 1000-kratne redčitve izvlečkov. Vzorcju 100 µL izvlečka smo dodali 750 µL dH<sub>2</sub>O in 50 µL FC reagenta. Naredili smo 3 tehnične ponovitve. Slepri probi smo dodali 800 µL dH<sub>2</sub>O, naredili 2 ponovitvi. Počakali smo 3 minute, nato smo v vsak vzorec in slepo probo dodali 100µL 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Inkubirali smo 60 minut v temi in nato pomerili absorbanco pri 750nm. Za standard smo uporabili raztopino katehola.

### Določanje flavonoidov

Najprej smo naredili 100-kratne in 1000-kratne redčitve izvlečkov. Redčili smo s dH<sub>2</sub>O. Kot vzorec smo vzeli po 900 µL redčenega izvlečka ajde. Vzorcem smo dodali 100 µL 5% AlCl<sub>3</sub> v metanolu, naredili smo 3 tehnične ponovitve. Slepri probi smo dodali 100µL metanola, naredili smo 2 ponovitvi. Inkubirali smo 30 min v temi. Pomerili smo absorbanco pri 425 nm. Standard je bila standardna raztopina rutina.

### Obdelava in statistična analiza podatkov

Rast gliv smo spremljali s spremljanjem prirasta gliv na ploščah, ki smo jih v nadaljevanju slikali in jih obdelali s programom ImageJ, kjer smo izmerili površine. Slike smo obdelali s programom ImageJ. Podatke, pridobljene z meritvami smo statistično obdelali. Za obdelavo podatkov smo uporabili program R (R Core Team, 2023), kjer smo izvedli enosmerno ANOVO in Tukey post hoc test (p<0,05).

## Rezultati

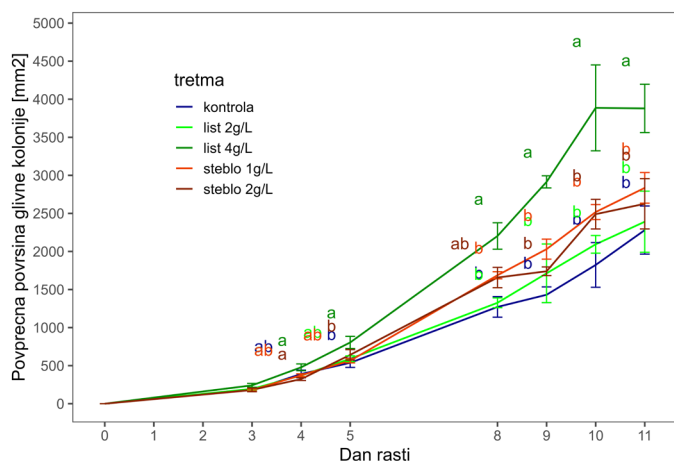
### Rast gliv na različnih gojiščih

Iz slike 1 je razvidno, da izvlečki navadne ajde ne delujejo zaviralno na glivo *Alternaria alternata*, saj so bile povprečne

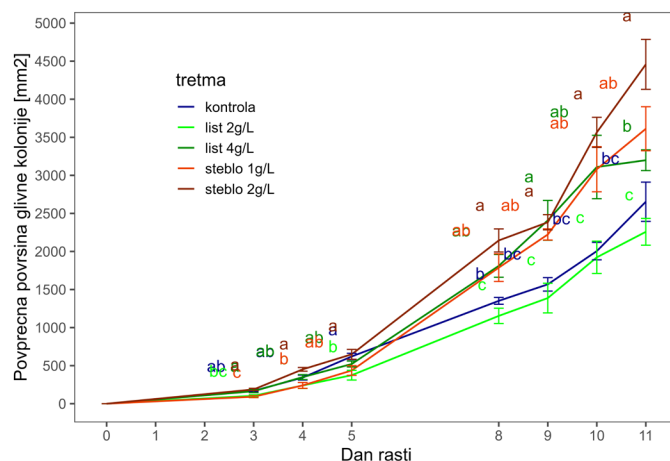
**Tabela 1:** Vsebnost fenolov in flavonoidov v ajdi

Del rastline	flavonoidi (mg/mL)	fenoli (mg/mL)
List	5,73 ± 0,03	13,4 ± 0,5
Steblo	1,67 ± 0,08	2,93 ± 0,17

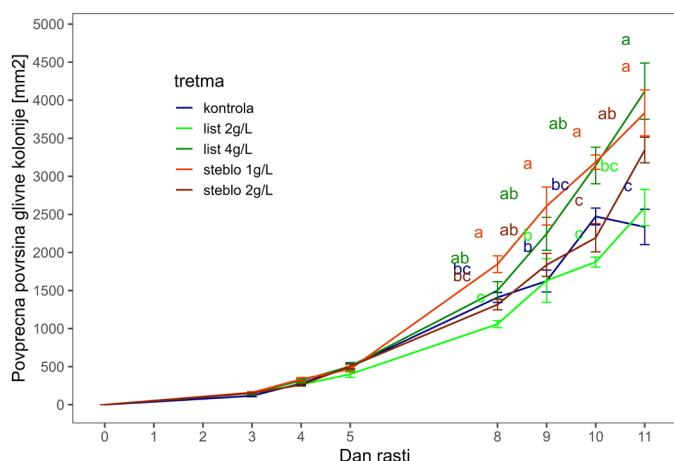
velikosti kolonij na gojiščih z dodanimi izvlečki stebel in listov ajde primerljive ali celo večje od kolonije glive na kontrolnem gojišču. Od 3. dneva dalje smo opazili statistično značilno razliko v povprečni površini kolonij med glivami, ki so rastle na gojiščih z dodanim izvlečkom lista v koncentraciji 4 g/L in ostalimi tretmaji, ki pa se med seboj niso razlikovali.



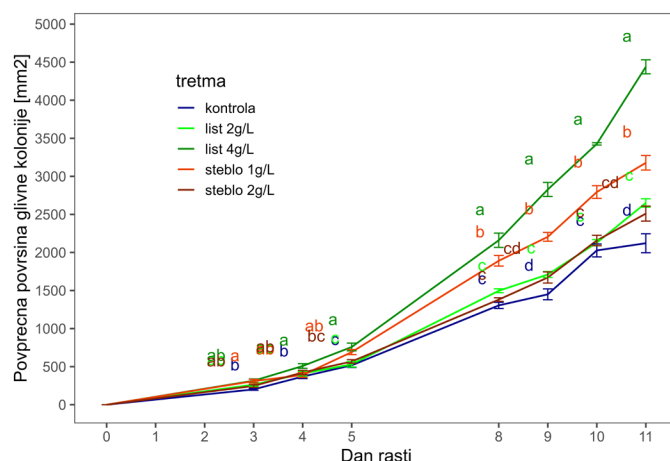
**Slika 1:** Grafični prikaz rasti glive *Alternaria alternata* po dnevih na kontrolnem gojišču in gojiščih z dodanimi izvlečki: list 2 g/L – dodan izvleček lista ajde v koncentraciji 2 g/L, list 4 g/L – dodan izvleček lista ajde v koncentraciji 4 g/L, steblo 1 g/L – dodan izvleček stebela ajde v koncentraciji 1 g/L, steblo 2 g/L – dodan izvleček stebela ajde v koncentraciji 2 g/L. Prikazana so povprečja +/- standardne napake (n=6). Različne črke pomenijo statistično značilne razlike med posameznimi skupinami na določen dan opazovanja (enosmerna ANOVA, Tukey post hoc test,  $p < 0,05$ ).



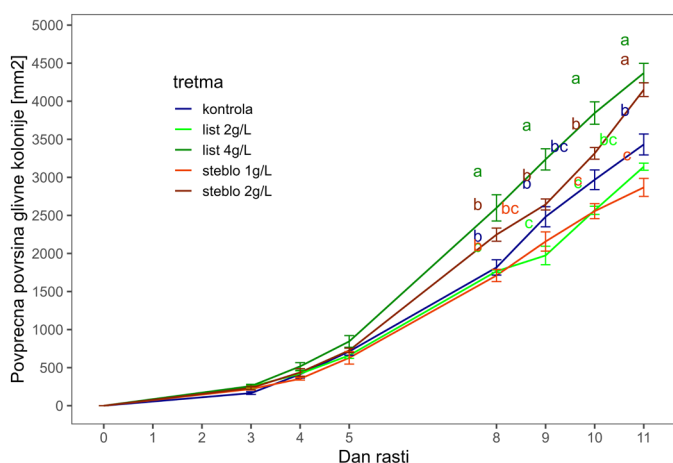
**Slika 2:** Grafični prikaz rasti glive *Alternaria infectoria* po dnevih na kontrolnem gojišču in gojiščih z dodanimi izvlečki: list 2 g/L – dodan izvleček lista v koncentraciji 2 g/L, list 4 g/L – dodan izvleček lista v koncentraciji 4 g/L, steblo 1 g/L – dodan izvleček stebela v koncentraciji 1 g/L, steblo 2 g/L – dodan izvleček stebela v koncentraciji 2 g/L. Prikazana so povprečja +/- standardne napake (n=6). Različne črke pomenijo statistično značilne razlike med posameznimi skupinami na določen dan opazovanja (enosmerna ANOVA, Tukey post hoc test,  $p < 0,05$ ).



**Slika 3:** Grafični prikaz rasti glive *Fusarium fujikuroi* po dnevih na kontrolnem gojišču in gojiščih z dodanimi izvlečki: list 2 g/L – dodan izvleček lista v koncentraciji 2 g/L, list 4 g/L – dodan izvleček lista v koncentraciji 4 g/L, steblo 1 g/L – dodan izvleček stebela v koncentraciji 1 g/L, steblo 2 g/L – dodan izvleček stebela v koncentraciji 2 g/L. Prikazana so povprečja +/- standardne napake (n=6). Različne črke pomenijo statistično značilne razlike med posameznimi skupinami na določen dan opazovanja (enosmerna ANOVA, Tukey post hoc test,  $p < 0,05$ ).



**Slika 4:** Grafični prikaz rasti glive *Fusarium graminearum* po dnevih na kontrolnem gojišču in gojiščih z dodanimi izvlečki: list 2 g/L – dodan izvleček lista v koncentraciji 2 g/L, list 4 g/L – dodan izvleček lista v koncentraciji 4 g/L, steblo 1 g/L – dodan izvleček stebela v koncentraciji 1 g/L, steblo 2 g/L – dodan izvleček stebela v koncentraciji 2 g/L. Prikazana so povprečja +/- standardne napake (n=6). Različne črke pomenijo statistično značilne razlike med posameznimi skupinami na določen dan opazovanja (enosmerna ANOVA, Tukey post hoc test,  $p < 0,05$ ).



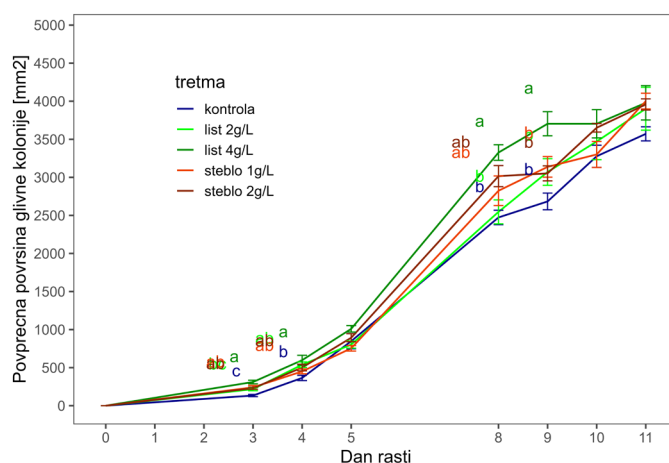
**Slika 5:** Grafični prikaz rasti glive *Fusarium oxysporum* po dnevih na kontrolnem gojišču in gojiščih z dodanimi izvlečki: list 2 g/L – dodan izvleček lista v koncentraciji 2 g/L, list 4 g/L – dodan izvleček lista v koncentraciji 4 g/L, steblo 1 g/L – dodan izvleček stebela v koncentraciji 1 g/L, steblo 2 g/L – dodan izvleček stebela v koncentraciji 2 g/L. Prikazana so povprečja +/- standardne napake (n=6). Različne črke pomenijo statistično značilne razlike med posameznimi skupinami na določen dan opazovanja (enosmerna ANOVA, Tukey post hoc test,  $p < 0,05$ ).

Na sliki 2 je prikazana rast glive *Alternaria infectoria*. Pri primerjavi kolonij med skupinami opazimo, da gliva raste najhitreje na gojišču s stebelnim izvlečkom v koncentraciji 2 g/L. Analiza rezultatov kaže, da ostala gojišča nimajo učinka na rast glive. Tudi pri tej glivi ni opaziti zaviralnega učinka, izjema je 8. dan vzorčenja, ko je bila površina glive na gojišču s stebelnim izvlečkom v koncentraciji 2 g/L manjša od kontrole. Iz slike 3 je razvidno, da izvlečki navadne ajde ne delujejo zaviralno na glivo *Fusarium fujikuroi*, saj so bile povprečne velikosti kolonij na gojiščih z dodanimi izvlečki stebel in listov ajde primerljive ali celo večje od kolonije glive na kontrolnem gojišču. Od 5. dneva dalje smo opazili statistično značilno razliko v povprečni površini kolonij med glivami, ki so rastle na gojiščih z dodanim izvlečkom stebela v koncentraciji 1 g/L in ostalimi tretmaji, ki pa se med seboj niso razlikovali.

Tudi pri primerjavi rasti kolonij *Fusarium graminearum*, smo opazili pozitiven vpliv na rast na posameznih gojiščih z izvlečki listov kot stebel (Slika 4). Rezultati površin kolonij kažejo, da izvlečka list 4 g/L in steblo 1g/L spodbujata rast glive *Fusarium graminearum*. Ostali dve gojišči na rast glive nista imeli učinka skozi celotni čas opazovanja, saj ni opaznih razlik v površini.

Pri glivi *Fusarium oxysporum* smo opazili pozitiven vpliv izvlečka na rast glive. Razlike v rasti se pojavijo po 5. dnevu opazovanja – na gojišču z dodanim izvlečkom lista v koncentraciji 4 g/L, kjer je gliva rastla najhitreje. Podobno je na 11. dan razvidna statistična razlika v rasti kolonij na gojišču s stebelnim izvlečkom v koncentraciji 2 g/L in v primerjavi manjšimi ostalimi skupinami. Na 9. dan izjemoma opazimo manjšo rast glive *Fusarium oxysporum* na gojišču z izvlečkom lista v koncentraciji 2 g/L v primerjavi s kontrolnim gojiščem. Podobno zmanjšano rast *Fusarium oxysporum* za posamezni dan smo opazili tudi pri *Alternaria infectoria*.

V primeru glive *Epicoccum nigrum* smo opazili manjše razlike v rasti na posamezne dneve opazovanja – na gojišču z dodanim izvlečkom lista v koncentraciji 4 g/L je denimo na 3. in 4., ter



**Slika 6:** Grafični prikaz rasti glive *Epicoccum nigrum* na gojišču z dodanimi izvlečki navadne ajde: list 2 g/L – dodan izvleček lista v koncentraciji 2 g/L, list 4 g/L – dodan izvleček lista v koncentraciji 4 g/L, steblo 1 g/L – dodan izvleček stebela v koncentraciji 1 g/L, steblo 2 g/L – dodan izvleček stebela v koncentraciji 2 g/L. Prikazana so povprečja +/- standardne napake (n=6). Različne črke pomenijo statistično značilne razlike med posameznimi skupinami na določen dan opazovanja (enosmerna ANOVA, Tukey post hoc test,  $p < 0,05$ ).

8. in 9. dan opazovanja rastla bolje kot na kontrolnem gojišču. Med gojišči z dodanimi ostalimi izvlečki in kontrolo ni bilo razlike v rasti. Na predzadnji in zadnji dan opazovanja nismo več zaznali razlik v rasti na različnih gojiščih.

## Diskusija

Tekom raziskave smo postavili hipoteze, da bodo imeli izvlečki listov in stebel ajde zaradi vsebnosti različnih bioaktivnih snovi, zaviralen učinek na rast gliv, vendar pa naši rezultati kažejo, da izvlečki stebel in listov na nobeno testirano glivo ne delujejo zaviralno, temveč njihovo rast celo spodbujajo. Izjemo smo zasledili samo pri posameznih dnevih in sicer pri glivi *Alternaria infectoria* (slika 1), kjer je statistična analiza pokazala, da je pri listnem izvlečku v koncentraciji 2 g/L bila rast kolonije počasnejša v primerjavi s kontrolo in pri glivi *Fusarium oxysporum* (slika 5), kjer se je pokazala majhna razlika v rasti na stebelnem izvlečku v koncentraciji 1 g/L, kjer smo zaznali zmanjšano rast, vendar pri nobeni od omenjenih gliv ni bilo opaženo izrazitejše zavrtje rasti, s čimer smo postavljeno hipotezo ovrgli, saj noben izvleček očitno ni vseboval dovolj aktivnih protiglivičnih snovi, da bi le-ta zaviral rast gliv. Izvlečki so kvečjemu vsebovali snovi, ki so rast gliv spodbudili. Poleg fenolov in flavonoidov so smo pri pripravi izvlečkov ekstrahirali tudi sladkorje, ki so prisotni v rastlinah. Več jih je prisotnih v listih, kar je glede na primerjavo s kontrolo na samo rast gliv delovalo pozitivno.

V nadaljevanju smo si postavili cilj preveriti, ali bo imel učinek koncentracije in vrsta izvlečka pomemben vpliv na rast izbrane patogene glive, pri čemer smo predpostavili, da višja kot bo koncentracija dodanega izvlečka stebela oz. lista, do močnejšega zaviralnega učinka rasti bo prišlo. Tudi to hipotezo smo ovrgli, saj se je v vseh primerih zgodil ravno nasproten učinek in sicer višja kot je bila koncentracija, bodisi listnega bodisi stebelnega izvlečka, do večje spodbude rasti je prišlo. Rezultati so pokazali,

da so na gojišču z listnim izvlečkom v koncentraciji 4 g/L, testirane glive imele v povprečju največjo rast, z izjemo glive *Alternaria infectoria* (slika 1), kjer je bila ta največja pri izvlečku stebela v koncentraciji 2 g/L. Tekom poskusa smo tudi preverjali ali ima na rast posamezne glive statistično pomemben vpliv tudi sama koncentracija ali listnega ali stebelnega izvlečka. Pri izvlečku listov, kjer sta bili uporabljeni koncentraciji 2 g/L in 4 g/L se je izkazalo, da ima sama koncentracija pomemben vpliv na rast vseh izbranih gliv in sicer je bila pri višji koncentraciji rast glive bolj spodbujena kot pri nižji koncentraciji glede na kontrolo. Naše pridobljene rezultate bi lahko pojasnili s tem, da se v listnih izvlečkih nahaja dodaten vir ogljika, ki spodbuja rast gliv. Predvidevali smo, da bi ta vir lahko bil ekstrahirani sladkorji, ki jih je rastlina hranila bodisi v listu oz. stebelu. Zavrtja rasti glive *Epicoccum nigrum* (slika 6) nismo zabeležili, kar je pričakovano, saj je omenjena gliva pogost endofit številnih rastlinskih vrst in se je tekom evolucije verjetno prilagodila na mikookolje te rastline (Taguian in sod., 2021). Patogena gliva *Alternaria alternata* ima sposobnost sinteze ekstracelularnih encimov kot so lakaze, fenol oksidaze in amilaze ob prisotnosti fenolnih spojin (Thakkar in Bhatt, 2020). Pri vsebnosti fenolov in flavonoidov smo zaznali, da se povečane koncentracije obeh nahajajo v listih pri čimer lahko sklepamo, da je do pospešene rasti v listih pri višji koncentraciji prišlo zaradi sinteze lakaze in podobnih encimov, ki so fenole razgradile in porabile kot alternativni vir ogljika.

Polifenolne spojine so heterogena skupina rastlinskih sekundarnih metabolitov, ki jih delimo na fenolne kisline, flavonoide, stilbene, lignane ter ostale (Ganesan in Xu., 2017). Sprememba vsebnosti fenolov igra pomembno vlogo pri okužbi z glivami. Povečanje vsebnosti fenolnih spojin omogoči učinkovitejšo odstranitev reaktivnih kisikovih spojin in/ali povečanje vgradnje in navzkrižnega povezovanja fenolnih spojin s celično steno. Flavonoidi pa s svojim protibakterijskim delovanjem ščitijo seme med kalitvijo (Kovačec in sod., 2016). Vrednosti celokupnih fenolov so se pri našem poskusu pri izvlečkih listov gibale v območju 13 mg/mL in pri izvlečku stebela v območju 2,9 mg/mL (preglednica 1). Glede na pridobljene rezultate smo našo hipotezo, kjer smo predpostavili, da bo višja koncentracija izvlečka bolj zaviralno vplivala na rast, ovrgli. Izkazalo se je, da listni izvleček v višji koncentraciji spodbuja rast vseh patogenih gliv, medtem ko pri endofitski glivi razlike med rastjo na izvlečku in kontrolnem gojišču ni bilo. Listni izvleček z nižjo koncentracijo pri glivah *Alternaria alternata* (slika 1), *Epicoccum nigrum* (slika 6), ni vplival na rast glive. Pri ostalih dveh glivah *Alternaria infectoria* (slika 2) in *Fusarium oxysporum* (slika 5) smo zaznali zmanjšano rast na listnem izvlečku z nižjo koncentracijo pri čimer lahko sklepamo, da je verjetno bila koncentracija induktorja sinteze ekstracelularnih encimov prenizka za indukcijo sinteze, vendar bi bile pri tem potrebne nadaljnje analize, da bi to lahko zanesljivo potrdili. Podatki o vplivu stebelnih izvlečkov na rast gliv so pri različnih vrstah precej različni: pri glivi *Alternaria infectoria* (slika 2) je višja koncentracija spodbujala rast, medtem ko nižja koncentracija ni vplivala na rast. Edini primer zaviralnega učinka je opaziti pri *Fusarium oxysporum* (slika 5), kjer nižja koncentracija stebelnega izvlečka zavirala rast, vendar zgolj na določene dneve opazovanja. Pri glivi *Fusarium graminearum* (slika 4) je rezultat nasproten. *Fusarium oxysporum* (slika 5) ima na gojišču s stebelnim izvlečku boljšo rast, višja koncentracija stebelnega izvlečka na rast ne vpliva

več (ni razlike v primerjavi s kontrolo). Podatki za stebelni izvleček so torej enotni, zato zaključujemo samo, da stebelni izvleček nima zaviralnega učinka rasti na uporabljene glive v poskusu. Dziaček in sod. (2018) so v svoji študiji naredili analizo izvlečkov listov ajde različnih kultivarjev in ugotovili, da se pri vseh v najvišji koncentraciji nahaja ferulna kislina, ki deluje antimikotično, vendar pri našem poskusu verjetno ni bila prisotna v zadostni koncentraciji, da bi lahko rekli, da znatno vpliva na rast in razvoj vseh patogenih gliv, vendar lahko trdimo, da ni vplivala na inhibicijo rasti gliv, saj so le-te imele statistično v povprečju večje kolonije, glede na kontrolo. Tekom poskusa smo preverjali rast izbranih gliv na listnih in stebelnih izvlečkih posamezno. V obstoječi literaturi (Müller in sod., 2012), so navedli, da ima pomemben vpliv na proizvodnjo mikotoksinov in rast tudi kokultivacija gliv *Alternaria alternata* in *Alternaria infectoria*, zato bi bilo smiselno posamezne glive medsebojno inokulirati na različnih izvlečkih, da bi preverili, kakšen je vpliv posamezne glive na rast druge glive v tem specifičnem okolju, da bi lahko lažje razjasnili, kako glive sobivajo v naravnem okolju.

## Zaključki

Tekom rezultatov smo pokazali, da bioaktivne učinkovine, ki se sintetizirajo v navadni ajdi, ne predstavljajo dovolj učinkovite zaščite pred nobeno uporabljeno glivo, saj v uporabljenih koncentracijah ne zavirajo njihove rasti, ampak rast, glede na kontrolo, spodbudijo. S tem smo zaključili, da navadna ajda sama po sebi ne sintetizira dovolj antimikotičnih snovi, da bi zavrle rast patogenih gliv, saj so le te na okolje prilagojene. Po vsej verjetnosti uporabljajo bioaktivne snovi, ki jih sintetizira ajda, kot alternativni vir ogljika, kar jim omogoča kompetitivno prednost. Tekom analize smo preverili tudi vsebnost fenolov in flavonoidov, kjer smo višje koncentracije zaznali v listih, kar je vplivalo spodbujevalno na rast pri večini uporabljenih gliv, z izjemo glive *Alternaria infectoria*, kjer so bile kolonije večje pri višji koncentraciji stebelnega izvlečka. Tekom rezultatov se je izkazalo, da ima koncentracija izvlečka ajde pomemben vpliv na rast gliv. Za listni izvleček je opazna promocija rasti nekaterih gliv, nasprotno pa nižja koncentracija listnega ekstrakta lahko deluje zaviralno za glivi *Alternaria infectoria* in *Fusarium fujikuroi*, kjer je bila po vsej verjetnosti koncentracija bioaktivnih učinkovin prenizka, da bi se dosegel prag povečane sinteze ekstracelularnih encimov, ki bi znatno lahko vplivali na rast gliv. Zelo različen odziv gliv na izvlečka ajde kaže na kompleksne organizme, ki imajo različen odziv na spremembo ravnih pogojev.

Za boljšo razjasnitev rezultatov bi bilo smiselno preveriti tudi samo sestavo komponent bioaktivnih snovi, ki smo jih tekom poskusa preverjali celokupno pri navadni ajdi, da bi lažje lahko razložili zakaj je pri določenih patogenih glivah prišlo do spodbujene rasti. Tekom rezultatov smo pokazali, da so patogene glive občutljive že na majhne razlike v koncentraciji posameznega izvlečka. V ta namen bi bilo tudi smiselno pojasniti in razjasniti na kakšen način se gliva na določeno okolje tako, da bi preverili tudi samo sestavo ekstracelularnih encimov in drugih metabolnih presnovkov, ki jih gliva sintetizira. Smiselno bi bilo preveriti tudi generacijske čase (specifično hitrost rasti) posameznih gliv in jih normalizirati, da bi lahko lažje videli vpliv na rast posamezne patogene glive.

