

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Eva KOVAČEC

**ENDOFITSKE GLIVE IZ SEMEN NAVADNE AJDE  
(*Fagopyrum esculentum* Moench) IN NJIHOVE  
INTERAKCIJE Z BAKROVIMI SPOJINAMI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Eva KOVAČEC

**ENDOFITSKE GLIVE IZ SEMEN NAVADNE AJDE (*Fagopyrum  
esculentum* Moench) IN NJIHOVE INTERAKCIJE Z BAKROVIMI  
SPOJINAMI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**ENDOPHYTIC FUNGI FROM COMMON BUCKWHEAT SEEDS (*Fagopyrum  
esculentum* Moench) AND THEIR INTERACTIONS WITH COPPER  
COMPOUNDS**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2016

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani z dne 21. 3. 2016 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje biologija. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Marjana Regvar in za somentorja doc. dr. Matevž Likar.

Doktorsko delo je zaključek Interdisciplinarnega doktorskega študija Bioznanosti na področju biologije. Izolacija gliv, poskusi z glivami in rastlinami ter pretežni del analiz so bili opravljeni na Katedri za fiziologijo rastlin Oddelka za biologijo, medtem ko so bile meritve sekundarnih metabolitov opravljene na Katedri za mikrobiologijo Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. XRF analize so bile opravljene v Laboratoriju za rentgensko fluorescenčno spektrometrijo Odseka za fiziko nizkih in srednjih energij Inštituta Jožef Stefan v Ljubljani, meritve  $\mu$ -PIXE v Mikroanalitskem centru Inštituta Jožef Stefan v Podgorici. Karakterizacija bakrovih delcev je bila opravljena na Odseku za sintezo materialov Inštituta Jožef Stefan v Ljubljani. Prostorsko porazdelitev elementov so z metodo LA-ICP-MS določili v Laboratoriju za analizo kemijo Kemijskega inštituta v Ljubljani. Meritve XANES in EXAFS so bile izvedene na žarkovni liniji BM23 na sinhrotronu ESRF v Grenoblu, Franciji. Vsebnosti organskih kislin z HPLC so bile izmerjene na Oddelku za mikrobiologijo Fakultete za znanost in informatiko Univerze v Szegedu na Madžarskem.

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednik: prof. dr. Alenka GABERŠČIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Članica: prof. dr. Katarina VOGEL-MIKUŠ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Član: prof. dr. Primož PELICON  
Inštitut Jožef Stefan, Mikroanalitski center, Odsek za fiziko nizkih in srednjih energij

Datum zagovora: 6. 6. 2016

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačano, neizključeno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Eva Kovačec

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
- DK UDK 581.1:615.9(043.3)=163.6
- KG *Fagopyrum esculentum/Fagopyrum tataricum*/glivne združbe/glivni antagonizem/Cu/nanodelci/sekundarni metaboliti/fenolne spojine/tolerančni mehanizmi
- AV KOVAČEC, Eva, univ. dipl. biolog
- SA REGVAR, Marjana (mentor)/LIKAR, Matevž (somentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, znanstveno področje biologija
- LI 2016
- IN ENDOFITSKE GLIVE IZ SEMEN NAVADNE AJDE (*Fagopyrum esculentum* Moench) IN NJIHOVE INTERAKCIJE Z BAKROVIMI SPOJINAMI
- TD Doktorska disertacija
- OP XIX, 132 str., 15 pregl., 36 sl., 41 pril., 356 vir.
- IJ SI
- JI sl/en
- AI Raziskave sestave glivnih združb v semenih navadne in tatarske ajde tekom skladiščenja so pokazale, da se pogostost kolonizacije semen s časom skladiščenja zmanjšuje, ter da so populacije v teh semenih relativno stabilne, saj obstajajo antagonistične interakcije med najpogostejšimi izoliranimi rodovi. Encimsko sintezo gliv, natančneje sintezo amilaze, celulaze in polifenol oksidaze smo povezali z vplivom na kalitev semen ter razvojem kalic. Ob izpostavitvi gliv različnim bakrovim spojinam, smo ugotovili, da se glive odzivajo različno in imajo razvite določene razstrupljevalne mehanizme. Preučili smo mehanizem strupenosti teh spojin na glive, ki vključuje oceno stopnje oksidativnega stresa, sintezo zunajceličnih encimov, sideroforov in organskih kislin. Glivni izolat *Botrytis cinerea* je bil sposoben biotransformacije mikrodelcev CuO in nanodelcev CuO ter Cu. Pokazali smo, da so fungicidi, ki strukturno temeljijo na nanodelcih CuO neprimerni za zatiranje *B. cinerea*, kot verjetno tudi ostalih gliv s sposobnostjo sinteze oksalne kisline v visokih koncentracijah. Ob izpostavitvi semen navadne in tatarske ajde različnim bakrovim spojinam se je izkazalo, da imata oblika Cu in vrsta ajde pomemben vpliv na izmerjene parametre, medtem ko imata na rast in razvoj rastlin ter privzem elementov vpliv predvsem oblika Cu in njegova koncentracija. Tretiranje rastlin z bakrovimi spojinami je spremenilo vsebnosti sekundarnih metabolitov, kot tudi mineralov. Privzem Cu v poganjke je koreliral s stopnjo oksidativnega stresa rastline. Z razporeditvijo elementov na prečnem prerezu listov tretiranih rastlin z nanodelci CuO smo opazili, da se Cu v največji meri nahaja v žili listov, kar bi lahko ogrožalo prehrabno varnost človeka.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dd
- DC UDC 581.1:615.9(043.3)=163.6
- CX *Fagopyrum esculentum*/*Fagopyrum tataricum*/fungal communities/fungal antagonism/Cu/nanoparticles/secondary metabolites/fenolic compounds/tolerance mechanisms
- AU KOVAČEC, Eva
- AA REGVAR, Marjana (supervisor)/LIKAR, Matevž (co-supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, Scientific Field of Biology
- PY 2016
- TI ENDOPHYTIC FUNGI FROM COMMON BUCKWHEAT SEEDS (*Fagopyrum esculentum* Moench) AND THEIR INTERACTIONS WITH COPPER COMPOUNDS
- DT Doctoral dissertation
- NO XIX, 132 p., 15 tab., 36 fig., 41 ann., 356 ref.
- LA SI
- AL sl/en
- AB The research of the fungal communities in seeds of common and Tartary buckwheat during storage showed that the frequency of colonization decreases with storage time, although the populations of these seeds are relatively stable, due to antagonistic interactions found among fungi. The fungal enzymatic syntheses, in particular of amylase, cellulase and polyphenol oxidase, was correlated to their impact on seed germination and seedlings development. When fungi were exposed to various Cu compounds, the mechanisms of their toxicity were studied with the oxidative stress estimation, the synthesis of extracellular enzymes, siderophores and organic acids. The fungal isolate *Botrytis cinerea* was capable of CuO and Cu micro- and nanoparticles biotransformation. We showed that the fungicides based on CuO nanoparticles are not suitable for the suppression of *B. cinerea*, as probably not for fungi with high oxalic acid synthesis. When seeds of common and Tartary buckwheat were exposed to different Cu compounds, it was seen that the buckwheat species and form of Cu compounds were influential factors, while the major factors that affect plant performance and elemental uptake were form and concentration of Cu compounds. Treating the plants resulted in altered secondary metabolites and mineral content, while the uptake of Cu correlated with the level of oxidative stress. The Cu distribution in the leaf cross-section of the treated shoots with nanoparticles CuO was mainly located in the vessel, which may compromise the human food safety.

## KAZALO VSEBINE

	str.
<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATIONS.....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE.....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC.....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO SLIK.....</b>	<b>XI</b>
<b>KAZALO PRILOG.....</b>	<b>XV</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....</b>	<b>XVIII</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	3
1.2 RAZISKOVALNE HIPOTEZE .....	3
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>4</b>
2.1 AJDA IN NJEN SEKUNDARNI METABOLIZEM .....	4
2.1.1 Navadna ajda .....	5
2.1.2 Tatarska ajda .....	6
2.1.3 Oksidativni stres in sekundarni metaboliti rastlin .....	7
2.1.3.1 Sekundarni metaboliti navadne in tatarske ajde .....	8
2.1.4 Ajda kot akumulacijska rastlina .....	9
2.2 ENDOFITSKE GLIVE IN NJIHOVE INTERAKCIJE Z RASTLINAMI.....	11
2.2.1 Dejavniki, ki vplivajo na interakcije med glivami in rastlino .....	11
2.2.2 Interakcije med glivami in ajdo.....	13
2.3 BAKER, BAKROVI FUNGICIDI IN NANOTEHNOLOGIJA .....	14
2.3.1 Vrste in delovanje različnih bakrovih fungicidov .....	14
2.3.2 Mehanizem strupenosti bakra in odpornost nanj .....	16
2.3.3 Nanotehnologija in bakrovi nanodelci .....	17
2.4 INTERAKCIJE GLIV Z BAKROM IN BAKROVIMI NANODELCI .....	18
2.4.1 Biogena sinteza nanodelcev bakra, bakrovega oksida in bakrovega sulfida.....	20
2.5 INTERAKCIJE RASTLIN Z BAKROM IN BAKROVIMI NANODELCI ...	20

<b>2.5.1</b>	<b>Kopičenje nanodelcev v organizmih .....</b>	<b>22</b>
2.6	METODE ZA PREUČEVANJE STRUPENOSTI KOVIN.....	23
<b>2.6.1</b>	<b>Metode za preučevanje odziva rastlin in gliv na različne spojine .....</b>	<b>23</b>
<b>2.6.2</b>	<b>Rentgenska fluorescenčna spektroskopija (XRF).....</b>	<b>24</b>
<b>2.6.3</b>	<b>Protonsko inducirana emisija rentgenskih žarkov (<math>\mu</math>-PIXE).....</b>	<b>25</b>
<b>2.6.4</b>	<b>Laserska ablacijska masna spektroskopija z induktivno sklopljeno plazmo (LA-ICP-MS) .....</b>	<b>26</b>
<b>2.6.5</b>	<b>Rentgenska absorpcijska spektroskopija (XAS) .....</b>	<b>26</b>
<b>2.6.6</b>	<b>Elektronska difrakcija (ED) .....</b>	<b>27</b>
<b>2.6.7</b>	<b>Tekočinska kromatografija z visoko ločljivostjo (HPLC) .....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>ENDOFITSKE GLIVE SEMEN AJDE .....</b>	<b>29</b>
3.1	MATERIALI IN METODE .....	29
<b>3.1.1</b>	<b>Izolacija gliv iz semen ajde in testiranje vpliva teh gliv na kalitev semen in razvoj kalic.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Postopek izolacije gliv, pogostost kolonizacije semen in zastopanost glivnih rodov .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Morfološki opis in molekulska identifikacija gliv.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Zunajcelična encimska aktivnost gliv .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1.5</b>	<b>Preučevanje interakcij med glivami.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1.6</b>	<b>Vpliv gliv na kalitev semen in sekundarni metabolizem kalic.....</b>	<b>31</b>
3.1.6.1	Določanje vsebnosti sekundarnih metabolitov v kalicah ajde.....	32
<b>3.1.7</b>	<b>Statistična analiza podatkov .....</b>	<b>32</b>
3.2	REZULTATI .....	32
<b>3.2.1</b>	<b>Morfološki opis in identifikacija gliv .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Zastopanost glivnih rodov v semenih ajde .....</b>	<b>35</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Izvencelična encimska aktivnost gliv .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Medsebojne interakcije med glivami .....</b>	<b>39</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Vpliv gliv na kalitev semen in sekundarni metabolizem kalic.....</b>	<b>40</b>
3.3	RAZPRAVA.....	43
<b>3.3.1</b>	<b>Kolonizacija semen in prevlada gliv .....</b>	<b>44</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Ekstracelularna encimska aktivnost.....</b>	<b>45</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Rast gliv in njihove medsebojne interakcije.....</b>	<b>47</b>

3.3.4	Vpliv gliv na kalitev semen in razvoj kalic.....	48
3.3.5	Vpliv gliv na skupne fenolne spojine, flavonoide in tanine v kalicah .....	49
4	<b>INTERAKCIJE GLIV Z RAZLIČNIMI BAKROVIMI SPOJINAMI ...</b>	<b>51</b>
4.1	MATERIALI IN METODE .....	51
4.1.1	Karakterizacija bakrovih delcev .....	51
4.1.2	Zasnova poskusov s trdnimi in tekočimi gojišči .....	51
4.1.3	Luženje bakrovega iona v prisotnosti gliv.....	52
4.1.4	Razporeditev bakra po agarji plošči.....	52
4.1.5	Razporeditev bakra v glivnem miceliju.....	53
4.1.6	Vezavne oblike bakra v novonastalih bakrovih spojinah .....	53
4.1.7	Lipidna peroksidacija gliv ob prisotnosti različnih bakrovih spojin.....	54
4.1.8	Glivna sinteza sideroforov .....	54
4.1.9	Glivna sinteza zunajceličnih encimov ob prisotnosti različnih spojin.....	54
4.1.10	Glivna sinteza organskih kislin ob prisotnosti različnih spojin .....	55
4.1.11	Statistična analiza podatkov .....	55
4.2	REZULTATI .....	55
4.2.1	Karakterizacija bakrovih delcev .....	55
4.2.2	Biomasa glivnega micelija.....	57
4.2.3	Lipidna peroksidacija v glivnih micelijih.....	59
4.2.4	Izgled gliv na trdnem gojišču in razporeditev bakra vzdolž agarne plošče.....	60
4.2.5	Razporeditev bakra vzdolž prečnega prereza tretiranih micelijev.....	61
4.2.6	Glivna sinteza sideroforov .....	62
4.2.7	Sinteza in izločanje izvenceličnih encimov tretiranih gliv .....	64
4.2.8	Sinteza in izločanje organskih kislin tretiranih gliv .....	65
4.2.9	Vezavna oblika bakra in njegovo molekularno okolje.....	67
4.3	RAZPRAVA.....	68
4.3.1	Karakterizacija bakrovih delcev .....	68
4.3.2	Odziv glivnega micelija na tretiranje z bakrovimi spojinami .....	69
4.3.3	Vpliv različnih bakrovih spojin na izgled gliv in razporeditev bakra .....	70
4.3.4	Glivna sinteza sideroforov, zunajceličnih encimov in organskih kislin kot potencialni razstrupljevalni mehanizmi.....	72



<b>4.3.5</b>	<b>Vezavne oblike bakra v novonastali modri spojnini.....</b>	<b>74</b>
<b>5</b>	<b>ODZIV SEMEN IN RASTLIN NAVADNE TER TATARSKE AJDE NA PRISOTNOST RAZLIČNIH BAKROVIH SPOJIN .....</b>	<b>75</b>
5.1	MATERIALI IN METODE .....	75
<b>5.1.1</b>	<b>Kalitveni test.....</b>	<b>75</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Hidroponski poskus .....</b>	<b>75</b>
5.1.2.1	Določanje vsebnosti karotenoidov in klorofilov v rastlinah ajde .....	77
5.1.2.2	Lipidna peroksidacija v rastlinah ajde .....	77
5.1.2.3	Sinteza sekundarnih metabolitov v rastlinah ajde .....	77
5.1.2.4	Meritve mineralne sestave korenin in poganjkov ajde .....	77
5.1.2.5	Priprava mikronskih rezin in meritve $\mu$ -PIXE.....	78
<b>5.1.3</b>	<b>Statistična analiza podatkov .....</b>	<b>78</b>
5.2	REZULTATI .....	79
<b>5.2.1</b>	<b>Odziv semen in kalic v kalitvenem testu.....</b>	<b>79</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Odziv rastlin v hidroponskem poskusu .....</b>	<b>84</b>
5.3	RAZPRAVA.....	98
<b>5.3.1</b>	<b>Vpliv različnih bakrovih spojin na kalitev semen in razvoj kalic navadne in tatarske ajde .....</b>	<b>98</b>
<b>5.3.2</b>	<b>Vpliv različnih bakrovih spojin na rast in razvoj rastlin navadne in tatarske ajde, privzem in porazdelitev bakra ter nekaterih drugih esencialnih elementov .....</b>	<b>101</b>
<b>6</b>	<b>SKLEPI.....</b>	<b>107</b>
<b>7</b>	<b>POVZETEK .....</b>	<b>109</b>
7.1	POVZETEK.....	109
7.2	SUMMARY.....	111
<b>8</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>113</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

str.