## Literatura

1. Campbell GC. 1997. Buckwheat. *Fagopyrum esculentum* Moench. International Plant Genetic Resources Institute, Rim, Italija.
2. Dziadek K, Kopeć A., Piątkowska E, Leszczyńska T, Pisulewska E, Witkowicz R, Bystrowska B, Francik R. 2018. Identification of polyphenolic compounds and determination of antioxidant activity in extracts and infusions of buckwheat leaves. *European Food Research and Technology* 244: 333–343.
3. Ganesan K, Xu B. 2017 Polyphenol-Rich Dry Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and Their Health Benefits. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 11: 2331.
4. 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.
5. Keriene I, Mankeviciene A, Blazyte J. 2020. The effect of antifungal extracts on the contamination of grain with microfungi. *Food Science & Nutrition* 8, 3: 1375-1382.
6. Keriene I, Mankeviciene A, Cesnuleviciene R. 2018. Risk factors for mycotoxin contamination of buckwheat grain and its products. *World Mycotoxin Journal* 11, 4: 519–529.
7. Kovačec E. 2016. Endofitske glive iz semen navadne ajde in njihove interakcije z bakrovimi spojinami. Dokt. disertacija. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana.
8. Luthar Z, Golob A, Germ M, Vombergar B, Kreft I. 2021. Tartary Buckwheat in Human Nutrition. *Plants*, 10, 4: 700.
9. Lv Z, Shi W, Zhang, Q. 2022. Role of Essential Amino Acids in Age-Induced Bone Loss. *International Journal of Molecular Sciences* 23, 19: 11281.
10. Martinez S, Gabriel JL, Allende-Montalbán R, San-Juan-Heras R, Delgado MM. 2022. The Application of a Bio-Stabilized Municipal Solid Waste-Based Fertilizer for Buckwheat Production. *Agriculture*, 12, 6: 776.
11. Moreno Amador ML, Comino Montilla IM, Sousa Martín C. 2014. Alternative Grains as Potential Raw Material for Gluten– Free Food Development in the Diet of Celiac and Gluten– Sensitive Patients. *Austin Journal of Nutrition and Metabolism* 2, 3: 1-9.
12. 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: 851.
13. Müller M, Steier I, Köppen R, Siegel D, Proske M, Korn U, Koch M. 2012. Cocultivation of phytopathogenic *Fusarium* and *Alternaria* strains affects fungal growth and mycotoxin production. *Journal of applied microbiology* 113: 874-87.
14. R Core Team (2023). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. (<https://www.R-project.org/>).
15. Ruan J, Zhou Y, Yan J, Zhou M, Woo SH, Weng W, Cheng J, Zhang K. 2022. Tartary Buckwheat: An Under-Utilized Edible and Medicinal Herb for Food and Nutritional Security. *Food Reviews International* 38, 4: 440-454.
16. Stibilj V, Kreft I, Smrkolj P, Osvald J. 2004. Enhanced Selenium Content in Buckwheat (*Fagopyrum Esculentum* Moench) and Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) Seeds by Foliar Fertilisation. *European Food Research and Technology* 219, 2: 142-144.
17. Taguiam JD, Evallo E, Balendres MA. 2021. Epicoccum species: ubiquitous plant pathogens and effective biological control agents. *European Journal of Plant Pathology* 159, 4: 713–725.
18. Thakkar AT, Bhatt SA. (2020). Isolation, identification, and optimization of fungal laccase from *Alternaria alternata*. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* 8, 3: 64-69.

# Vpliv izvlečkov zelenih delov tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum*) na rast izbranih vrst gliv

Julija Horvat, Anja Javornik, Barbara Knez, Anže Nemec

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

- Namen raziskave je bil preučiti vpliv izvlečka iz stebela oziroma listov tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum*) na rast vrst gliv: *Alternaria alternata*, *A. infectoria*, *Fusarium fujikuroi*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* in *Epicoccum nigrum*.
- V prvem delu eksperimenta smo spektrofotometrično metodo določili vsebnost sekundarnih metabolitov (fenolov in flavonoidov) v izvlečkih zelenih delov tatarske ajde. V drugem delu smo pripravili dve različni koncentraciji izvlečka stebela (1 g/L in 2 g/L) ter dve koncentraciji izvlečka listov (2 g/L in 4 g/L). Izvlečke smo vmešali v gojišče PDA in razlili na plošče. Plošče z glivami smo inkubirali deset dni ter jih vsak dan slikali ter na koncu z računalniško analizo izračunali površine.
- Potrdili smo večjo prisotnost fenolov in flavonoidov v listih kot v steblih. Prisotnost fenolov je bila petkrat višja, flavonoidov pa osemkrat. Rezultati so pokazali, da v večini primerov izvlečki ne zavirajo rasti, namreč spodbujajo rast ali pa nimajo vpliva na rast. Ta rezultat lahko pripisujemo vsebnosti fotosintetskih produktov zelenih delov tatarske ajde, ki so bili v izvlečkih.

**Ključne besede:** flavonoidi, fenoli, *Alternaria*, *Fusarium*, *Epicoccum*

## Uvod

Z večanjem svetovne populacije se večajo tudi proizvodne zahteve v kmetijstvu, kjer želimo čim večjo učinkovitost in čim manj izgub pridelka. Za ta namen se v rastlinski produkciji uporablja veliko različnih pesticidov. Med najpomembnejše in najbolj gojene kmetijske rastline sodijo koruza, pšenica in riž, ki se uporabljajo tako za prehrano ljudi, kot tudi za krmo živali (Schafer 2022). Semena in zrna so pogosto izpostavljena glivnim okužbam, predvsem glivam *Alternaria*, *Fusarium*, *Penicillium* in *Aspergillus*, kar predstavlja problem v kmetijski proizvodnji in tudi za zdravje ljudi. Povečana uporaba pesticidov za zatiranje glivnih okužb lahko povzroči kontaminacijo tal in vode ter posledično akutne in kronične škodljive učinke za zdravje ljudi, ki so jim izpostavljeni (Gyawali 2018). Da bi se izognili pretirani uporabi pesticidov (fungicidov), je potrebno odkriti nove učinkovite možnosti zatiranja škodljivcev na pridelku.

Tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) je dvokaličnica, ki jo uvrščamo v družino Polygonaceae. Izvira iz vzhodne Azije, dandanes pa jo gojimo po vsem svetu, predvsem zaradi njenih dobrih prehranskih lastnosti (Luthar s sod. 2021). Kot stranski produkt pridelave ajde pridobimo veliko biomaso zelenih delov rastlin, ki se jih drugače ne uporabi, čeprav lahko vsebujejo določene snovi, ki bi se jih lahko izkoristilo za različne namene. Tatarska ajda vsebuje visoke koncentracije proteinov, esencialnih aminokislin, vlaknin in številne sekundarne metabolite, kot so fenoli in flavonoidi (Zhong s sod 2022). Ti dve skupini kažeta tudi protiglivno delovanje in zavirata nastajanje mikotoksinov. Eden od načinov proti glivnega delovanja flavonoidov je njihova vgradnja v lipidno membrano, ki ji sledi depolarizacija celične membrane, kar povzroči celično smrt (Koval s sod. 2020).

Namen naše raziskave je bil ugotoviti, kako učinkoviti so ekstrakti stebela in listov ajde različnih koncentracij, kot alternativa za zatiranje nekaterih gliv, ki pogosto okužujejo semena in zrna. Postavili smo tudi dve hipotezi. Prva je bila, da vsebujejo listi več fenolov in flavonoidov kot steblo tatarske ajde, druga pa, da bodo gojišča z višjimi koncentracijami izvlečkov tatarske ajde bolj zavirale rast gliv kot gojišča z nižjimi koncentracijami izvlečkov.

## Metode in materiali

### Biološki material

Uporabljeni so bili zeleni deli, torej stebela in listi tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum* Gaertn). Uporabljenih je bilo pet patogenih gliv (*Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium fujikuroi*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*) in endofitska gliva (*Epicoccum nigrum*). Glive so bile gojene na ploščah s krompirjevim dekstroznim agarjem (PDA) z dodanim antibiotikom kloramfenikolom (50 mg/L), pri sobnih pogojih.

### Priprava izvlečka in proti glivni testi

Najprej smo iz listov in stebel tatarske ajde pripravili izvlečke. Listi in stebela so bili posušeni na zraku, ter nato fino zdrobljeni vsak posebej v prah. Izvlečke smo pripravili tako, da smo v steklenico zatehtali 25 g prahu listov ali pa 15 g prahu stebel in dolili 70 % etanol do oznake 400 ml na steklenici. Po 24. urah

stresanja pri 130 rpm smo izvlečke prefiltrirali skozi filtrirni papir. Supernatant smo nato sterilno prefiltrirali skozi (0,22 $\mu$ m) sterilni filter in ga rotavaporirali do suhega.

Stehtali smo dobljen suh izvleček, nato pa smo ga raztopili in redčili z etanolom. Pri stebelu smo naredili založno raztopino z 2 g stebelnega izvlečka na 10 mL etanola, pri listih pa z 4 g listnega izvlečka na 10 mL etanola. Pripravili smo pet različnih gojišč: kontrola, gojišče S1, gojišče S2, gojišče L1 in gojišče L2. Osnovno gojišče je vsebovalo 15 g PDA, 35 mg antibiotika kloramfenikol in 700 mL destilirane vode. Stebelni izvleček smo v različnih koncentracijah dodali v S1 (1 g/L) in S2 gojišče (2 g/L). Listni ekstrakt pa smo v različnih koncentracijah dodali v L1 (2 g/L) in L2 gojišče (4 g/L). V kontrolno gojišče smo dodali ustrezen ekvivalent 70 % etanola (10 mL).

Na gojišča smo nato nacepili vse glivne vrste tako, da smo iz gojišča PDA s svežo, enotedensko kulturo posamezne glive izrezali 5x5 mm velik košček in ga prenesli na izbrano gojišče (kontrolno in vsa gojišča z izvlečki). Za vsako glivo smo za vsako gojišče naredili po 6 ponovitev. Glive smo inkubirali 11 dni, ter jih v času rasti dnevno fotografirali. Slike smo analizirali z uporabo programa ImageJ.

### Določanje fenolov

Najprej smo naš osnovni koncentriran izvleček (2 g/10 mL za steblo in 4 g/10 mL za liste) redčili 100x in 1000x. Iz vsake redčitve smo naredili tri vzorce in dve slepi probi. Za vsak vzorec smo združili 100  $\mu$ l redčenega ekstrakta, 750  $\mu$ l destilirane vode in 50  $\mu$ l Folin-Ciocalteu reagenta. Za vsako slepo probo smo združili 100  $\mu$ l redčenega ekstrakta in 800  $\mu$ l destilirane vode. Po 3 minutah smo vsakemu vzorcu in vsaki slepi probi dodali 100  $\mu$ l 20 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Po 60 min inkubaciji v temi smo izmerili absorbanco pri 750 nm. Kot standard umeritveno krivuljo smo uporabili raztopino katehola (0,5 – 0,01 mg/ml).

### Določanje flavonoidov

Tudi za analizo fenolov smo naše koncentrirane izvlečke najprej 100x oziroma 1000x redčili. Iz vsake redčitve smo naredili 3 vzorce in 2 slepi probi. Za vsak vzorec smo združili 900  $\mu$ l redčenega ekstrakta in 100  $\mu$ l 5% AlCl<sub>3</sub> v MeOH. Za vsako slepo probo smo združili 900  $\mu$ l redčenega ekstrakta in 100  $\mu$ l MeOH. Po 30 minutni inkubaciji smo izmerili absorbanco pri 425nm. Kot standard za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili raztopino rutina v različnih koncentracijah (0,25 – 0,0125 mg/ml).

### Statistična analiza

Rezultate smo prikazali na grafih v programu XL-toolbox, ter jih obdelali z enosmerno analizo variance (ANOVA), kjer smo za post-hoc analizo izbrali Holm-Šidak metodo.

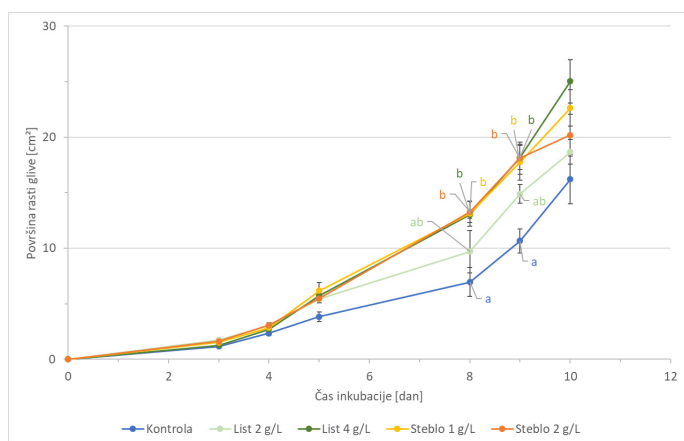
## Rezultati

Kot je razvidno iz Tabele 1, je imel izvleček listov značilno višje koncentracije tako skupnih fenolov, kot tudi flavonoidov. Rezultati za rast glive *Alternaria alternata* so pokazali, da izvlečki listov in stebela niso povzročili nobenega večjega zmanjšanja rasti glive (Slika 1). V osmem dnevu so se pokazale statistične razlike v rasti gliv. Najbolje so rasle na gojišču z dodanim izvlečkom v koncentraciji 4 g/L. Prav tako so statistično značilno boljšo rast kot kontrola dosegle glive na

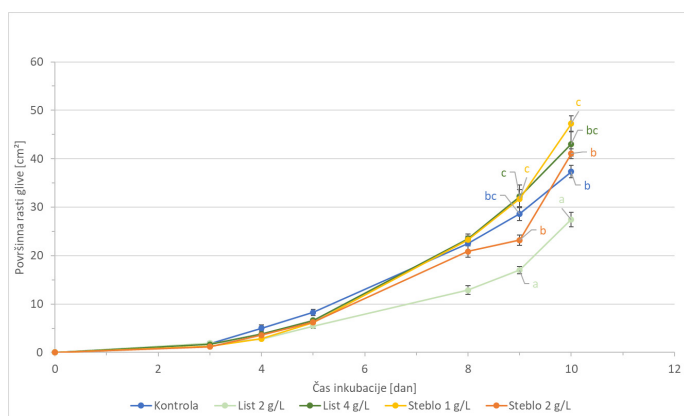
**Tabela 1:** Vsebnost fenolov in flavonoidov v steblo in listih tatarske ajde v miligramih na mililiter koncentriranega izvlečka (mg/ml), n=3.

	Skupni fenoli	Flavonoidi
steblo	2,9 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,6 ± 0,06 <sup>a</sup>
list	13,3 ± 0,33 <sup>b</sup>	5 ± 0,0 <sup>b</sup>

gojiščih z dodanim izvlečkom stebela v koncentraciji 1 g/L in 2 g/L. Med kontrolo in gojiščem z dodanim izvlečkom listov v koncentraciji 2 g/L ni bilo statističnih razlik. V kontrolni skupini, kjer gojišču nismo dodali izvlečkov, so glive najslabše rasle. Graf rasti glive *Alternaria infectoria* (Slika 2) prikazuje, da se



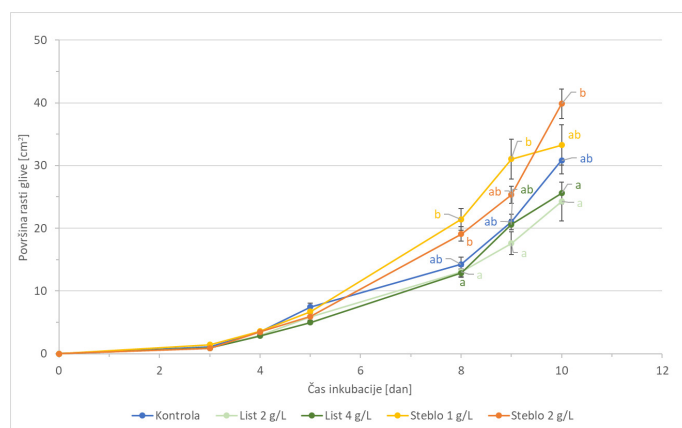
**Slika 1:** Vpliv izvlečkov zelenih delov tatarske ajde na rast glive *Alternaria alternata* v času med prvim in desetim dnevom inkubacije. Na grafu so prikazane povprečne vrednosti površine glive za posamezni dan in standardne napake (n=6). Različne črke na grafu prikazujejo statistično značilne razlike v rasti gliv na gojiščih z različnimi izvlečki na posamezen dan opazovanja (enosmerna ANOVA, Holm-Šidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



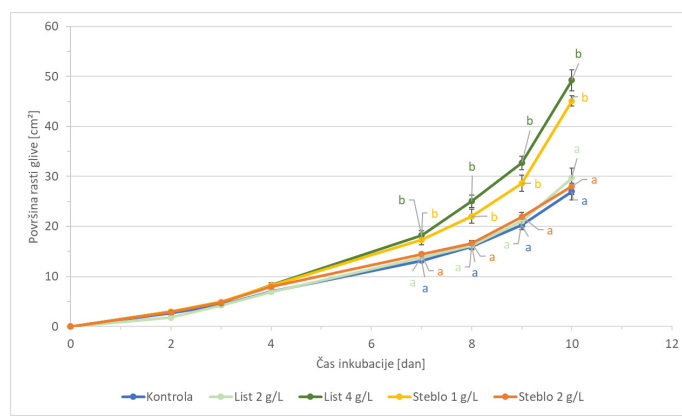
**Slika 3:** Vpliv izvlečkov zelenih delov tatarske ajde na rast glive *Fusarium fujikuroi* v času med prvim in desetim dnevom inkubacije. Na grafu so prikazane povprečne vrednosti površine glive za posamezni dan in standardne napake (n=6). Različne črke na grafu prikazujejo statistično značilne razlike v rasti gliv na gojiščih z različnimi izvlečki na posamezen dan opazovanja (enosmerna ANOVA, Holm-Šidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

rast gliv na gojiščih z dodanimi izvlečki statistično značilno ne razlikuje od rasti gliv na gojišču brez dodanih izvlečkov, kontroli. Statistično značilne razlike obstajajo med glivami, ki so rasle na gojišču z dodanim izvlečkom listov v koncentraciji 2 g/L in 4 g/L ter glivami, ki so rasle na gojišču z dodanim izvlečkom stebela v koncentraciji 1 g/L, osmi in deveti dan, ne pa tudi deseti dan. Prav tako obstajajo statistično značilne razlike med glivami, ki so rasle na gojiščih z dodanim izvlečkom listov v koncentraciji 2 g/L in 4 g/L ter glivami, ki so rasle na gojišču z dodanim izvlečkom stebela v koncentraciji 2 g/L osmi in deseti dan, ne pa tudi deveti dan.

Slika 3 prikazuje rezultate rasti glive *Fusarium fujikuroi*. Rezultati prikazujejo statistično značilno najnižjo rast glive na gojišču z dodanim izvlečkom listov v koncentraciji 2 g/L deveti in deseti dan. Deveti dan se rast glive na kontrolnem gojišču

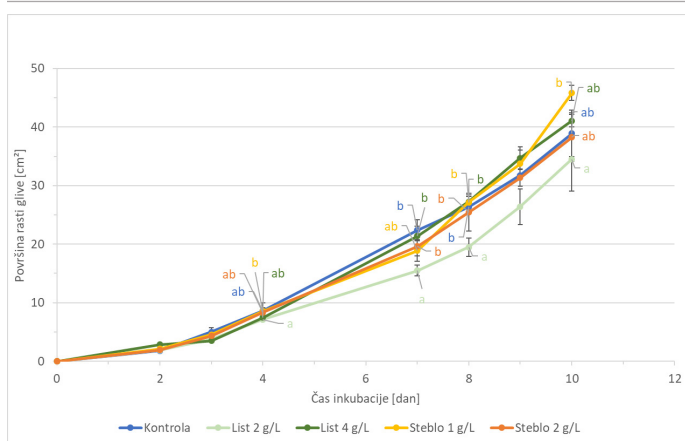


**Slika 2:** Vpliv izvlečkov zelenih delov tatarske ajde na rast glive *Alternaria infectoria* v času med prvim in desetim dnevom inkubacije. Na grafu so prikazane povprečne vrednosti površine glive za posamezni dan in standardne napake (n=6). Različne črke na grafu prikazujejo statistično značilne razlike v rasti gliv na gojiščih z različnimi izvlečki na posamezen dan opazovanja (enosmerna ANOVA, Holm-Šidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



**Slika 4:** Vpliv izvlečkov zelenih delov tatarske ajde na rast glive *Fusarium graminearum* v času med prvim in desetim dnevom inkubacije. Na grafu so prikazane povprečne vrednosti površine glive za posamezni dan in standardne napake (n=6). Različne črke na grafu prikazujejo statistično značilne razlike v rasti gliv na gojiščih z različnimi izvlečki na posamezen dan opazovanja (enosmerna ANOVA, Holm-Šidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



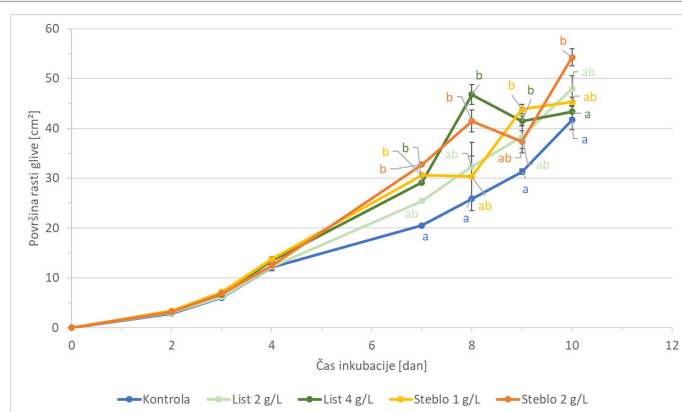


**Slika 5:** Vpliv izvlečkov zelenih delov tatarske ajde na rast glive *Fusarium oxysporum* v času med prvim in desetim dnevom inkubacije. Na grafu so prikazane povprečne vrednosti površine glive za posamezni dan in standardne napake (n=6). Različne črke na grafu prikazujejo statistično značilne razlike v rasti gliv na gojiščih z različnimi izvlečki na posamezen dan opazovanja (enosmerna ANOVA, Holm-Šidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

statistično značilno ne razlikuje od rasti na gojišču z dodanim izvlečkom stebela v koncentraciji 1 g/L in 2 g/L, niti od rasti na gojišču z dodanim izvlečkom lista v koncentraciji 4 g/L. Deseti dan se rast glive na kontrolnem gojišču in gojišču z dodanim izvlečkom stebela v koncentraciji 2 g/L statistično značilno ne razlikuje, se pa ti vrednosti statistično razlikujeta od rasti glive na gojišču z dodanim izvlečkom stebela v koncentraciji 1 g/L. Prav tako se deseti dan rast gliv na gojišču z dodanim izvlečkom listov v koncentraciji 4 g/L statistično značilno ne razlikuje od kontrolne skupine in gliv, ki so rasle na gojiščih z izvlečkom stebela v obeh koncentracijah.

Pri glivi *Fusarium graminearum* rezultati prikazujejo statistično značilno različno rast gliv med tistimi, ki so rasle na kontrolnem gojišču, na gojišču z dodanim izvlečkom lista v koncentraciji 2 g/L, gojišču z dodanim izvlečkom stebela v koncentraciji 2 g/L in med tistimi glivami, ki so rasle na gojiščih z dodanim izvlečkom lista v koncentraciji 4 g/L ter gojišču z dodanim izvlečkom stebela v koncentraciji 1 g/L po sedmem dnevu rasti. Statistično značilno najboljšo rast so imele glive, ki so rasle na gojišču z dodanim izvlečkom lista v koncentraciji 4 g/L in gojišču z dodanim izvlečkom stebela s koncentracijo 1 g/L.

Na Sliki 5 je razvidno, da smo pri glivi *Fusarium oxysporum* zasledili zelo malo statistično značilnih razlik v rasti gliv. Opazili smo le statistično značilno različno rast gliv na gojišču z dodanim izvlečkom listov v koncentraciji 2 g/L od kontrolne skupine, kjer v gojišče nismo dodali nobenega izvlečka, sedmi in osmi dan. Rezultati nam kažejo, da deseti dan obstaja statistično značilna razlika v rasti gliv na gojišču z dodanim izvlečkom listov v koncentraciji 2 g/L in glivami, ki so rasle na gojišču z dodanim izvlečkom stebela v koncentraciji 1 g/L. Pri glivi *Epicoccum nigrum* se je skozi ves čas opazovanja nakazoval trend, da na gojiščih z dodanimi izvlečki v povprečju rasle bolje, kot na kontrolnem gojišču (Slika 6). Na osmi dan opazovanja je ta gliva najbolje rasla na gojiščih z dodanimi višjimi koncentracijama tako izvlečkov listov kot stebela, najslabše pa pri kontroli. Na deseti dan so bile te razlike opazne le še med gojiščem z dodano višjo koncentracijo izvlečka stebela, medtem ko med ostalimi gojišči z izvlečki nismo opazili



**Slika 6:** Vpliv izvlečkov zelenih delov tatarske ajde na rast glive *Epicoccum nigrum* v času med prvim in desetim dnevom inkubacije. Na grafu so prikazane povprečne vrednosti površine glive za posamezni dan in standardne napake (n=6). Različne črke na grafu prikazujejo statistično značilne razlike v rasti gliv na gojiščih z različnimi izvlečki na posamezen dan opazovanja (enosmerna ANOVA, Holm-Šidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

statistične razlike glede na kontrolo.

## Diskusija

Kopičenje fenolov in flavonoidov pri tatarski ajdi predstavlja pomembno biološko vlogo, saj ti sodelujejo v procesih fotosinteze, dihanja in razmnoževanja (Borovaya in Klykov 2020). Akumulirajo se v različnih koncentracijah v različnih organih. Pri tatarski ajdi se v listih nahajajo predvsem rutin, cianidin, kvercetin, derivati flavonov ter fenolkarbonsilne kisline, medtem ko v koreninah in stebelu prevladujejo rutin, cianidin, kvercetin in klorogenska kislina (Borovaya in Klykov 2020). Tudi v naši raziskavi so se vrednosti fenolov in flavonoidov v izvlečku lista in stebela razlikovale. Prisotnost fenolov in flavonoidov je bila višja v listih kot v stebelu. Do podobnih rezultatov sta prišla tudi Yuand T. in Gang Z. (2001), kjer sta izmerila večjo koncentracijo fenolov v listih kot v stebelu tatarske ajde. V študiji iz leta 1999 so Kishore in sodelavci preučevali vpliv nadmorske višine rasti ajde na sintezo fenolov (Tsuji in Ohnishi 1999). Izkazalo se je, da obstaja pozitivna korelacija z višanjem povprečne nadmorske višine rastišča in količino nekaterih fenolnih antioksidantov. Z višanjem nadmorske višine se poveča tudi sončno UV sevanje in posledica tega so boljše antioksidativne lastnosti rastlin (Kishore s sod. 2010). Sklepamo, da tatarska ajda, ki smo jo uporabili v raziskavi, ni rasla v naravnih pogojih, zato je vsebovala manj antioksidativnih snovi, kot bi jih, če bi uspevala v visokogorju.

Pri obeh izvlečkih, tako listov kot stebela tatarske ajde, je bilo prisotnih več skupnih fenolov od flavonoidov, kar je smiselno, saj so flavonoidi le ena od skupin fenolov. Pri določanju skupnih fenolov smo uporabili metodo z uporabo Folin-Ciocalteu reagenta, kjer smo določili vse (poli)fenole, ki so se oksidirali. Sem spadajo tudi vsi flavonoidi. Pri določanju skupnih flavonoidov pa smo določili le flavonoide, ki imajo veliko afiniteto za vezavo kovinskih ionov. Ker je flavonoidov manj kot vseh fenolov so pridobljeni rezultati smiselni. V študiji Keriene in sod. iz leta 2020 so ugotovili, da je protiglivi učinek fenolnih spojin na rast gliv *Fusarium* odvisen

od kemijskih lastnosti in koncentracije. Prav tako smo v naši raziskavi opazili razlike med izvlečki listov in stebel. V naši študiji smo preučevali vpliv izvlečkov tatarske ajde na rast patogenih gliv in ugotovili, da so izvlečki zelenih delov tatarske ajde v različnih koncentracijah v večini primerov spodbudili rast izbranih vrst gliv. To nasprotuje naši hipotezi, da izvlečki tatarske ajde zavirajo rast gliv. Pozitivni vpliv na rast gliv *Fusarium fujikuroi* in *Fusarium graminearum* je imel izvleček stebela v koncentraciji 1 g/L. Gojišče z dodanim izvlečkom lista v koncentraciji 4 g/L je spodbudil rast gliv *Alternaria alternata* in *Fusarium graminearum*. Gojišča z dodanim izvlečkom stebela v obeh koncentracijah sta spodbudila rast glive *Alternaria alternata*. Tudi graf rasti glive *Epicoccum nigrum* predstavlja, da je v povprečju rast glive boljša na gojiščih z dodanimi izvlečki, kot na kontrolnem gojišču. Izvlečke iz zelenih delov ajde smo pridobili z etanolom, kar pomeni, da so v izvlečkih prisotne vse snovi iz rastline, ki so topne v etanolu, ki je polarno topilo. Sem spadajo poleg fenolov in flavonoidov še drugi sekundarni metaboliti, kot so tanini, alkaloidi, steroidi, saponini (Essien s sod. 2018). Izvlečki pa so po vsej verjetnosti vsebovali tudi enostavne sladkorje, ki so fotosintezni produkti zelenih delov rastlin. Ogljikovi hidrati predstavljajo glavni vir energije za glive in spodbudijo njihovo rast, zato je to najverjetneje vzrok, zakaj so glive na nekaterih gojiščih z izvlečki rasle hitreje kot pri kontroli.

Le v primeru glive *Fusarium fujikuroi* je gliva ves čas merjenja slabše rasla na gojišču z dodanim izvlečkom lista v koncentraciji 2 g/L, kot na kontrolnem gojišču. Rezultati rasti gliv *Alternaria infectoria* in *Fusarium oxysporum* ne prikazujejo statistično značilnih razlik v rasti gliv na gojiščih z dodanim izvlečkom in kontrolnim gojiščem. Iz tega lahko sklepamo, da na rast teh dveh gliv izvlečki niso vplivali.

V študiji iz leta 2020 so Gondo in sod. opazovali vpliv etil acetatni izvlečkov listov ajde na rast nekaterih vrst patogenih gliv. Dokazali so, da izvlečki navadne in tatarske ajde proizvajajo snovi s protiglavnim delovanjem proti širokemu spektru patogenih gliv. Tudi v študiji iz leta 2021, so Gondo in sod. dokazali protiglavno aktivnost etil acetatnih izvlečkov listov ajde proti patogeni glivi *C. orbiculare*, ki povzroča bolezen kumar. V naši raziskavi opazimo različno hitrost rasti med različnimi vrstami. Vrsta *E. nigrum* je imela deseti dan največjo površino rasti v vseh skupinah, vrsta *A. alternata* pa je imela najmanjšo površino rasti v vseh skupinah. Naši rezultati prikazujejo, da imajo različne koncentracije izvlečkov drugačen vpliv na različne vrste gliv.

## Zaključki

Na osnovi naših rezultatov lahko potrdimo prvo hipotezo, da vsebujejo izvlečki listov več fenolov in flavonoidov kot izvlečki stebela tatarske ajde. V drugem delu poskusa pa smo ugotovili, da pri petih glivah (*A. alternata*, *F. graminearum*, *E. nigrum*, *A. infectoria* in *F. oxysporum*) večinoma ne pride do zmanjšanja rasti gliv v prisotnosti različnih koncentracij izvlečka listov in stebela tatarske ajde, temveč rast ponekod še celo pospešijo. Le pri glivi *Fusarium fujikuroi* smo opazili zmanjšano rast gliv na gojiščih z dodanimi nekaterimi izvlečki vse dni merjenja

rasti. Kot teoretično najbolj učinkovito za zaviranje rasti teh gliv (v primeru, ko je do tega prišlo), se je izkazalo gojišče z dodano koncentracijo 2 g izvlečka listov tatarske ajde na liter gojišča. Na podlagi tega smo ovrgli našo drugo hipotezo, da bodo gojišča z višjimi koncentracijami izvlečkov bolj zavrla rast gliv kot tista z nižjimi koncentracijami izvlečkov. Naši rezultati nakazujejo, da izvlečki zelenih delov tatarske ajde v večini niso zelo učinkoviti za zmanjšanje rasti določenih patogenih gliv. Raziskavo bi lahko izboljšali tako, da bi iz izvlečkov izolirali le fenole in flavonoide in preverili njihov protiglavn potencial brez prisotnosti ostalih komponent, ki bi lahko ta učinek izničile. Prav tako pa bi lahko preverili še poreklo uporabljene tatarske ajde, saj pričakujemo pri tatarski ajdi, gojeni pri kontroliranih pogojih, nižjo vsebnost fenolov in flavonoidov kot pri tatarski ajdi, ki rasle v visokogorju. Slednja bi se lahko izkazala za bolj učinkovito pri zatiranju rasti nekaterih patogenih gliv.

## Literatura

- Borovaya S, Klykov AG, 2020. Some aspects of flavonoid biosynthesis and accumulation in buckwheat plants. *Plant Biotechnology Reports* 14: 213-225.
- Essien AD, Akuodor CG, Ajoku AG, Megwas AU, Anele DO, Ezeunala NM, Okezei AO, 2018. Antimicrobial and toxicological evaluation of ethanol leaf extract of *Salacia lehmbachii*. *Interdisciplinary Toxicology* 10, 4: 163-167.
- Gondo Y, Miwa Y, Kihara J, Ueno M, 2021. Fungicidal Activity of Buckwheat Leaf Extracts against *Colletotrichum orbiculare* the Causal Agent of Anthracnose Disease in Cucumber, *Journal of Japanese Society of Agricultural Technology Management* 27, 3:115-122.
- Gondo Y, Kamada I, Kihara J, Ueno M, 2020. Antifungal activity of leaf extracts from several buckwheat varieties against plant pathogenic fungi. In *Bull. Fac. Life Env. Sci. Shimane Univ.* 25: 27-30.
- Gyawali K. 2018. Pesticide Uses and its Effects on Public Health and Environment. *Journal of Health Promotion* 6: 28-36.
- Kerene I, Mankeviciene A, Blazyte J, 2020. The effect of antifungal extracts on the contamination of grain with microfungi. *Food Science and Nutrition* 8, 3: 1375-1382.
- Kishore G, Ranjan S, Pandey A, Gupta S. 2010. Influence of Altitudinal Variation on the Antioxidant Potential of Tartar Buckwheat of Western Himalaya. *Food Sci. Biotechnolgy* 19, 5: 1355-1363
- Koval D, Plocková M, Kyselka J, Skřivan P, Sluková M, Horáčková Š. 2020. Buckwheat Secondary Metabolites: Potential Antifungal Agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68, 42: 11631-11643.
- Luthar Z, Golob A, Germ M, Vombergar B, Kreft I. 2021. Tartary Buckwheat in Human Nutrition. *Plants* 10, 4: 700.
- Schafer S, 2022. Who Produces What? Key Agriculture Stats from Around the Globe. <https://www.agweb.com/markets/world-markets/who-produces-what-key-agriculture-stats-around-globe> (maj 2023)
- Yuand T, Gang Z, 2001. Study on the flavone content of buckwheat. *Journal of Sichuan Agricultural University* 19: 112-119.
- 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: 374.

# Vpliv substrata na rast in razvoj ter mineralno sestavo ječmena

Tanita Kranjc, Žiga Oven, Sara Stopar, Lara Šušmelj, Anja Verbanec

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

- Namen dela je bil preizkusiti uporabo različnih substratov za gojenje ječmena in sicer: vermikulita, kokosovih vlaken, kokosovih vlaken z dodajanjem hranilne raztopine, zemlje za rože, peščene ter glinene zemlje.
- Uporabnost substratov smo preverjali z meritvami potencialne in dejanske fotokemične učinkovitosti ter meritvami transpiracije, merjenjem dolžine poganjkov in korenin ter tehtanjem sveže in suhe biomase poganjkov in korenin. Z metodo XRF smo na koncu poskusa tudi izmerili koncentracije različnih elementov v rastlinah ječmena (koreninah in poganjkih).
- Ječmen je najbolje uspeval v zemlji za rože, ki je glede na specifikacije na embalaži verjetno polna organske snovi in ima primerno odcednost, ki mu ustreza.

**Ključne besede:** ječmen, substrat, zadrževanje vode, minerali

## Uvod

Ječmen (*Hordeum vulgare* L.) je žito, ki spada v družino Poaceae (red Poales). Uporablja se predvsem za krmo živali in pivovarstvo, čeprav velja tudi za glavno živilo v regijah, kjer ni mogoče gojiti drugih žit. Trenutno je ječmen četrta najpomembnejša žitarica na svetu, ki jo pridelujejo v več kot 100 državah. V zadnjem desetletju je Evropa pridelala približno 60 % svetovne količine ječmena, Azija in Amerika pa 15 % oziroma 13 % (Giraldo in sod., 2019). Leta 2022 smo v Sloveniji posejali okoli 27 900 hektarjev krmnih žit. Med njimi je prevladoval ječmen, ki je pokrival okoli 22 600 ha. Prav tako smo leta 2022 pridelali 5 ton ječmena na hektar, kar pomeni kar 112 520 ton ječmena (SURs, 2022). Zaradi njegove pomembne vloge v prehrani živali in ljudi, je treba povečati proizvodnjo ječmena, vendar na trajnosten način (Giraldo in sod., 2019).

Ječmen, namenjen za prehrano ljudi, se pogosto prideluje na obremenjenih območjih, ker se le ta dobro prilagaja neugodnim okolijskim razmeram. Gojijo ga na območjih, kjer prihaja do občasne suše, erozije tal ali pozebe (Belay in Stauffer, 2011). Pri tem se pogosto sooča z biotskim in abiotskim stresom. Enega izmed glavnih abiotskih stresov lahko predstavlja prav substrat, na katerem ječmen raste (Roberts in Mattoo, 2018). Različni substrati se med sabo razlikujejo po vsebnosti vode, teksturi, pH vrednosti, slanosti tal, količini organskih slojev itd. (Zajícová in Chuman, 2019). Rastline za spopadanje z okolijskimi stresorji uporabljajo različne notranje homeostatske mehanizme, toda kljub temu, obremenitveni faktorji lahko vplivajo na donos rastline, kar je razvidno v številu in masi zrn. Stres, povzročen zaradi neugodnega substrata, lahko na rastlini izmerimo s pomočjo meritev rasti listov rastline, hitrosti fotosinteze in rasti rastlin (Habib, 2022). Z našo raziskavo smo želeli preizkusiti uporabnost različnih substratov za pridelavo ječmena. Ob tem smo si postavili naslednje hipoteze:

- Ječmen bo najbolje uspeval v zemlji za rože, najslabše pa v glineni zemlji.
- Zaradi večje odcednosti bo ječmen, posajen v peščeni zemlji, začel veneti.
- Ječmen bo bolje rasel v kokosovih vlaknih, zalitih s hranilno raztopino kot v tistih z destilirano vodo.
- Zaradi pomanjkanja organske snovi ječmen, posajen v vermikulitu, ne bo uspeval najbolje.

## Metode in materiali

Dvotedenske sadike ječmena, ki smo jih predhodno vzgojili na vermikulitu, smo posadili v šest različnih substratov, vsakega v petih ponovitvah. Ti substrati so bili zemlja za rože (ZR); vermikulit (VE); peščena zemlja (PZ); kokosova vlakna, zalivana z destilirano vodo (KV) in zalivana s hranilno raztopino (KV + HR) ter glinena zemlja (GZ). V vsak lonec smo posadili šest rastlin ječmena, ki smo jim predhodno dobro sprali vermikulit s korenin ter jih presadili v posamezen substrat ter lončke postavili v rastno komoro za štiri tedne.

### Zalivanje rastlin

Pred začetkom poskusa smo vse skupine rastlin enakomerno zalili in sicer tako, da se je substrat močno navlažil. Vsak teden smo rastline zalili dvakrat s po 100 ml in sicer vse z destilirano vodo, razen skupine kokosovih vlaken (KV + HR), ki smo jih

zalili s Hoaglandovo raztopino (Rajan in sod., 2019).

### Transpiracija in fotokemična učinkovitost

V sedemdnevnih razmikih smo opravili različne meritve. S porometrom (Leaf Porometer SC-1) smo na sredini listne ploskve pravega lista merili transpiracijo. Fotokemično učinkovitost smo merili s fluorometrom (OS5-FL Modulated Fluorometer) in sicer potencialno (Fv/Fm), po 15 minutah aklimatizacije lista v temi, dejansko fotokemično učinkovitost (Y) pa na svetlobi.

### Meritve dolžine in tehtanje

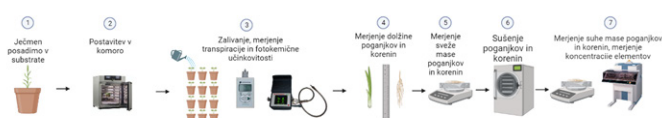
Vsak teden smo s pomočjo merila izmerili dolžino poganjkov. Ob koncu gojenja rastlin smo le-te vzeli iz substratov in jih izprali pod vodo. Koreninski del smo ločili od nadzemnega, izmerili dolžino vsakemu posebej in združili koreninski del vseh rastlin, ki so rastle v istem tipu substrata, ter nadzemni del vseh rastlin iz istega substrata. To smo nato stehtali in dobili svežo maso, potem pa smo po enem tednu sušenja v lizofilizatorju to ponovno stehtali in dobili suho maso. Korenine in poganjke smo s pomočjo tekočega dušika strli u terilnici in dobili fin prah iz katerega smo naredili tablete, ki smo jih tudi stehtali.

### Meritev koncentracije elementov

V tabletah smo s pomočjo rentgenske fluorescenčne spektroskopije (XRF) izmerili vsebnost fosforja, žvepla, klora, kalija, kalcija, mangana, železa in cinka v rastlinskih tkivih – poganjkih in koreninah.

Shematski prikaz poteka našega poskusa je prikazan na Sliki 1.

**Slika 1:** Shematski prikaz metod dela (Biorender).



## Rezultati

Ugotovili smo, da je najbolje rasel ječmen, gojen v ZR (Slika 2). V ostalih substratih je ječmen razvil krajše poganjke, ki pa so bili podobnih dolžin.

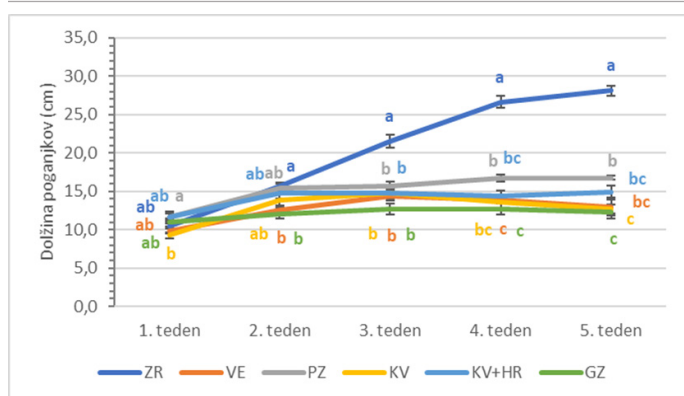
Na koncu poskusa smo izmerili še dolžino korenin (Slika 3). Najdaljše korenine je razvil ječmen, ki smo ga gojili v PZ, najkrajše pa tisti, ki smo ga gojili v GZ. Med ostalimi skupinami ni bilo bistvenih razlik.

Meritve so pokazale, da je največjo svežo maso tako poganjkov kot korenin pridelal ječmen, gojen v ZR (Slika 4). Med ostalimi substrati ni bilo statističnih razlik. Kar se tiče suhe biomase, jo je prav tako pridelal največ ječmen iz ZR, tako korenin kot poganjkov, najmanjšo pa iz VE in GZ (Slika 5).

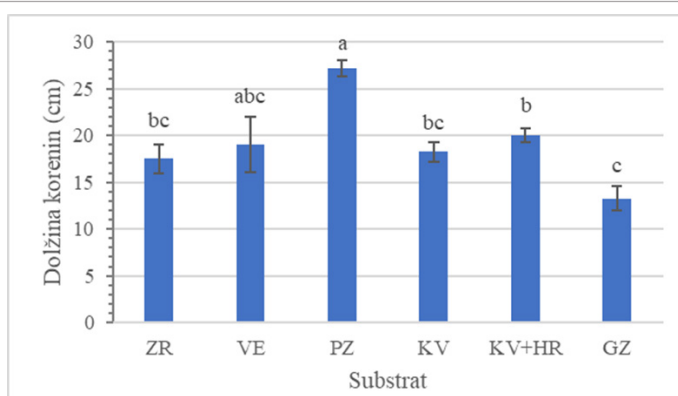
Največja stopnja transpiracije je bila v drugem tednu izmerjena pri ječmenu, ki je rasel na ZR, najmanjša pa pri KV (Slika 6).

V tretjem tednu je bila transpiracija največja pri KV + HR, najmanjša pa pri PZ in ZR, čeprav je pri slednji bila v drugem tednu bistveno večja od ostalih (Slika 5b). Podatkov iz četrtega tedna ni, ker ni bilo statistično značilnih razlik.

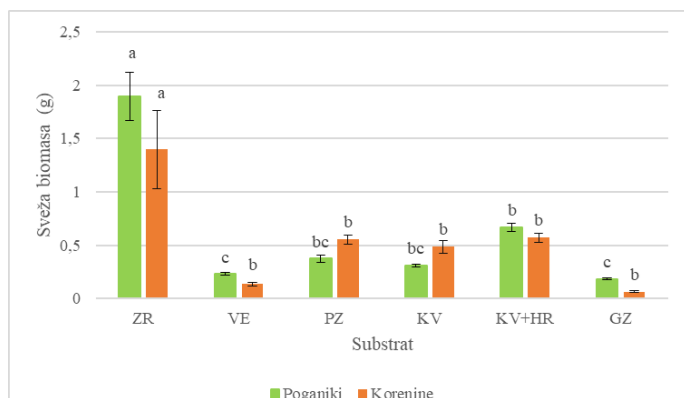
Pri meritvah dejanske (Y) fotokemične učinkovitosti nismo



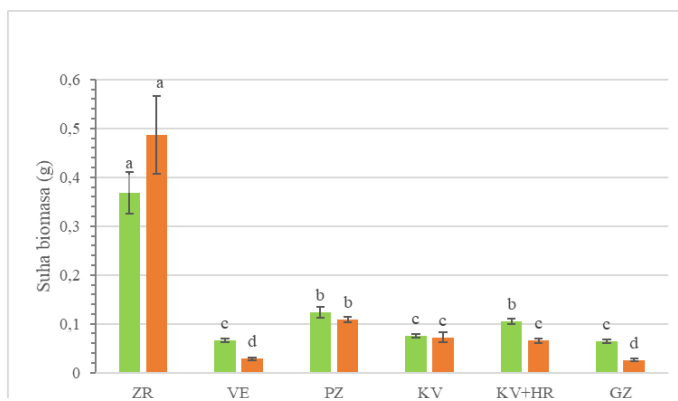
**Slika 2:** Dolžina poganjkov pri ječmenu na različnih substratih v času petih tednov (povprečje  $\pm$  SE;  $n=5$ ). Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike med posameznimi skupinami (substrati) na isti čas opazovanja (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



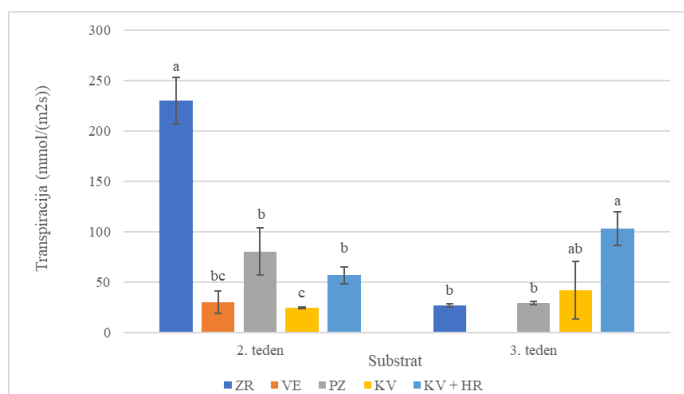
**Slika 3:** Dolžina korenin pri ječmenu na različnih substratih (povprečje  $\pm$  SE;  $n=5$ ). Različne črke nad podatki označujejo statistično pomembne razlike (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



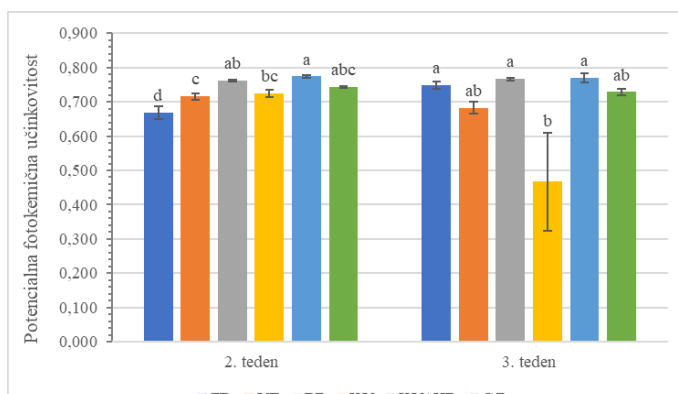
**Slika 4:** Sveža biomasa korenin in poganjkov ječmena na različnih substratih (povprečje  $\pm$  SE;  $n=5$ ). Različne črke nad podatki označujejo statistično pomembne razlike (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



**Slika 5:** Suha biomasa korenin in poganjkov ječmena na različnih substratih (povprečje  $\pm$  SE;  $n=5$ ). Različne črke nad podatki označujejo statistično pomembne razlike (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



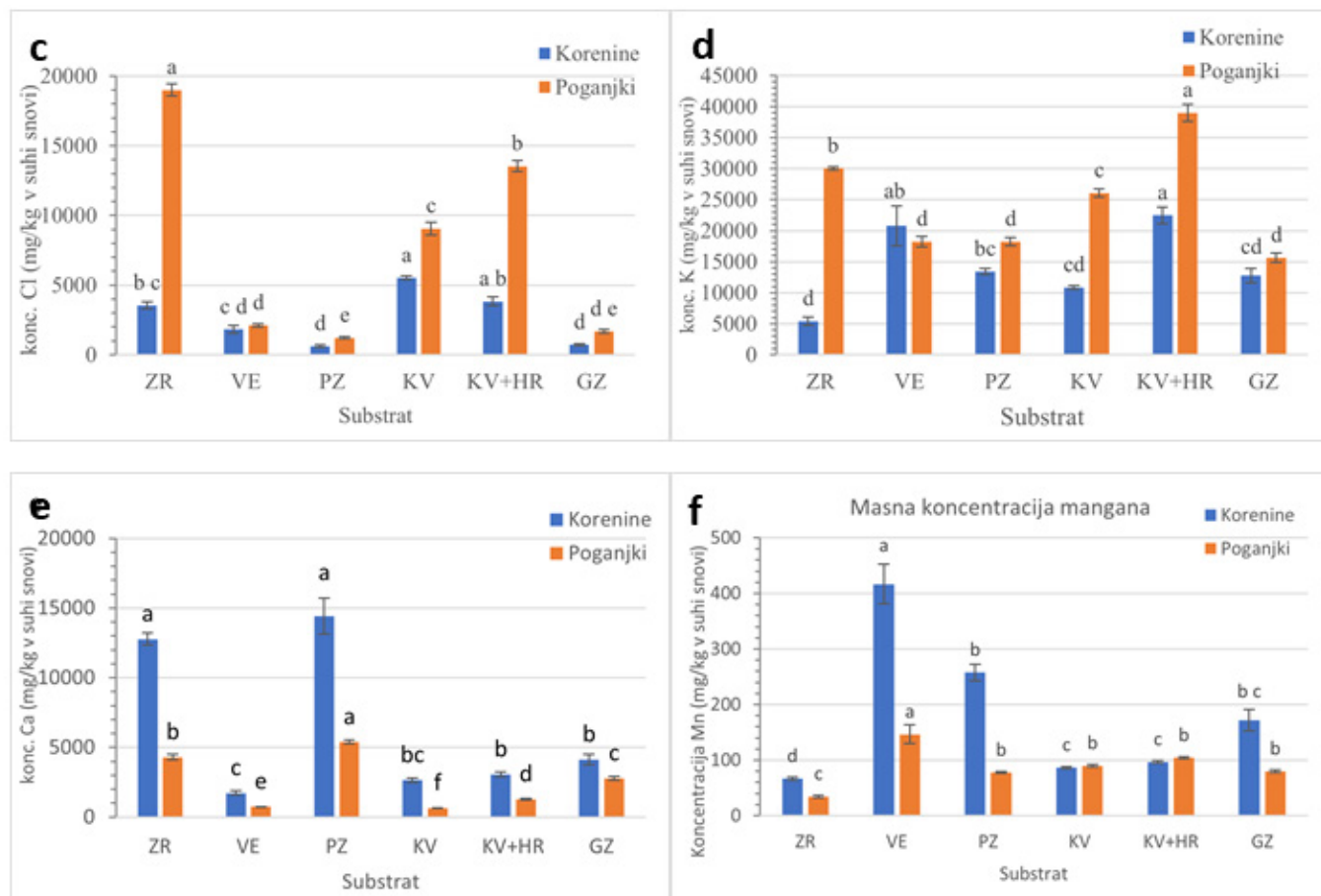
**Slika 6:** Transpiracija pri ječmenu na različnih substratih a) 2. teden, b) 3. teden (povprečje  $\pm$  SE;  $n=5$ ). Različne črke nad podatki označujejo statistično pomembne razlike (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).