<b>Pregl. 1:</b> Obseg polj posejanih z ajdo (Ha) v Sloveniji od leta 1992 do 2012.....	4
<b>Pregl. 2:</b> Pridelek ajde (tone) v Evropski uniji in Sloveniji od leta 2000 do 2012. ....	4
<b>Pregl. 3:</b> Nekaterne formulacijske oblike bakrovih pripravkov, ki jih uporabljamo pri varstvu rastlin pred boleznimi (Lešnik in sod., 2009). ....	15
<b>Pregl. 4:</b> Molekulska identifikacija izbranih glivnih izolatov iz semen navadne ajde. ....	33
<b>Pregl. 5:</b> Dejavniki, ki vplivajo na kolonizacijo semen, analizirani s faktorsko ANOVO. Predstavljene so statistične značilnosti izbranih dejavnikov in njihovih interakcij na glivno številčnost in raznolikost (p-vrednosti, statistično značilne so v krepkem). ....	37
<b>Pregl. 6:</b> Presevni testi glivne sinteze izvenceličnih encimov (povprečje $\pm$ SN; n=6). Različne črke (a-e) označujejo statistično značilne razlike med encimskimi aktivnostmi glivnih izolatov (Duncanov test, $p < 0,05$ ). ....	38
<b>Pregl. 7:</b> Pomen izločanja encimov glivnih izolatov in njihov učinek na kalitev semen in razvoj kalic ter dolžino koreničic (Studentov t-test; statistično značilni vplivi so v krepkem). ....	42
<b>Pregl. 8:</b> Glivna sinteza oksalne kisline in pH vrednosti gojišč. Podatki so predstavljeni kot povprečje $\pm$ SN (n=5), kjer različne črke (a-f) desno vrednosti predstavljajo statistično značilne razlike med tretmaji (Tukeyev test; $p < 0,05$ ). 66	66
<b>Pregl. 9:</b> Diskriminantne spremenljivke odziva semen in kalic a) navadne ajde in b) tatarske ajde na tretiranje z različnimi bakrovimi spojinami s postopno linearno diskriminantno analizo (9 spremenljivk, 24 skupin). Odebeljene črke in številke predstavljajo statistično značilen vpliv spremenljivk ( $p < 0,05$ ). ....	79
<b>Pregl. 10:</b> Vpliv dejavnikov vrste ajde, oblike Cu in koncentracije Cu ter njihovih interakcij na izmerjene parametre odziva semen in kalic navadne ter tatarske ajde. Rezultati so podani kot p-vrednosti (faktorska ANOVA), kjer odebeljene številke predstavljajo statistično značilen vpliv dejavnika na izbran parameter ( $p < 0,05$ ). ....	81
<b>Pregl. 11:</b> Diskriminantne spremenljivke odziva rastlin a) navadne ajde in b) tatarske ajde na hidroponsko tretiranje z različnimi bakrovimi spojinami s postopno linearno diskriminantno analizo (26 spremenljivk, 9 skupin). Odebeljene črke in številke predstavljajo statistično značilen vpliv spremenljivk ( $p < 0,05$ ). ....	86

- Pregl. 12:** Vpliv dejavnikov vrste ajde, oblike Cu ter njunih interakcij na a) rastne parametre, b) koncentracije elementov v koreninah in c) koncentracije elementov v poganjkih obeh ajd. Rezultati so podani kot p-vrednosti (faktorska ANOVA), kjer odebeljene številke predstavljajo statistično značilen vpliv dejavnika na izbran parameter ( $p < 0,05$ ). ..... 88
- Pregl. 13:** Vpliv dejavnikov vrste ajde, oblike Cu in koncentracije Cu v uporabljenih spojinah ter njihovih interakcij na a) vse rastne parametre, b) koncentracije elementov v koreninah in c) koncentracije elementov v poganjkih. Rezultati so podani kot p-vrednosti (faktorska ANOVA), kjer odebeljene številke predstavljajo statistično značilen vpliv dejavnika na izbran parameter ( $p < 0,05$ ). ..... 89
- Pregl. 14:** Koncentracije izbranih elementov ( $\mu\text{g g}^{-1}$  SM) v oblogah na površini korenin navadne ajde tretirane z MD CuO in ND CuO  $10 \text{ mg l}^{-1}$  ( $n=1$ ; SN=10 % v primeru lahkih elementov in SN=5-10 % v primeru težkih elementov)..... 96
- Pregl. 15:** Vpliv dejavnikov a) vrste ajde, tkiva in njunih interakcij na razporeditev Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu in Zn na prečnih prerezi navadne in tatarske ajde ter b) dejavnikov tretmaja, tkiva in njunih interakcij na razporeditev Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu in Zn na prečnih prerezi navadne ajde tretiranih z MD CuO, ND CuO in Cu soljo. Rezultati so podani kot p-vrednosti (faktorska ANOVA), kjer odebeljene številke predstavljajo statistično značilen vpliv dejavnika na izbran parameter ( $p < 0,05$ ). ..... 98

## KAZALO SLIK

	str.
<b>Sl. 1:</b> Cvetovi in semena navadne ajde <i>Fagopyrum esculentum</i> Moench (foto: Eva Kovačec).....	5
<b>Sl. 2:</b> Cvetovi in semena tatarske ajde <i>Fagopyrum tataricum</i> Gaertn. (foto: Eva Kovačec).....	7
<b>Sl. 3:</b> Filogenetsko drevo zaporedij izbranih glivnih izolatov s tipskimi sevi in sevi najbližjih ujemanj.....	34
<b>Sl. 4:</b> Hitrost rasti gliv (mm dan <sup>-1</sup> ) na ploščah PDA (povprečje ± SN; n=8). Različne črke (a-d) označujejo statistično značilne razlike med glivnimi izolati (Duncanov test, $p < 0,05$ ).....	35
<b>Sl. 5:</b> Raznolikost gliv in njihova dinamika v semenih ajde. Glive smo izolirali 0, 6 in 12 mesecev po žetvi pridelka iz semen navadne ajde (2012, 2013) in tatarske ajde (2012). Grafi prikazujejo deleže semen (%) koloniziranih z glivami (različne barve predstavljajo različne rodove, glej legendo) in tiste, ki niso bila kolonizirana (bela) (n=125).....	36
<b>Sl. 6:</b> Aktivnost sinteze zunajceličnih encimov med izbranimi glivami, prikazana z barvnim diagramom z dodanim drevesom podobnosti na osnovi analize grozdov. Predstavljeni podatki so Z-normalizirani in centrirani, beli kvadratki predstavljajo nižje in črni višje vrednosti (glej legendo).....	38
<b>Sl. 7:</b> Glivne medsebojnih interakcije v a) testu dvojnih kultur neposredne izpostavljenosti (vrednosti predstavljajo relativne površine gliv (%) glede na kontrolo, ki je površina izolata izpostavljenega drugemu miceliju enakega izolata) in v b) testu dvojnih kultur posredne izpostavljenosti hlapnim organskim spojinam gliv (vrednosti predstavljajo relativne površine gliv (%) glede na kontrolo, ki je površina izolata izpostavljenemu neinkuliranemu gojišču), prikazane z barvnima diagramoma z dodanim drevesom podobnosti na osnovi analize grozdov. Beli kvadratki predstavljajo spodbujeno rast glive in črni zavirano rast glive (glej legendo). Predstavljeni so odzivi gliv napisanih na dnu, na vpliv gliv napisanih na desni strani. ....	39
<b>Sl. 8:</b> Vpliv gliv na kalitev semen in razvoj kalic ter dolžino koreničice. Kalitev in razvoj kalic (leva os) so izražene glede na delež kontrole, pri dolžinah koreničic (črne pike; desna os) pa kot izmerjeni podatki (mm). Podatki so predstavljeni kot povprečje ± SN (razvoj kalic, n=20; dolžina koreničic, n=30). Različne črke pri normalnih kalicah (a-c) in dolžini koreničic (m-p), označujejo statistično značilne razlike med kalicami, vzgojenih v prisotnosti različnih gliv (Duncanov test, $p < 0,05$ ).....	41
<b>Sl. 9:</b> Vpliv gliv na sekundarni metabolizem kalic. Vsebnost fenolov, flavonoidov in taninov (% SM) v kalicah ajde (povprečje ± SN; n=7). Različne črke nad stolpci za fenole (a-d), flavonoide (m-p) in tanine (w-z) označujejo statistično značilne razlike med kalicami, vzgojenih v prisotnosti različnih gliv (Duncanov test, $p < 0,05$ ).....	42
<b>Sl. 10:</b> Aktivnost izločanja izvenceličnih encimov s stopnjo rasti gliv ter njihov vpliv na sekundarni metabolizem kalic ajde (fenoli, flavonoidi, tanini) med izbranimi glivami,	

- prikazane z barvnim diagramom z dodanim drevesom podobnosti na osnovi analize grozdov. Predstavljeni podatki so Z-normalizirani in centrirani, beli kvadrati predstavljajo nižje in črni višje vrednosti (glej legendo).....50
- Sl. 11:** Opis lastnosti delcev z a) fotografijami enakih zateht (100 mg) različnih bakrovih spojin (od leve proti desni MD CuO, ND CuO in ND Cu), z b) posnetki presečne elektronske mikroskopije MD CuO, ND CuO in ND Cu, ki razkrijejo velikost in obliko delcev, s pripisano izoelektrično točko (IET) in z c) vrednostmi luženja bakrovega iona v gojiščih (predstavljene kot odstotek celotnega Cu dodanega gojišču v obliki MD CuO, ND CuO in ND Cu), po 2 tednih rasti micelijev *A. alternata* in *B. cinerea* (povprečje ± SN; n=3). Različne črke zraven simbolov predstavljajo statistično značilne razlike (Tukeyev test;  $p < 0,05$ ).....56
- Sl. 12:** Biomasa glivnega micelija (% kontrole) izpostavljenih gliv *A. alternata* in *B. cinerea* različnim koncentracijam  $\text{Cu}^{2+}$  v gojišču (povprečje ± SN; n=3).....57
- Sl. 13:** Odziv gliv na tretiranje z bakrovimi spojinami s prikazom a) vsebnosti vode v micelijih in b) suhe biomase micelijev (povprečje ± SN; n=3), iz gojišč z dodatkom MD CuO, ND CuO, ND Cu in Cu soli v koncentracijah 1 % in 10 % določene vsebnosti Cu v drugih tretmajih, po 2 tednih rasti. Različne črke nad stolpci predstavljajo statistično značilne razlike med tretmaji (Tukeyev test;  $p < 0,05$ ).....58
- Sl. 14:** Lipidna peroksidacija v tretiranih micelijih *A. alternata* in *B. cinerea*. Podatki so predstavljeni kot vsebnost malondialdehida (MDA) v glivi (povprečje ± SN; n=4) iz gojišč z dodatkom MD CuO, ND CuO, ND Cu in Cu soli v koncentraciji 1 % določene vsebnosti Cu v ostalih tretmajih, po 2 tednih rasti. Različne črke nad stolpci predstavljajo statistično značilne razlike med tretmaji (Tukeyev test;  $p < 0,05$ ).....59
- Sl. 15:** Izgled gliv *A. alternata* in *B. cinerea* in razporeditev Cu vzdolž agarne plošč z *B. cinerea* z XRF. Fotografije smo posneli 12 tednov po inokulaciji plošč z različnimi bakrovimi spojinami, MD CuO, ND CuO, ND Cu in Cu sol, od zgoraj in od spodaj agarne plošč. Razporeditev Cu je predstavljena kot koncentracija Cu ( $\text{mg cm}^{-2}$ ) v razdaljah 0,5 cm od sredine inokulirane agarne plošče, črtkane črte prikazujejo meje med prozornim (P), modrim (M) in glivnim (G) delom.....60
- Sl. 16:** Izgled glivnih micelijev in razporeditev Cu vzdolž tretiranih micelijev. Predstavljene so vrednosti Cu (cps) vzdolž micelijev *A. alternata* in *B. cinerea*, ki so rasli v tekočih gojiščih brez dodanega bakra, z dodanimi Cu soljo (1 %), MD CuO, ND CuO in ND Cu, kjer črtkane črte označujejo mejo med starim (S) in mladim (M) delom glivnega micelija.....62
- Sl. 17:** Sinteza in izločanje sideroforov gliv *A. alternata* in *B. cinerea*, določena s CAS agarjem 2 dni po inokulaciji z a) micelijem *A. alternata* z rumenim obročem in b) micelijem *B. cinerea* z vijoličnim obročem ter z metodo prekrivajočega CAS agarja, 7 dni po inokulaciji z c) *A. alternata* in d) *B. cinerea*.....63

- Sl. 18:** Detekcija glivne sinteze sideroforov v tekočih gojiščih, v a) mikrotitrni plošči z različnimi tekočimi gojišči z dodanimi različnimi bakrovimi spojinami in CAS reagentom ter b) s prikazano obarvanostjo gojišča po dodatku CAS reagenta v epruveti (neinokulirano gojišče, kontrolno gojišče *A. alternata* in kontrolno gojišče *B. cinerea*).....63
- Sl. 19:** Sinteza in izločanje izvenceličnih encimov prikazana z barvnim diagramom z dodanim drevesom podobnosti na osnovi analize grozdov. Predstavljene so vrednosti vsebnosti encimov, glede na referenčno tabelo proizvajalca, v gojiščih z dodanimi različnimi bakrovimi spojinami (MD CuO, ND CuO, ND Cu, sol Cu) in inokuliranimi z micelijami *A. alternata* (A) in *B. cinerea* (B). Predstavljeni podatki so Z-normalizirani in centrirani, beli kvadrati predstavljajo nižje in črni višje vrednosti (glej legendo).....65
- Sl. 20:** Logaritmirane vrednosti vsebnosti organskih kislin v gojiščih z dodanimi različnimi bakrovimi spojinami (MD CuO, ND CuO, ND Cu, sol Cu) in inokuliranimi z micelijami *A. alternata* (A) in *B. cinerea* (B). .....66
- Sl. 21:** Analiza XAS spektrov z a) linearno kombinacijo XANES spektrov neznane modre spojine in izbranih spektrov različnih bakrovih spojin ter b) analizo EXAFS meritev modre spojine in primerjava s koordinacijo referenčne spojine Cu-oksalata.....67
- Sl. 22:** Topnost različnih bakrovih spojin v dH<sub>2</sub>O in oksalni kislini. Fotografije smo posneli 24 ur po reakciji, z leve proti desni: Cu sol, MD CuO, ND CuO in ND Cu v dH<sub>2</sub>O ter Cu sol, MD CuO, ND CuO in ND Cu v oksalni kislini. ....68
- Sl.23:** Zasnova poskusa gojenja ajde v hidroponiki. ....76
- Sl. 24:** Vpliv različnih bakrovih spojin na dolžino koreninčic tretiranih kalic ajde s pripadajočo efektivno koncentracijo (EK) za a) sol Cu in navadno ajdo, b) MD CuO in navadno ajdo, c) ND CuO in navadno ajdo, d) sol Cu in tatarsko ajdo, e) MD CuO in tatarsko ajdo in f) ND CuO in tatarsko ajdo. ....80
- Sl. 25:** Graf linearne diskriminantne analize za izmerjene parametre odziva (kalitev 1. dan, kalitev 8. dan, SvM, SM, fenoli, flavonoidi, tanini) semen in kalic a) navadne in b) tatarske ajde, tretiranih z različnimi bakrovimi spojinami (mikro-MD CuO, nano-ND CuO, sol-Cu sol).....82
- Sl. 26:** Grupiranje kalic kontrole in vseh bakrovih tretmajev na podlagi vseh izmerjenih rastlinskih parametrov odziva a) navadne ajde in b) tatarske ajde. Analizo smo opravili z Wardovo metodo. Obkroženi so tretmaji (mikro-MD CuO, nano-ND CuO, sol-Cu sol), ki se grupirajo v dve ločeni skupini.....83
- Sl. 27:** Suha masa (g) a) korenin in b) poganjkov tretiranih rastlin navadne in tatarske ajde z MD CuO in ND CuO v koncentracijah 1, 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> ter Cu soljo 0,1 in 1 mg l<sup>-1</sup> (povprečje ± SN; n=5). Različne črke nad stolpci predstavljajo statistično značilne razlike med tretmaji (Duncanov test;  $p < 0,05$ ). ....84

- Sl. 28:** Izmerjene koncentracije Cu ( $\log \text{ mg kg}^{-1} \text{ SM}$ ) v a) koreninah in b) poganjkih navadne in tatarske ajde tretiranih z MD CuO in ND CuO v koncentracijah 1, 10 in  $100 \text{ mg l}^{-1}$  ter Cu soljo  $0,1$  in  $1 \text{ mg l}^{-1}$  (povprečje  $\pm$  SN;  $n=5$ ). Različne črke nad stolpci predstavljajo statistično značilne razlike med tretmaji (Duncanov test;  $p<0,05$ ). .....85
- Sl. 29:** Lipidna peroksidacija v svežih poganjkih tretiranih rastlin. Podatki so predstavljeni kot vsebnosti malondialdehida (MDA) v poganjku (povprečje  $\pm$  SN;  $n=5$ ) tretiranih rastlin navadne in tatarske ajde z MD CuO in ND CuO v koncentracijah 1, 10 in  $100 \text{ mg l}^{-1}$  ter Cu soljo  $0,1$  in  $1 \text{ mg l}^{-1}$  relativno glede na kontrolo (%). Različne črke nad stolpci predstavljajo statistično značilne razlike med tretmaji (Tukeyev test;  $p<0,05$ ). .....87
- Sl. 30:** Graf linearne diskriminantne analize za izmerjene parametre odziva (SM korenin, SM poganjkov,  $kl_a$ ,  $kl_b$ ,  $kl_{ab}$ , karotenoidi, fenoli, flavonoidi, tanini, privezm elementov v korenine in poganjke za P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn) rastlin a) navadne in b) tatarske ajde, tretiranih z različnimi bakrovimi spojinami (mikro-MD CuO, nano-ND CuO, sol-Cu sol). .....90
- Sl. 31:** Graf linearne diskriminantne analize za rastne in fiziološke parametre odziva (SM korenin, SM poganjkov,  $kl_a$ ,  $kl_b$ ,  $kl_{ab}$ , karotenoidi, fenoli, flavonoidi, tanini) rastlin a) navadne in b) tatarske ajde, tretiranih z različnimi bakrovimi spojinami (mikro-MD CuO, nano-ND CuO, sol-Cu sol). .....91
- Sl. 32:** Graf linearne diskriminantne analize za privzem elementov v korenine (P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn) rastlin a) navadne in b) tatarske ajde, tretiranih z različnimi bakrovimi spojinami (mikro-MD CuO, nano-ND CuO, sol-Cu sol). .....92
- Sl. 33:** Graf linearne diskriminantne analize za privzem elementov v poganjke (P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn) rastlin a) navadne in b) tatarske ajde, tretiranih z različnimi bakrovimi spojinami (mikro-MD CuO, nano-ND CuO, sol-Cu sol). .....93
- Sl. 34:** Razporeditev izbranih elementov na prečnih prerezih z  $\mu$ -PIXE med tkivi ajde, prikazana z barvnim diagramom z dodanim drevesom podobnosti na osnovi analize grozdov. Izmerjene vrednosti v a) koreninah in b) listih rastline navadne (N) in tatarske (T) ajde tretiranih z MD in ND CuO  $10 \text{ mg l}^{-1}$  in Cu soljo  $1 \text{ mg l}^{-1}$ . Predstavljeni podatki so Z-normalizirani in centrirani, beli kvadrati predstavljajo nižje in črni višje vrednosti (glej legendo). .....94
- Sl. 35:** Graf linearne diskriminantne analize razporeditve elementov (Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn) v a) koreninah in b) listih rastlin navadne in tatarske ajde ter navadne ajde tretirane z različnimi bakrovimi spojinami (mikro-MD CuO, nano-ND CuO, sol-Cu sol). .....95
- Sl. 36:** Koncentracije Cu ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) v izbranih listnih tkivih ajde pomerjenih na liofiliziranih prečnih rezinah listov z metodo  $\mu$ -PIXE ( $n=1$ ). .....96

## KAZALO PRILOG

**PRILOGA A:** Rast izoliranih gliv na različnih gojiščih.

**PRILOGA B:** Rezultati faktorske ANOVE za pogostost izolacije gliv vseh rodov, gliv rodu *Epicoccum* sp., *Botrytis* sp. in *Alternaria* sp. iz semen navadne in tatarske ajde po 0, 6 in 12 mesecih skladiščenja. v letih pridelka 2012 in 2013.

**PRILOGA C:** Vremenski pogoji v preučevanih sezonah pridelka.

**PRILOGA D:** Glivne interakcije pri testih neposrednih dvojnih kultur.

**PRILOGA E:**

**PRILOGA E1:** Površine glivnega micelija ( $\text{mm}^2$ ) v neposrednih testih dvojnih kultur kot odziv na izpostavljenost miceliju drugega izolata (povprečje  $\pm$  SN; n=5).