**Slika 7:** Potencialna fotokemična učinkovitost pri ječmenu na različnih substratih (povprečje  $\pm$  SE;  $n=5$ ). Različne črke nad podatki označujejo statistično pomembne razlike (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post-hoc test,  $p < 0,05$ ).

opazili statistično značilnih razlik med skupinami (vrednosti so se gibale med 0,690 in 0,740), so pa bile razlike pri potencialni ( $F_v/F_m$ ) fotokemični učinkovitosti (Slika 7). V drugem tednu je bila najvišja izmerjena pri KV + HR, najnižja pa pri ZR. V tretjem tednu je bila najvišja pri ZR, PZ in KV + HR, najnižja pa pri KV. V

četrtm tednu ni bilo statistično značilnih razlik. Kar se tiče rezultatov meritve elementov, je bilo največ fosforja prisotnega v poganjkih ječmena iz KV + HR, najmanj pa v poganjkih iz GZ (Slika 8a). Žvepla je bilo največ v poganjkih iz KV + HR in ZR, meritve iz korenin niso pokazale statistično



**Slika 8:** Koncentracija fosforja (a), žvepla (b), klora (c), kalija (d), kalcija (e), mangana (f), železa (g) in cinka (h) pri koreninah in poganjkih ječmena na različnih substratih (povprečje  $\pm$  SE;  $n = 5$ ). Različne črke nad podatki prikazujejo statistično pomembne razlike (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post-hoc test  $p < 0,05$ ).

značilnih razlik (Slika 8b). Klora je bilo največ v poganjkih iz ZR, najmanj pa v koreninah iz GZ in PZ (Slika 8c). Poganjki ječmena iz KV + HR so vsebovali tudi veliko kalija, tega je bilo najmanj v koreninah iz ZR, ga pa je bilo veliko v poganjkih iz ZR (Slika 8d). Največ kalcija je bilo v koreninah ječmena iz PZ in ZR, najmanj pa v poganjkih iz KV (Slika 8e). Mangana je bilo veliko v koreninah ječmena, ki je rasel v VE in PZ, najmanj pa v poganjkih iz ZR (Slika 8f). Ječmen, ki je rasel v GZ, je v koreninah vseboval najvišje koncentracije železa, nekoliko manj jih je bilo v VE, zelo malo pa jih je bilo v poganjkih iz vseh substratov (Slika 8g). Cinka je bilo največ v poganjkih ječmena iz KV + HR, nekaj ga je bilo tudi v koreninah iz GZ in PZ (Slika 8h).

## Diskusija

Skladno s pričakovanji smo zaznali občutne razlike med rastjo ječmena na različnih substratih. Ječmen ima dobro toleranco na različne tipe prsti, kjer je predvsem pomembna dobra odcednost, saj se ne obnese dobro v premočenih tleh (Valenzuela in Smith, 2002). Splošno velja, da za ugodno pridelavo ječmenu ustrezajo kakovostna tla z zadostno vsebnostjo organske snovi. Skladno s temi pričakovanji smo najdaljše poganjke izmerili pri ječmenu gojenem v ZR, ki naj bi po specifikaciji na embalaži vsebovala precej organske snovi. Čeprav z manjšo dolžino poganjkov, je ječmen iz PZ dosegel najdaljši koreninski sistem. PZ je v našem eksperimentu predstavljala najbolj odceden substrat, kjer smo pričakovali

sušne pogoje. Kayan in sod. (2014) so dokazali, da lahko pomanjkanje vode zavre rast poganjkov in nasprotno ojača razvoj koreninskega sistema. Tudi v našem primeru je bila rast poganjkov v primerjavi z rastjo v ZR okrnjena, a ne toliko kot pri rasti v GZ, kjer je bil koreninski sistem najslabše razvit. Kompaktnost substrata kot je GZ ima lahko močan vpliv na rast, saj so Bingham in sod. (2010) dokazali, da lahko kompaktna zemlja za 23 % zmanjša dolžino korenin in za 21 % zmanjša listno površino. Kompaktna in razmočena tla kot je GZ med drugim vplivajo na dostopnost kisika, ki je ključen za rast koreninskih vršičkov in penetracijo prsti (Hoad in sod., 2001). Slednje pojasni slabo rast in slabo razvit koreninski sistem na GZ. Nasprotno so bili koreninski sistemi zelo podobno razviti pri ječmenu v VE, KV in KV+HR, kjer gre za bolj prežračene substrat, z dobro zadrževalno kapaciteto vode.

Zelo dober pokazatelj prirasta biomase je parameter suhe biomase, kjer ponovno kot najboljša odstopa ZR. Ječmen v slednji je imel tudi največjo maso koreninskega sistema, ki je tokrat občutno presegala maso korenin pri ječmenu iz PZ. Sklepamo, da slednje odraža razliko v razvejanosti in gostoti koreninskega sistema, ki je bistveno večja pri ječmenu v ZR, med tem ko je bila v PZ rast korenin bolj linearna. Pri ostalih substratih so bila odstopanja v suhi masi poganjkov minimalna. Zanimiva primerjava je tudi med svežo in suho biomaso pri ječmenu iz VE in GZ, kjer sta bila rezultata pri meritvi sveže biomase nižja od ostalih, med tem ko se pri merjenju suhe biomase izravnata z ostalimi substrati. Čeprav v meritvah dolžine poganjkov nismo zaznali razlik med ječmeni iz KV

in KV+HR, meritve biomase razkrijejo večji prirast biomase poganjkov ječmena v KV+HR, med tem ko v masi korenin ni bilo večjih razlik.

Nekoliko nepričakovane rezultate smo dobili pri merjenju transpiracije. Transpiracija je praviloma skoraj linearno odvisna od vsebnosti vode v substratu (Salim in Todd, 1965), zato bi pričakovali nižje vrednosti na bolj odcednih substratih kot je PZ in višje vrednosti v substratih z večjo vsebnostjo organske snovi, kot so KV in ZR. Pomembno je omeniti tudi možnost napak, saj je zaradi ozkih listov mladih sadik ječmena težko doseči zadostno pokrivnost z instrumentom, transpiracija pa je med drugim močno odvisna od listne površine (Eavis in Taylor, 1979). Na vermikulitu, ki ima sicer dobro zadrževalno kapaciteto vode (Tingey in sod., 1982), transpiracija po nizkem rezultatu 2. tedna, na 3. teden ta sploh ni bila več merljiva zaradi propadanja, kar nakazuje možnost vzrokov tudi v pomanjkanju hranil, predvsem dušika. Pomanjkanje ključnih hranil lahko zaviralno deluje na transpiracijo (Afrousheh in sod., 2010), kar lepo dokažemo v primerjavi med ječmeni iz KV in KV+HR. V obeh meritvah je dodatek hranilne raztopine bistveno izboljšal transpiracijo. Nepričakovano v prvi meritvi izstopa še PZ, kjer smo pričakovali najnižje vrednosti. Razlike v transpiraciji ne moremo razložiti niti z razliko v dolžini korenin, saj so Eavis in Taylor (1979) na primeru soje pokazali, da dolžina korenin na transpiracijo ne vpliva.

Pri meritvah vsebnosti mineralov nas je predvsem zanimalo, kako vsebnost mineralov v rastlinah odraža vsebnost mineralov v substratih ter posledično kako dobro so bile rastline sposobne minerale privzemati. Rezultati so pokazali, da je veliko mineralov, kot so fosfor, žveplo, klor, kalij in cink v največjih koncentracijah prisotni v KV + HR, zalivanih s hranilno raztopino, kar bi lahko bila verjetno posledica prav zalivanja s hranilno raztopino, saj ta vsebuje različna hranila. V naših rezultatih je bila največja koncentracija železa prisotna v rastlinah iz glinene zemlje. Višjo vsebnost železa v glinenih tleh potrjuje tudi literatura (Stucki, 2006). Največ kalcija je bilo prisotnega v koreninah ječmena iz peščene zemlje, kar je nenavadno, saj je za peščena tla značilno, da imajo zelo majhne vsebnosti hranil oziroma so zelo revna (Dwevedi in sod., 2017). Največ mangana je bilo prisotnega pri ječmenu iz vermikulita. Matveeva in sod. (2018) so v raziskavi uporabili vermikulit za odstranjevanje mangana iz odpadnih vod, kar pomeni, da je vermikulit dober absorbent. Razlike v vsebnosti v koreninah in poganjkih lahko nakazujejo na to, da nekatera hranila rastline zadržujejo v koreninah, druga pa bolj prenašajo v poganjke, kjer jih bolj potrebujejo, to pa je lahko tudi povezano s funkcijami teh mineralov. Ječmen načeloma potrebuje predvsem dušik, fosfor, mangan, kalij, žveplo, cink in bor za svojo optimalno rast in razvoj, zato je predvsem pomembno, da substrat, ki ga uporabimo, vsebuje ta hranila (Yara, n.d.).

## Zaključek

Ječmen ima najraje dobro odcedna tla z veliko organske snovi, zato najbolje uspeva v substratu, ki tem lastnostim ustreza. Raziskava je potrdila našo prvo hipotezo, saj je ječmen, glede na razvoj dolžine korenin in poganjkov, najbolje uspeval v zemlji za rože, ki vsebuje veliko organske snovi in je dobro odceden substrat; najslabše poganjke pa je razvil v glineni zemlji, saj je preveč kompakten substrat in posledično slabo odceden. Peščena zemlja pa po drugi strani predstavlja preveč

odceden substrat, zato rastlina trpi pomanjkanje vode in začne veneti. S tem potrdimo našo drugo hipotezo. Hranilna raztopina da kokosovim vlaknom veliko hranil in rastlinam pomaga pri rasti, saj so naše rastline ječmena, ki so bile zalivane s hranilno raztopino v kokosovih vlaknih bolje rastle kot tiste, ki so bile zalivane z destilirano vodo. Vsebovale so tudi več različnih elementov. Tako lahko potrdimo tudi našo tretjo hipotezo, potrdimo pa lahko tudi našo zadnjo, saj je ječmen res slabo uspeval v vermikulitu, verjetno prav zaradi vsebnosti organske snovi, saj drugače dobro zadržuje vodo in prezračiti tla, vendar je reven z organsko snovjo. Pomembno je tudi, da uporabljen substrat vsebuje hranila, ki jih ječmen potrebuje za svojo rast in razvoj, kot so dušik, fosfor, mangan, kalij, žveplo, cink in bor. Naša raziskava je pokazala, da bi bil najbolj primeren substrat za gojenje ječmena zemlja za rože, vendar niso vsi rezultati tega potrdili, zato so potrebne dodatne raziskave, kateri substrat bi bil najbolj primeren za gojenje ječmena.

## Literatura

- Giraldo P, Benavente E, Manzano-Agugliaro F, Gimenez E. 2019. Worldwide research trends on wheat and barley: A bibliometric comparative analysis. *Agronomy* 9, 7: 352.
- Afrousheh M, Ardalan M, Hokmabadi H, Afrousheh M. 2010. Nutrient deficiency disorders in *Pistacia vera* seedling rootstock in relation to eco-physiological, biochemical characteristics and uptake pattern of nutrients. *Scientia Horticulturae* 124, 2: 141–148.
- Belay T, Stauffer C. 2011. Biotypic and genetic variability in the Russian Wheat Aphid (*Diuraphis noxia* (Mordvilko))(Homoptera: Aphididae). *Proceedings of the 2nd National Barley Research and Development Review Workshop*: 205.
- Bingham IJ, Bengough AG, Rees RM. 2010. Soil compaction-N interactions in barley: Root growth and tissue composition. *Soil & Tillage Research* 106, 2: 241–246.
- Dwevedi A, Kumar P, Kumar P, Kumar Y, Sharma YK, Kayastha AM. 2017. Soil sensors: detailed insight into research updates, significance, and future prospects. V: *New Pesticides and Soil Sensors*. Elsevier Academic Press, London, UK.
- Eavis BW, Taylor HM. 1979. Transpiration of Soybeans as Related to Leaf Area, Root Length, and Soil Water Content. *Agronomy Journal* 71, 3: 441–445.
- Habib I, Shahzad K, Rauf M, Ahmad M, Alsamadany H, Fahad S, Saeed NA. 2022. Dehydrin responsive HVA1 driven inducible gene expression enhanced salt and drought tolerance in wheat. *Plant Physiology and Biochemistry* 180: 124–133.
- Hoad SP, Russell G, Lucas ME, Bingham IJ. 2001. The management of wheat, barley, and oat root systems. *Advances in Agronomy* 74: 193–246.
- Rajan P, Lada RR, MacDonald MT. 2019. Advancement in Indoor Vertical Farming for Microgreen Production. *American Journal of Plant Sciences* 10, 8: 1397–1408.
- Roberts DP, Mattoo AK. 2018. Sustainable agriculture—Enhancing environmental benefits, food nutritional quality and building crop resilience to abiotic and biotic stresses. *Agriculture*, 8, 1: 8.
- Salim MH, Todd GW. 1965. Transpiration Patterns of Wheat, Barley and Oat Seedlings Under Varying Conditions of Soil Moisture. *Agronomy Journal* 57, 6: 593–596.
- Stucki JW. 2006. Properties and Behaviour of Iron in Clay Minerals. *Developments in Clay Science* 1: 423–475.
- SURS. 2022. Pridelek strnih žit nekoliko lažji od lanskega, marelice in češnje obrodile odlično. Statistični urad RS. <https://www.stat.si/statweb/News/Index/10596> (dostopano: junij 2023)
- Tingey DT, Raba S, Rodecap KD, Wagner JJ. 1982. Vermiculite, a Source of Metals for *Arabidopsis thaliana*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 107, 3: 465–468.

15. Yara. 2023. Barley nutrient requirements, <https://www.yara.co.uk/crop-nutrition/barley/barley-nutrient-requirements/Yara>. (n.d.). Barley nutrient requirements, <https://www.yara.co.uk/crop-nutrition/barley/barley-nutrient-requirements/> (dostopano: junij 2023)
16. Zajícová K. Chuman T. 2019. Application of ground penetrating radar methods in soil studies: A review. *Geoderma* 343: 116-129.
17. Tingey, D. T., Raba, S., Rodecap, K. D., & Wagner, J. J. (1982). Vermiculite, a Source of Metals for *Arabidopsis thaliana*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 107(3): 465–468.
18. Yara. (n.d.). Barley nutrient requirements, <https://www.yara.co.uk/crop-nutrition/barley/barley-nutrient-requirements/Yara>. (n.d.). Barley nutrient requirements, <https://www.yara.co.uk/crop-nutrition/barley/barley-nutrient-requirements/>, 4. junij 2023
19. Zajícová K. in Chuman T. (2019). Application of ground penetrating radar methods in soil studies: A review. *Geoderma*, 343: 116-129.



# Vpliv substrata na rast in razvoj ter mineralno sestavo kumar

Katarina Vodnik<sup>1</sup>, Urša Grohar<sup>2</sup> in Pia Pogač<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, študij agronomije Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup>Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, študij biotehnologije, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

- Namen poskusa je bil ugotoviti vpliv različnih substratov na rast in mineralno sestavo sadik kumar.
- V lončke z različnimi substrati: kokosova vlakna, kokosova vlakna z dodano hoaglandovo raztopino, pesek, glino, vermikulit in običajno komercialno zemljo za rože smo posadili sadike kumar. Spremljali rast listov in transpiracijo. Po enem mesecu smo stehali svežo in suho maso korenin in poganjkov. Z metodo XRF smo izmerili vsebnost elementov: fosfor, žveplo, klor, kalij, kalcij, mangan, železo, nikelj, cink.
- Najboljša rast je bila v substratih kokosova vlakna z dodano hranilno raztopino in zemlji za rože, najslabša pa v peščeni zemlji in glineni zemlji. V povprečju smo največjo vsebnost elementov smo zaznali v poganjkih v substratu kokosova vlakna z dodano hranilno raztopino, in v koreninah rastlin v substratih vermikulit in peščena zemlja.

**Ključne besede:** *Cucumis sativus*, substrat, biomasa, mikroelementi

## Uvod

Kumara (*Cucumis sativus*) je plazeča vrsta rastlin, ki spada v družino Cucurbitaceae. Gojijo jo v rastlinjakih po celem svetu, izvirajo pa iz tropskih in sub-tropskih predelov sveta. Njen plod ima nizko energijsko vrednost a vsebuje veliko vitaminov (A, C in K), magnezija, kalcija in fosforja (Manggoel in sod., 2022). V zadnjih desetletjih je človek zaradi hitre rasti prebivalstva primoran povečati pridelavo hrane. Tako je zaradi intenzivnega kmetijstva prišlo do izčrpanja tal in izpiranja hranil. Hkrati pa so podnebne spremembe povzročile pogostejše ekstremne dogodke kot so suša, zmrzal in poplave (Anwar in sod., 2013). Tla igrajo ključno vlogo za rast rastlin z zagotavljanjem osnovnih hranil, vode in fizične podpore (Olle in sod., 2012). Vsebnost hranil v tleh lahko pomembno vpliva na rast rastlin, ker rastlinske vrste potrebujejo več elementov za svojo rast in razvoj. Nekatera hranila so zelo potrebna (makroelementi, npr. C, N, P, K, Ca in Mg), medtem ko so druga potrebna v relativno majhnih količinah (mikroelementi, npr. Mn, Fe, Zn in Cu). V različnih substratih so mikro in makroelementi lahko prisotni v različnih količinah in različno dostopni (Wen in sod., 2018). Olle M. in sod. trdijo, da na razpoložljivost hranil vpliva predvsem pH, saj so hranila pri nizkih ravneh pH manj dostopna. Fizikalne lastnosti tal, vključno s teksturo, strukturo in poroznostjo, prav tako vplivajo na rast rastlin, preko razpoložljivosti vode in prodiranja korenin. Dobro prezračena, rahla tla spodbujajo rast korenin in vsrkavanje hranil, medtem ko zbita tla z nizko poroznostjo to omejujejo (Passioura J.B., 1991). Peščena tla na primer imajo nizko sposobnost zadrževanja vode, kar lahko povzroči, da rastline doživijo stres zaradi suše. Glinena tla so po drugi strani sposobna zadržati veliko vode, a so nagnjena k zastajanju vode, ki lahko prepreči rast korenin in rastlini povzroča stres. Na splošno velja, da rastline dobro uspevajo v tleh z uravnoteženo vsebnostjo hranil, dobro strukturo, optimalno pH vrednostjo in zadostno razpoložljivostjo vode. Kakovost tal ima torej širok spekter učinkov na rastline in je ključnega pomena za njihov razvoj. Testiranje lastnosti in sestave tal, gnojenje in namakanje ter pravilno upravljanje tal lahko prispevajo k optimalni rasti in zdravju rastlin (Brady in Weil, 2016).

Pri našem eksperimentu smo preučevali vpliv različnih substratov na rast kumar. Zanimalo nas je, kako bodo substrati, ki se razlikujejo v strukturi, sposobnosti zadrževanja vode in vsebnosti hranil vplivali na rast. Naše hipoteze so bile, da bo kumara najbolje rasla v običajni zemlji za rože, saj ima po sestavi veliko hranil, ki omogočajo idealno rast. Pričakovali smo, da bodo kumare bolje uspevale v kokosovih vlaknih, katerim bomo dodajali še hranila, kot v kokosovih vlaknih, ki jih bomo zalivali z navadno vodo. Predvidevali smo tudi, da bo rast najslabša v peščeni zemlji, ki slabo zadržuje vodo in vsebuje malo hranil ter v glineni zemlji zaradi kompaktne strukture.

## Materiali in metode

### Sajenje rastlin v različne substrate

Dvotedenske sadike kumare, ki smo jih vzgojili na vermikulitu, smo posadili v različne substrate: kokosova vlakna, kokosova vlakna z dodano hranilno raztopino, pesek, glino, vermikulit in običajno komercialno zemljo za rože. Za vsak substrat smo naredili pet ponovitev, torej v pet lončkov z izbranim substratom smo posadili po štiri sadike kumare. Pazili smo, da

smo izbrali rastline, ki so bile med seboj čim bolj primerljive po velikosti in vitalnosti. Vse skupine smo na začetku poskusa dobro zalili.

### Potek poskusa in spremljanje rasti rastlin

Rast rastlin smo tedensko spremljali v rastni komori. Vse lončke smo izpostavili enakim pogojem - vlagi, temperaturi, svetlobi in količini vode. Zalivali smo jih z destilirano vodo, enkrat na teden po 100 mL. Izjema so bili lončki s kokosovimi vlakni. Pet smo jih zalivali le z destilirano vodo, ostalih pet pa s hoaglandovo raztopino (hidroponska hranilna raztopina). Edina spremenljivka, ki naj bi vplivala na rast je bil torej substrat, v katerem smo kumare posadili.

Vsak teden, za časa enega mesca, smo merili dolžino pravih listov in rezultate beležili v excel.

### Meritve transpiracije

V vsakem lončku smo na listu ene od rastlin izmerili transpiracijo z uporabo porometra (SC-1 porometer, Decagon Devices, Inc.).

### Analiza sveže in suhe biomase

Rastline smo po štirih tednih vzeli iz lončkov in jih očistili, da na koreninah ni bilo več substrata. Izmerili smo dolžine poganjkov in korenin ter tehtali mase svežih poganjkov in korenin. Nato smo jih posušili z liofilizacijo in tehtali še suhe biomase.

Meritve koncentracij elementov z metodo XRF

Posušene dele rastlin smo s pomočjo tekočega dušika strli v prah, ki smo ga nato s hidravlično stiskalnico stisnili v tabletko. Za vsak substrat smo združili vso biomaso poganjkov in vso biomaso korenin in za vsako skupino pripravili po 3 tabletko. Koncentracijo elementov fosforja (P), kalija (K), kalcija (Ca), žvepla (S), železa (Fe), mangana (Mn) in cinka (Zn) smo izmerili z rentgensko fluorescenčno spektroskopijo (XRF) z uporabo rentgenskega spektrometra Peduzo T02.

### Statistična analiza

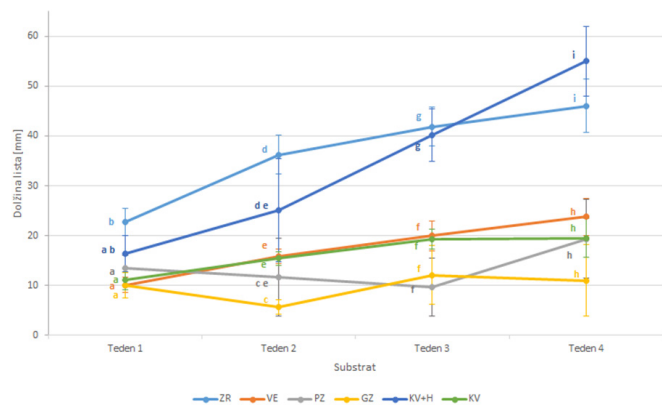
Podatke smo zabeležili v excelovo tabelo in s programom XL-toolbox izvedli enosmerno analizo variance (ANOVA) s Holm-Sidak posthoc testom. Kot statistično značilno različne smo smatrali vrednosti  $p < 0,05$ .

## Rezultati

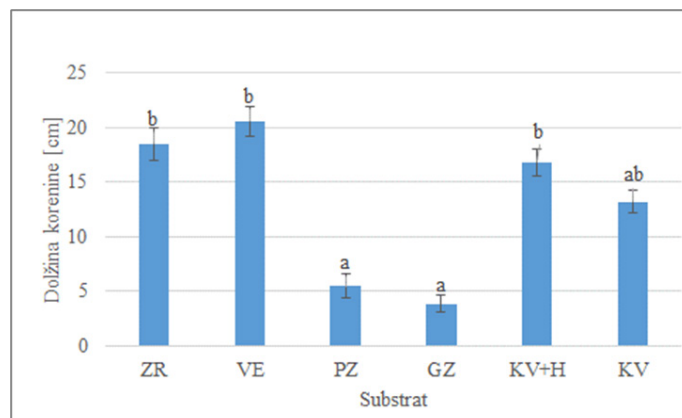
### Rast rastlin

Razvoj rastlin smo spremljali z beleženjem rasti listov sadik kumar. Povprečne dolžine listov in njihova standardna napaka so prikazane na Sliki 1. Prve tri tedne so bili listi v povprečju najdaljši v substratu zemlja za rože (ZR), na koncu poskusa pa so bili listi v substratu kokosova vlakna z dodanimi hranili (KV + H) najdaljši ( $55 \pm 3,13$  mm). Sprva je bila povprečna dolžina listov v substratu z vermikulitom (VE), enaka kot v substratu z glineno zemljo (GZ),  $10,05 \pm 0,69$  mm, a se je rast rastlin v GZ upočasnila že v drugem tednu in so listi zrasli do  $11 \pm 3,18$  mm četrty teden. Na koncu poskusa je bila razlika med rastlinami z najdaljšimi (KV+H) in rastlinami z najkrajšimi (GZ) listi  $44 \pm 4,47$  mm.

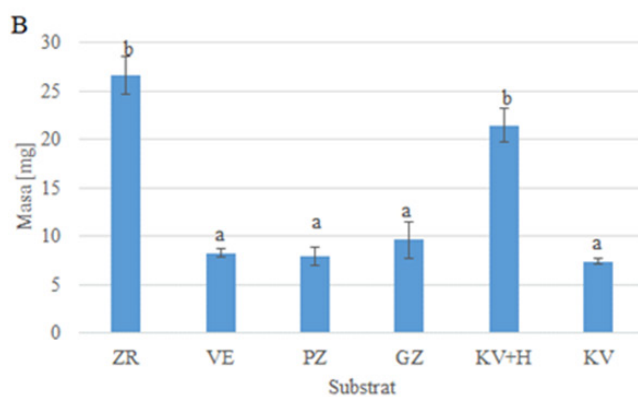
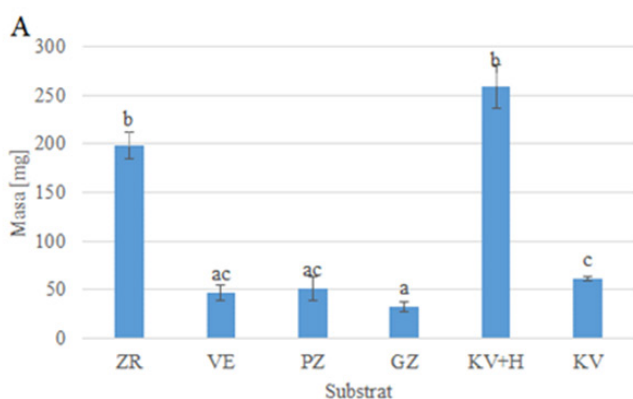
Po končanem poskusu smo izmerili tudi dolžino korenin (Slika 2). Najdaljše korenine so se razvile v VE (več kot 20 cm).



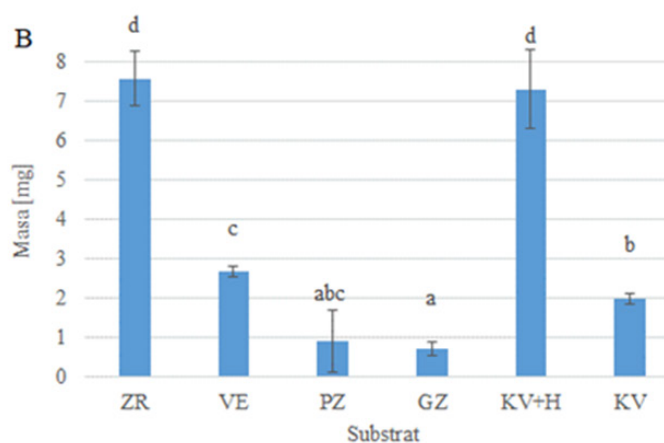
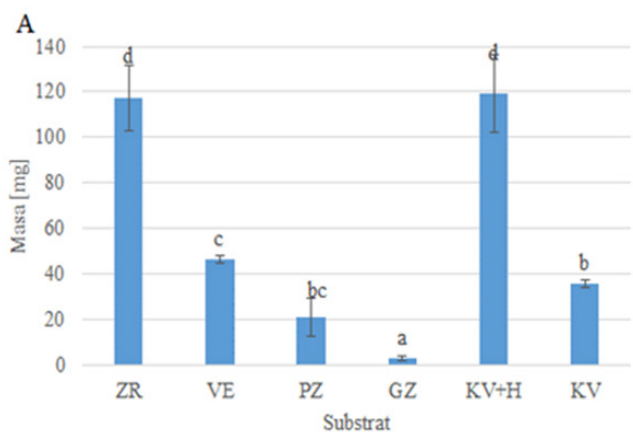
**Slika 1:** Povprečna dolžina listov kumar skozi štiri tedne v milimetrih in s pripadajočo standardno napako (ZR, VE, KV + H in KV  $n=20$ , PZ  $n=8$ , GZ  $n=12$ ), v različnih substratih: zemlja za rože (ZR), vermikulit (VE), peščena zemlja (PZ), glinena zemlja (GZ), kokosova vlakna z dodano hranilno raztopino (KV + H) in kokosova vlakna brez hranilne raztopine (KV). Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak posthoc test,  $p < 0,05$ ).



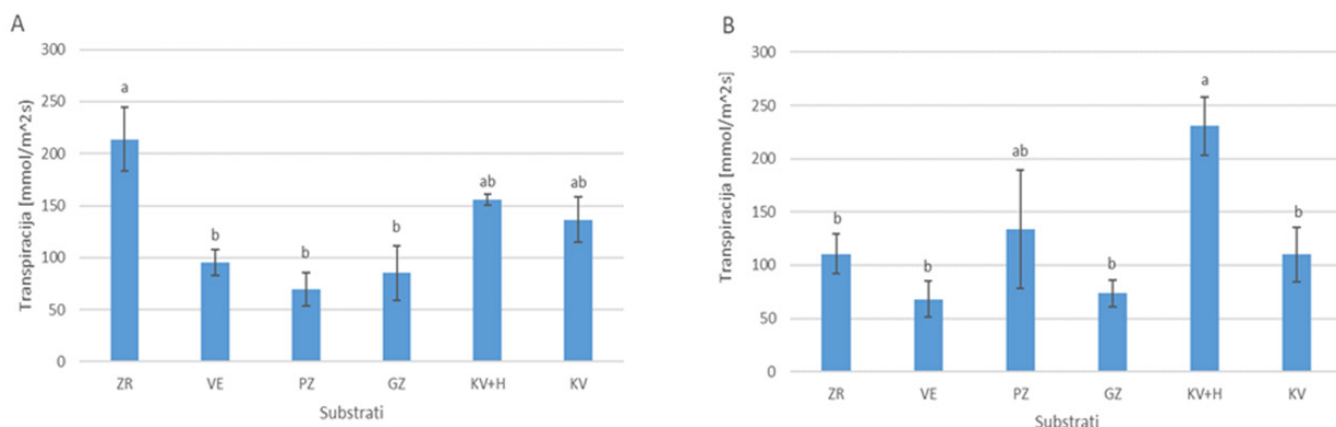
**Slika 2:** Povprečna dolžina korenin kumar (v centimetrih) s pripadajočo standardno napako (ZR, VE, KV + H in KV  $n=20$ , PZ  $n=8$ , GZ  $n=12$ ), v različnih substratih: zemlja za rože (ZR), vermikulit (VE), peščena zemlja (PZ), glinena zemlja (GZ), kokosova vlakna z dodano hranilno raztopino (KV + H) in kokosova vlakna brez hranilne raztopine (KV). Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak posthoc test,  $p < 0,05$ ).



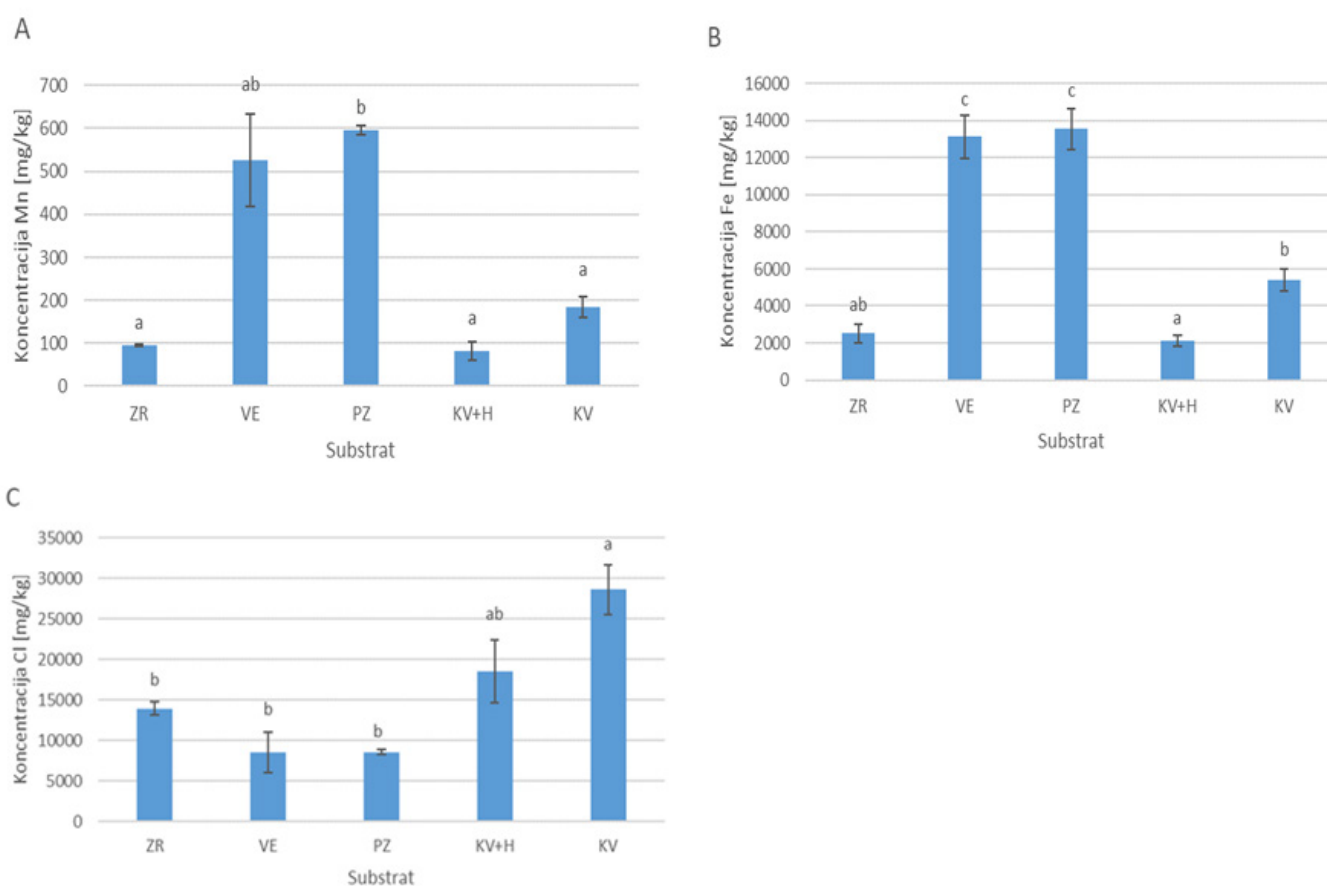
**Slika 3:** Povprečna sveža masa (A) in povprečna suha masa (B) poganjkov kumar v miligramih s pripadajočo standardno napako (ZR, VE, KV + H in KV  $n=20$ , PZ  $n=8$ , GZ  $n=12$ ), v različnih substratih: zemlja za rože (ZR), vermikulit (VE), peščena zemlja (PZ), glinena zemlja (GZ), kokosova vlakna z dodano hranilno raztopino (KV + H) in kokosova vlakna brez hranilne raztopine (KV). Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak posthoc test,  $p < 0,05$ ).



**Slika 4:** Povprečna sveža (A) in povprečna suha (B) masa korenin kumar v miligramih s pripadajočo standardno napako (ZR, VE, KV + H in KV  $n=20$ , PZ  $n=8$ , GZ  $n=12$ ), v različnih substratih: zemlja za rože (ZR), vermikulit (VE), peščena zemlja (PZ), glinena zemlja (GZ), kokosova vlakna z dodano hranilno raztopino (KV + H) in kokosova vlakna brez hranilne raztopine (KV). Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak posthoc test,  $p < 0,05$ ).



**Slika 5:** Transpiracija listov kumare v mmol/m<sup>2</sup>s s pripadajočo standardno napako (ZR, VE, KV + H in KV n<sub>1</sub>=20, PZ n<sub>2</sub>=8, GZ n<sub>3</sub>=12), drugi (A) in četrti (B) teden po začetku poskusa v različnih substratih: zemlja za rože (ZR), vermikulit (VE), peščena zemlja (PZ), glinena zemlja (GZ), kokosova vlakna z dodano hranilno raztopino (KV + H) in kokosova vlakna brez hranilne raztopine (KV). Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak posthoc test, p<0,05).



**Slika 6:** Mineralna sestava elementov v koreninah: mangan (A), železo (B) in klor (C) s pripadajočo standardno napako (ZR, VE, KV + H in KV n<sub>1</sub>=20, PZ n<sub>2</sub>=8, GZ n<sub>3</sub>=12), v različnih substratih: zemlja za rože (ZR), vermikulit (VE), peščena zemlja (PZ), glinena zemlja (GZ), kokosova vlakna z dodano hranilno raztopino (KV + H) in kokosova vlakna brez hranilne raztopine (KV). Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak posthoc test, p<0,05).

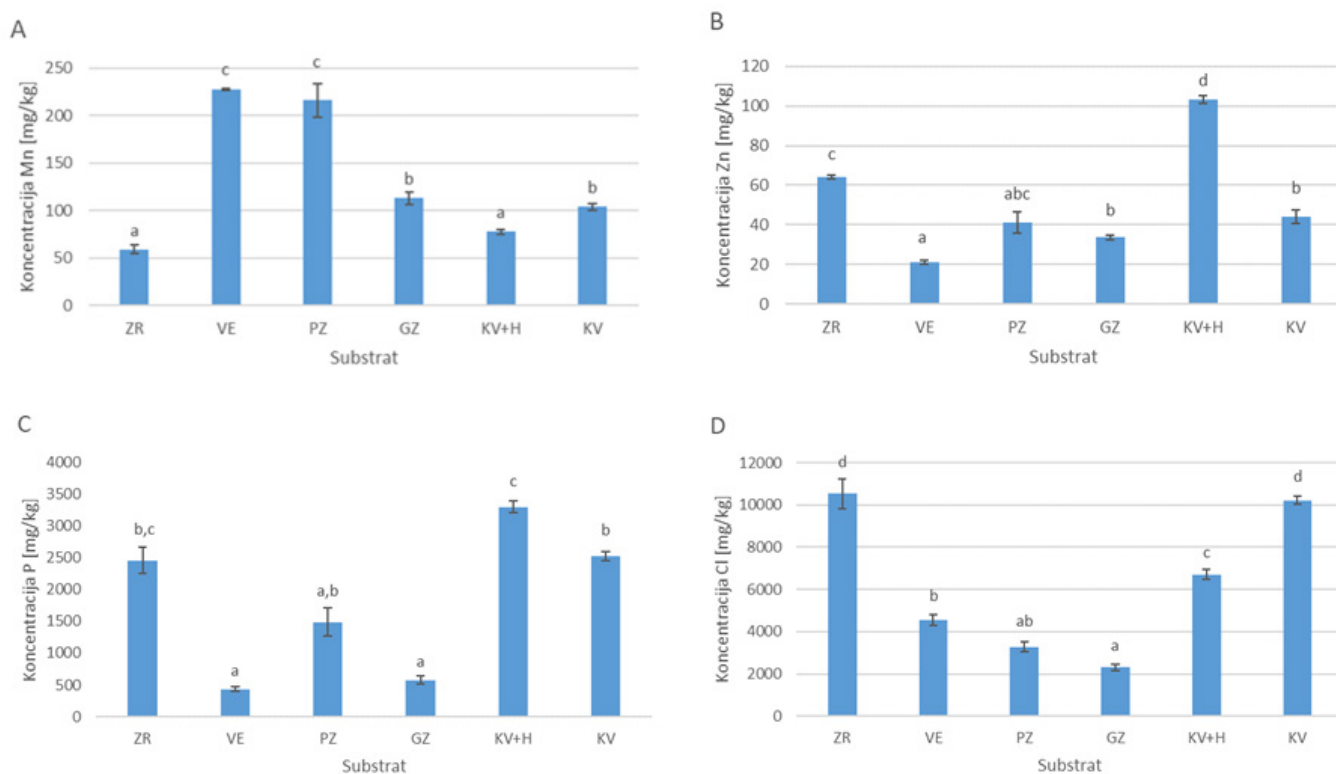
Najkrajše korenine smo zabeležili v substratih GZ (3,8 cm) in PZ (5,4 cm).

### Biomasa

Primerjali smo svežo in suho maso poganjkov ter rezultate prikazali na Sliki 3. Poganjki so v primeru substrata KV + H in ZR dosegli večjo svežo biomaso od rastlin v drugih substratih.

Najnižjo svežo maso so imeli poganjki v GZ. Poganjki v ZR so imeli  $6,09 \pm 0,27$  g manj sveže mase (Slika 3A) in  $0,05 \pm 0,03$  g več suhe mase (Slika 3B) od poganjkov v KV + H. Največ suhe mase so imeli v substratih ZR in KV + H.

Sveža masa korenin kumar je bila največja pri rastlinah, ki so rastle na ZR in KV+H, najnižja pa pri GZ, razlika je bila za več kot 90 % (Slika 4). Podobne trende kot pri sveži masi, smo opazili tudi v primeru suhe mase korenin.



**Slika 7:** Mineralna sestava elementov v poganjkih: mangan (A), cink (B), fosfor (C) in klor (D) s pripadajočo standardno napako (ZR, VE, KV + H in KV n1=20, PZ n2=8, GZ n3=12), v različnih substratih: zemlja za rože (ZR), vermikulit (VE), peščena zemlja (PZ), glinena zemlja (GZ), kokosova vlakna z dodano hranilno raztopino (KV + H) in kokosova vlakna brez hranilne raztopine (KV). Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak posthoc test,  $p < 0,05$ ).

## Transpiracija

Drugi teden opazovanja smo najvišjo stopnjo transpiracije opazili pri ZR ( $213,74 \pm 13,62$  mmol/m<sup>2</sup>) in najnižjo pri PZ ( $69,8 \pm 11,17$  mmol/m<sup>2</sup>) ter VE ( $95,7 \pm 5,61$  mmol/m<sup>2</sup>). Med tem ko smo četrty teden opazili najvišjo stopnjo pri KV + H ( $230,6 \pm 12,20$  mmol/m<sup>2</sup>) in najnižjo pri VE ( $68,2 \pm 16,9$  mmol/m<sup>2</sup>).

## Mineralna sestava korenin in poganjkov

Na Sliki 6 so zbrani rezultati o vsebnosti treh mikroelementov v koreninah in sicer mangana - Mn, železa - Fe in klora - Cl. Korenine rastlin v substratu PZ in VE so vsebovale večje količine Mn in Fe kot v drugih substratih. Cl je bilo največ v KV, med ostalimi pa ni bilo statistično značilnih razlik.

Podatke o vsebnosti mikroelementov v poganjkih smo zbrali na Sliki 7. V poganjkih v substratu KV + H sta bili najvišji koncentraciji Zn ( $103 \pm 1,51$  mg/kg) in P ( $3303 \pm 78,50$  mg/kg). Poganjki v substratu VE in PZ so vsebovali skoraj 2-krat več Mn kot poganjki v substratih ZR in KV + H (Slika 7A). Najmanj P je bilo v substratih VE in GZ. Najvišja koncentracija Cl je bila v poganjkih v ZR in KV.

## Diskusija

Med rastlinami na različnih substratih smo opazili razlike v velikosti listov. Rastline v GZ niso imele velikih listov, verjetno tudi kot posledica tega, da je bil njihov koreninski sistem slabo razvit. Nenavaden sprva naraščajoč in potem padajoč trend rasti v substratu PZ je lahko nastal, ker se je večino rastlin v substratu PZ posušilo že po prvem tednu. Tudi v GZ se je večino listov posušilo, nekateri pa so ostali kratki. Listi

so najboljše zrasli v ZR in KV + H (Slika 1). Večji listi in več listov omogoča večjo stopnjo transpiracije (Li in sod, 2020), zato je izrazito povečanje stopnje transpiracije v primeru KV + H od drugega do četrtega tedna smotrno. Povečano transpiracijo v PZ, v kateri smo pričakovali obratno, da bo rastlina zaradi pomanjkanja vode in manjših listov manj transpirirala, morda, ker je propadlo večino rastlin, na katerih nismo mogli izmeriti transpiracije. Presenetil je tudi upad transpiracije v ZR, kjer je bilo v četrtem tednu veliko število velikih zdravih listov, zaradi katerih bi se transpiracija morala povečati. To se je lahko zgodilo zaradi napake v merjenju ali slabše dostopnosti vode iz substrata (Westgate in Bozer, 1983).

V GZ so bile korenine najslabše razvite, kar je vplivalo na slab razvoj nadzemnega dela. V zbiti glini korenine nimajo prostora za rast, hkrati pa doživljajo začasna obdobja pomanjkanja kisika, ko tla postanejo poplavljeni ali prepojena z vodo in visoke temperature spodbujajo hitro porabo O<sub>2</sub> s strani talnih mikroorganizmov in korenin (Shikovin sod, 2020). Posledično korenine v okolju brez O<sub>2</sub> ne morejo opravljati običajnega celičnega dihanja in spremenijo metabolno pot, pri čemer kot stranski produkt nastaja mlečna kislina, ki je škodljiva za korenine in povzroči celično smrt (Malcolm, 1992). Zaradi nefunkcionalnega podzemnega dela rastlina ne dobi dovolj energije, hranil in vode in propade. Najdaljše korenine so se razvile v KV, ker je substrat zelo porozen, lahek in lahko zadrži veliko zraka in vode (Zupanc, 2007). Rastline v substratu KV so imele kljub dolgim koreninam najmanjše liste in kot odraz pomanjkanja hranil v substratu, ki je bolj primeren za hidroponsko pridelavo kamor bi običajno dodali hranila v raztopini.

Organske komponente v substratu se med pridelavo pridelka

razgradijo in lahko spremenijo fizikalno in kemično sestavo medija (Olle in sod., 2012). Koncentracije elementov v koreninah GZ nismo izmerili, ker je večino korenin propadlo ali pa so bile kratke in po liofilizaciji ni bilo dovolj šne količine za merjenje z metodo XRF. Nizka vsebnost mikroelementov v nekaterih substratih je lahko znak zakisanosti substrata, saj je razpoložljivost na primer Fe in Mn odvisna od pH stanja v tleh, zato se, če se pH v tleh zniža, razpoložljivost Fe in Mn povečata (Mohammadi Ghehsareh in Samadi, 2012). Zaradi njegove dobre vodozadrževalne lastnosti VE v praksi dodajamo drugim substratom. Vsebuje v glavnem kalcij, magnezij, kalij, železo in silicij (Marinova in sod., 2012), katerih vrednosti, razen Fe (Slika 6B), se niso pomembno razlikovale med substrati, zato jih nismo prikazali. Velike koncentracije Mn lahko povzročijo upad fotosinteze in antagonizem z nekaterimi elementi (Alejandro in sod., 2020), a rastline niso kazale glavnih znakov toksičnosti (kloroze). Poganjki so bili v KV + H zaradi dodane hranilne raztopine dobro preskrbljeni z mikroelementi in so vsebovali največ fosforja (Slika 7C), pomembnega za rast in razvoj (Wang in sod. 2018), ki je omogočal bujno rast sadik.

## Zaključki

Tekom naše raziskave smo ugotovili, da ima izbira pravega substrata za sajenje kumar pomemben vpliv na njihovo rast in razvoj. Kot smo pričakovali, je bila najslabša rast v substratih s peščeno in glineno zemljo. Rast v substratu s kokosovimi vlakni z dodano hoaglandovo raztopino je bila boljša kot v substratu s kokosovimi vlakni brez dodane raztopine.

V nadaljnjih raziskavah bi bilo smiselno meriti pH in elektroprevodnost substrata ter primerjati manj substratov hkrati, da bi lažje določili kaj jim manjka, da bi rastline v njih dobro rasle. Smiselno bi bilo primerjati substrate glede na namen pridelave, saj je na primer substrat VE uporabljen v glavnem za hidroponsko pridelavo. Zanimivo bi bilo izvesti poskuse, ki bi trajali dovolj dolgo, da bi analizirali tudi plodove kumar in na podlagi vsebnosti hranil določili optimalen substrat za gojenje kumar v prihodnosti.