**PRILOGA E2:** Površine glivnega micelija ( $\text{mm}^2$ ) v testih posrednih dvojnih kultur kot odziv na izpostavljenost hlapnim organskim spojinam (povprečje  $\pm$  SN; n=6).

**PRILOGA F:** Rezultati multivariatne regresijske analize vpliva aktivnosti sinteze encimov amilaze, polifenol oksidaze, celulaze in lipaze ter hitrosti rasti gliv na vsebnost fenolov in taninov v kalicah, ki so rasle ob prisotnosti različnih gliv. Statistično značilne vplive prikazujejo odebeljene črke.

**PRILOGA G:**

**PRILOGA G1:** Koncentrični krog ED, ki so rezultat sipanja elektronov na praškovnih vzorcih a) ND CuO in b) ND Cu.

**PRILOGA G2:** Primerjava meritev zeta-potenciala ND CuO in ND Cu.

**PRILOGA H:** Rezultati faktorske ANOVE vpliva vrste glive, oblike Cu in njune interakcije na luženje bakrovega iona, biomaso, vsebnost vode v miceliju, MDA koncentracije, sinteze oksalne kisline in pH gojišč v gojiščih z različnima glivama (*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*) in dodanimi različnimi bakrovimi spojinami (Cu sol, MD CuO, ND CuO in ND Cu).

**PRILOGA I:** Tabela rezultatov API ZYM<sup>®</sup> testa sinteze in izločanja 20 izvenceličnih encimov.

**PRILOGA J:** Rezultati meritev organskih kislin v vzorcih gojišč ( $\text{mg ml}^{-1}$ ), kjer so rasle glive pod različnimi pogoji. Z odebeljeno so označene vrednosti nad mejo detekcije in mejo kvantifikacije.

**PRILOGA K:** Najboljši parametri fita Cu K-roba EXAFS modela najbližjih koordinacijskih lupin okoli Cu atoma v standardu Cu-oksalata in neznani modri bakrovi spojini, ki jo naredi gliva *Botrytis cinerea* ko je izpostavljena ND CuO.

**PRILOGA L:**

**PRILOGA L1:** Izmerjenih podatki izbranih parametrov odziva semen in kalic navadne ajde v kalitvenem testu (povprečje  $\pm$  SN).

**PRILOGA L2:** Izmerjenih podatki izbranih parametrov odziva semen in kalic tatarske ajde v kalitvenem testu (povprečje  $\pm$  SN).



#### **PRILOGA M:**

**PRILOGA M1:** Diskriminantne spremenljivke odziva semen in kalic navadne ajde s postopno linearno diskriminantno analizo (9 spremenljivk, 24 skupin).

**PRILOGA M2:** Diskriminantne spremenljivke odziva semen in kalic tatarske ajde s postopno linearno diskriminantno analizo (9 spremenljivk, 24 skupin).

**PRILOGA N:** Ocenjene učinkovite koncentracije posameznih bakrovih spojin na dolžino korenčic tretiranih kalic a) navadne ajde in b) tatarske ajde.

**PRILOGA O:** Rezultati faktorske ANOVE vpliva vrste ajde, oblike Cu, koncentracije Cu in njihovih interakcij na kalitev semen 1. in 8. dan poskusa, svežo maso, suho maso, dolžino korenčice, fenole, flavonoide in tanine v kalicah navadne in tatarske ajde.

**PRILOGA P:** Rezultati linearne diskriminantne analize izmerjenih podatkov odziva (kalitev 1. dan, kalitev 8. dan, SvM, SM, dolžina korenčic, fenoli, flavonoidi, tanini) semen in kalic navadne in tatarske ajde v kalitvenem poskusu z dodajanjem različnih bakrovih spojin (MD CuO, ND CuO, Cu sol) v različnih koncentracijah.

#### **PRILOGA R:**

**PRILOGA R1:** Surovi podatki izmerjenih parametrov v hidroponskem poskusu za navadno ajdo (povprečje  $\pm$  SN).

**PRILOGA R2:** Surovi podatki izmerjenih parametrov v hidroponskem poskusu za tatarsko ajdo (povprečje  $\pm$  SN).

**PRILOGA R3:** Korelacije med vsemi merjenimi parametri v hidroponskem poskusu. Levo so vrednosti za navadno ajdo, desno pa za tatarsko ajdo.

#### **PRILOGA S:**

**PRILOGA S1:** Diskriminantne spremenljivke odziva rastlin navadne ajde s postopno diskriminantno analizo (26 spremenljivk, 9 skupin).

**PRILOGA S2:** Diskriminantne spremenljivke odziva rastlin tatarske ajde s postopno diskriminantno analizo (26 spremenljivk, 9 skupin).

#### **PRILOGA T:**

**PRILOGA T1:** Vrednosti parametrov linearne diskriminantne analize vseh izmerjenih podatkov odziva rastlin navadne in tatarske ajde v hidroponskem poskusu z dodajanjem različnih bakrovih spojin (MD CuO, ND CuO, Cu sol) v različnih koncentracijah.

**PRILOGA T2:** Vrednosti parametrov linearne diskriminantne analize fiziološkega in rastnega odziva rastlin navadne in tatarske ajde v hidroponskem poskusu z dodajanjem različnih bakrovih spojin (MD CuO, ND CuO, Cu sol) v različnih koncentracijah.

**PRILOGA T3:** Vrednosti parametrov linearne diskriminantne analize privzema elementov P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu in Zn v korenine rastlin navadne in tatarske ajde tretiranih v hidroponskem poskusu z dodajanjem različnih bakrovih spojin (MD CuO, ND CuO, Cu sol) v različnih koncentracijah.

**PRILOGA T4:** Vrednosti parametrov linearne diskriminantne analize privzema elementov P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu in Zn v korenine rastlin navadne in tatarske ajde tretiranih v hidroponskem

poskusu z dodajanjem različnih bakrovih spojin (MD CuO, ND CuO, Cu sol) v različnih koncentracijah.

#### **PRILOGA U:**

**PRILOGA U1:** Koncentracijske mape porazdelitve elementov P, S, K, Ca in Mg, Fe, Cu ter Zn pomerjenih na liofiliziranih prečnih rezinah korenin netretirane tatarske ajde in navadne ajde ter navadne ajde tretirane z MD CuO 10 mg l<sup>-1</sup>, ND CuO 10 mg l<sup>-1</sup> in Cu soljo 1 mg l<sup>-1</sup> z metodo μ-PIXE.

**PRILOGA U2:** Koncentracijske mape porazdelitve elementov P, S, K, Ca in Mg, Fe, Cu ter Zn pomerjenih na liofiliziranih prečnih rezinah listov netretirane tatarske ajde in navadne ajde ter navadne ajde tretirane z MD CuO 10 mg l<sup>-1</sup>, ND CuO 10 mg l<sup>-1</sup> in Cu soljo 1 mg l<sup>-1</sup> z metodo μ-PIXE.

#### **PRILOGA V:**

**PRILOGA V1:** Rezultati analize porazdelitvenih map μ-PIXE koncentracij elementov Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu in Zn (μg g<sup>-1</sup>) v posameznih tkivih prečnih rezin korenin rastlin navadne in tatarske ajde ter korenin rastlin navadne ajde tretiranih z različnimi bakrovimi spojinami (mikro-MD CuO 10 mg l<sup>-1</sup>, nano-ND CuO 10 mg l<sup>-1</sup> in sol-Cu sol 1 mg l<sup>-1</sup>).

**PRILOGA V2:** Rezultati analize porazdelitvenih map μ-PIXE koncentracij elementov Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu in Zn (μg g<sup>-1</sup>) v posameznih tkivih prečnih rezin listov rastlin navadne in tatarske ajde ter listov rastlin navadne ajde tretiranih z različnimi bakrovimi spojinami (mikro-MD CuO 10 mg l<sup>-1</sup>, nano-ND CuO 10 mg l<sup>-1</sup> in sol-Cu sol 1 mg l<sup>-1</sup>).

**PRILOGA Z:** Vrednosti parametrov linearne diskriminantne analize razporeditve elementov P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu in Zn v koreninah in listih rastlin navadne in tatarske ajde ter navadne ajde tretirane z različnimi bakrovimi spojinami (MD CuO, ND CuO, Cu sol).

#### **PRILOGA AB:**

**PRILOGA AB1:** Korelacije med izmerjenimi vsebnostmi elementov z μ-PIXE v posameznih tkivih prečnih prereзов kontrolnih korenin in listov navadne ajde.

**PRILOGA AB2:** Korelacije med izmerjenimi vsebnostmi elementov z μ-PIXE v posameznih tkivih prečnih prereзов korenin in listov navadne ajde tretiranih z MD CuO 10 mg l<sup>-1</sup>.

**PRILOGA AB3:** Korelacije med izmerjenimi vsebnostmi elementov z μ-PIXE v posameznih tkivih prečnih prereзов korenin in listov navadne ajde tretiranih z ND CuO 10 mg l<sup>-1</sup>.

**PRILOGA AB4:** Korelacije med izmerjenimi vsebnostmi elementov z μ-PIXE v posameznih tkivih prečnih prereзов korenin in listov navadne ajde tretiranih s Cu soljo 1 mg l<sup>-1</sup>.

**PRILOGA AB5:** Korelacije med izmerjenimi vsebnostmi elementov z μ-PIXE v posameznih tkivih prečnih prereзов kontrolnih korenin in listov tatarske ajde.

#### **PRILOGA AC:**

**PRILOGA AC1:** Rezultati faktorске ANOVE vpliva vrste ajde, tkiva in njune interakcije na razporeditev Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu in Zn na prečnih prerezih korenin in listov navadne in tatarske ajde.

**PRILOGA AC2:** Rezultati faktorске ANOVE vpliva tretmaja, tkiva in njune interakcije na razporeditev Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu in Zn na prečnih prerezih korenin in listov navadne ajde tretiranih z MD CuO, ND CuO in Cu soljo.

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Ag	srebro
Al	aluminij
AM	arbuskularna mikoriza/-ni
ANOVA	analiza variance
Ca, Ca <sup>2+</sup>	kalcij, kalcijev ion
CAS	krom azurol sulfonat (angl. <i>crome azurol sulphonate</i> )
Cu, Cu <sup>2+</sup>	baker, bakrov ion
CuO	bakrov (II) oksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DSE	temno-septirani endofit/-i (angl. <i>dark-septate endophyte</i> )
ED	elektronska difrakcija
EDX	energijsko-disperzijska spektroskopija (angl. <i>energy dispersive spectroscopy</i> )
EK	efektivna koncentracija
EXAFS	podaljšana fina struktura rentgenskih absorpcijskih robov (angl. <i>extended X-ray absorption fine structure</i> )
Fe	železo
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. <i>high performance liquid chromatography</i> )
IET	izoelektrična točka
ITS	regija notranjih distančnikov DNK (angl. <i>internal transcribed spacer</i> )
IJS	Inštitut Jožef Stefan
K, K <sup>+</sup>	kalij, kalijev ion
KI	Kemijski inštitut
kl <sub>a</sub>	klorofil a
kl <sub>b</sub>	klorofil b
kl <sub>ab</sub>	vsota klorofilov a in b
LA-ICP-MS	laserska ablacijska masna spektroskopija z induktivno sklopljeno plazmo (angl. <i>laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry</i> )
LDA	linearna diskriminantna analiza (angl. <i>linear discriminant analysis</i> )

MD	mikrodelci
MDA	malondialdehid
Mg	magnezij
$\mu$ -PIXE	protonsko inducirana emisija rentgenskih žarkov z visokoenergijskim fokusiranim žarkom (angl. <i>particle induced micro-X-ray fluorescence</i> )
Mn	mangan
MNM	Melin-Norkrans gojišče (angl. <i>Melin-Norkrans media</i> )
ND	nanodelci
P	fosfor
ppm	število delcev na milijon (angl. <i>parts per million</i> )
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i> )
ROS	reaktivne kisikove spojine (angl. <i>reactive oxidative species</i> )
S	žveplo
SE	standardna napaka (angl. <i>standard error</i> )
SM	suha biomasa
SN	standardna napaka
SR	sinhrotronski/-a
SvM	sveža biomasa
TEM	presevna elektronska mikroskopija (angl. <i>transmission electron microscopy</i> )
XANES	bližnja struktura rentgenskih absorpcijskih robov (angl. <i>X-ray absorption near-edge structure</i> )
XAS	rentgenska absorpcijska spektroskopija (angl. <i>X-ray absorption spectroscopy</i> )
XRF	rentgenska fluorescenčna spektrometrija (angl. <i>X-ray fluorescence spectrometry</i> )
Zn	cink

## 1 UVOD

Tako v ajdi kot tudi v večini drugih kopenskih rastlinah najdemo glivne endofite, ki kolonizirajo notranja tkiva gostitelja, od korenin, listov, stebel do semen. Endofiti imajo šibek pozitiven ali celo negativen vpliv na rastlino, a ne povzročajo vidnih poškodb tkiv gostiteljske rastline (Brundrett, 2006). Različni glivni endofiti lahko vplivajo na rast rastlin, vključno s stopnjo kalitve, povečanjem biomase, razvojem semen ter vplivom na sekundarni metabolizem rastline (Khan in sod., 2012). Vključujejo se v obrambo gostiteljske rastline pred patogeni (virusi, mikrobi) in herbivori ali/in jim pomagajo preživeti abiotске stresne dejavnike, kot sta suša in vročina, zaradi česar so povezave med rastlino in glivo zanimive za izboljšave poljščin (Gao in sod., 2010).

Kljub dokazani prisotnosti glivnih endofitov v tkivih ajde, so raziskave, ki bi vključevale ajdo in njene endofitske glive izjemno redke. Korenine navadne in tatarske ajde lahko kolonizirajo glive taksonomskih skupin *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Glomeromycota* in *Chytridiomycota*, ki vključujejo predstavnike tako arbuskularno mikoriznih (AM) gliv kot tudi temno septiranih endofitov (DSE) (Likar in sod., 2008; Regvar in sod., 2012). Mikrobna inokulacija semen tatarske ajde vpliva na njeno rast in vsebnost flavonoidov (Tao in sod., 2004), vpliv glivnih endofitov iz semen na rast in razvoj ajde pa je še neraziskan. Prisotnost endofitskih gliv v semenih in njihova ekološka pomembnost nista vprašljivi, saj se take glive lahko razširjajo s svojim gostiteljem in imajo tako edinstvene pogoje za razvoj v kalicah (Ganley in Newcombe, 2006).

Zaradi vnosa bakrovih spojin v agrikulturne ekosisteme, je pričakovati, da so se in se bodo interakcije organizmov z njimi povečale. Kljub dejstvu, da je baker (Cu) esencialen mikroelement, ki je nujen za preživetje vseh organizmov, je v večjih količinah strupen (Adriano, 2001). Bakrove pripravke, ki temeljijo na več kot 40 različnih bakrovih spojinah, že desetletja uporabljajo za zatiranje glivnih in bakterijskih bolezni rastlin v kmetijstvu ter zaščiti lesa. Veljajo tudi za tradicionalno prakso v ekološkem kmetijstvu. Značilnost predvsem starejših fungicidov je bila, da nanosena količina ni bila biološko izkoriščena, zato je višek Cu predstavljal le nepotrebno onesnažilo okolja (Lešnik in sod., 2009).

Raznovrstni bakrovi pripravki delujejo zatiralno na organizme tako, da prosti bakrovi ioni ( $\text{Cu}^{2+}$ ) v vodotopni obliki preko oksidacije funkcionalnih skupin v notranjosti celice blokirajo ali deaktivirajo delovanje encimov, zasedejo vezavna mesta drugih ionov in/ali negativno vplivajo na prepustnost membrane celic (Yruela, 2005). Biološki sistemi so razvili mehanizme, ki omogočajo zmanjševanje števila prostih  $\text{Cu}^{2+}$ , bodisi z omejevanjem privzema, bodisi z znotrajcelično imobilizacijo. Toleranca gliv na Cu je povezana s sintezo stabilnih, neškodljivih kompleksov. Pri rastlinah že minimalno povečana koncentracija prostih  $\text{Cu}^{2+}$  povzroči motnje v njihovi homeostazi in metabolizmu, od dihanja in fotosinteze do sinteze prostih radikalov in s tem povezanega oksidativnega stresa.

Na drugi strani pa se je med leti 2005 in 2010 se je število izdelkov nanotehnologije povečalo za 18-krat (Judy in sod., 2011). Produkti nanotehnologije so atomski ali

molekulski agregati, ki vsaj v eni dimenziji merijo od 1 do 100 nm. Zaradi majhnosti ter strukturnih in površinskih karakteristik so njihove fizikalno-kemijske lastnosti drugačne kot lastnosti večjih delcev enakega materiala, kar ponuja nove razsežnosti uporabe (Stampoulis in sod., 2009). Dokazano je bilo, da so rastline sposobne privzema nanodelcev (ND) ter njihovega kopičenja v svojih organih, od korenin, stebela, listov do semen. Tako so ND sposobni prenosa preko prehranjevalne verige iz nižjih trofičnih nivojev na višje, kar posledično predstavlja grožnjo tudi človeku (Judy in sod., 2011). Ena izmed vej nanotehnologije se z uporabo inženirskih ND v kmetijstvu trudi zamenjati strupena fitofarmaceutvska in fungicidna sredstva, zmanjšati izgube hranil pri gnojenju in povečati pridelek preko upravljanja z optimalno količino hranil (Gogos in sod., 2012; Altomani Neves Dias in sod., 2015). Pomemben pristop na tem področju je tretiranje semen z različnimi oblogami ND (Adhikari in sod., 2015). Poleg omenjenega obstaja tudi potreba po odkrivanju novih strategij za razvoj protimikrobnih učinkovin s širokim sprektrom delovanja, pri čemer imajo produkti nanotehnologije velik potencial (Ingle in sod., 2014).

Za raziskavo smo izbrali ajdo, kot pomembno zdravilno in prehrambno rastlino, ki je bila do sedaj vključena v le dve študiji strupenosti ND (Lee in sod., 2013b; Lee in sod., 2013c). Različne organske kisline in fenolne spojine, ki kelirajo dvovalentne kovinske ione prehodnih kovin, so odgovorne, da ajda kopiči Al in Pb v poganjkih ter preživi visoke koncentracije Cu ter Zn (Ma in Hiradate, 2000; Tani in Barrington, 2006). Prav zaradi visokih vsebnosti različnih sekundarnih metabolitov, ki so zaslužni za vse večje povpraševanje po ajdi in povečevanje obdelovalnih površin posejanih z ajdo, sta navadna in tatarska ajda primerni rastlini za raziskave vplivov različnih spojin na sekundarni metabolizem rastlin.