## Literatura

- Alejandro S, Höller S, Meier B, Peiter E. 2020. Manganese in Plants: From Acquisition to Subcellular Allocation. *Frontiers in Plant Science* 11: 300.
- Anwar MR, Liu DL, Macadam I, Kelly G. 2013. Adapting agriculture to climate change: a review. *Theoretical and Applied Climatology* 113: 225–245.
- Brady NC, Weil RR. 2016. *The Nature and Properties of Soils*. Pearson Education, Columbus, ZDA.
- Li L, Chen S, Yang C, Meng F, Sigimis N. 2020. Prediction of plant transpiration from environmental parameters and relative leaf area index using the random forest regression algorithm. *Journal of Cleaner Production* 261: 121136
- Malcom CD. 1992. Soil aeration and plant root metabolism. *Soil Science* 154, 4: 259-268.
- Manggoel W, Uguru M, Ogbonna PE, 2022. Comparative study on phenology, gender and yield components of cucumber (*Cucumis sativus* L.) varieties. *Journal of Tropical Agriculture, Food, Environment and Extension* 21: 68-74.
- Marinova S, Toncheva R, Zlatareva E, Pchelarova H. 2012. Characteristics of Vermiculite and its Influence on the Yield of Lettuce in Greenhouse Experiment. BALWOIS 2012 – Ohrid. Institute of Soil Science, Sofia, Bulgaria. [https://balwois.com/wp-content/uploads/old\\_proc/223.pdf](https://balwois.com/wp-content/uploads/old_proc/223.pdf) (dostopano: junij 2023)
- Mohammadi GA, Samadi N. 2012. Effect of soil acidification on growth indices and microelements uptake by greenhouse cucumber. *African Journal of Agricultural Research* 7: 1659-1665
- Olle M, Ngoujaio M, Siomos A. 2012. Vegetable quality and productivity as influenced by growing medium: a review. *Agriculture* 99, 4: 399–408
- Passioura JB. 1991. Soil structure and plant growth. *Australian Journal of Soil Research* 29, 6: 717.
- Pochiecha M. 2007. Prilagoditve rastlin z amfibijskim značajem v presihajočih vodnih telesih. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. [http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn\\_pociecha\\_maja.pdf](http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/dn_pociecha_maja.pdf) (dostopano: junij 2023)
- Schrieber U, Bilger W, Neubauer C. 1995. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. V: *Ecophysiology of photosynthesis*. Schulze ED, Caldwell MM. (ur.). Springer Verlag, Berlin – Heidelberg.
- Shikov AE, Chirkova TV, Yemelyanov VV. 2020. Post-Anoxia in Plants: Reasons, Consequences, and Possible Mechanisms. *Russian Journal of Plant Physiology* 67: 45–59.
- Šušteršič J. 2014. Vpliv vodnega izvlečka krhke vrbe na rast in razvoj japonskega dresnika Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Pedagoška fakulteta. [http://pefprints.pef.uni-lj.si/2285/1/Diplomsko\\_delo\\_J%C5%A0\\_4%2C6.pdf](http://pefprints.pef.uni-lj.si/2285/1/Diplomsko_delo_J%C5%A0_4%2C6.pdf) (dostopano: junij 2023)
- Zupanc P. 2007. Vpliv količine in velikosti zeolita na zadrževanje vode v rastnem substratu. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. [http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/vs\\_zupanc\\_polona.pdf](http://www.digitalna-knjiznica.bf.uni-lj.si/vs_zupanc_polona.pdf) (dostopano: junij 2023)
- Wang F, Deng M, Xu J, Zhu X, Mao C. 2018. Molecular mechanisms of phosphate transport and signaling in higher plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 74: 114-122.
- Wen J, Ji H, Sun N, Tao H, Du B, Hui D, Liu C. 2018 Imbalanced plant stoichiometry at contrasting geologic-derived phosphorus sites in subtropics: the role of microelements and plant functional group. *Plant Soil* 430: 113–125.
- Westgate M, Bozer J. 1983. Transpiration- and Growth-Induced Water Potentials in Maize , *Plant Physiology* 74, 4: 882–889.

# Vpliv delcev mikroplastike na rast in razvoj ter mineralno prehrano koruze in sončnice

Miha Kitek, Luka Mravlje, Sergej Praček, Maša Starman, Jakob Trebše

Biotehniška fakulteta, študij biotehnologije, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

- Cilj naše raziskave je bil preučiti vpliv mikroplastike iz PVC materiala na rast, mineralno sestavo ter vsebnost fotosinteznih barvil pri dveh vrstah rastlin, in sicer koruzi (*Zea mays*) ter sončnici (*Helianthus annuus*). S pridobljenimi rezultati želimo razumeti, kakšen izziv predstavlja onesnaževanje z mikroplastiko za ti dve vrsti rastlin.
- Izvedli smo lončni poskus, kjer smo v substrat zmešali delce polivinilklorida (PVC). V poskus smo vključili dve vrsti rastlin: sončnico in koruzo. Za vsako rastlino posebej smo oblikovali tri poskusne skupine. Kontrolno skupino brez PVC delcev in dve eksperimentalni skupini: prva je imela v substratu 1 % (m/m) PVC delcev, druga pa 5 % (m/m) PVC delcev. Po poskusu smo izmerili svežo in suho maso korenin ter poganjkov. Analizirali smo vsebnost klorofila s spektrofotometrom in vsebnost mineralnih snovi z rentgensko fluorescenčno spektrometrijo.
- V raziskavi smo določili, da 5 % PVC v začetku rasti pospeši rast koruze, zavre pa rast sončnice. V kasnejših fazah 5 % PVC zavre rast sončnic. Mikroplastika vpliva tudi na zmanjšanje vsebnosti klorofila a in b in na akumulacijo cinka, žvepla, fosforja, mangana in kalcija v koruzi.
- V našem poskusu smo delno potrdili hipoteze. Opazili smo inhibitorne učinke PVC plastike na rast in vsebnost klorofila, ki so bili odvisni od vrste in koncentracije PVC. Hkrati pa smo v določenih primerih opazili, da višje koncentracije PVC niso negativno vplivale na rastline, kar nasprotuje našim hipotezam.

**Ključne besede:** PVC, onesnaževanje, rentgenska fluorescenčna spektroskopija, akumulacija

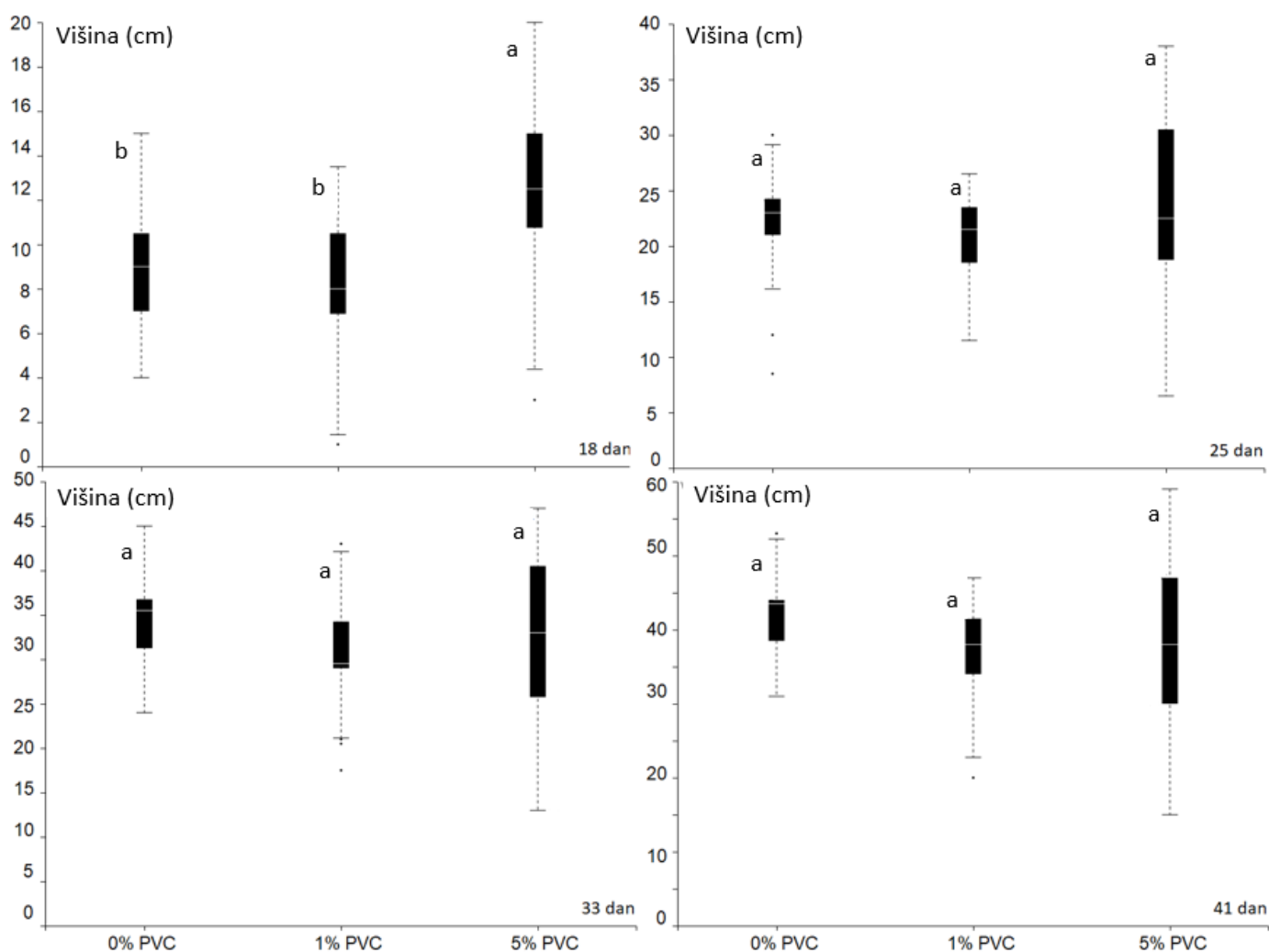
## Uvod

Onesnaževanje s plastiko je postalo eden ključnih okoljskih problemov na našem planetu. Zaradi široke razširjenosti plastike je pomembno raziskati, kako ta vpliva na rastline. Mikroplastika nastane z razpadom večjih plastičnih delov in ima velikost delcev manjšo od 5 mm. Številne študije so že bile izvedene, ki raziskujejo, kako prisotnost mikroplastike v tleh vpliva na rastline. Ugotovljeno je bilo, da mikroplastika negativno vpliva na rast rastlin, fotosintezno aktivnost, oksidativni stres in rastlinski metabolizem. Prav tako se je pokazalo, da ima lahko mikroplastika citotoksične in genotoksične učinke na rastline (Chen s sod., 2022). Obstaja več dejavnikov, ki lahko vplivajo na stopnjo toksičnosti mikroplastike, med katerimi so velikost delcev, prisotnost drugih onesnaževalcev in vrsta mikroplastike (Larue s sod., 2021). Poleg vpliva na rastline ima mikroplastika tudi učinke na tla in rizosfero rastlin (De Souza Machado s sod., 2019). Učinki mikroplastike so močno odvisni tudi od vrste rastline, saj različne študije opažajo različne odzive rastlin na prisotnost mikroplastike, saj v nekaterih primerih mikroplastika sploh nima signifikantnega učinka na fiziologijo rastlin (Meng s sod., 2021) (Li s sod., 2020).

Polivinil klorid (PVC) je ena najbolj razširjenih vrst plastike na

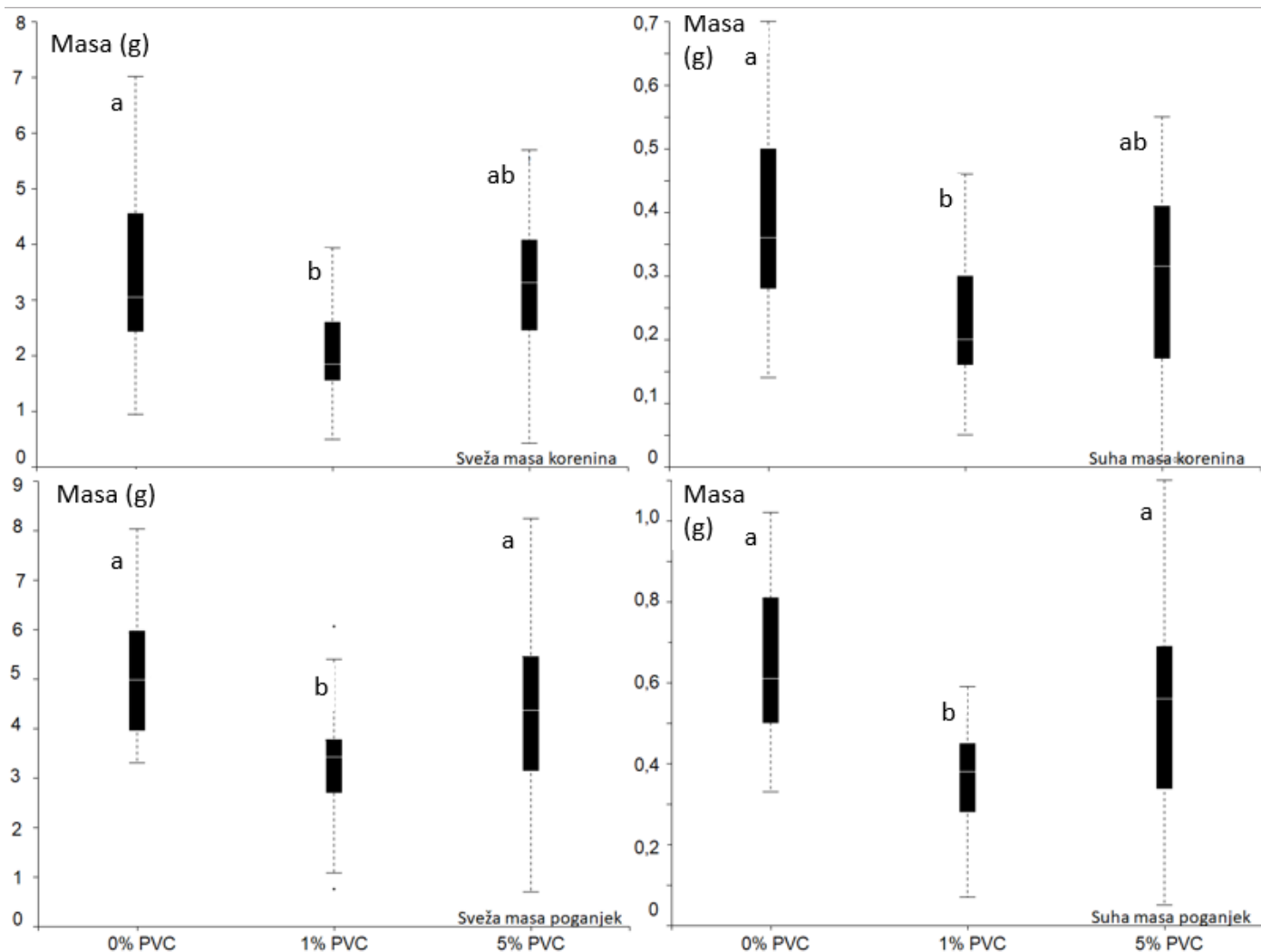
svetu. Gre za polimer, sestavljen iz monomera, ki vsebuje eno molekulo klora (Sadat-Shojai in Bakhshandeh, 2011). Rezultati študij so pokazali, da ima PVC mikroplastika lahko različne učinke na različne vrste rastlin. Študija na oljni buči (*Cucurbita pepo* L.) in dveh vrstah plevela (*Centaurea cyanus* in *Senecio inaequidens*) je pokazala splošno negativen vpliv prisotnosti PVC mikroplastike na rast in fiziologijo rastlin (Gentili s sod., 2022) (Colzi s sod., 2022). Študija na navadni solati (*Lactuca sativa* L.) pa je pokazala tako negativne kot tudi pozitivne učinke prisotnosti PVC mikroplastike. Opazili so daljše, debelejšje in večje korenine pri obravnavanih rastlinah, hkrati pa so zaznali tudi višje stopnje oksidativnega stresa pri teh rastlinah. (Li s sod., 2020)

Glede na razlike v vplivu PVC mikroplastike na rastline smo se v naši raziskavi osredotočili na dve pomembni kulturni rastlini: sončnico in koruzo. Namen naše raziskave je bil ugotoviti, kako PVC mikroplastika v tleh vpliva na višino poganjkov, svežo in suho maso poganjkov ter korenin, ter kakšen je vpliv na mineralno sestavo teh rastlin. Naše hipoteze so bile, da bo prisotnost PVC mikroplastike negativno vplivala na rast obeh rastlinskih vrst, vendar z nekaj razlikami med njima. Hkrati smo predvidevali, da bo PVC mikroplastika vplivala tudi na mineralno sestavo obravnavanih rastlin, zlasti smo pričakovali povečano vsebnost klora, ki bi ga rastline lahko prevzele iz PVC



**Slika 1:** Višina koruze, rastočih na substratu z 0, 1 in 5 % PVC po 18., 25., 33. in 41. dne. Prikazane so s škatlo z brki (n=17), \* označuje osamelce. Posamezne črke (a, b) prikazujejo statistične razlike med posameznimi skupinami (enosmerna ANOVA, Tukeyev post hoc test,  $p < 0,05$ ).





**Slika 2:** Sveža in suha masa korenin in poganjkov koruze, rastočih na substratu z 0, 1 in 5 % PVC po 41. dnevu. Prikazane so s škatlo z brki ( $n=17$ ), \* označuje osamelce. Posamezne črke (a, b, ab) prikazujejo statistične razlike med posameznimi skupinami (enosmerna ANOVA, Tukeyev post hoc test,  $p < 0,05$ ).

mikroplastike.

## Metode in materiali

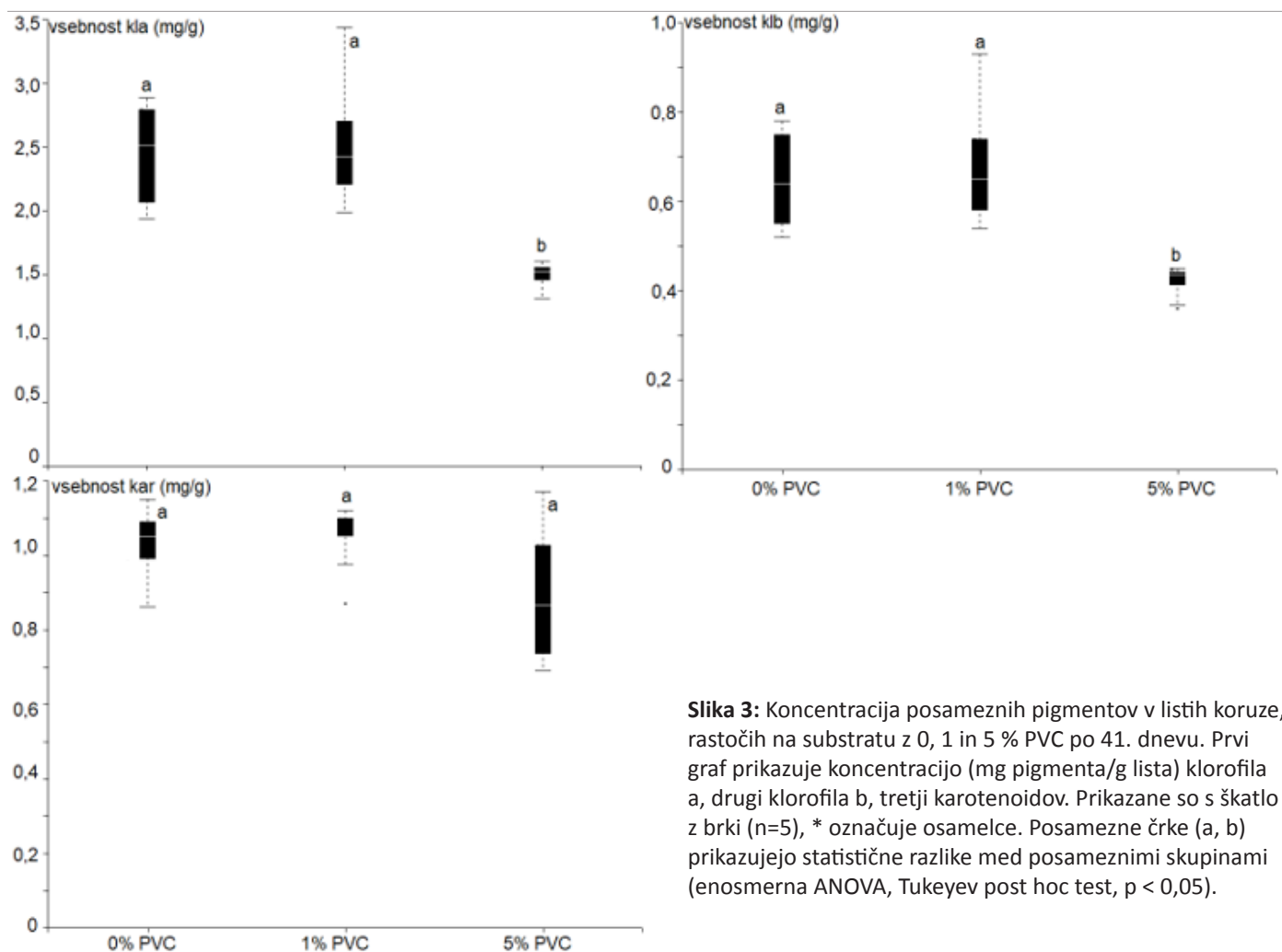
V okviru projektne delo smo izvedli lončni poskus, kjer smo v substrat zmešali delce polivinilklorida (PVC). V poskusu smo vključili semena dveh vrst rastlin - sončnico in koruzo. Za vsako rastlino posebej smo oblikovali tri poskusne skupine. Kontrolno skupino, ki v substratu ni imela dodanih delcev PVC. Prav tako smo dodali dve eksperimentalni skupini in sicer skupino, ki je imela v substratu dodan 1 % (m/m) PVC delcev ter še skupino, ki je imela v substratu vmešano 5 % (m/m) PVC delcev. Za vsako vrsto rastlin smo uporabili po 5 ponovitev pri vsaki izmed različni koncentraciji PVC delcev. V poskusu smo imeli 15 lončkov za sončnico in 15 lončkov za koruzo. V vsak lonček posebej smo posadili po 5 rastlin in jih postavili v rastno komoro s stalno zračno vlago (45 %), temperaturo 21 °C in fotoperiodo 16 h svetlobe, 8 h teme. Po 10 dneh smo rastline v posameznem lončku redčili na 5 rastlin na lonček pri koruzi in na 3 rastline na lonček pri sončnici. Rastline smo v komori gojili 6 tednov in jih med tem dvakrat tedensko zalivali ter merili njihovo velikost. Po pretekle poskusu smo rastline poželi, jih ločili na zelene liste ter korenine in vsakemu vzorec posebej določili svežo maso. V naslednjem koraku smo rastline zavili v ALU folijo, zamrznili ter jih pustili sušiti v

liofilizatorju za 72 ur. Naslednji dan smo vzorcem določili še suho maso in jih strli v terilnicah, katerim smo za lažje trenje dodali tekoči dušik. V prvi analizi smo želeli določiti vsebnost klorofila, zato smo v epruveto dodali 30 mg strtega vzorca in 5 ml 80 % acetona (Monni s sod., 2001). Vzorce smo nato vorteksirali in jih 24 ur inkubirali v hladilniku na 7°C. Naslednji dan smo vzorcem ponovno dodali aceton, ki je preko noči izhlapel, do skupnega volumna 5 ml. Vzorce smo nato ponovno vzorce vrtnčili ter centrifugirali. Vsebnost različnih barvil smo izmerili s spektrofotometrom pri treh valovnih dolžinah, in sicer pri 647 nm, 664 nm in 470 nm. V drugi analizi smo iz strtih vzorcev naredili tabletko, te stehali in nato analizirali vsebnost mineralnih snovi. Vsebnost mineralnih snovi smo določili z rentgensko fluorescenčno spektrometrijo (Nečemer s sod., 2011). Pridobljene podatke smo obdelali s programom Microsoft Excel. Podatki so bili statistično obdelani v programu R z uporabo enosmerne analize variance in Tukeyevim post hoc testom. Rezultate smo prikazali na grafih v programu RAWGraphs.

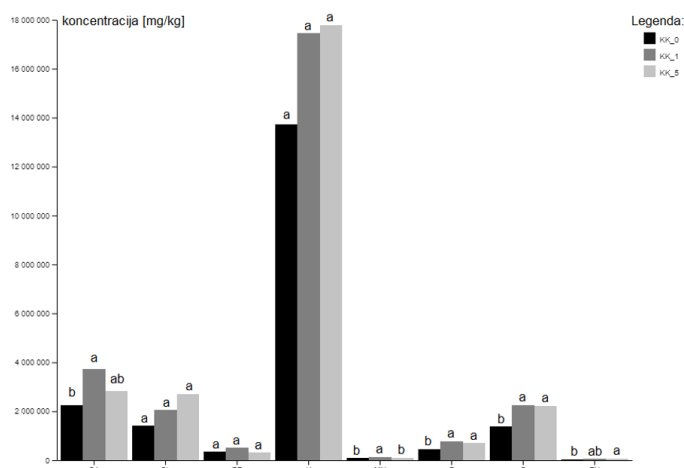
## Rezultati

### Koruzo

Iz slike 1 je razvidno, da vsebnost PVC vpliva na rast koruze le v

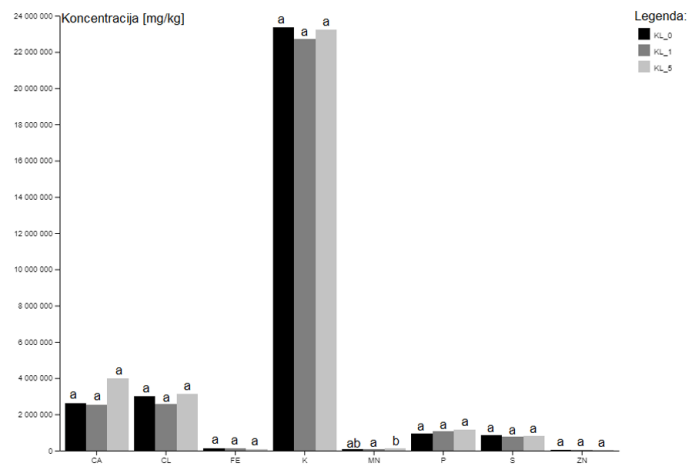


**Slika 3:** Koncentracija posameznih pigmentov v listih koruze, rastočih na substratu z 0, 1 in 5 % PVC po 41. dnevu. Prvi graf prikazuje koncentracijo (mg pigmenta/g lista) klorofila a, drugi klorofila b, tretji karotenoidov. Prikazane so s škatlo z brki (n=5), \* označuje osamelce. Posamezne črke (a, b) prikazujejo statistične razlike med posameznimi skupinami (enosmerna ANOVA, Tukeyev post hoc test,  $p < 0,05$ ).



**Slika 4:** Koncentracije posameznih mineralov (mg elementa/kg suhe biomase) v koreninah koruze, rastočih na substratu z 0 (črn), 1 (temno siv) in 5 (svetlo siv stolpec) % PVC po 41. dnevu. Na sliki si sledijo minerali: Ca – kalcij, Cl – klor, Fe – železo, K – kalij, Mn – mangan, P – fosfor, S – žveplo, Zn – cink. Prikazane so povprečne vrednosti (n=4). Posamezne črke (a, b, ab) prikazujejo statistične razlike med posameznimi skupinami (enosmerna ANOVA, Tukeyev post hoc test,  $p < 0,05$ ).

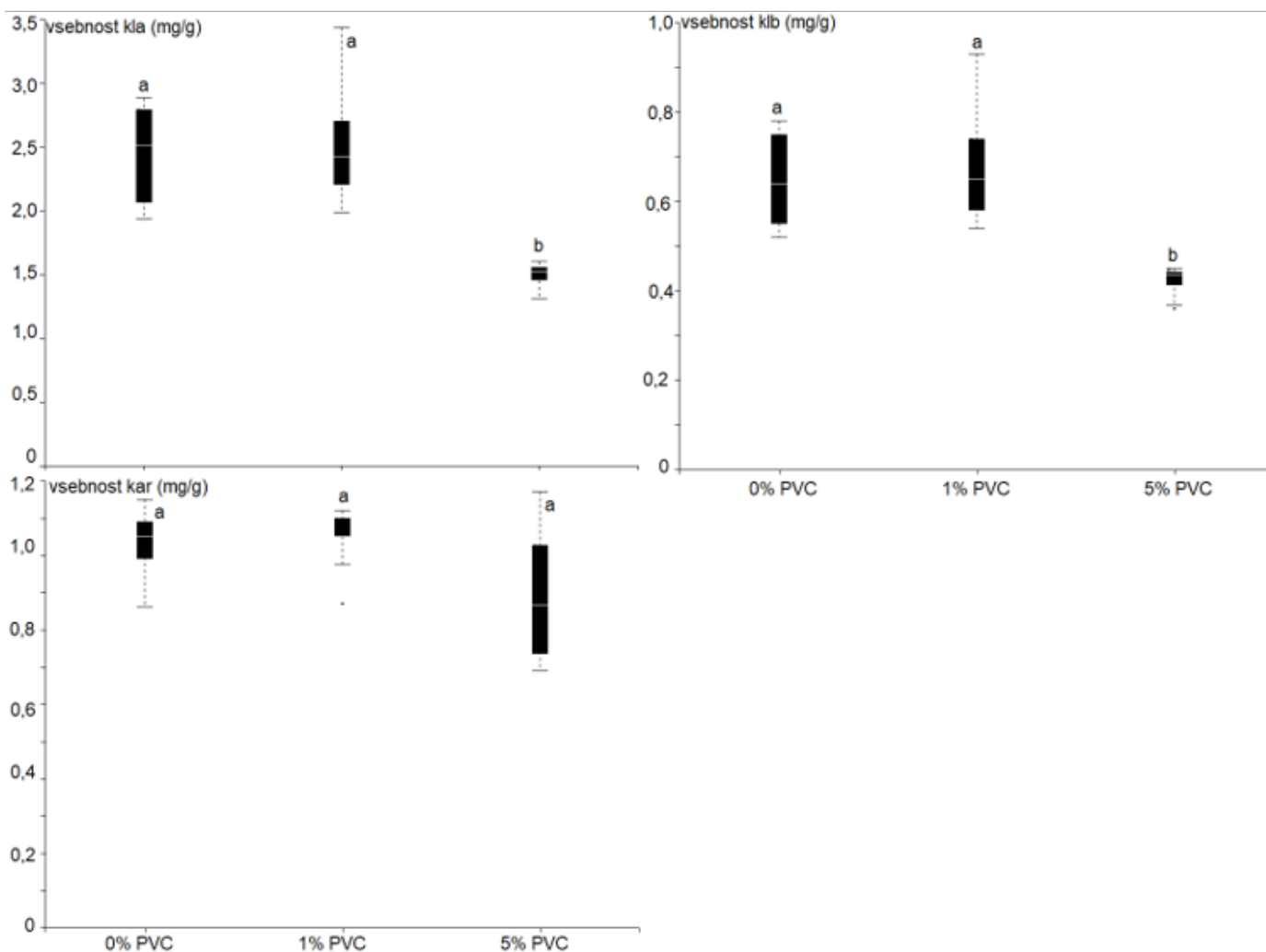
začetnih fazah rasti (18. dan). Takrat je višina koruze rastoče v 5 % PVC (v povprečju 12,6 cm) v primerjavi s kontrolo (v povprečju 8,9 cm) za 41,8 % višja. Kasneje ta učinek na rast ni opazen, med različnimi substrati ni statistično signifikantnih



**Slika 5:** Koncentracije posameznih mineralov (mg elementa/kg suhe biomase) v listih koruze, rastočih na substratu z 0 (črn), 1 (temno siv) in 5 (svetlo siv stolpec) % PVC po 41. dnevu. Na sliki si sledijo minerali: Ca – kalcij, Cl – klor, Fe – železo, K – kalij, Mn – mangan, P – fosfor, S – žveplo, Zn – cink. Prikazane so povprečne vrednosti (n=4). Posamezne črke (a, b, ab) prikazujejo statistične razlike med posameznimi skupinami (enosmerna ANOVA, Tukeyev post hoc test,  $p < 0,05$ ).

razlik.

Prav tako smo preverili vpliv koncentracije PVC v substratu na maso poganjkov in korenin koruze. Slika 2 prikazuje, inhibitorno delovanje substrata z 1 % PVC na razvoj korenin in



**Slika 6:** Višina sončnic, rastočih na substratu z 0, 1 in 5 % PVC po 18., 25., 33. in 41. dne. Prikazane so s škatlo z brki ( $n=15$ ), \* označuje osamelce. Posamezne črke (a, b, ab) prikazujejo statistične razlike med posameznimi skupinami (enosmerna ANOVA, Tukeyev post hoc test,  $p < 0,05$ ).

poganjkov, medtem ko pri substratu s 5 % PVC nismo zasledili inhibitornega delovanja na razvoj poganjkov in korenin. Sveža masa korenin koruze je v rastoči z 1 % PVC v primerjavi s kontrolo za 38,1 % nižja, sveža masa poganjkov pa za 40,4 %. Suha masa korenin koruze je v rastoči z 1 % PVC v primerjavi s kontrolo za 41,4 % nižja, suha masa poganjkov pa za 46,3 %. Iz slike 3 je razvidno, da substrat s 5 % PVC deluje inhibitorno na tvorbo klorofila a in b, medtem ko substrat z 1 % PVC ne izkazuje nobenega statistično inhibitornega učinka pri tvorbi klorofila a in b, glede na kontrolno skupino. Noben od substratov s PVC pa ne vpliva na tvorbo samih karotenoidov v primerjavi s kontrolo. Substrat s 5 % PVC zniža koncentracijo klorofila a za 38,9 %, klorofila b pa za 35,3 %.

Analiza mineralov v korenini koruze (Slika 4) je pokazala, da rast koruze na substratih z 1 in 5 % PVC ne vpliva na spremembo akumulacije kloridnih, kalijevih in železovih ionov v korenine. Iz same analize grafov pa lahko opazimo, da rast na substratu z 1 in 5 % PVC statistično značilno zviša akumulacijo fosforjevih in žveplovih ionov. Akumulacijo kalcijevih in manganovih ionov se zviša na substratu z 1 % PVC, akumulacijo cinkovih pa na substrat s 5 % PVC.

Analiza mineralov v listih koruze (Slika 5) je pokazala, da rast koruze na substratih z 1 in 5 % ne vpliva na spremembo akumulacije fosforjevih, žveplovih, kloridnih, kalijevih, kalcijevih, železovih in cinkovih ionov v liste. Edina statistično

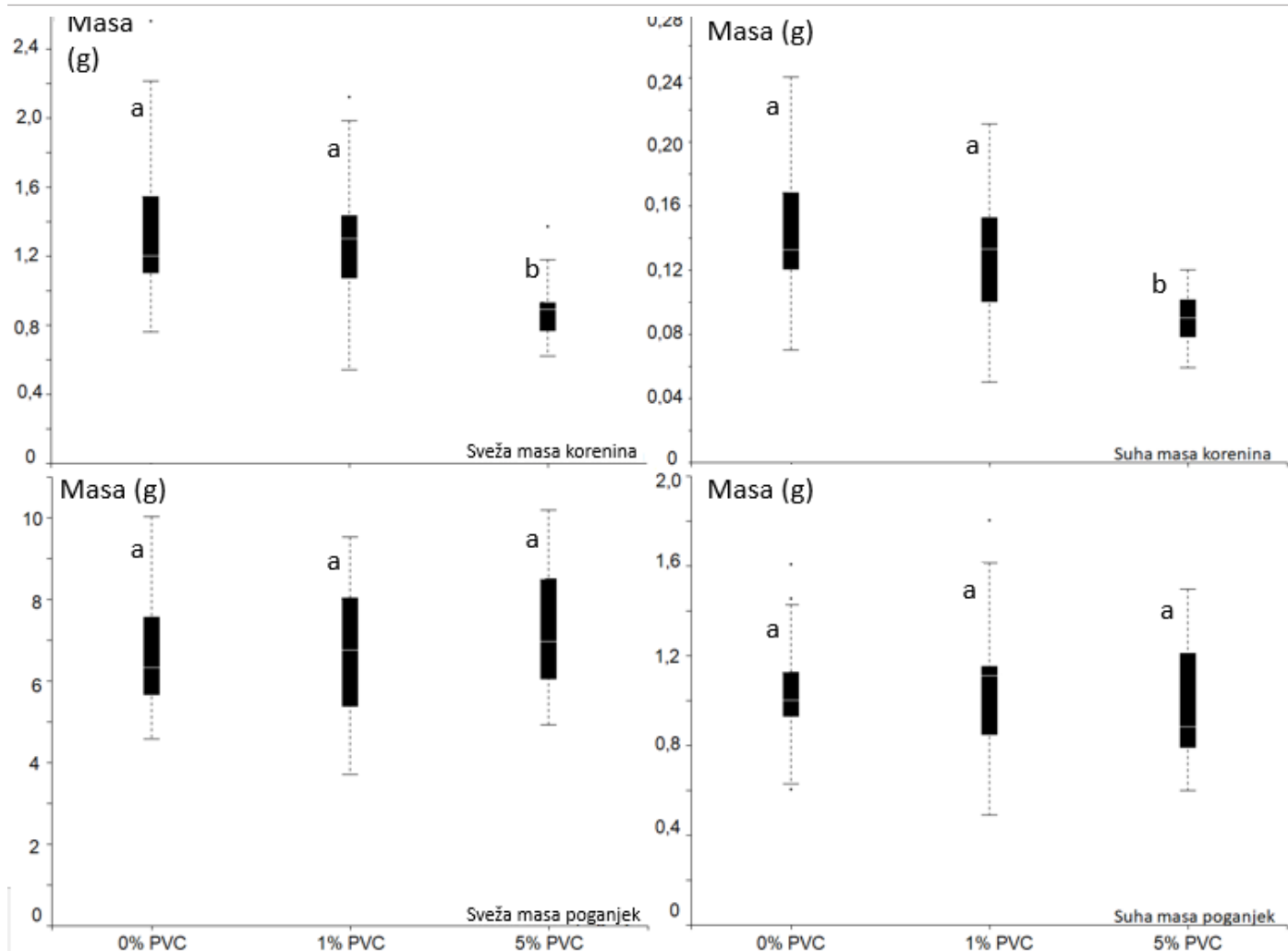
signifikantna razlika se nahaja v akumulaciji manganovih ionov, kjer je akumulacija mangana v substratu z 1 % PVC nižja od akumulacije v substratu s 5 % PVC.

### Sončnica

Iz slike 6 je razvidno, da vsebnost PVC vpliva na rast sončnic v začetnih (18. dan) in kasnejših fazah rasti (41. dan). 18. dan je višina sončnic rastoče v 5 % PVC (v povprečju 6,43 cm) v primerjavi s kontrolo (v povprečju 7,63 cm) za 15,7 % nižja, 41. dan pa je za 18,9 % višja. Ob drugih časovnih točkah ta učinek ni opazen, med različnimi substrati ni statistično signifikantnih razlik.

Prav tako smo preverili vpliv koncentracije PVC v substratu na maso poganjkov in korenin sončnic. Slika 7 prikazuje, da le substrat s 5 % PVC deluje inhibitorno na razvoj korenin. Sveža masa korenin koruze je v rastoči s 5 % PVC v primerjavi s kontrolo za 35,2 % nižja, suha masa korenin pa za 38,4 %. Analiza rastlinskih pigmentov je pokazala, da med kontrolo in testnimi substrati ni statistično signifikantnih razlik v tvorbi klorofila a in b ter karotenoidov v listih sončnice (podatki niso prikazani).

Analiza mineralov v korenini in listih sončnice je pokazala, da med kontrolo in testnimi substrati ni statistično signifikantnih razlik v akumulaciji mineralov: kalcij, klor, železo, kalij, mangan, fosfor, žveplo, cink. (podatki niso prikazani).



**Slika 7:** Sveža in suha masa korenin in poganjkov sončnic, rastočih na substratu z 0, 1 in 5 % PVC po 41. dnevu. Prikazane so s škatlo z brki ( $n=15$ ), \* označuje osamelce. Posamezne črke (a, b) prikazujejo statistične razlike med posameznimi skupinami (enosmerna ANOVA, Tukeyev post hoc test,  $p < 0,05$ ).

## Diskusija

V okviru našega poskusa smo hipoteze delno potrdili, saj je v določenih primerih rastlina s substratom, ki vsebuje PVC imela res počasnejšo in nižjo rast, vendar ni korelirala vedno z naraščajočo koncentracijo PVC, kot bi morda to pričakovali. Koruza s 5 % PVC substratom je sicer rastla hitreje, kot kontrolna v začetnih fazah, kar nismo ravno pričakovali, v kasnejši fazi pa so bile vse rastline koruze enako visoke. Inhibitorni vpliv na rast samih korenin smo pri koruzi zaznali samo pri rastlinah, ki so bile v substratu z 1 % PVC, medtem ko pri ostalih dveh ni bilo statistično significantnih razlik. Upad mase poganjkov pri koruzi (tako sveže kot suhe) smo opazili samo pri rastlinah z 1 % substratom PVC. Tu smo pričakovali večji upad mase poganjkov pri sami koruzi z 5 % substratom PVC, morda je na račun večjega privzema PVC delcev pri slednji bila zato višja masa. Glede na kontrolno, se je koncentracija klorofila a in b znižala le pri koruzi s 5 % PVC substratom, medtem ko pri ostalih dveh nismo zaznali razlik. Prav tako so koncentracije karotenoidov ostale pri vseh skupinah koruze praktično enake. Pri sami analizi mineralov v koreninah koruze nismo zaznali nobenih statistično significantnih sprememb, kar je v nasprotju z našo hipotezo, ko smo predvideli, da se bo povečala koncentracija kloridnih ionov v premem sorazmerju z naraščajočo koncentracijo PVC delcev v substratu. Opazili

smo le spremembe pri koncentracijah manganovih ter cinkovih ionov pri substratih z 1 % ter 5 % PVC. Glede same mineralne sestave listov pri koruzi nismo zaznali sprememb, le posamezna odstopanja manganovih ionov pri koruzi tretirani z 1 % PVC.

Pri sončnicah smo opazili inhibicijo same rasti poganjkov le v začetnih fazah, saj je bil upad rasti približno 15 %. Rast sončnic obravnavanih s PVC se je celo nekoliko zvišala proti samemu koncu poskusa, vendar nismo opazili statistično significantnih razlik. Pričakovali bi, da bi sama rast bila najbolj inhibirana pri rastlinah s 5 % PVC substratom. Pri sami masi svežih in suhih poganjkov ter korenin smo odstopanja zaznali le pri sončnicah, ki so bile v substratu s 5 % PVC, sveži in suhi masi korenin sta se pri slednjih znižali za približno 35 %. Za primerjavo nismo zaznali razlik med svežo in suho maso korenin in poganjkov pri sončnicah v 1 % PVC substratu ter kontrolni skupini. Sklepamo, da je torej 1 % koncentracija PVC še tolerirana iz strani rastline, morda tudi višje koncentracije, vendar bi morali sam poskus ponoviti in rastlino gojiti pri večjih različnih koncentracijah. Pri sončnicah pa za razliko od koruze ni prišlo do nobenih statistično značilnih sprememb pri sami vsebnosti klorofilov a in b glede na kontrolno skupino rastlin. Pri sami mineralni sestavi korenin sončnic nismo zaznali statistično značilnih sprememb, za razliko od mineralne sestave samih listov sončnic, kjer se je pa razmerje med kloridnimi in kalijevimi

ioni rahlo povečala, kar delno potrjuje našo hipotezo, da se bo količina kloridnih ionov zvišala na račun PVC delcev v substratu.

## Zaključek

Naša raziskava je pokazala, da ima prisotnost PVC mikroplastike negativen vpliv na rast in vsebnost fotosintetskih barvil sončnice medtem ko prisotnost je PVC pri sončnici negativno vplival le na svežo in suho maso korenin na akumulacijo večino mineralov v koreninah in poganjkih rastlin. Naši rezultati kažejo, da je pomembno nadaljevati raziskave o učinkih PVC mikroplastike, saj so ti učinki kompleksni in se lahko razlikujejo glede na uporabljeno rastlino ter koncentracijo PVC mikroplastike. Poleg naše raziskave tudi druge številne raziskave potrjujejo, da je lahko onesnaževanje s plastiko resen okoljski problem, ki zahteva nadaljnje ukrepe za zmanjšanje uporabe plastike, recikliranje in ustrezno odstranjevanje odpadkov. Na podlagi naših ugotovitev bi bilo smiselno izvajati nadaljnje raziskave o vplivu drugih vrst mikroplastike na rastline in celotne ekosisteme.

## Literatura

- Chen G, Li Y, Liu S, Junaid M, Wang J. 2022. Effects of micro(nano) plastics on higher plants and the rhizosphere environment. *The Science of the Total Environment* 807, 1: 150841.
- Colzi I, Renna L, Bianchi E, Castellani MB, Coppi A, Pignattelli S, Loppi S, Gonnelli C. 2022. Impact of microplastics on growth, photosynthesis and essential elements in *Cucurbita pepo* L. *Journal of Hazardous Materials*, 423: 127238.
- De Souza Machado AA, Lau CW, Kloas W, Bergmann J, Bachelier JB, Faltin E, Becker R, Görlich AS, Rillig M C. 2019. Microplastics Can Change Soil Properties and Affect Plant Performance. *Environmental Science & Technology* 53, 10: 6044–6052.
- Gentili R, Quaglioni L, Cardarelli E, Caronni S, Montagnani C, Citterio S. 2022. Toxic Impact of Soil Microplastics (PVC) on Two Weeds: Changes in Growth, Phenology and Photosynthesis Efficiency. *Agronomy* 12, 5: 1219.
- Larue C, Sarret G, Castillo-Michel H, Pradas Del Real AE. 2021. A Critical Review on the Impacts of Nanoplastics and Microplastics on Aquatic and Terrestrial Photosynthetic Organisms. *Small* 17, 20: 2005834.
- Li Z, Li Q, Li R, Zhao Y, Geng J, Wang G. 2020. Physiological responses of lettuce (*Lactuca sativa* L.) to microplastic pollution. *Environmental Science and Pollution Research* 27, 24: 30306–30314.
- Mauri M., Elli T, Caviglia G, Ubaldi G, Azzi M. 2017. RAWGraphs: A Visualisation Platform to Create Open Outputs. V: Proceedings of the 12th Biannual Conference on Italian SIGCHI. New York, NY, USA: ACM. <https://doi.org/10.1145/3125571.3125585> (dostopano: junij 2023)
- Meng F, Yang X, Riksen M, Xu M, Geissen V. 2021. Response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) growth to soil contaminated with microplastics. *Science of The Total Environment* 755: 142516.
- Monni S, Uhlig C, Junntila O, Hansen E, Hynynen J. 2001. Chemical composition and ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to aboveground element application. *Environmental Pollution* 112, 3: 417–426.
- Nečemer M, Kump P, Vogel-Mikus K. 2011. Use of X-Ray fluorescence-based analytical techniques in phytoremediation. V: *Handbook of Phytoremediation*. Nova Science Publishers, New York, ZDA.
- R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/> (dostopano: junij 2023).
- Sadat-Shojai M, Bakhshandeh G-R. 2011. Recycling of PVC wastes. *Polymer Degradation and Stability* 96, 4: 404–415.

# Primerjava vpliva plazemske obdelave na mikrobiom zrnja navadne in tatarske ajde po eni rastni sezoni na polju

Sims Tjuša Elizabeth, Suchy Hana in Štampar Laura

Biotehniška fakulteta, študij biotehnologije, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

- Namen naše raziskave je bil ugotoviti, kako predhodna obdelava zrnja navadne in tatarske ajde s hladno plazmo vpliva na okuženost zrnja in na diverziteto epifitskih in endofitskih gliv po eni rastni sezoni na polju.
- Na gojišča PDA smo nanесли posamezna zrna navadne in tatarske ajde, med katerimi so bila nekatera pred sejanjem na polje obdelana s hladno plazmo, druga pa ne. Zrasle glive na gojiščih smo prešteli in morfotipizirali ter nato posamezne morfotipe do vrste ali do rodu določili s pomočjo slikovnega določevalnega ključa. Opazovali smo epifitske kot endofitske glive.
- Primerjava je pokazala, da predhodna obdelava zrnja s hladno plazmo (pred sejanjem na polje) ni imela statistično značilnega učinka na delež okuženosti z glivami, na število zraslih kolonij in na povprečno število morfotipov na ploščah.

**Ključne besede:** epifiti, endofiti, hladna plazma, glive, diverziteta

## Uvod

Ajda je kulturna rastlina iz družine dresnovk (Polygonaceae) (Farooq in sod., 2016). Poznamo več vrst ajde, najbolj znani in pogosto preučevani sta navadna ajda (*Fagopyrum esculentum* Moench.) in tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.). Odlikuje ju vsebnost številnih bioaktivnih snovi, kot so fenoli, ki imajo med drugim pozitivne vplive na zdravje človeka. Učinkovali naj bi protivnetno, antioksidativno, protitumorsko in protidiabetično (Giménez-Bastida in Zieliński, 2015). Pomembno vlogo pri razvoju rastline imajo glivni endofiti, ki so zelo raznoliki in prisotni v vseh delih rastline. Ker lahko vplivajo na kakovost semen, so podatki o vsebnosti endofitov v semenih ključnega pomena (Faeth in Fagan, 2002). Določene vrste gliv namreč lahko sintetizirajo mikotoksine, ki so zdravju škodljivi, nekateri pa so celo genotoksični. Poleg tega pa lahko zunajcelični encimi in toksini zavirajo kalitev semena ter posledično poslabšajo njihovo kakovost (Kovačec in sod., 2016). Dekontaminacija semen in njihovo ustrezno skladiščenje je torej ključno za vzdrževanje ustrezne kakovosti in preprečevanje ekonomskih izgub (Sivachandiran in Khacef, 2017). Številne rastlinske bolezni, ki jih povzročajo tudi fitopatogene glive, so še zmeraj odgovorne za propad 20–30% pridelka na letni ravni (Oerke, 2004). Konvencionalne metode za omejevanje širjenja rastlinskih patogenov, kot so recimo kemične metode (fungicidi), ima mnoge slabosti, npr. manjšo učinkovitost, onesnaževanje okolja in visoke ekonomske stroške (Adhikari in sod., 2020). V zadnjem času se obdelava semen s plazmo ponuja kot okolju prijaznejša in učinkovitejša rešitev (Adhikari in sod., 2020). Hladna plazma (HP) je ioniziran plin, ki ga ustvarimo z izpostavitvijo izbranega plina mikrovalovom, radijskim frekvencam, pulzirajočemu ali izmeničnemu električnemu toku (Sivachandiran in Khacef, 2017) in ma potencial za spodbujanje kalitve ter lahko služi kot sredstvo za površinsko dekontaminacijo (Filatova in sod., 2009).

Da bi ugotovili, kakšna je stabilnost glivnih združb zrnja navadne in tatarske ajde po obdelavi zrnja s hladno plazmo in sejanju na polje po eni rastni sezoni, smo poskusili identificirati površinske glive in endofite, ki smo jih izolirali iz obdelanih ter neobdelanih semen. Predvidevamo, da bo obdelava s hladno plazmo zmanjšala številčnost in raznovrstnost gliv, še posebej pa se bo to poznalo pri rasti površinskih gliv.

## Material in metode

Del zrnja navadne ajde (NA) in tatarske ajde (TA) (letnik 2021) smo junija 2022 izpostavili hladni plazemski obdelavi (HP), del pa smo pustili neobdelan (kontrola). Obdelava s HP je potekala na Inštitutu Jožef Stefan, parametri obdelave pa so bili sledeči: nizko-tlačna HP, moč 1500 W, čas izpostavitve 60 s, mešanica N2 in O2 (50:50). Nato smo to zrnje posejali na polje in pustili eno rastno sezono, da so rastline zrastle, zacvetele in začele ploditi. Po koncu rastne sezone (septembra 2022) smo na polju pobrali zrnje NA in TA, tako kontrolnih rastlin kot rastlin, ki so zrastle iz predhodno obdelanih semen s HP. Tako smo pridobili 4 skupine zrnja: NA 2022 HP, NA 2022 K, TA 2022 HP in TA 2022 K. Poleg tega smo izolirali tudi glive iz »matičnega zrnja«, torej NA in TA letnik 2021, tako da smo imeli skupaj 6 skupin zrnja. Iz vsake skupine smo izolirali tako površinske (epifitske) kot tudi glive iz notranjosti (endofitske).