Širša javnost se vedno bolj zaveda nevarnosti nanotehnologije in nepoznavanja mehanizma delovanja njenih produktov, zato so nanotoksikološke raziskave na prehrabnih rastlinah pomembne s stališča presoje potencialnega nenamernega vnosa ND v prehranske verige. Na drugi strani je strupenost ND na določenih taksonomskih skupinah, npr. glivah, vodnih makrofitih, plenilcih in kopenskih herbivorih slabo raziskana, zato je potrebna njihova vključitev v nanotoksikološke študije (Berhardt in sod., 2010). Obenem je boljše razumevanje mehanizmov, ki omogočajo tolerantnim organizmom preživetje v prisotnosti visokih koncentracij kovin, tako velikega okoljskega kot gospodarskega pomena (Al Alabboud in Alawlaqi, 2011).

## 1.1 NAMEN DELA

Namen doktorskega dela je bil podrobneje preučiti dinamiko glivne kolonizacije semen navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench) in tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) tekom skladiščenja. Testirali smo medsebojne interakcije med izoliranimi glivami, tako posredne kot neposredne, ter njihov vpliv na kalitev semen navadne ajde, rast in razvoj kalic ter vsebnost sekundarnih metabolitov v kalicah ajde. Po naših informacijah je to prva raziskava na področju preučevanja mikoflore semen tatarske ajde.

Raziskali smo vpliv različnih bakrovih spojin na rast izbranih izoliranih gliv iz semen ajde in poskusili razložiti prisotne tolerančne mehanizme glive. Pri tem smo si pomagali z natančnim opisom gliv, od sinteze zunajceličnih encimov, organskih kislin do sideroforov ter z določitvijo prostorske porazdelitve Cu in analizo vezavnih oblik Cu v glivnih micelijih. Za lažje predvidevanje interakcij med delci in glivami, smo bakrovim delcem določili izoelektrično točko, velikost delcev, obliko delcev in stopnjo luženja Cu<sup>2+</sup> v gojiščih z glivami.

V kalitvenih testih in hidroponskih poskusih interakcij različnih bakrovih spojin s semeni in rastlinami navadne in tatarske ajde smo želeli preučiti možen vnos Cu v rastline ter določiti glavni dejavnik strupenosti delcev, kot tudi vpliv bakrovih delcev na rast, razvoj in ionomiko rastlin ter ugotoviti, kateri izmerjen rastlinski parameter je najboljši pokazatelj strupenosti testiranih spojin. Obenem smo ovrednotili vpliv izbranih bakrovih spojin na rastlinski sekundarni metabolizem, t.j. vsebnost skupnih fenolov, flavonoidov in taninov. Ker je ajda prehrabna rastlina in funkcionalno živilo, ima naša raziskava tudi potencialno pomemben družbeno-ekonomski vpliv.

## 1.2 RAZISKOVALNE HIPOTEZE

- Seme navadne in tatarske ajde bo kolonizirano z različnimi vrstami endofitskih gliv, katerih sestava in pogostost se bo tekom skladiščenja spreminjala.
- Glivni izolati se bodo razlikovali v učinkih na kalitev semen in razvoj kalic navadne ajde.
- Učinki bakrovih spojin na rast glivnih izolatov bodo pogojeni z obliko bakrove spojine.
- Odziv gliv na tretiranje z bakrovimi spojinami bo vrstno specifičen.
- Učinki bakrovih spojin na kalitev semen in razvoj kalic navadne in tatarske ajde bodo pogojeni z obliko bakrove spojine in vrsto ajde.
- Fiziološki odziv rastlin ajde, vsebnost sekundarnih metabolitov in privzem Cu bodo pogojeni z obliko bakrove spojine in njeno koncentracijo.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 AJDA IN NJEN SEKUNDARNI METABOLIZEM

Ajda je dvokaličnica, ki spada v družino dresnovk (*Polygonaceae*), ki obsega okoli 1000 vrst. Rod *Fagopyrum* šteje 19 vrst, od katerih je večina divjih in le 2 kultivirani – navadna ajda in tatarska ajda. Ajdo opisujejo kot psevdožito, saj za razliko od pravih žit ni enokaličnica in ne spada v družino trav. Kljub tej botanični razliki pa jo pogosto v kmetijstvu in trgovini uvrščamo skupaj z žiti v isto skupino, saj jo pridelujemo na podoben način kot žita. Tudi uporaba zrn ajde je podobna krušnim žitom, in sicer jo meljemo, da dobimo moko. V prehrani se pogosto uporablja kot kaša ali ajdove testenine, iz ajde lahko pridelujemo ajdin cvetlični med in zelen ajdin čaj (Bonafaccia in Fabjan, 2003; Bonafaccia in sod., 2003). Zadnje čase na mednarodnem tržišču posebej izstopajo kalčki oz. mlade rastlinice, ki se zaradi visoke vsebnosti različnih rastlinskih produktov, med drugim rutina in proteinov (Li in Zhang, 2001; Chen in sod., 2008), uporabljajo kot prehranski dodatek z medicinsko vrednostjo vsepovsod po svetu (Kreft in sod., 2006; Kim in sod., 2008). Poleg tega so izdelki iz ajde znani kot vir elementov v sledih in prehranskih vlaknin. Med drugim je ajda varno živilo za bolnike s celiakijo (Bonafaccia in Fabjan, 2003; Bonafaccia in sod., 2003).

Ajda na prejšnje posevke ni občutljiva, raste na revnih tleh, ne potrebuje sredstev za gnojenje, a prevelike zaloge dušika v tleh zanjo niso primerne. Je skromna rastlina in zaradi mikorize s simbiotskimi glivami uspešneje črpa mineralne snovi iz tal kot večina drugih poljščin (Kreft, 1995). Med kmetijskimi pridelovalci je priljubljena tudi zaradi zaviranja rasti plevela. Ostanki ajde povzročijo spremembe v dinamiki dušika, kar je vzrok za zmanjšano rast plevelov, čeprav je učinkovitost zatiranja odvisna tudi od vrste plevela (Kumar in sod., 2008).

Države, ki danes prevladujejo v pridelovanju ajde so Rusija, Ukrajina, Poljska, Belorusija, Hrvaška, Slovenija, Avstrija, Danska in Francija ter v manjši meri tudi druge (Kreft, 1995). V zadnjih 20 letih se je posevek ajde v Sloveniji od leta 1992 do 2012 štirikratno povečal (**Preglednica 1**) (FAOSTAT, 2015). Prav tako se iz leta v leto povečuje skupen pridelek ajde v Evropski uniji in Sloveniji od leta 2000 do danes (**Preglednica 2**) (FAOSTAT, 2015).

**Preglednica 1:** Obseg polj posejanih z ajdo (Ha) v Sloveniji od leta 1992 do 2012.

**Table 1:** Field areas (Ha) cultivated with buckwheat in Slovenia from 1992 to 2012.

	1992	1994	1996	1998	2000	2002	2004	2006	2008	2010	2012
Slovenija	483	720	542	424	632	1169	578	547	761	1198	1676

**Preglednica 2:** Pridelek ajde (tone) v Evropski uniji in Sloveniji od leta 2000 do 2012.

**Table 2:** Crop yield (tons) in Europe union and Slovenija from 1992 to 2012.

	2000	2002	2004	2006	2008	2010	2012
Evropska unija	136259	144342	229607	159753	198262	246343	242336
Slovenija	683	1264	244	497	733	1370	1340



Ajda je med drugim uvrščena med najbolj ogrožene rastlinske vrste, za katere je IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) leta 1993 (danes je to Bioversity International) predlagal, da se jo obravnava v skupini rastlin, ki imajo odločilno prednost pri zbiranju in hranjenju (IPGRI Annual Report, 1993, cit. po Luthar, 2012).

Pri nas poznamo in sejemo dve vrsti ajde, navadno ajdo (*Fagopyrum esculentum* Moench) in tatarsko ali zeleno ajdo (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.).

### 2.1.1 Navadna ajda

Navadna ajda (*Fagopyrum esculentum* Moench) izvira iz province Junan na jugozahodu Kitajske, od koder se je razširila na jugu preko Butana, Nepala in Indije do Pakistana, na severu pa preko severne Kitajske, Sibirije, Rusije in Ukrajine v Evropo med 14. in 15. stoletjem. Leta 1426 je bila prvič omenjena v Sloveniji (Kreft, 1995).



**Slika 1:** Cvetovi in semena navadne ajde *Fagopyrum esculentum* Moench (foto: Eva Kovačec).

**Figure 1:** The blossoms and seeds of common buckwheat *Fagopyrum esculentum* Moench (photo: Eva Kovačec).

Navadna ajda je enoletna rastlina, ki lahko zraste od 120 do 150 cm v višino. V skromnih razmerah njena višina doseže le okoli 30 cm, v hribovitih legah pa do 70 cm. Steblo ajde je pokončno in votlo, razvejano ali nerazvejano, kiselkastega okusa zaradi velike vsebnosti oksalne kisline ter pogosto rdečkasto obarvano, zlasti na osončeni strani stebel. Glavna korenina je sorazmerno plitva, s številnimi stranskimi koreninami pa skupaj predstavlja le 3 do 4 % mase celotne rastline. Listi so srčasto puščičasti, spodnji pecljati, zgornji pa sedeči. Cvetno odevalo je zeleno, cvetni listi so majhni, dolgi 2 do 3 mm, sorazmerno ozki, cvetovi so enakovratni in na kratkih pecljih tvorijo sestavljena socvetja belih ali rožnatih barv (**Slika 1**). Je tujeprašna rastlina z samoinkompatibilnim pelodom (Kreft, 1995; Campbell, 1997). Za opraševanje navadne ajde so zelo pomembne žuželke, še posebej čebele, saj je bilo dokazano, da s postavitvijo panjev v bližini cvetočih polj ajde lahko povečamo pridelek (Kreft, 1995). Seme navadne ajde je trirobo, ploskve so ravne, rahlo zaokrožene in gladke. Če je seme dobro napolnjeno, so stranice semena izbočene, v nasprotnem primeru pa so ravne ali celo vbočene (**Slika 1**). Po barvi lahko ločimo semena

od črnih, temno in svetlo rjavih, do sivih s pegami, srebrnkasto sivih in svetlejših sivih (Kreft, 1995).

### 2.1.2 Tatarska ajda

Tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) raste v gorovju jugozahodne Kitajske (Sichuan), severni Indiji, Butanu in Nepal. Pred 30 leti je bilo možno tatarsko ajdo najti kot poljščino v nekaterih predelih Slovenije, in sicer na Gorenjskem, Dolenjskem in Zgornjesavinjski dolini, danes pa jo je zamenjala navadna ajda, in lahko tatarsko najdemo samo kot plevel v navadni ajdi (Kreft, 1995). V Sloveniji jo danes ponovno sejejo le na Dolenjskem, kjer se s pridelavo njene moke in kaše ukvarjajo na mlinu Rangus.

Tatarska ajda imenovana tudi zelena ali grenka ajda je zelo podobna navadni ajdi, le da se običajno oplodi sama. Je prav tako enoletnica, ki zraste do 1 m visoko in je nekoliko bolj odporna na poleganje kot navadna ajda (Kreft, 1995). Stebla so brazdasta, razvejana ali nerazvejana, poraščena z dlačicami. Listi tatarske ajde so pogosto širši kot dolgi, stebela in listi pa bolj zeleni kot pri navadni ajdi. Tudi socvetja so bolj zelenkasta do rahlo rumenkasta in tvorijo gosta socvetja z dvospolnimi cvetovi, ki se samooprašujejo in so klejstogamni, kar pomeni, da se oprašijo v zaprtem cvetu. Semena tatarske ajde so nekoliko manjša, svetlorjava do rjavosiva ali nekoliko zelenkasta (**Slika 2**). Oblika semen je triroba, robovi so zaokroženi, nekoliko oblasti, površine semen niso ravne, temveč motne in hrapave (**Slika 2**). Tatarska ajda je bolj kot navadna odporna proti vremenskim nepravilnostim, posebno proti mrazu, zaradi česar je primerna za gojenje predvsem v višje ležečih pokrajinah (Kreft, 1995).

Zrnje tatarske ajde vsebuje proteine z visoko biološko vrednostjo in uravnoveženimi aminokislinami, ima relativno veliko surovih vlaken in vitaminov B1, B2 in B6 in vsebuje več rutina kot navadna ajda (Bonafaccia in Fabjan, 2003; Fabjan in sod., 2003). Rezultati kažejo, da 50 g otrobov tatarske ajde pokrije polovico priporočenega dnevnega vnosa cinka in kroma ter le 5 % priporočenega dnevnega vnosa selena (Bonafaccia in sod., 2003). Raziskave so pokazale, da luščine tatarske ajde vsebujejo več tiamina, riboflavina in pirodoksina v primerjavi z navadno ajdo (Bonafaccia in Fabjan, 2003). Prav tako tatarsko ajdo preizkušajo v razne terapevtske namene, saj naj bi po navedkih priročnikov kitajske medicine ugodno vplivala na sluh in vid, bolečine v trebuhu, zniževanje sladkorja v krvi, krvavenje iz dlesni in prav zaradi tega na trgu dosega višje cene (Campbell, 1997).

Ker tatarska ajda obrodi tudi do 3x več in je samoprašna rastlina, je deležna mnogih raziskav k izboljšanju vrste navadne ajde, na katero bi prenesli gen za samooploditev. Pri tatarski ajdi pa bi s križanjem z navadno ajdo lahko odpravili grenčino in težjo luščljivost semen (Campbell, 1997).



**Slika 2:** Cvetovi in semena tatarske ajde *Fagopyrum tataricum* Gaertn. (foto: Eva Kovačec).

**Figure 2:** The blossoms and seeds of Tartary buckwheat *Fagopyrum tataricum* Gaertn. (photo: Eva Kovačec).

### 2.1.3 Oksidativni stres in sekundarni metaboliti rastlin

Izraz sekundarni metabolit na nek način ni najboljši, saj brez razlikovanja pokriva zelo veliko nesorodnih spojin in jim dodeljuje sekundarno, manj pomembno vlogo. Danes vemo, da so mnogi sekundarni metaboliti ključne komponente aktivnih in učinkovitih obrambnih mehanizmov pred sevanjem, škodljivci, mikroorganizmi, predvsem pa oksidativnemu stresu. Rastlinam oksidativni stres lahko povzročijo stresni okoljski pogoji (prevelika osvetljenost, suša, vročina, mraz), UV sevanje, težke kovine, nanodelci (ND) ali mikroorganizmi, ki v stiku z organizmom lahko tvorijo reaktivne kisikove spojine (ROS) (Navarro in sod., 2008).

Reaktivne kisikove spojine so prosti radikali oz. atomi, molekule ali ioni z vsaj enim prostim elektronom brez para in so visoko reaktivni. Poškodujejo lahko celične strukture, vključno z nukleinskimi kislinami, beljakovinami in membranami. Pri preprečevanju oksidativnega stresa imajo ključno vlogo sekundarni metaboliti, t.i. antioksidanti, ki preprečujejo oksidacijo biomolekul. Antioksidanti preprečujejo oksidativni stres z lovljenjem prostih radikalov, s keliranjem kovinskih ionov, z odstranjevanjem in/ali popravitvijo oksidativno poškodovanih biomolekul. Tako prosti radikali pridobijo manjkajoče elektrone in se pretvorijo v stabilno, neškodljivo stanje. V zdravem organizmu so antioksidanti in prosti radikali v stalnem ravnotežju, če pa se to ravnotežje poruši, dramatično upade rast in produktivnost rastline, katerima nemalokrat sledi smrt (Hegedüs in sod., 2001).

Reaktivne kisikove spojine pravzaprav nastajajo v običajnih procesih v rastlinah, v kloroplastih med fotosintezo, v mitohondrijih med dihanjem, v peroksisomih med fotorespiracijo... Če so te reakcije dobro nadzorovane, imajo ROS zelo pomembne funkcije v celici kot medcelične signalne molekule, imajo vlogo pri strukturi celične stene, vplivajo na senescenco, aktivirajo lahko obrambne odzive na biotski in abiotski stres ter pri napadu

patogenov omejuje širitev okužbe z ojačenjem celičnih sten ali z neposrednim delovanjem na patogene organizme (Dat in sod., 2000).

Večino sekundarnih metabolitov rastlin lahko razdelimo v razrede glede na strukturne podobnosti, biosintezne poti ali na vrste rastlin, ki jih sintetizirajo. Antioksidativni obrambni sistem rastline ločimo na dva tipa, neencimskega (npr. askorbat (vitamin C), reduciran glutation,  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), karotenoide, fenole, flavonoide...) in encimskega (npr. superoksid dismutaze, katalaze, peroksidaze, reduktaze...).

Fenolne spojine so neencimski antioksidanti, ki jih razdelimo na flavonoide, hidrolizirajoče tanine, lignine, stilbene in tripolene. Mnogi fenoli imajo strukturno vlogo v celični steni, številni nestrukturni fenoli pa prispevajo k odpornosti proti biološkemu razkroju, barvi cvetov, vonju in okusu. Njihova vloga je tudi kemijska obramba pred vdorom mikroorganizmov v rastlino in so tudi komercialno pomembni v farmaciji, prehrabni industriji in v hortikulturi (Luthar, 1992). Flavonoidi so pri vseh rastlinah najbolj razširjeni sekundarni metaboliti, saj predstavljajo predvsem obrambne in signalne molekule. Poleg tega privlačijo insekte za opraševanje, ščitijo rastline pred škodljivimi insekti, virusi in glivami, zavirajo delovanje različnih encimov ter vplivajo na oksidacijske in redukcijske procese v celici. Obenem ščitijo višje rastline pred škodljivim UV-B sevanjem (Kreft in sod., 2002). So pomembni signali tako pri simbiotskih kot patogenih interakcijah. Podrazred flavonoidov, tanini imajo v glavnem antibakterijske, antitumorske, antiviralne in antimutagene lastnosti, zaradi česar so zelo uporabljeni v različnih industrijskih panogah. Njihova značilnost je, da zavirajo encime ( $\alpha$ -amilazo) in imajo v večjih količinah negativen vpliv na prebavljivost aminokislin (Luthar, 1992).

#### 2.1.3.1 Sekundarni metaboliti navadne in tatarske ajde

Obe ajdi sta poznani kot rastlini z bogatim fenolnim metabolizmom in sta odlični vir različnih fenolnih spojin, med katerimi prevladujejo flavonoidi. Največja količina teh antioksidantov se nahaja v cvetovih, pecljih in steblih v času cvetenja in razvoja prvih semen. Največ je rutina, ki je tudi najpomembnejši antioksidant v ajdi in epikatehina (Kalinova in sod., 2006).

Kot vseh ostalih flavonoidov, je tudi rutina več v zgornjih in mlajših listih (10 %), kot pa v spodnjih, starejših (1,5 %). Poleg rutine so prisotni tudi drugi flavonoidi, a v precej nižjih koncentracijah: kvercitrin je v cvetovih do 0,35 %, v ostalih delih rastline pa od 0,005 % do 0,03 %, hiperozida približno 0,005 % do 0,04 %, kvercitrin pa manj kot 0,007 % (Hagels in sod., 1995). Tudi Kalinova in Vrchotova (2009) sta primerjali deleže flavonoidov (izokvercitrin, katehina in rutina) v posameznih delih ajde v času cvetenja in dokazali, da se med oblikovanjem in razvojem semena spremeni tako kvaliteta kot kvantiteta flavonoidnih komponent.

Semena navadne ajde vsebujejo od 13 do 36 mg rutina 100 g<sup>-1</sup> SM (Kim in sod., 2008). Semena tatarske ajde vsebujejo tudi kvercetin in kvercitrin, ki pa ju v navadni ajdi niso

zaznali (Fabjan in sod., 2003). Semena ajde vsebujejo od 0,5 % do 4,5 % taninov, kar je odvisno od genotipa, poliploidnosti, starosti plodu in ekoloških dejavnikov. Rastline enakega genotipa, ki so rasle v različnih okoljih, imajo pogosto različno vsebnost taninov (Luthar, 1992).

Kot vir hrane z antioksidanti so zelo primerni otrobi ajde in ajdova kaša. Do sedaj je bila izmerjena vsebnost rutina v moki tatarske ajde 11,67 mg g<sup>-1</sup>, kvercetina pa 0,63 mg g<sup>-1</sup>. Vsebnost rutina v kruhu narejenem iz 100 % moke tatarske ajde je bila 0,44 mg g<sup>-1</sup>, vsebnost kvercetina pa 5 mg g<sup>-1</sup> (Lukšič, 2013). Količina rutina izmerjenega v izvlečku iz kaše tatarske ajde znaša 187,60 mg g<sup>-1</sup> izvlečka, količina kvercetina pa 28,50 mg g<sup>-1</sup> izvlečka. V izvlečku kaše navadne ajde so bile vsebnosti manjše, rutina je bilo 2,93 mg g<sup>-1</sup> izvlečka in kvercetina 6,47 mg g<sup>-1</sup> izvlečka (Wei in sod., 2008).

Znanstveniki so dokazali, da UV-B sevanje spodbuja sintezo flavonoidov v ajdi, čeprav leto v visokih intenzitetah lahko škoduje rastlinam, kar se odraža v manjših koncentracijah flavonoidov (Kreft in sod., 2002). Flavonoidi naj bi tudi igrali ključno vlogo pri prepoznavanju glivnih partnerjev pri mikorizi, kot tudi bili vzrok specifičnosti glivnih patogenov (glej poglavje 2.2.2 Interakcije med glivami in ajdo).

#### **2.1.4 Ajda kot akumulacijska rastlina**

Onesnaženost prsti in vode s strupenimi kemikalijami je zelo resen okoljevarstven in kmetijski problem. Znanstveniki so ocenili, da je kar 60 % površin, kjer se gojijo rastline, ali v pomanjkanju z minerali ali bodisi v presežku (Cakmak, 2002). Posledično prihaja do biološke dostopnosti in kopičenja kovin in drugih strupenih kemikalij v kmetijske rastline, kar povzroča skrbi glede varne prehrane in potencialnega zdravstvenega tveganja. Rastline lahko absorbirajo samo biološko razpoložljive elemente, ki so določene z naravnim odlaganjem v tleh, pH vrednostjo tal (nižji kot je pH, bolj je kovina dostopna), vsebnostjo organske snovi in sposobnostjo kationske izmenjave (Marschner, 1995). Poleg teh dejavnikov je pomembna tudi sposobnost rastlin za privzem, transport in razporejanje elementov v rastlinskih organih (Waters in Sankaran, 2011).

Ena izmed učinkovitih, okoljsko neuničujočih in poceni metod za remediacijo prsti je fitoekstrakcija (Eapen in D'Souza, 2005). Navadna ajda je dobro poznana kot vrsta, ki kopiči aluminij (Al) in svinec (Pb) posebno v listih (Shen in sod., 2002). Poleg tega je poznana kot vrsta, ki je sposobna tolerirati visoke koncentracije bakra (Cu) in cinka (Zn) (Tani in Barrington, 2006). Zaradi kratkega razvojnega cikla in sposobnosti rasti v zahtevnih pogojih in kisljih tleh ima podoben fitoekstrakcijski potencial kot hiperakumulatorji (Tamura in sod., 2005). Obenem proizvede tudi relativno veliko biomase na zemlji revni s hranili (Nikolić in sod., 2010).

Raziskovalci so preučili in razložili privzem Al, in sicer ajda privzema le ionsko obliko Al, ki se po žilah prenaša v obliki Al-citrata (Ma in Hiradate, 2000). V koreninah so poleg Al-citrata našli tudi Al-okсалat (1:3) (Ma in Hiradate, 2000). Najverjetneje rastlina za prenos

uporablja citrat, saj je ta varnejši, ker oksalat s Ca postane netopen. Ko je oksalat prisoten v koreninah in listih, celice verjetno sekvestrirajo oksalat v vakuolo in s tem preprečijo nastanek netopnega produkta. V primeru, da pride do nastanka Al-oksalatnih komponent, se le-te sekvestrirajo v vakuoli ali odložijo kot kristali v apoplastu.

Navadna ajda, ki raste na onesnaženih tleh s Pb, akumulira Pb, saj so bile povprečne koncentracije Pb v listih  $8000 \text{ mg kg}^{-1}$  suhe mase (SM), v stebelu  $2000 \text{ mg kg}^{-1}$  SM in v koreninah  $3300 \text{ mg kg}^{-1}$  SM, obenem pa rastline niso kazale nikakršnih simptomov strupenosti. Ajda velja za hiperakumulatorsko rastlino Pb, saj lahko vsebuje nad  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$  SM Pb. Ob dodatku biorazgradljivega kelatorja je ajda vsebovala 5-krat višje koncentracije Pb v poganjkih kot v poganjkih brez dodanega kelatorja (Tamura in sod., 2005).

Antioksidativna aktivnost taninov v ajdi povzroči keliranje dvovalentnih kovinskih ionov prehodnih kovin (npr. Fe, Cu, Zn) in njihovo vezavo v stabilne komplekse, varne za celico. Izvleček taninov iz ajde je močnejše keliral dvovalentne ione Cu, Fe in Zn, v primerjavi z izvlečkom taninov iz otrobov ajde. Najbolj učinkoviti so bili pri keliranju Cu ionov, medtem ko manj pri Fe in Zn ionih (Karamać, 2007). Ta ugotovitev je povod za raziskave kopičenja Cu v ajdi.

V raziskavi Nikolić in sod. (2010) so v navadni ajdi preučili metalotionine, ki vežejo kovinske ione kot so  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  ali  $\text{Cd}^{2+}$  preko tiolnih skupin cisteinskih ostankov (Cobbett in Goldsbrough, 2002). Dokazali so, da Cu in Zn stimulirata ekspresijo genov za metalotionine v listih in potrdili varovalno vlogo metaloproteina FeMT3 pred težkimi kovinami v rastlinskih tkivih. Mnogi raziskovalci so pokazali, da imajo različni tipi metalotioninov različno in prekrivajočo funkcijo v vzdrževanju homeostaze esencialnih prehodnih kovin in zaščite proti znotrajceličnemu oksidativnemu stresu (Xue in sod., 2009; Lee in sod., 2004; Guo in sod., 2008).

Tudi Orožen in sod. (2012) so preučili vsebnosti elementov v semenih pšenice, navadne in tatarske ajde pridelanih na konvencionalen način. Najvišje koncentracije večine izmerjenih elementov so izmerili v zrnih pšenice, medtem ko so zrna tatarske ajde imela najvišje koncentracije Ca. Potrdili so, da bi z uživanjem  $100 \text{ g}$  navadne ajde lahko pokrili polovico dnevni potreb po Fe in Cu, medtem ko bi s  $100 \text{ g}$  tatarske ajde pokrili polovico dnevni potreb po Mn in  $40 \%$  priporočene vrednosti po Fe. Vendar je pri teh priporočilih potrebno upoštevati, da imajo elementi v semenih zmanjšano biološko dostopnost za absorpcijo zaradi vezave na fitinsko kislino in druge strukturne komponente semen (Hunt, 2003). Rezultati kažejo na potrebo po sistematičnem spremljanju vnosa neželenih kovin v zrnje izbranih rastlinskih vrst in večjo uporabnost navadne in tatarske ajde za vzgojo v tleh s konvencionalno pridelavo.

## 2.2 ENDOFITSKE GLIVE IN NJIHOVE INTERAKCIJE Z RASTLINAMI

Z izrazom endofit mislimo vse organizme, ki so kadarkoli v njihovem življenjskem ciklu prisotni v tkivu rastline in pri tem ne povzročajo znakov okužbe. V širšem pomenu so endofiti vsi organizmi, običajno govorimo o bakterijah in glivah, ki so prisotni v notranjosti rastline (gr. *endon* - notri, notranji; gr. *phyton* - rastlina) (Chanway, 1996). Če tkivo površinsko steriliziramo in iz njega izoliramo mikroorganizme, so ti izolati endofiti. Najdemo jih v različnih rastlinskih organih, od korenin, listov, stebel in semen. Brundrett (2006) navaja, da imajo endofiti šibek pozitiven ali celo negativen vpliv na rastlino, a ni nujno, da povzročajo vidne poškodbe tkiv gostiteljske rastline. Endofitizem je lahko le faza glive v njenem celotnem življenjskem ciklu, saj pojem lahko vključuje vse patogene v določenem stadiju razvoja (latentni, zgodnji stadiji virulentne okužbe...). Definicijo zato zožimo tako, da zajema vse organizme, ki s svojo okužbo dolgoročno gledano ne povzročajo škode (Schulz in Boyle, 2006). Endofiti so lahko specializirani na nivoju družine (Rodriguez in sod., 2009) ali pa so prisotni v številnih podnebnih ter na različnih rastiščnih in rastlinah. Najbolj raziskani so endofiti trav, saj sem uvrščamo večino pomembnih industrijskih rastlin.

Da obe vrsti lahko preživita in uspešno sobivata, je nujno potrebno ravnovesje antagonizmov med gostiteljem in endofitom, kar se je razvilo tekom evolucije. Če endofiti sintetizirajo določene metabolite (npr. encime), ki so nujni za okužbo, rastlina odgovori z obrambnimi reakcijami, ki se sprožijo v primeru okužbe s patogeni, vendar nobena od reakcij ne bo prevladala. V primeru, da pride do prevlade ene strani, ne govorimo več o interakciji brez simptomov, saj se lahko razvije okužba ali pa gliva odmre (Schulz in Boyle, 2006). Ravno zaradi tega razloga je včasih težko ločiti mejo med pozitivnimi in negativnimi učinki povezav med neko glivo in rastlino, saj lahko rahlo spremenjeni okoljski dejavniki porušijo njuno medsebojno ravnovesje (Junker in sod., 2012).

Pri rastlinah so prevladujoča skupina glivnih endofitov mikorizne glive, katere so prisotne pri kar 90 % rastlin na svetu. Pri skoraj vsaki od preučevanih rastlin so zasledili prisotnost endofitov v različnih organih rastline, od korenin, stebel, listov do semen. Raziskave o kolonizaciji semen so redke, kljub pomembnosti teh informacij, saj so lahko semena potencialni vir začetnega inokuluma za mnoge glivne bolezni (Kay in Owen, 1973; Rioux in sod., 2014).

### 2.2.1 Dejavniki, ki vplivajo na interakcije med glivami in rastlino

Odnosi med organizmi so zelo kompleksni. Nanje vplivajo mnogi dejavniki, tako notranji kot zunanji, tako biotski kot abiotski... V primeru simbioze je sobivanje obeh vrst posledica dobro nadzorovanega ravnovesja sinergizmov in antagonizmov med gostiteljem in endofitom. Zelo pomembno vlogo pri tem igrajo primarni in sekundarni metaboliti tako gliv kot rastlin. Študije metaboloma nam omogočajo vpogled v spremembe metaboloma rastline tekom glivne infekcije (Sardans in sod., 2011). Omenjeni mehanizmi medsebojnih interakcij so se razvili tekom evolucije in so natančno regulirani.

Flavonoidi imajo dokazano pomembno vlogo signalne verige pri interakciji med AM glivo in gostiteljem. Kar nekaj je podatkov o vplivu flavonoidov na rast hif, diferenciacijo hif in koreninsko kolonizacijo (Steinkellner in sod., 2007). Mnogi flavonoidi imajo specifične vplive glede na rod in vrsto AM glive (Scervino in sod., 2005). Ko so rastline kolonizirane z AM glivami, se vzorec flavonoidov drastično spremeni (Morandi, 1996, Vierheilig in sod., 1998, cit. po Steinkellner in sod., 2007). Znanstveniki so v mnogih študijah opisali pozitivni vpliv AM pri varovanju pred vdorom koreninskih patogenov pri različnih rastlinskih vrstah (Quilambo, 2003; Koide in Mosse, 2004).

Po drugi strani pa imajo flavonoidi vlogo pri rastlinskih interakcijah s patogenimi glivami. Spremembe v vsebnostih polifenolov, flavonoidov in taninov v kalicah imajo pomembno vlogo pri odpornosti negostiteljskih rastlin na nitaste glive. Med okužbo rastline povečajo količino fenolnih spojin za odstranjevanje ROS in/ali za povečanje vključitve in navzkrižnega povezovanja fenolnih spojin s celično steno (Bennett in Wallsgrove 1994; Hura in sod., 2014). Spremembe celične stene lahko delujejo kot fizična ovira za glive in/ali lahko motijo razgradnjo komponent celične stene, ki so pogosto vir hranil za glive (Elad in sod., 2007). V koreninskih eksudatih metuljnic se pojavijo različni flavonoidi, ki stimulirajo kaljivost makrokonidijev *Fusarium solani*, ki je znan patogen na grahu in fižolu, medtem ko nimajo vpliva na kalitev makrokonidijev glive *F. acuminatum*, patogena na travah ter *F. solani*, ki napada bučnice (Ruan in sod., 1995). Tudi ekstrakt flavonoidov ajde ima antibakterijsko delovanje, kar nakazuje na njihovo vlogo pri zaščiti rastlinic ajde med kalitvijo (Zhou in sod., 2011).

Salicilna, jasmonska in oksalna kislina veljajo za signalne molekule pri interakcijah med glivami in rastlino. Oksalna kislina v visoki koncentraciji povzroči programirano celično smrt z anionskim efluksom, ki je predpogoj za sintezo etilena in s tem omogoči napredovanje glivi. V nizki koncentraciji pa omogoča rastlini, da razvije odpornost proti glivi, npr. predhodno tretiranje kalic *Arabidopsis thaliana* z oksalno kislino lahko omogoči kalici odpornost na glivo *Sclerotium rolfsii* (Lehner in sod., 2008). Fitopatogene glive, kot so *Sclerotium rolfsii*, *Botrytis cinerea* in *Sclerotinia sclerotium* so sposobne okužiti mnoge rastline, med njimi tudi ajdo, čemur sledi velika izguba pridelka. Zgodnjo faza okužbe spremlja sinteza in kopičenje velikih količin oksalne kisline, ki se kaže kot glavni pokazatelj patogenosti (Dutton in Evans, 1996).

Zaradi zahtevnih okoljskih pogojev, kjer so sejali ajdo, je rastlina tekom evolucije razvila učinkovite mehanizme odpornosti proti patogenom in škodljivcem, kot npr. protiglivični proteini, ki verjetno sodelujejo na začetku okužbe in delujejo kot zaščitna prepreka pred razširitvijo patogena. Mednje sodijo encimski inhibitorji, ki so znani kot zaščita pred proteolitičnimi encimi žuželk in patogenih mikrobov. V večini študij so ugotovili, da so te vrste proteinov v semenih neučinkovite proti njihovim lastnim proteazam, medtem ko učinkovito inhibirajo proteolitične encime živalskega in mikrobnega izvora (Dunaevsky in sod., 2001).



## 2.2.2 Interakcije med glivami in ajdo

Na ajdo najbolj vplivajo patogene glive, saj so bolezni na ajdi močno povezane z ekonomijo in količino pridelka. Razširjanje patogena je odvisno od sorte, podnebnih pogojev ter agronomskih tehnik, npr. čas setve, gostota posevka, kolobarjenje, gnojenja...

Ajda je rastlina, ki je običajno odporna na mraz, bolezni in škodljivce. Med boleznimi ajde pri nas se je včasih pojavila ajdova peronospora (*Peronospora fagopyri*), vendar le na oslabeledih rastlinah (Kreft, 1995). Ajdo lahko okuži 30 različnih vrst gliv, pripadajoče 22 različnim rodom (Milevoj, 1989), med njimi so plesni, glive listne pegavosti, uvelosti, trohnobe, ožigi, sneti, rje,... Glive lahko okužijo ajdo od semena do žetve, najpogosteje pa so okuženi listi. Patogeni v prsti povzročijo gnilobo kalečih semen, odmiranje kalic, trohno korenin in stebel. Nekatere bolezni napadejo listje in socvetja, druge pa tvorijo značilne obloge micelijev na steblih ali listih. Nekatere glive povzročijo pegavost listov z različnimi oblikami in barvami peg, okuženi listi se posušijo in odpadejo (Milevoj, 1989).

Ajda je tudi znana kot mikorizna rastlina in prva sta o mikoriznosti ajde poročala Virant in Kajfež-Bogataj (1988) iz Biotehniške fakultete v Ljubljani. Mikrobna inokulacija semen ajde pred setvijo lahko ugodno vpliva na rast in razvoj rastlin ter poveča količino pridelka in vsebnost flavonoidov v rastlinah (Tao in sod., 2004). Leta 2008 so Likar in sod. (2008) prvič poročali o AM kolonizaciji tatarske ajde. Pri obeh vrstah so opazili tako DSE kot AM glive, ki so pripadale avtohtonim glivam iz polja. V raziskavi vpliva UV sevanja na flavonoide navadne in tatarske ajde so ugotovili, da se vsebnost flavonoidov v tatarski ajdi z UV sevanjem zviša, kar gre pripisati genetskim predizpozicijam tatarske ajde, ki jo sejejo na visokih nadmorskih višinah z več UV sevanja (Regvar in sod., 2012).