## Izolacija epifitskih in endofitskih gliv iz zrnja navadne in tatarske ajde

Epifitske glive smo iz zrnja izolirali tako, da smo cela zrna NA in TA položili na gojišče PDA (krompirjev dekstrozni agar) z dodatnim antibiotikom kloramfenikolom (50 mg/L). Zrnje smo na glivna gojišča prenesli s pinceto ob sterilnih pogojih. Za izolacijo endofitskih gliv smo zrnje najprej namočili za 10 min v 30 % vodikov peroksid (klasična sterilizacija), nato pa 3x sprali z avtoklavirano destilirano vodo. Nato smo posamezna zrna s skalpelom v sterilnih pogojih prerezali na polovico ter jih s pinceto položili na gojišče PDA tako, da se je notranjost zrna stikala z gojiščem. Za vsako skupino smo naredili 20 paralelk, torej smo preučevali 120 petrijevk z epifitskimi glivami ter 120 z endofitskimi glivami, torej skupno 240 petrijevk. Petrijevke smo zatesnili, prenesli v kartonsko škatlo in jih prenesli v rastno komoro na kontrolirane pogoje (temperatura 20 °C, tema) za en teden. Po enotedenski kultivaciji gliv so iz zrnja na ploščah zrastle različne glive, ki smo jih morfotipizirali glede na njihove morfološke lastnosti (barva z zgornje in s spodnje strani, tekstura, oblika rasti). Na podlagi morfoloških značilnosti smo ocenili število gliv, ki kolonizirajo posamezno zrno. Po 2 predstavnikih istega morfotipa smo precepili naprej, tako da smo kos (približno dimenzije 0,5 x 0,5 cm) glive skupaj z gojiščem pod njo izrezali s spatulo in predstavili na novo gojišče PDA. Nato smo čiste kulture glive s spatulo postrgali iz gojišča in prenesli v terilnico. S pomočjo tekočega dušika smo vzorec strli s terilom in prenesli v mikrocentrifugirke za nadaljnjo izolacijo DNA. DNA smo poskusili izolirati s pomočjo kita, vendar je bila izolacija neuspešna. Morfotipe gliv smo zato do vrste ali rodu določili s pomočjo slikovnega določevalnega ključa (Mravlje, 2021).

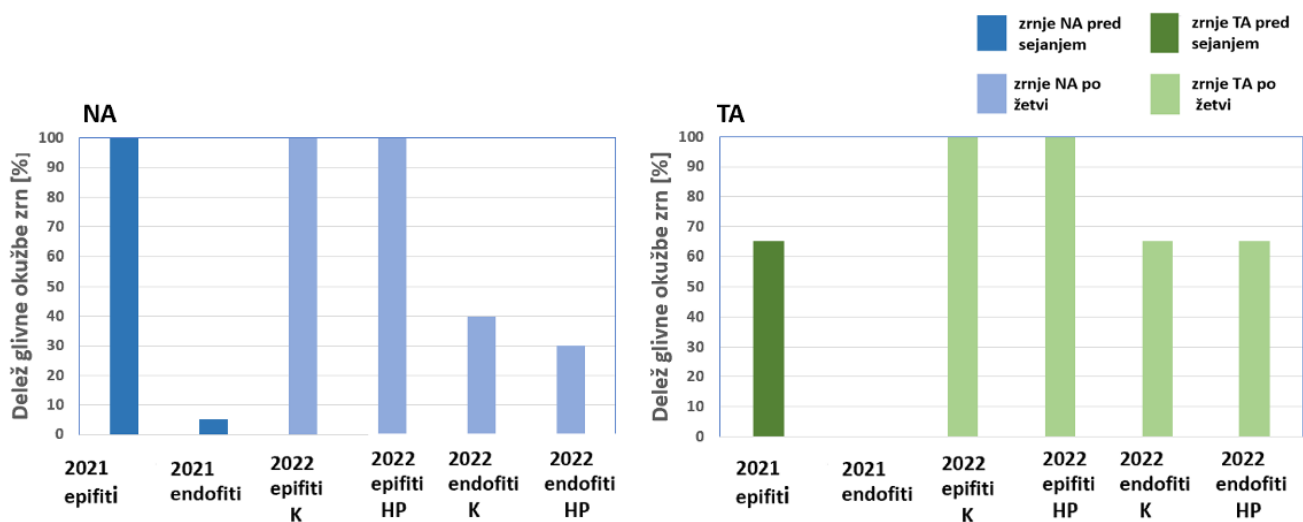
## Statistična analiza

Podatke o glivnih morfotipih smo zbrali in uredili v programu Microsoft Excel in jih statistično obdelali v istem programu s programsko opremo Daniel's XL Toolbox, s pomočjo katere smo izvedli analizo variance (ANOVA) s Holm-Sidak Post hoc testom in t-testom (razlike so statistično pomembne pri  $p < 0,05$ ).

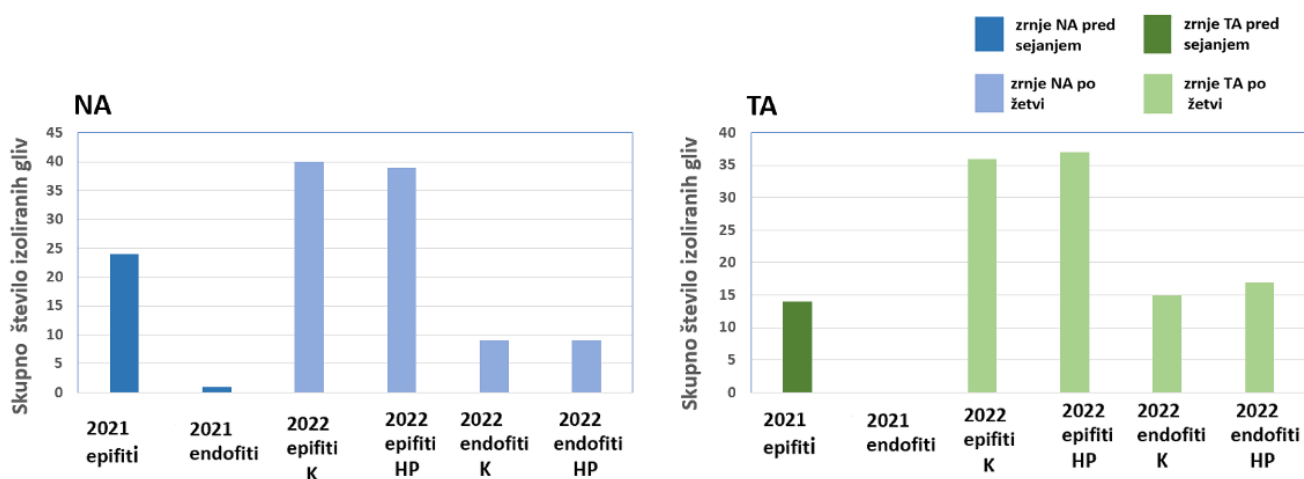
## Rezultati

Pri analizi deleža glivne okužbe zrnja navadne in tatarske ajde (Slika 1) lahko vidimo, da je bila okužba z epifiti pri vseh skupinah 100 %, z izjemo tatarske ajde iz leta 2021 (65 % okuženost). Okužba z endofiti pa je variirala glede na tretma. Zrnje tako tatarske kot tudi navadne ajde iz leta 2021 je kazalo najmanjšo stopnjo okuženosti z endofiti (5 % okuženost pri navadni in 0 % okuženost pri tatarski ajdi), največjo okuženost z endofiti pa je imelo zrnje tatarske ajde iz leta 2022 (65 % okuženost).

Na podlagi analize deleža okužbe (Slika 1) kot tudi analize skupnega števila izoliranih glivnih kolonij (Slika 2) in povprečnega števila izoliranih glivnih morfotipov (Slika 3) lahko vidimo, da ni prišlo do bistvenih razlik med predhodno s hladno plazmo obdelanimi in kontrolnimi zrnji pri nobenih od obeh vrst ajde. Pri NA lahko vidimo, da je bilo iz zrnja rastlin, ki so bile vzgojene iz neobdelanega (kontrolnega) zrnja izoliranih 40 kolonij epifitskih gliv, iz zrnja rastlin, ki so bile vzgojene iz predhodno s HP obdelanih zrn pa 39 (Slika 2). V povprečju smo tako pri vseh teh skupinah zrnja izolirali približno 2 morfotipa epifitskih gliv na ploščo (Slika 3). Povprečno število izoliranih



**Slika 1:** Delež glivne okužbe zrnja navadne ajde (NA) in zrnja tatarske ajde (TA) pri različnih letinah (2021 in 2022) pri površinsko nesteriliziranem zrnju (izolacija epifitov) ter predhodno površinsko steriliziranem zrnju (izolacija endofitov). (K) – zrnje pridobljeno iz kontrolnih rastlin; (HP) – zrnje pridobljeno iz rastlin, zrastleh iz zrnja, ki je bilo predhodno obdelano s hladno plazmo (HP). N = 20 zrn na skupino.



**Slika 2:** Skupno število glivnih kolonij izoliranih iz zrnja navadne ajde (NA) in zrnja tatarske ajde (TA) pri različnih letinah (2021 in 2022) pri površinsko nesteriliziranem zrnju (izolacija epifitov) ter predhodno površinsko steriliziranem zrnju (izolacija endofitov). (K) – zrnje pridobljeno iz kontrolnih rastlin; (HP) – zrnje pridobljeno iz rastlin, zrastleh iz zrnja, ki je bilo predhodno obdelano s hladno plazmo (HP). N = 20 zrn na skupino.

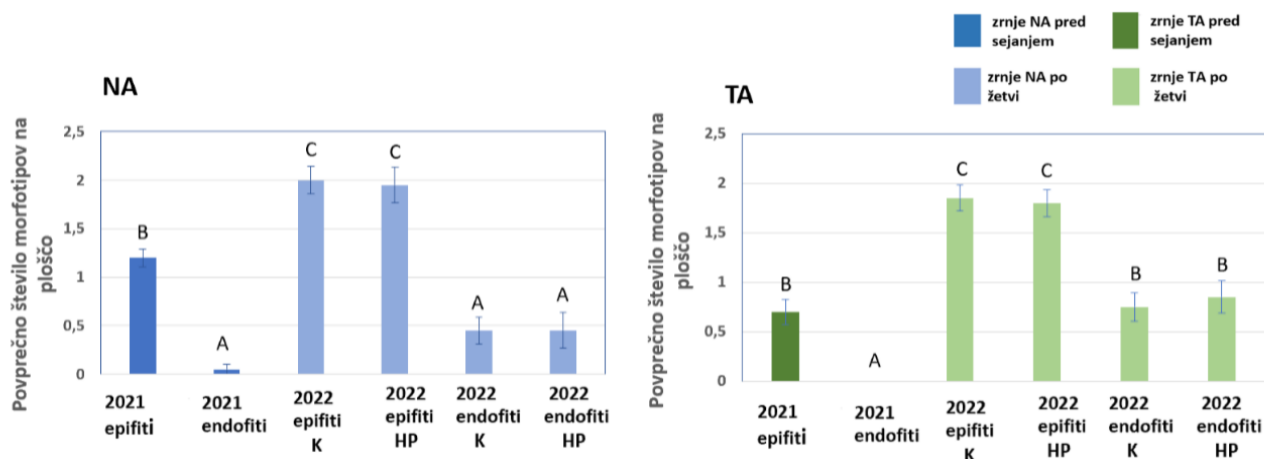
morfotipov pri NA je bilo okoli 0,5 na zrno, pri TA pa nekoliko višje in sicer med 0,75 in 0,85.

Iz zrnja NA (Slika 4) smo izolirali 11 taksonov gliv, iz TA (Slika 5) pa 7 taksonov gliv. Iz NA smo izolirali 5 vrst endofitov (*Alternaria* sp., *Alternaria infectoria*, *Epicoccum nigrum*, *Didymella* sp. in *Botrytis cinerea*), poleg tega pa še 6 vrst epifitov (*Fusarium sporotrichioides*, neznana vrsta iz debla Ascomycota, *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Fusarium* sp. in *Arthrinium* sp.). Iz TA smo izolirali 4 vrste endofitov (*Alternaria* sp., *Epicoccumnigrum*, *Didymella* sp. in *Botrytis cinerea*), poleg tega pa tudi 3 vrste epifitov (*Fusarium sporotrichioides*, neznana vrsta iz debla Ascomycota, *Rhizopus* sp. in *Mucor* sp.).

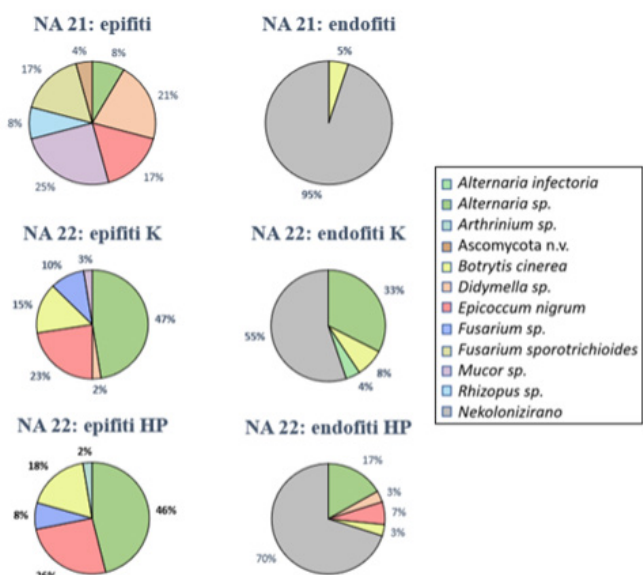
## Diskusija

V številnih študijah je bilo pokazano, da predhodna obdelava zrnja s hladno plazmo spodbuja njihovo kalitev, izboljšuje vitalnost sadik in vodi k zmanjšanju glivičnih ter bakterijskih patogenov, ki povzročajo različne bolezni rastlin (Filatova in sod., 2019). V naši raziskavi, kjer smo proučevali vpliv obdelave zrnja s hladno plazmo na številčnost in diverziteteto gliv v naslednji generaciji zrn (po eni rastni sezoni na polju), nismo opazili razlik med kontrolno skupino in skupino, ki je bila predhodno obdelana s hladno plazmo. Delež epifitske glivne okužbe zrn pri NA je namreč znašal 100 % tako pri obeh neobdelanih zrnih (NA 2021 in NA 2022 K) kot tudi pri skupini,



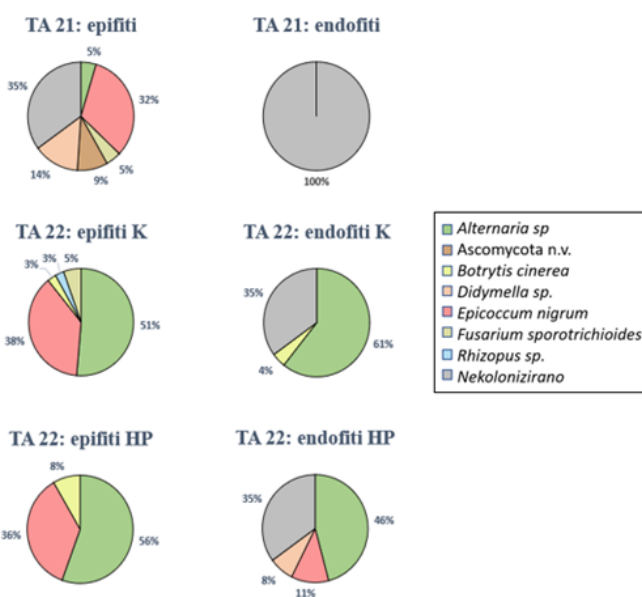


**Slika 3:** Povprečno število izoliranih glivnih morfovtipov s standardno napako na ploščo iz zrnja navadne ajde (NA) in zrnja tatarske ajde (TA) pri različnih letinah (2021 in 2022) pri površinsko nesteriliziranem zrnju (izolacija epifitov) ter predhodno površinsko steriliziranem zrnju (izolacija endofitov). (K) – zrnje pridobljeno iz kontrolnih rastlin; (HP) – zrnje pridobljeno iz rastlin, zrastlih iz zrnja, ki je bilo predhodno obdelano s hladno plazmo (HP). N = 20 zrn na skupino. Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami (enosmerna ANOVA,  $p < 0,05$ ).



**Slika 4:** Diverzitetata glivnih taksonov izoliranih iz zrnja navadne ajde pri različnih letinah (2021 in 2022), pridobljenih iz kontrolnih (K) rastlin oziroma iz rastlin vzgojenih iz predhodno s hladno plazmo (HP) obdelanih zrn. (N = 20 zrn na skupino). Oznaka n. v. pomeni neznana vrsta.

kjer je bilo matično zrnje obdelano s plazmo (NA 2022 HP). Pri endofitski glivni okužbi zrnja NA so rezultati pričakovani, saj je delež okužbe s 40% najvišji pri kontrolni skupini (NA 2022 K), medtem ko ima matično zrnje (NA 2021) le 5% glivno okuženost, zrnje, katerega matično zrnje je bilo obdelano z plazmo, pa ima 30% okuženost. To se sklada z raziskavami Kovačec in sod. (2016), ki ugotavljajo, da lahko delež glivne okužbe zrnja v enem letu skladiščenja upade iz 46% na manj kot 5%. V primeru epifitske okužbe zrnja TA so rezultati prav tako pričakovani, saj ima matično zrnje (TA 2021) za 35% nižji delež glivne kolonizacije kot zrnje, katerega matično zrnje



**Slika 5:** Diverzitetata glivnih taksonov izoliranih iz zrnja tatarske ajde pri različnih letinah (2021 in 2022), pridobljenih iz kontrolnih (K) rastlin oziroma iz rastlin vzgojenih iz predhodno s hladno plazmo (HP) obdelanih zrn.. (N = 20 zrn na skupino). Oznaka n. v. pomeni neznana vrsta.

je bilo predhodno obdelano s hladno plazmo (TA 2022 HP). Tudi pri deležu okužbe TA z endofiti je opažamo enak trend, saj sta deleža okužbe med zrnjem poskusne (TA 2022 HP) in kontrolne skupine (TA 2022 K) iz leta 2022 enaka, medtem ko iz matičnega zrnja ni zrasla nobena kolonija. To lahko pripišemo predvsem odmiranju endofitov tekom staranja semen matičnega zrnja (Kovačec in sod., 2016). Naši rezultati tako nakazujejo, da predhodna obdelava zrnja s hladno plazmo pred sejanjem na polje ne vpliva na skupno število epifitskih in endofitskih gliv, kakor tudi na povprečno število izoliranih morfovtipov prisotnih na zrnju ajde.

Pri analizi diverzitete gliv lahko vidimo, da sta bili diverziteti endofitskih in epifitskih gliv večji pri NA kot TA, kar se sklada z rezultati raziskave Mravlje in sod., 2021. Omenjena raziskava je pokazala, da pride ob daljši izpostavljenosti zrnja NA in TA hladni plazmi do upada diverzitete celokupnih (v našem primeru tako endofitskih kot epifitskih) gliv, vendar študija ne omenja vpliva hladne plazme na drugo generacijo zrnja rastlin ajde. Vidimo pa lahko tudi, da je zrnje skupin, ki so bile predhodno obdelane s hladno plazmo (tako v primeru NA kot TA), imelo podobno diverzitetu gliv v primerjavi z njihovimi kontrolnimi skupinami, tako epifitskih kot tudi endofitskih gliv. Žal ob pregledu literature nismo zasledili, da bi katera koli raziskovalna skupina po svetu že izvedla podobno študijo, kjer bi primerjali vpliv predhodne obdelave zrnja s hladno plazmo na glivne kolonizatorje naslednje generacije zrnja (po eni rastni sezoni na polju), zato naših rezultatov ne moremo primerjati z drugimi študijami. Ne glede na to podobnosti med kontrolnimi in skupinami, katerih matična semena so bila predhodno obdelana s hladno plazmo, kažejo na to, da obdelava matičnih semen s hladno plazmo ni imela vpliva na glivne združbe naslednje generacije zrnja.

Iz naših rezultatov je razvidno, da je na zrnju NA in TA iz leta 2022 (tako kontrolnih, kot tudi skupini, ki je bila predhodno obdelana s hladno plazmo) daleč najbolj prevladoval glivni rod *Alternaria* (od 30 do 60% vseh izoliranih gliv iz posamezne skupine zrnja), ki je prav tako prevladoval na zrnju ajde v raziskavah Kovačec in sod., 2016 ter Mravlje in sod., 2021. Da so vrste gliv iz rodu *Alternaria* najbolj trdovratne ob poskusu dekontaminacije s hladno plazmo, sta ugotovili tudi študiji Kordas in sod. (2015) in Mravlje in sod. (2021), pri katerih so analizirali vrstno sestavo gliv naravnega mikrobioma semen po obdelavi s hladno plazmo. Pri obeh študijah so bile najbolj zastopane vrste pri analizah naravnega mikrobioma semen po obdelavi s hladno plazmo iz rodu *Alternaria*. Poleg tega smo pogosto izolirali tudi glivo vrste *Epicoccum nigrum*, kar je prav tako v skladu z rezultati študij zgoraj omenjenih avtorjev. Nekoliko redkeje smo izolirali glive iz rodu *Fusarium*, ki naj bi imela visoko občutljivost na obdelavo s hladno plazmo (Zahoranová s sod, 2015), vendar pri primerjavi naših rezultatov diverzitete epifitskih gliv NA ni prišlo do bistvenega upada deleža kolonizacije z glivami iz rodu *Fusarium* pri zrnju iz skupine, predhodno obdelane s hladno plazmo v primerjavi s kontrolno skupino iz leta 2022, kar ponovno nakazuje na to, obdelava matičnega zrnja s hladno plazmo ni imela učinka na drugo generacijo zrnja.

## Zaključek

Predhodna obdelava zrnja s hladno plazmo pred sejanjem na polje v našem primeru ni imela učinka na kasnejšo okuženost zrnja druge generacije navadne in tatarske ajde z glivami, kar je bilo v nasprotju z našimi pričakovanji. Nismo opazili bistvenih razlik v skupnem številu izoliranih gliv, prav tako ne v povprečnem številu morfotipov, tako pri epifitih kot endofitih. Smo pa opazili nekoliko nižjo diverzitetu epifitskih gliv (predvsem pri tatarski ajdi), izoliranih iz zrnja pridobljenega iz rastlin, vzgojenih iz predhodno obdelanih zrn s hladno plazmo, kar se je skladalo z našimi pričakovanji. Nasprotno pa smo opazili celo rahlo povečanje diverzitete endofitskih gliv, izoliranih iz zrnja pridobljenega iz rastlin, vzgojenih iz

predhodno obdelanih zrn s hladno plazmo, tako v primeru navadne kot tudi tatarske ajde. Rezultati naše raziskave torej nakazujejo, da je za učinek obdelave s hladno plazmo, zrnje potrebno obdelati pred vsakim sejanjem, saj se vpliv obdelave na glivni mikrobiom ne odraža v naslednji generaciji rastlin. Za zanesljivejše zaključke bi morali naš eksperiment ponoviti, z večjim številom zrn na posamezno proučevano skupino.

## Literatura

1. Farooq S, Rehman RUI, Pirzadah TB, Malik B, Ahmad Dar F, TFarooq S, Rehman RUI, Pirzadah TB, Malik B, Ahmad Dar F, Tahir I. 2016. Chapter twenty three - Cultivation, Agronomic Practices, and Growth Performance of Buckwheat. *Molecular Breeding and Nutritional Aspects of Buckwheat* 299-319. Academic Press, Oxford, UK. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803692-1.00023-7>.
2. Giménez-Bastida J in Zieliński H. 2015. Buckwheat as a Functional Food and Its Effects on Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 7896-7913. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02498>
3. Faeth SH, Fagan WF. 2002. Fungal Endophytes: Common Host Plant Symbionts but Uncommon Mutualists. *Integrative and Comparative Biology* 42: 360–368. doi: <https://doi.org/10.1093/icb/42.2.360>
4. Kovačec E, Likar M, Regvar M. 2016. Temporal changes in fungal communities from buckwheat seeds and their effects on seed germination and seedling secondary metabolism. *Fungal Biol.* 120(5):666-78. doi: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.03.003>
5. Sivachandiran L, Khacef A. 2017. Enhanced seed germination and plant growth by atmospheric pressure cold air plasma: combined effect of seed and water treatment. *RSC Advances* 7: 1822-1832. doi: <https://doi.org/10.1039/C6RA24762H>
6. 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. doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00077>
7. Filatova I, Azharonok V, Gorodetskaya E, Mel L, Shedikova O, Shik A. 2009. Plasma-radiowave stimulation of plant seeds germination and inactivation of pathogenic microorganisms. *Proc. Int. Plasma Chem. Soc.* 19:627. Dostopno na spletni strani: [https://www.researchgate.net/publication/266231050\\_Plasma-radiowave\\_stimulation\\_of\\_plant\\_seeds\\_germination\\_and\\_inactivation\\_of\\_pathogenic\\_microorganisms](https://www.researchgate.net/publication/266231050_Plasma-radiowave_stimulation_of_plant_seeds_germination_and_inactivation_of_pathogenic_microorganisms)
8. 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):851. doi: <https://doi.org/10.3390/plants10050851>
9. Zahoranová A, Henselová M, Hudecová D, Kaliňáková B, Kováčik D, Medvecká V, Černák M. 2015. Effect of Cold Atmospheric Pressure Plasma on the Wheat Seedlings Vigor and on the Inactivation of Microorganisms on the Seeds Surface. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*. 36(2): 397–414. doi: <https://doi.org/10.1007/s11090-015-9684-z>
10. Oerke, E. C. 2006. Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* 144, 31–43. doi: <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>
11. Kordas L, Pusz W, Czapka T, Kacprzyk R, 2015. The Effect of Low Temperature Plasma on Fungus Colonization of Winter Wheat Grain and Seed Quality. *Polish Journal of Environmental Studies* 24(1):433-438. doi: <http://www.pjoes.com/pdf-89435-23352?filename=The%20Effect%20of.pdf>
12. Mravlje J. 2021. Določevalni ključ: Glivna zbirka – izolati iz semen ajde. Gradivo za vaje, BF UL