V različnih presejalnih študijah so poročali, da semena ajde lahko naseljuje do 36 različnih glivnih vrst, vključno z rodovi *Alternaria*, *Fusarium*, *Botrytis* in *Cladosporium* (Kalinova in sod., 2004; Mills in Wallace, 1972; Singh in sod., 1984). Mnoge glive, vključno *Alternaria* spp., *Botrytis* spp. in *Fusarium* spp. lahko sintetizirajo mikotoksine, ki so genotoksični in pri človeku povzročijo obolenje krvnih celic in/ali so povezani z rakom požiralnika (Logrieco in sod., 2009; Miller, 1995; Soriano in Dragacci, 2004). Poleg proizvodnje teh strupov in zunajceličnih encimov, lahko glive zavirajo kalitev semen, poškodujejo celične membrane in povečajo iztekanje celičnih vsebin iz semen, s čimer se zmanjša kakovost skladiščenih semen in s tem poveča negativni vpliv teh gliv na pridelavo rastlin (Halloin, 1983).

Obenem lahko najdemo encimske inhibitorje v celotni rastlini ajde, posebej v semenih. Večina inhibitorjev se veže na proteinaze in tako tvori stabilne komplekse z disulfidnimi in vodikovimi vezmi in hidrofobnimi interakcijami (Laskowski in Qasim, 2000, cit. po Ruan in sod., 2011). Znanstveniki so poročali o različnih proteinaznih inhibitorjih iz semen navadne ajde in tatarske ajde (Ruan in sod., 2011). Izoliran tripsin proteinazni inhibitor iz semen tatarske ajde je zaviral rast fitopatogenih gliv *Mycosphaerella melonis*, *Alternaria*

*cucumerina*, *Alternaria solani*, *Colletotrichum glaeosporioide*, *Pyricularia oryzae*, *Phytophthora capsici* in *Heminthosporium turcicum*.

### 2.3 BAKER, BAKROVI FUNGICIDI IN NANOTEHNOLOGIJA

Za vse organizme je baker (Cu) eden izmed sedmih esencialnih mikroelementov in je nujno potreben za njihovo rast in razvoj (Lee in sod., 2008), saj je med drugim sestavni del številnih encimov (Hou in sod., 2007). Rastline ga potrebujejo le v majhnih količinah (5-20 ppm za normalno rast), prav tako tudi glive in drugi mikroorganizmi. V večjih količinah je strupen za vse organizme, od bakterij do živali (Adriano, 2001).

Baker se že stoletja uporablja za razkuževanje tekočin in človeškega tkiva. Danes se Cu uporablja za čiščenje vode, kot algicid, fungicid, zatiralec nematodov in mehkužcev, kot antibakterijsko in zaščitno sredstvo (Gabbay in sod., 2006). Najpogosteje se uporablja v električni industriji, saj je odličen prevodnik električnega toka.

Različne bakrove spojine veljajo za ene najbolj naravnih snovi za zaviranje glivnih in bakterijskih bolezni rastlin (Rice in sod., 2006). V kmetijskih ekosistemih, zlasti v vinogradih in sadovnjakih se veliko različnih bakrovih spojin uporablja že desetletja, saj je njihovo delovanje zelo širokega spektra (Komarek in sod., 2010). Obstajajo dokazi, da imajo bakrovi fungicidi dolgoročen neugoden vpliv na številne talne organizme, saj presežek Cu, ki je bil uporabljen kot fungicid, vendar biotsko neizrabljen, predstavlja le nepotrebno okoljsko onesnažilo. V večini tipov tal ostanki Cu verjetno ostanejo skoraj neomejen čas in tako lahko trajno vplivajo na kvaliteto tal v bodočnosti (Van Zwieten in sod., 2004). Nekatero evropske države so uvedle omejitve ali prepovedi uporabe bakrovih fungicidov (Wang in sod., 2009), a je uporaba Cu še vedno dovoljena in priporočena pri ekološki pridelavi hrane, ki je vedno bolj pogosta tako pri nas, kot drugod. Nizozemska je uporabo bakrovih fungicidov prepovedala v celoti, v Švici so omejili dovoljeno količino Cu na hektar letno, uporaba Cu kot fungicida pa je že leta umaknjena z danskega tržišča (Wang in sod., 2009).

#### 2.3.1 Vrste in delovanje različnih bakrovih fungicidov

Bakrovi pripravki pogosto veljajo kot bolj naravna sredstva za zatiranje škodljivih gliv in bakterij kot sintetična ali organska sredstva (Rice in sod., 2006). Baker primarno deluje zatiralno na ciljne organizme tako, da prosti  $\text{Cu}^{2+}$  v vodotopni obliki vstopajo v notranjost njihovih celic in se vežejo na encime, da le-ti ne morejo več opravljati svoje funkcije. Mehanizem delovanja netopnih oblik Cu pa je zunanje, na celične stene in membrane gliv in bakterij, ne da bi vstopale v notranjost. Najbolj poznane in pri nas najpogosteje uporabljene oblike bakrovih fungicidov so sulfati, kloridi, oksidi, hidroksidi in oksikloridi (Lešnik in sod., 2009). Bakrovi pripravki lahko temeljijo na več kot 40 različnih bakrovih spojinah (**Preglednica 3**). Pri formulaciji pripravkov izdelovalci težijo k idealnemu razmerju med topnostjo in obstojnostjo fungicidne obloge. S povečevanjem topnosti se

poveča hitrost sproščanja ionov, hitrost spiranja obloge in obseg prodiranja ionov v tretirane rastline (Lešnik in sod., 2009).

**Preglednica 3:** Nekatere formulacijske oblike bakrovih pripravkov, ki jih uporabljamo pri varstvu rastlin pred boleznimi (Lešnik in sod., 2009).

**Table 3:** Some Cu formulations for protection of the plants from different diseases (Lešnik et al., 2009).

Komercialno ime pripravka	Kemijska oblika Cu	Vsebnost Cu (%)
CUPRABLAU	Cu-hidroksid (dodatki Zn, ...)	34-36
CINKARNA PFCu	Cu-hidroksid-EDTA kompleks (poskus. form.)	5-10
CHAMPION, KOCIDE	Cu-hidroksid	50
FUNGURAN, RAMIN	Cu-oksiklorid	50
MODRE GALICE	Cu-sulfat pentahidrat + razni dodatki	10-20
PROTEX - CU	Cu-sulfat - čiste raztopine brez pH regulatorja	5-6
BORDOJSKA BROZGA	Cu-sulfat + dodatki za regulacijo pH	20-25
KUPRO	Cu-oksi-sulfat + dodatki za regulacijo pH	18-20
COBRE NORDOX	Cu-oksidi (črni baker)	50-70
COPTREL	Cu-oksidi – sečnina kompleks	30-35
COPPER ACETATE	Cu-acetat	10-15
CUEVA	Cu-oktanoat (kompleks maščobne kisline)	10
LIQUICOP	Cu-amonij-acetat	8-10
CELTIC	Cu-amonij-klorid-hidrat	5-10
BIOACUMEN	Cu-pektinat (kompleks s pektini)	5-10
LABICUPER	Cu-glukonat	8-10
RAZNI PRIPRAVKI	Cu-oleat, Cu-kvinolinat, Cu-stearat, ...	5-10
COPPER CB	Cu-karbonat	40-50
SP-URANIA KUPFER	Cu-tio-laktat	5-7
COPPER PROTEIN	Cu-klorid-peptidat (kompleks s proteini)	2-3
NATURAM, PEPTIRAM	Cu-aminokislinski kompleksi	5-7

Za nekatere starejše formulacije je bilo značilno, da se je Cu iz fungicidne obloge zaradi zelo nizke topnosti sprostil le v zelo majhnem obsegu. Tako je npr. v biološko aktivno obliko,  $\text{Cu}^{2+}$ , iz obloge v nekaterih primerih prešlo manj kot 1 % od skupne količine nanesenega Cu (Lešnik in sod., 2009). Vsa ostala nanesena količina je bila biološko neizrabljena in je predstavljala zgolj stranski odpadni produkt in nepotreben onesnaževalec okolja. Ker so razlike v topnosti različnih bakrovih oblik lahko nekaj 1000-kratne in tiste najbolj topne obloge lahko izpere dež preden  $\text{Cu}^{2+}$  opravijo zatiralni učinek, je naloga sodobnih oblik bakrovih pripravkov povečati biološki izkoristek nanesenega Cu predvsem v obliki fungicidne obloge s kombinacijo različnih bakrovih kompleksov in kemijsko časovno kontroliranim sproščanjem  $\text{Cu}^{2+}$ . Upoštevati je treba tudi različne pH vrednosti na listnih površinah, kot posledica atmosferskih vplivov in rastlinskih izločkov, saj imajo le-te velik vpliv na topnost bakrovih spojin. Pomembno vlogo pri sproščanju ionov ima tudi velikost delcev fungicidne obloge in tip kristalov iz katerih je grajena obloga (mreža, paličice, snežinke, ...). Z zmanjševanjem delcev (tudi pod 0,1  $\mu\text{m}$  v nano oblike) se precej poveča topnost in aktivnost, vendar lahko ND hkrati povečajo nekatera tveganja (Lešnik in sod., 2009). Poleg tega ukrepi za zmanjševanje negativnih ekoloških posledic uporabe

bakrovih pripravkov temeljijo na povečani uporabi bioloških pripravkov, ki bi lahko nadomestili uporabo Cu (Van Zwieten in sod., 2004; Lešnik in sod., 2009).

Pomemben del vnosa Cu v okolje predstavlja njegova uporaba za zaščito lesa, saj bakrovi fungicidi veljajo za najpomembnejšo skupino fungicidov za zaščito lesa pred glivami in algami (Humar in Pohleven, 2005). Tako naj bi ostalo tudi v prihodnosti, saj trenutno zanje ne obstaja ustrezne alternative. Letno se za zaščito lesa porabi 100 000 ton bakrovih pripravkov, ta številka pa še vedno strmo narašča (Humar in Pohleven, 2005). Z bakrovimi pripravki zaščiten les ogrožajo le vedno bolj razširjeni na Cu prilagojeni sevi gliv (Humar in Pohleven, 2005).

### **2.3.2 Mehanizem strupenosti bakra in odpornost nanj**

Fungicidno delovanje bakrovih spojin je v primerjavi z delovanjem organskih fungicidov zelo nespecifično (Humar in Pohleven, 2005). Mehanizmi strupenosti  $\text{Cu}^{2+}$  vključujejo oksidacijo funkcionalnih skupin, ki blokira ali deaktivira delovanje encimov, tekmovalno z drugimi ioni za vezavna mesta,  $\text{Cu}^{2+}$  lahko negativno vplivajo na prepustnost membrane celic, ki je bistvena za vzdrževanje homeostaze (Yruela, 2005). Redoks spremembe elementa med  $\text{Cu}^{2+}$  in  $\text{Cu}^+$  lahko povzročijo nastanek strupenih prostih radikalov, ki poškodujejo DNA, lipide, proteine in ostale biomolekule (Yruela, 2005). Strupenost Cu se kaže v zaviranju sinteze beljakovin, motenem celičnem dihanju zaradi blokade encimov v dihalni verigi, vdoru snovi iz okolice v celico ter zmanjšani in moteni izmenjavi elementov, kar je posledica lipidne peroksidacije celične membrane, lahko pa inducira nastanek ROS in s tem povezan oksidativni stres (Lešnik in sod., 2009; Yruela, 2005). Zaradi tako raznolikih interakcij med kovinami in živimi organizmi je lahko prizadeta prav vsaka stopnja v razvoju, diferenciaciji in metabolizmu. Stopnja poškodbe ter posledično simptomi so odvisni od organizma, oblike bakrove spojine, njene koncentracije, različnih fizikalno-kemijskih vplivov od pH, ionsko izmenjevalne kapacitete in prisotnostjo drugih ionov (Lešnik in sod., 2009).

Toleranca je definirana kot sposobnost organizma, da zaradi svojih biokemičnih in fizioloških lastnosti, ki so lahko posledica genetskih prilagoditev, v naravnem okolju ali v laboratorijskih pogojih preživi, ne glede na prisotnost kovine (Gadd, 1993). Obstaja več razlag odpornosti organizmov na povišane koncentracije elementov v okolju. Ena možnost je posledica biotske raznovrstnosti. Tako se v onesnaženem okolju ne zvišuje tolerantnost vrst, pač pa se le zmanjša biotska raznolikost v ekosistemu (Woodward in De Groot, 1999). Druga razlaga je, da višje koncentracije elementa v okolju povzročijo razvoj novih tolerantnejših organizmov (Jellison in sod., 1997).

Zaradi dolgotrajne izpostavljenosti gliv različnim fungicidnim bakrovim spojinam, so nekatere razvile odpornost na Cu (Cervantes in Gutierrez-Corona, 1994), tako da so potrebne višje in višje koncentracije Cu za doseganje enakega fungicidnega učinka. Poznamo različne znotrajcelične in zunajcelične tolerančne mehanizme. Ti vključujejo zunajcelično raztapljanje in vezavo v komplekse, izločanje zunajceličnih metabolitov,

vezavo v in na celične stene, privzem in prenos v celico, znotrajcelično razstrupljanje ali skladiščenje znotraj organelov ter sintezo metalotioninov (Cervantes in Gutierrez-Corona, 1994). Tolerantnost gliv na Cu so v prvih raziskavah povezovali s sintezo oksalne kisline, ki z bakrovimi biocidi tvori netopne in zato nestrupene komplekse Cu-oksalata. V novejših raziskavah so dokazali, da je toleranca gliv na Cu bolj povezana s pH vrednostjo okolja kot pa s topnostjo bakrovih spojin (Humar in sod., 2005). Glivna toleranca na Cu variira tako med posameznimi vrstami kot med posameznimi izolati iste vrste (Hirt, 1949, Da Costa, 1959, cit. po Humar in sod., 2002).

### 2.3.3 Nanotehnologija in bakrovi nanodelci

Ker mnogi inženirsko proizvedeni nanomateriali izboljšujejo kvaliteto našega življenja, njihova uporaba v zadnjih letih dramatično narašča. Kot posledica razmaha nanotehnologije v stik s proizvedenimi nanodelci (ND), med drugim tudi ND Cu in CuO, prihaja vse več organizmov. Zaradi tega je nujno potrebno izboljšati znanje o lastnostih ND in mehanizmih njihovega delovanja, obenem pa postaviti regulative, ki se tičejo njihove uporabe oz. primerne odstranitve (Drobne, 2007).

Nanodelci so atomski ali molekulski agregati, ki vsaj v eni dimenziji merijo od 1 do 100 nm (Remškar, 2009). Zaradi majhnosti ter strukturnih in površinskih karakteristik se njihove fizikalno-kemijske lastnosti razlikujejo od lastnosti večjih delcev enakega materiala (Stampoulis in sod., 2009). ND CuO so pomembni v raziskavah ekološke strupenosti, saj so zelo strupeni za organizme, kljub njihovi nizki topnosti. Vzrok njihove strupenosti niso kovinski ioni, kar velja za ND Ag in ZnO (Bodarenko in sod., 2013). Usoda ND in njihova strupenost je odvisna od velikosti in razporeditve delcev, stopnje organiziranosti, naboja in topnosti. Prav vse študije strupenosti, ki so na voljo, tako na bakterijah, kvasovkah, živalih in rastlinah, poročajo o večji strupenosti ND CuO v primerjavi s standardno obliko oz. mikrodenci (MD) CuO (Aruoja in sod., 2009, Rousk in sod., 2012; Shi in sod., 2014; Dimkpa in sod., 2012b; Atha in sod., 2012; Karlsson in sod., 2009). Srednje smrtne vrednosti koncentracij ND CuO se razlikujejo tudi glede na skupine organizmov.

Letno na odlagališčih pristane 150 ton Cu in Cu oksidov, 3 tone v zraku, 36 ton v prsti in 11 ton v vodi (Keller in sod., 2013). Emisije v tleh predstavljajo četrtno vsega odpada, kar je pomembno dejstvo za ohranjanje varnega kmetijstva, kot tudi uporabe odpadnih voda za zalivanje in gnojenje kmetijskih površin (Judy in sod., 2011). Ena izmed vej nanotehnologije se z uporabo inženirskih ND v kmetijstvu trudi zamenjati strupena fitofarmaceutvska sredstva, zmanjšati izgube hranil pri gnojenju in povečati pridelek preko upravljanja z optimalno količino hranil (Gogos in sod., 2012). Z nano premazi semen proizvajalci obljublajo izboljšano prehrano rastlin, kot tudi protimikrobno zaščito (Adhikari in sod., 2012; Adhikari in sod., 2015; Altomani Neves Dias in sod., 2015).

Nanokristali CuO so zelo dobri katalizatorji in delujejo pri nižjih temperaturah kot ostali komercialno dostopni materiali (Carnes in Klabunde, 2003). ND CuO se zaradi posebnih

optičnih, električnih in katalitičnih lastnosti intenzivno uporabljajo v elektroniki, optičnoelektronskih napravah, mikroelektromehaničnih sistemih, elektrokemičnih celicah, plinskih senzorjih, sončnih celicah, predvsem v vlogi superkonduktorja in katalizatorja (El Trass in sod., 2012; Chang in sod., 2011). ND CuO so baktericidni tako za Gram pozitivne bakterije kot tudi Gram negativne bakterije, ki povzročajo bolezni, ki se prenašajo po vodi (Pandey in sod., 2012). Nanodelci Cu in CuO se že uporabljajo kot sestavni del intrauterinih kontraceptivov, biomedicinskih in kirurških pripomočkov, embalaže iz plastike in bombažne tkanine (Aruoja in sod., 2009; Delgado in sod., 2011; Cioffi in sod., 2005; Usha in sod., 2010; Perelshtein in sod., 2009). Poleg tega so se ti ND izkazali za učinkovite pri zaščiti pred napadi virusov in imajo potencial za uporabo kot filtri, obrazne maske, zaščitna oblačila in kuhinjske krpe (Fujimori in sod., 2012). Uporabljajo se za prečiščevanje vode, v barvah in premazih za površine, ki se jih pogosto dotikamo v bolnišnicah. Nanodelci CuO v inertnem matriksu silicijevega dioksida so občutljivi na dušikov dioksid in ogljikov monoksid, zato so primerni za plinske senzorje (Dutta in sod., 2003).

Nanodelce Cu in CuO lahko pripravimo na različne načine: sonokemično, hidro- ali alko-termalno, z raztapljanjem, mikrovalovnim obsevanjem in mehničnem trenjem v trdnem stanju (Kida in sod., 2007). Metode proizvodnje potekajo v laboratoriju in so energetsko ter časovno potratne, predvsem pa drage (Chang in sod., 2011), zato znanstveniki stremijo k biogeni sintezi ND (glej poglavje 2.5.1 Biogena sinteza ND bakra, bakrovega oksida in bakrovega sulfida).

#### 2.4 INTERAKCIJE GLIV Z BAKROM IN BAKROVIMI NANODELCI

Dandanes obstaja potreba po odkrivanju novih strategij za razvoj protimikrobnih učinkovin s širokim spektrom protimikrobne aktivnosti (Ingle in sod., 2014). Proizvajalci težijo k idealnemu razmerju med topnost in stabilnostjo fungicida z namenom primerne biološke izrabe. Trenutno se intenzivno preučuje antimikrobna učinkovitost različnih kovinskih ND, prav zaradi njihove male velikosti in velike površine, ki posledično povečuje interakcije z mikrobi (Ingle in sod., 2008). Mnogi raziskovalci so potrdili antibakterijsko aktivnost ND CuO proti mnogim bakterijskim patogenom (Mahapatra in sod., 2008; Azam in sod., 2012). Čeprav je veliko raziskav na temo antibakterijske aktivnosti ND Cu, je podatkov o njihovi fungicidni aktivnosti malo (Ingle in sod., 2014, Pradhan in sod., 2014). Kljub temu, da so nekatere raziskave pokazale učinkovitejše delovanje ND Cu od ND Ag, je literatura o strupenosti ND CuO na organizme zelo omejena v primerjavi s srebrovimi ND (Bodarenko in sod., 2013; Yoon in sod., 2007). Ker je Cu cenejši, lažje dostopen in sinteza ND Cu stroškovno učinkovitejša v primerjavi s Ag, ND Cu in Cu oksidov pridobivajo pomembnost kot antimikrobni preparati (Ingle in sod., 2014).

Znanstveniki predlagajo tri glavne mehanizme strupenosti ND kovinskih oksidov (Gajewicz in sod., 2015; Gunawan in sod., 2011):

- luženje kovinskih kationov s površine delcev, ki nadalje vodi v nastanek hidroksilnih radikalov in posledično oksidativnega stresa;
- učinek trojanskega konja, kjer ND vstopijo v celico in se tam znotrajcelično raztopijo;
- tretji mehanizem vključuje redoks lastnosti površin kovinskih oksidov.

Različni ND vplivajo na rast gliv in povzročijo biokemijske spremembe na glivnem miceliju, predvsem znižajo vsebnost proteinov, lipidov in polisaharidov (Galindo in sod., 2013). Občutljivost na ND in njihov odgovor je pri glivah vrstno specifičen. Pri kvasovkah ND CuO ustavijo njihovo rast pri koncentraciji 40 mg l<sup>-1</sup>, medtem ko MD CuO pri koncentraciji 4000 mg l<sup>-1</sup> (Kasemets in sod., 2009). ND CuO zavirajo rast in povzročijo degeneracijo celične stene gliv, ki sodelujejo pri dekompoziciji rastlinskega materiala v sladkovodnih ekosistemih, stopnja strupenosti pa je odvisna od koncentracije in časa izpostavljenosti (Pradhan in sod., 2011). Glive iz onesnaženih in neonesnaženih potokov se razlikujejo v privzemu ND CuO ter njihovem morfološkem odzivu, kar nakazuje na razvoj tolerančnih mehanizmov onesnažilom dolgoročno izpostavljenih gliv (Pradhan in sod., 2014). Poleg tega se Cu veže na površino spor med kaljivostjo tako, da je potreben čas za proces razstrupljanja in izbor preživelih spor (Anand in sod., 2006). Študije o vplivu ND na glive so redke, zato bi bile podobne raziskave potrebne tudi na glivnih izolatih iz različnih okolij (Pradhan in sod., 2014).

Ker so že dokazali, da je mikroniziran Cu bolj učinkovit za zaščito lesa pred glivnim razkrojem kot Cu v običajni obliki, ima njegova uporaba potencial, da postane glavni preparat za zaščito lesa. To pomeni, da bo uporabljen Cu močno presešel količine predvidene za uporabo TiO<sub>2</sub> ND (Civardi in sod., 2015). Ko so ND enkrat prisotni v okolju lahko predstavljajo nevarnost okolju in se lahko vključijo ter kopičijo v prehranjevalnih verigah (Ma in sod., 2010; Anjum in sod., 2013; Keller in sod., 2013). Nanoonesnaževanje velja za tip onesnaževanja, ki ga je najtežje upravljati in nadzorovati (Gao in sod., 2013). Posledično privzem in kopičenje težkih kovin in ND v glivnih biomasah pridobiva vse več pozornosti v biotehnološkem kontekstu, saj lahko tehnologije na osnovi mikrobov zagotavljajo alternativne tehnike za odstranjevanje kovin ali ND iz onesnaženih tal in odpadnih voda in/ali pri proizvodnji različnih materialov. Na primer, Zafar in sod. (2007) so izolirali Cu tolerantne glive iz kmetijskega ekosistema, ki se dolgoročno uporabljajo za čiščenje Cu iz odpadnih voda. Iz vidika stroškov in učinkovitosti je sposobnost gliv za odstranjevanje kovin tako dobra ali celo boljša od drugih običajnih absorbentov (Bishnoi in Garima, 2005; Harms in sod., 2011). Boljše razumevanje mehanizmov, ki omogočajo glivam preživetje v prisotnosti visokih koncentracij kovin je tako velikega okoljskega kot gospodarskega pomena (Al Alabboud in Alawlaqi, 2011).

#### 2.4.1 Biogena sinteza nanodelcev bakra, bakrovega oksida in bakrovega sulfida

Številne bakterije in glive ob izpostavljenosti Cu soli lahko tvorijo ND Cu različnih velikosti, oblik in sestave (Rubilar in sod., 2013). Prav to lastnost izrablja pomemben del nanotehnologije, ki je proizvodnja ND z ekološko prijaznimi in varnimi postopki. Biogena sinteza nanostruktur izpolni oba pogoja, zato veliko znanstvenikov poroča o biogeni sintezi različnih ND z uporabo različnih organizmov (Rubilar in sod., 2013). Zaradi strupenosti  $\text{Cu}^{2+}$  ionov so biološki sistemi usmerjeni k redukciji njihovega števila in tako zmanjšanju njihove strupenosti. Tako so rastline s pomočjo AM gliv, ki rastejo v onesnaženi zemlji, sposobne transformirati Cu v kovinske ND v in na njihovih koreninah (Manceau in sod., 2008). Med glivami *Fusarium oxysporum* in med bakterijami *Pseudomonas sp.* so sposobni lužiti Cu iz integriranih vezij na elektronskih ploščah (Majumber, 2012, cit. po Rubilar in sod., 2013).

Biokatalitično redukcijo in odstranitev  $\text{Cu}^{2+}$  iz vodne raztopine ter nastanek ND Cu poteka ob prisotnosti kvasovk, *Saccharomyces cerevisiae*, bakterij *Pseudomonas stutzeri*, *Morganella morganii* in *M. psychrotolerans* (Chandran in sod., 2001, Varshney in sod., 2012, Ramanathan in sod., 2011, cit. po Rubilar in sod., 2012).

Ob prisotnosti vodne raztopine  $\text{CuSO}_4$  je bakterija *Serratia sp.* sposobna proizvesti mešanico ND Cu in različnih ND CuO (Hasan in sod., 2008, cit. po Rubilar in sod., 2013). ND  $\text{Cu}_2\text{O}$  so pri sobni temperaturi sposobne sintetizirati bakterije *Lactobacillus sp.* in kvasovke *S. cerevisiae* (Prasad in sod., 2010, cit. po Rubilar in sod., 2013). Usha in sod. (2010) so poročali o enaki sposobnosti *Stroptomyces sp.* ter Sing in sod. (2010, cit. po Rubilar in sod., 2013) o *E. coli*, ki sintetizira ND bakrovega oksida različnih oblik in velikosti. Med glivami so tega sposobne *Penicillium aurantiogriseum*, *P. citrinum* in *P. waksmanii*, vsaka ND drugačne velikosti (Honary in sod., 2012, cit. po Rubilar in sod., 2013).

ND bakrovega sulfida (CuS) je proizvedla gliva *F. oxysporum* v raztopini  $\text{CuSO}_4$ . Ti ND so bili oblečeni s proteini, ki so preprečevali njihovo agregacijo (Hosseini in sod., 2012, cit. po Rubilar in sod., 2013).

#### 2.5 INTERAKCIJE RASTLIN Z BAKROM IN BAKROVIMI NANODELCI

Pomanjkanje Cu v rastlinah povzroča motnje v metabolizmu ogljikovih hidratov (fotosinteza, respiracija), metabolizmu dušika (fiksacija  $\text{N}_2$ , sinteza proteinov), sintezi celične stene (predvsem sinteza lignina), tvorbi semen in odpornosti proti boleznim. Baker v prevelikih količinah pa zavira rast in razvoj rastlin, povzroča razbarvanje korenin in kloroze na listih ter zavira razvoj kalic (Adriano, 2001). Učinki strupenosti se v splošnem kažejo bolj v zaviranju reproduktivne kot pa vegetativne rasti. Rastline najpogosteje pridejo v stik s Cu v kmetijskih ekosistemih, saj se tam uporablja veliko različnih fungicidov, ki so osnovani na bakrovih spojinah. Prav tako se npr.  $\text{Cu}_2\text{O}$  uporablja kot fungicid in sredstvo za oblaganje semen (Adhikari in sod., 2012).



Pri raziskavah strupenosti ND CuO na kopenske rastline se raziskovalci večinoma poslužujejo hidroponske metode gojenja rastlin (Wang in sod., 2012; Shi in sod., 2014; Dimpka in sod., 2012). Različne rastlinske vrste, tretirane z ND CuO so bile bolj prizadete od rastlin tretiranih z MD CuO, zavrta je bila njihova rast in sinteza klorofila (Shi in sod., 2011; Dimpka in sod., 2012b; Kim in sod., 2012). Pri vodni leči so povzročili zmanjšanje fotosintezne listne površine in s tem manjšo fotosintezno aktivnost (Perreault in sod., 2014). Vplivajo na spremembe v morfologiji korenin, zmanjšajo njihovo površino in dolžino (Wang in sod., 2012; Wu in sod., 2012; Lee in sod., 2013c). V rastlinah, tretiranih z ND CuO, so bile koncentracija Cu v poganjkih večje v primerjavi z rastlinami, ki so bile tretirane z MD CuO (Shi in sod., 2011; Zhou in sod., 2011; Dimpka in sod., 2012; Atha in sod., 2012). Nekateri avtorji poročajo o negativnem vplivu na kalitev semen, medtem ko drugi tega niso potrdili (Wu in sod., 2012; Wang in sod., 2012).

Strupenost za rastline ND CuO so Wu in sod. (2012) pripisali njihovi agregaciji na površini korenin. Zaradi svoje majhnosti in velike površinske aktivnosti lahko direktno poškodujejo celično membrano in tako vplivajo na privzem in prenos hranil (Lin in Xing, 2008; Ma in sod., 2010). K njihovi strupenosti pa lahko prispevajo tudi  $\text{Cu}^{2+}$  ion, ki se lužijo pri nižjem pH, ki je npr. v vakuoli in v koreninskih eksudatih (Shi in sod., 2014; Dimpka in sod., 2012b). ND CuO v koreninah povečajo lipidno peroksidacijo in oksidacijo glutationa, višjo peroksidazno in katalitično aktivnost (Dimpka in sod., 2012). To so posredni dokazi, da je vzrok strupenosti ND CuO na rastline sinteza kisikovih reaktivnih spojin v celici. Poleg vsega pa so ND CuO tudi genotoksični, saj povzročajo oksidativne poškodbe in lezije DNA (Atha in sod., 2012; Lee in sod., 2013b).

V tkivih listov koruze so s presevnim elektronskim mikroskopom identificirali ND CuO in dokazali, da se ND CuO lahko transportirajo iz korenin v poganjke in nazaj v korenine koruze (Wang in sod., 2012). Predvideli so, da se ND povežejo z ogljikovimi hidrati v času shranjevanja fotosintatov (Wang in sod., 2012). S pomočjo sinhrotronskih metod so določili speciacijo Cu v poganjkih rastlin, ki so bile izpostavljene suspenziji ND CuO. Cu v poganjkih se je nahajal večinoma v obliki CuO, del pa se je akumuliral v obliki Cu(II)-kompleksov, kot so Cu-alginat, Cu-cistein in Cu-oksalat (Shi in sod., 2014). Te ugotovitve nakazujejo, da ND CuO vstopijo v rastline kot intaktni, nato se v njihovem notranjem okolju biotransformirajo. V določenih delih rastlinskih tkiv verjetno luženje  $\text{Cu}^{2+}$  povzroči nizek pH. Raziskovalci so ND CuO lokalizirali kot posamične ali v majhnih agregatih, v okolici celičnih jeder, kot tudi v medceličnem prostoru (Atha in sod., 2012), kar je še dodaten dokaz, da se ND privzamejo v celico v intaktni obliki. Topnost ND CuO je 40-krat večja kot topnost MD CuO, saj se iz nano oblike CuO odluži približno 12 % Cu, iz MD CuO pa le 0,3 % Cu (Blinova in sod., 2010). Drugi navajajo, da ND CuO sprostijo 14-krat več Cu kot MD CuO (Shi in sod., 2011).

Za našo raziskavo strupenosti ND CuO smo izbrali ajdo, kot pomembno zdravilno in prehransko rastlino, ki je bila do sedaj vključena v le 2 študiji strupenosti ND (Lee in sod., 2013b; Lee in sod., 2013c). Ajda je primerna rastlina za raziskave strupenosti bakrovih

spojin, saj zaradi visokih vsebnosti različnih organskih kislin in taninov, ki kelirajo dvovalentne kovinske ione prehodnih kovin, kopiči Al in Pb v poganjkih ter preživi visoke koncentracije Cu ter Zn (Ma in Hiradate, 2000; Tani in Barrington, 2006). Obenem pa je to rastlina z visokimi vsebnostmi sekundarnih fenolnih metabolitov in je zato primerna za raziskave vplivov ND na sekundarni metabolizem rastline in njihovo potencialno vlogo pri zaščiti rastline.

### 2.5.1 Kopičenje nanodelcev v organizmih

Pri preučevanju razširjenosti inženirskih ND je ključna informacija o njihovi proizvodnji, ki jo najlažje spremljamo preko prodaje, njihove uporabe ter posledično odpadu. Zavedati se je potrebno tudi vmesnih emisij ND tekom proizvodnje, uporabe in odpada. Znanstveniki ocenjujejo, da je 63-91 % od 260000-309000 ton svetovne produkcije inženirskih ND končala na odlagališčih, od tega se jih je preneslo 8-28 % v prst, 0,4-7 % v vodna telesa in 0,1-1,5 % v atmosfero (Keller in sod., 2013). Emisije v zemlji predstavljajo četrtno vsega odpada, kar je pomembno z vidika ohranjanja varnega kmetijstva (Keller in sod., 2013).

Med leti 2005 in 2010, se je seznam izdelkov nanotehnologije podaljšal iz 54 izdelkov na 1015. Med leti 2008 in 2012 se je količina nanomateriala v odpadnem materialu povečala iz 0,1 na 0,5 mg kg<sup>-1</sup> TiO<sub>2</sub> ND, iz 6,8 do 22,3 µg kg<sup>-1</sup> ZnO ND in iz 2,3 na 7,4 µg kg<sup>-1</sup> Ag ND (Judy in sod., 2011). ND po uporabi lahko končajo v odpadnih vodah, ki se uporabljajo za zalivanje in gnojenje kmetijskih površin (Judy in sod., 2012). Preko odpadnih voda, se ND kopičijo v blatu in mulju, od tega jih 60 % konča na kmetijskih zemljah v ZDA in večini Evrope (Judy in sod., 2011). S tem ko se povečujejo koncentracije ND v zemlji, je tudi verjetnost prenosa v rastline večja. Zemeljski delci so lahko prenesejo na rastlinsko površino z vetrom, bioto, mehanskimi motnjami in dežnimi kapljicami (Judy in sod., 2012). Prenos ND in njihova biodostopnost za organizme sta odvisna od njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti (oblika, velikost, površinski naboj) ter lastnosti prsti (pH, ionsko razmerje, organska snov, količina gline) (Thul in sod., 2013). Če se ND nakopičijo v užitnih delih rastlin, bi se od tu lahko prenesli na ostale člene prehranjevalne verige (Judy in sod., 2012). V preteklosti se je že izkazalo, da je možna izpostavljenost preko hrane in trofični prenosi kemikalij (Judy in sod., 2011). Kljub tem dejstvom je malo objavljene literature o trofičnih prenosih ND. Poročali so o prenosu CdS kvantnih pik iz sladkovodnih alg na *Ceriodaphnia dubia* (Bouldin in sod., 2010, cit. po Judy in sod., 2011). Ker je prenos po kopenskem ekosistemu tudi grožnja človeku, so take študije nujno potrebne.

Ocene kroženja ND so uporabne za določanje izpustov in njihovega kopičenja na lokalni ravni. Te določimo z modeli za ocenjevanje koncentracij v različnih okoljih, ki temeljijo na proizvodnji, uporabi, odpadu in prenosu oz. usodi ND. Potrebne so dodatne študije na področju biološkega kopičenja in odstranjevanja ND, kot tudi študije o njihovih potencialnih strupenih učinkih, ki bi lahko bili posledica kontaminiranega rastlinskega

materiala. Zato se višje rastline, kot so avtohtone kulturne vrste in kultivirane rastline, uporabljajo kot bioindikatorji za spremljanje in ocenjevanje škode onesnaževanja (Lee in sod., 2013b).

## 2.6 METODE ZA PREUČEVANJE STRUPENOSTI KOVIN

Da lahko spremljamo onesnaženost oz. obremenjenost okolja in s tem dostopnost in strupenost onesnaževalcev za floro ter posledično človeka, se moramo posluževati različnih analitskih tehnik. Osnovni tipi poskusov preučevanja strupenosti različnih spojin na rastline so kalitveni testi, lončni poskusi in poskusi hidroponskega gojenja rastlin. Tretiranim rastlinam se običajno določijo osnovni fiziološki parametri odziva, med katere sodijo biomasa korenin in poganjkov, vsebnost pigmentov ter vsebnost različnih sekundarnih metabolitov, stopnja oksidativnega stresa in privzem elementov. Z napredkom znanosti pa za preučevanje strupenosti ne zadoščajo več standardne raziskave strupenosti za rastline, kot so ugotavljanje stopnje kaljivosti in merjenje dolžine korenin. Dandanes poznamo že kar nekaj metod za določanje skupne koncentracije elementov v vzorcu (Vogel-Mikuš in sod., 2012): rentgenska fluorescenčna spektroskopija (XRF), rentgenska fluorescenčna spektroskopija s totalnim odbojem (TXRF), atomska absorpcijska spektroskopija (AAS), induktivno sklopljena plazma z atomsko emisijsko spektroskopijo (ICP-ES), induktivno sklopljena plazma z masno spektroskopijo (ICP-MS)...

Prav tako za razumevanje mehanizmov strupenosti težkih kovin in ostalih okoljskih onesnaževalcev ter za razlage metabolnih poti elementov ne zadoščajo več analize skupnih koncentracij elementov, pač pa se moramo za natančnejše preučevanje poslužiti metod lokalizacije elementov na celičnem in subceličnem nivoju (Kaulich in sod., 2009; Punshon in sod., 2005), pa tudi določanja kemijskih oz. vezavnih oblik elementov (Lombi in sod., 2011; Vogel-Mikuš in sod., 2012). Za preučevanje elementarne sestave veljajo za zelo uporabne metode rentgenskega sevanja, saj so poceni, multielementne in okolju prijazne, obenem pa ni potrebno vnaprej predvideti elementne sestave v vzorcu (Nečemer in sod., 2008). Na drugi strani pa imamo metode za preučevanje razporeditve elementov kot so npr. protonsko inducirana emisija rentgenskih žarkov z visokoenergijskim fokusiranim žarkom ( $\mu$ -PIXE), sinhrotronska rentgenska fluorescenčna spektroskopija (sr-XRF), laserska ablacijska masna spektroskopija z induktivno sklopljeno plazmo (LA-ICP-MS) ter metode za preučevanje speciacije in vezavnih oblik elementov, kot je rentgenska absorpcijska spektroskopija (XAS).

### 2.6.1 Metode za preučevanje odziva rastlin in gliv na različne spojine

V vsej zgodovini raziskav strupenosti so razvili različne teste strupenosti, pri katerih žive organizme izpostavimo različnim snovem in opazujemo njihov odziv. Rastlinski testi, ki so bili predlagani s strani USEPA (1996, cit. po Monica in Cremonini, 2009), vključujejo predvsem raziskave vpliva snovi na kaljivost semen, rast korenin, spremembe biomase in opazovanje anatomsko-histoloških sprememb. S takimi testi lahko hitro pridemo do

podatkov o skupnem škodljivem vplivu snovi na organizem, obenem pa spoznamo tudi mehanizem strupenosti določene snovi. Nato s pomočjo različnih statističnih pristopov lahko npr. določimo smrtne ali efektivne koncentracije spojin, grupiramo testirane spojine glede na vpliv na različne izmerjene parametre odziva organizma, določimo najobčutljivejši izmerjen parameter odziva organizma...

Fiziološki odziv organizmov na prisotnost različnih spojin lahko spremljamo tudi z različnimi kemijskimi analiznimi tehnikami, ki največkrat temeljijo na spremembi barve. Velikokrat se poslužujemo spektrofotometrije, ki je absorpcijska molekulska spektroskopska metoda in temelji na absorpciji vidne (400 do 750 nm) oz. ultravijolične svetlobe (100 do 400 nm) pri točno določenih valovnih dolžinah, ki so značilne za preučevane ione in molekule. Ko svetloba prehaja skozi raztopino, ki vsebuje neko obarvano komponento, se fotoni določenih valovnih dolžin absorbirajo v vzorcu. Preostala svetloba, ki je analit ne absorbira, se od vzorca odbije (refleksija in posledično merimo reflektanco) oz. preide skozi vzorec (transmisija in posledično merimo transmitanco oz. absorbanco analita). Med spektrofotometrične metode sodi tudi določitev stopnje lipidne peroksidacije membran organizmov, ki je odličen pokazatelj strupenosti spojin in je posledica oksidativnega stresa. Prav tako lahko s spektrofotometričnimi metodami izmerimo sintezo primarnih in sekundarnih metabolitov (npr. klorofilov, karotenoidov, fenolov, flavonoidov in taninov) v ekstraktih liofiliziranega in homogeniziranega rastlinskega materiala, sintezo sideroforov s pomočjo univerzalnega krom azurol sulfonat gojišča, sintezo proteinov... Obstajajo tudi testi, ki temeljijo na vidni zaznavi spremembe obarvanosti raztopine, kot je npr. komercialni test API ZYM<sup>®</sup> za določitev sinteze zunajceličnih encimov in temelji na razgradnji določenega substrata v testnih enotah ter posledično spremembi v barvi raztopine.

## **2.6.2 Rentgenska fluorescenčna spektroskopija (XRF)**

Rentgenski žarki ali žarki X so elektromagnetno valovanje oz. fotoni z valovno dolžino v območju med 80 nm (okoli 15 eV) in 0,001 nm (okoli 1,2 MeV), katerih vir sevanja so lahko rentgenske cevi ali radioizotopi. Rentgenski žarki imajo zelo kratko valovno dolžino, zato lahko prehajajo skozi predmete, ki so za navadno svetlobo neprozorni, imajo pa dovolj visoko energijo, da izbijejo elektrone iz notranjih atomskih lupin.

Ob prehodu rentgenskih žarkov skozi snov, se nekateri fotoni absorbirajo v samem materialu ali pa se odbijejo stran od prvotne poti. Osnova metod rentgenske fluorescenčne spektroskopije je vzbujanje (ionizacija) atomov in nato relaksacija vzbujenega (ioniziranega) atoma. Če hočemo, da pride do pojava fotoefekta, mora energija fotona preseči vezavne energije elektronov na K, L in M lupinah (Markowicz, 1993).

Ko je atom vzbujen, je nestabilen in z viškom energije, ker mu na eni izmed notranjih lupin (K ali L) manjka elektron. To se zgodi v procesu fotoefekta oz. interakcije med fotonom in vezanim elektronom notranje lupine, ko le-ta absorbira energijo fotonov rentgenske svetlobe in se izbije iz atoma oz. izseva kot fotoelektron. Del vzbujevalne energije se

porabi za premostitev vezavne energije elektrona, preostanek pa se izrazi kot kinetična energija fotoelektrona. V procesu relaksacije atoma, se vrzel v elektronski lupini zapolni v nekaj femtosekundah z elektronom iz manj vezanega stanja (zunanje lupine L, M ali N) v t.i. radiacijskem prehodu. Razlika v energiji pri prehodu elektrona med stanjema se izseva kot foton rentgenske svetlobe.

Ker ima vsak element različne vezavne energije za posamezna stanja elektronov v lupinah (K, L, M), se pri procesu rentgenske fluorescence izsevajo za vsak element karakteristični rentgenski žarki, na podlagi katerih ločimo posamezne elemente med seboj (Markowicz, 1993).

Za analizo elementov v vzorcu je potrebno izmeriti spekter fluorescenčne rentgenske svetlobe, ki smo jo vzbudili v vzorcu. Za ta namen uporabljamo rentgenske spektrometre, ki merijo energijo in število rentgenskih žarkov, torej energijsko porazdelitev fluorescenčne rentgenske svetlobe. Osnovni del rentgenskega spektrometra je detektor, za katerega je pomembno, da loči po energiji karakteristične rentgenske žarke sosednjih elementov v periodnem sistemu.

Ena izmed različic XRF je metoda energijsko-disperzijska spektroskopija (EDX) v kombinaciji z elektronsko mikroskopijo, tako presevno, kot tudi vrstično. Uporablja se za preučevanje kemične sestave (kvalitativno in kvantitativno) na površini vzorca (Kaulich in sod., 2009). Snop elektronov, s katerim obstreljujemo vzorec, ima dovolj energije, da lahko v atomih elementov, ki sestavljajo obsevano mesto na vzorcu, povzročijo emisijo za te elemente karakterističnih rentgenskih žarkov. Glede na energijo emitiranih rentgenskih žarkov lahko sklepamo na kemično sestavo na obsevanem mestu, intenziteta pa nam pove količino elementa. Omenjena metoda nudi visoko lateralno ločljivost (<10 nm), meritve morajo potekati v vakuumu, sama metoda ni zelo občutljiva (0,01-0,1 utežnega odstotka %) in je primerna le za površinske analize vzorcev (Vogel-Mikuš in sod., 2012).

### **2.6.3 Protonsko inducirana emisija rentgenskih žarkov ( $\mu$ -PIXE)**

Je moderna, zanesljiva in primerno občutljiva metoda za lokalizacijo in obenem kvantifikacijo različnih elementov v bioloških vzorcih na tkivnem in celičnem nivoju (Merela in sod., 2009). Pravzaprav je ena najuporabnejših metod za mapiranje elementne sestave raznovrstnih vzorcev, saj je nedestruktivna, visoko občutljiva (meja detekcije posameznega elementa 0,1 – 1 ppm), ima možnost analize majhnih  $\mu\text{g}$  vzorcev in omogoča vzporedno detekcijo skoraj vseh elementov periodnega sistema (težjih od Na) z lateralno ločljivostjo 0,1 – 1  $\mu\text{m}^2$ .

Pri tehniki protonsko inducirane emisije rentgenskih žarkov z visokoenergijskim fokusiranim protonskim žarkom ( $\mu$ -PIXE) običajno določamo porazdelitvene mape elementov. Tudi metoda  $\mu$ -PIXE temelji na principu rentgenske fluorescence, le da tu atome vzbujamo s protoni preko elektromagnetne ali coloumske interakcije, kjer pospešeni protoni izbijajo elektrone iz notranjih lupin atoma (Small, 1993, Maenhaut in

Malmqvist, 1993, cit. po Vogel-Mikuš, 2006). Tako nastale vrzeli v elektronski lupini se zapolnijo z elektroni z višje ležečih zunanjih lupin. Pri takem prehodu se lahko izsevajo karakteristični fotoni, ki prevzamejo razliko energij začetnega in končnega, relaksiranega stanja atoma (Žitnik in sod., 1999). Fotone rentgenske svetlobe oz. fluorescenčno rentgensko sevanje lahko zaznavamo in merimo, kar omogoča kvalitativno ter kvantitativno analizo vsebnosti vzorca. Omejitev metode  $\mu$ -PIXE je doseg v globino, ki navadno znaša nekaj 10  $\mu\text{m}$ , in smo zato omejeni na analizo vzorcev blizu površine. Za analizo elementov v bioloških tkivih je zelo pomembna priprava vzorcev, saj med pripravo ne sme priti do prerazporejanja elementov. Najprimernejše je hitro zamrzovanje in nato dehidracija vzorcev, brez uporabe kemičnih fiksativov in kriosubstituentov, saj le-ti vplivajo na porazdeljevanje določenih elementov, pa tudi na končne izmerjene koncentracije, saj med postopkom fiksacije lahko prihaja do spiranja elementov in kontaminacije s fiksativi (Vogel-Mikuš in sod., 2009).

#### **2.6.4 Laserska ablacijska masna spektroskopija z induktivno sklopljeno plazmo (LA-ICP-MS)**

Induktivno sklopljena plazma (ICP) je najpogosteje uporabljen plazemski izvor v emisijski in masni spektrometriji. ICP izvor je sestavljen iz treh koncentričnih kvarčnih cevi, skozi katere teče tok argona, ki generira plazmo, deluje kot izolator in kot nosilec vzorca. Ker je temperaturni profil plazme enoten, je lastnost umeritvenih krivulj linearnost v območju šestih velikostnih redov. Prednosti ICP so, da atomizacija poteka v kemijsko inertni atmosferi argona, ki preprečuje nastanek oksidov.

Induktivna sklopljena plazma z masno spektrometrijo (ICP-MS) izrablja zmožnost ICP izvora iz argona za učinkovito tvorbo enojno nabitih ionov iz elementarnih snovi v vzorcu. Ti ioni so nato usmerjeni v masni spektrometer, kjer separacija ionov poteka z ločevanjem glede na njihova razmerja mase z nabojem ( $m/z$ ). Z masno spektroskopijo, ki sloni na laserski ablaciji (LA-ICP-MS) lahko izvajamo direktno trdno vzorčenje raznovrstnih anorganskih ali organskih materialov s pomočjo laserskega mikrožarka (s premerom od 2 do 200  $\mu\text{m}$ ) s takojšnjo elementno detekcijo z ICP-MS. Zmožnosti sistema LA-ICP-MS nam omogočajo izvajanje praktično nedestruktivnih mikroanaliz z visoko prostorsko ločljivostjo (za površinsko in globinsko profiliranje) v nizkem koncentracijskem območju večine elementov periodnega sistema. Prednosti LA-ICP-MS so večelementnost, hitrost analize, široko linearno delovno območje, možnost sklopitve s separacijskimi tehnikami, možnost analize mikro in makro komponent iz istega vzorca.

#### **2.6.5 Rentgenska absorpcijska spektroskopija (XAS)**

Napravam, s pomočjo katerih pospešujemo nabite delce (npr. elektrone) do visokih hitrosti s pomočjo usklajenih električnih in magnetnih polj v vakuumu, imenujemo pospeševalniki oz. sinhrotroni (SR). V sinhrotronu krožijo delci v vakuumski cevi po obodu in svetloba nastaja pri zavijanju elektronov v magnetnem polju, ko elektroni izgubljeno energijo in jo

v obliki fotonov različnih valovnih dolžin izsevajo v okolico. SR omogoča študije kemijske speciacije elementov s pomočjo rentgenske absorpcijske spektroskopije, kar odpira nove razsežnosti v raziskavi interakcij med elementi in rastlinami na ravni organov, tkiv in celic (Ortega in sod., 2009; Punshon in sod., 2005).

Sinhrotronska rentgenska absorpcijska spektroskopija je močno raziskovalno orodje za preučevanje atomske in molekulske strukture materialov (Wong in sod., 1984; Vogel-Mikuš in sod., 2010, 2012). Pri metodah rentgenske absorpcijske spektrometrije merimo absorpcijski koeficient v odvisnosti od energije fotonov. Strukturo, ki je v energijskem območju do približno 50 eV od absorpcijskega roba imenujemo bližnja struktura absorpcijskega roba oz. XANES. Iz strukture XANES lahko dobimo informacije o valenčnem stanju atoma, tipu ligandov in simetriji koordinacijske okolice atoma. Obliko absorpcijskega spektra v okolici absorpcijskega roba lahko uporabljamo kot prstni odtis (»fingerprint metoda«), v katerem prepoznavamo tipične vezavne oblike (Wong in sod., 1984). Drobna struktura, ki se razteza približno od 50 eV do 1000 eV nad robom, pa se imenuje podaljšana struktura rentgenskih robov oz. EXAFS. Z analizo signala EXAFS lahko ločimo prispevke posameznih lupin sosedov ter tako izvemo informacije o vrsti sosednjih atomov ter njihovi razdalji od centralnega atoma (Vogel-Mikuš in sod., 2012).

### **2.6.6 Elektronska difrakcija (ED)**

Uporablja značilnosti valovanja elektronov in njihovega sipanja na podlagi interakcij z naboji elektronov in jedra (elektrostatske interakcije). Elektronska difrakcija je podobna metodi rentgenske ali nevtronske difrakcije za preučevanje fine strukture trdnih kristaliničnih materialov. Metodo uporabljamo v kombinaciji s presevnim elektronskim mikroskopom (TEM) oz. vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM). Preučevan vzorec je običajno množica kristalov, ki so obrnjeni v poljubne smeri. Kristalne plasti delujejo kot uklonske mrežice, ki sipajo elektrone pod različnimi koti. Vsaka kristalna ravnina posameznega kristala siplje elektrone v drugo smer, vendar vse enakovredne ravnine sipljejo za enak kot. Zaradi periodičnosti kristala pride do interferenc sipanja, v določenih smereh do ojačitve, v drugih smereh pa do oslabitve. Rezultat so koncentrični krogi, njihov polmer pa ustreza sipalnemu kotu posamezne kristalne ravnine. Če poznamo kote, pod katerimi se elektroni sipljejo, lahko izračunamo razmik med atomi v kristalu in celo ugotovimo delež posameznih kristalov v vzorcu. Tako lahko določimo relativno kvalitativno in kvantitativno sestavo preučevanih vzorcev.

### **2.6.7 Tekočinska kromatografija z visoko ločljivostjo (HPLC)**

Tekočinska kromatografija je analizna tehnika, ki ločuje raztopljen vzorec v topilu in temelji na detekciji posameznih komponent vzorca s ciljem kvalitativne in kvantitativne določitve. Metoda temelji na porazdelitvi molekul med stacionarno in tekočo fazo, zaradi selektivnega zadrževanja komponent. Ločitev komponent vzorca poteka tako, da vzorec vbrizgamo v sistem in spiramo z mobilno fazo, ki jo predstavlja izbrano topilo.

Komponente se porazdelijo med topilom (mobilno fazo) in nosilcem oz. kolono (stacionarno fazo), ki ga predstavlja kolona HPLC. Na koloni se molekule ločijo in porazdelijo ter se ločeno izločijo iz kolone. Tam jih zaznamo z detektorji, katerih signali predstavljajo kromatograme s kromatografskimi vrhovi. Ploščina pod kromatografskim vrhom je proporcionalna koncentraciji in podaja kvantitativno informacijo ob primernem referenčnem vzorcu.



### 3 ENDOFITSKE GLIVE SEMEN AJDE

Preučili smo časovno dinamiko populacij gliv v semenih navadne in tatarske ajde. Po površinski sterilizaciji semen smo izolirali endofitske glive v treh časovnih točkah, takoj po žetvi semen ter 6 in 12 mesecev po njej. Glive smo opisali in izvedli molekulsko identifikacijo, ovrednotili njihovo hitrost rasti in sintezo zunajceličnih encimov ter na podlagi številčnosti gliv določili, katere glive prevladujejo v vsaki izolacijski točki in izračunali stopnjo kolonizacije semen. Preučili smo tudi vpliv izbranih glivnih izolatov na kalitev semen navadne ajde, na rast in razvoj kalic ter na vsebnosti sekundarnih metabolitov (fenolov, flavonoidov in taninov) v kalicah.

#### 3.1 MATERIALI IN METODE

##### 3.1.1 Izolacija gliv iz semen ajde in testiranje vpliva teh gliv na kalitev semen in razvoj kalic

V naši raziskavi smo uporabili semena navadne ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench) in tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) iz mlina Rangus (Otočec, Slovenija; 233 m nadmorske višine). Semena obeh vrst so vzgojili na sosednjih poljih (navadna ajda 45,820681°S in 15,334260°V ter tatarska ajda na 45,819977°S in 15,334947°V), v letih 2012 in 2013. Spreminjanje diverzitete gliv v času smo spremljali z izolacijo endofitskih gliv iz semen obeh vrst ajd v treh izolacijskih točkah, ob žetvi semen (0 mesecev skladiščenja semen), po 6 mesecih in 12 mesecih skladiščenja v suhih razmerah (38 % zračne vlage) pri sobni temperaturi. Pridelek tatarske ajde v letu 2013 zaradi neugodnih okoljskih pogojev ni uspel, zato podatkov o glivni kolonizaciji semen tatarske ajde v letu 2013 nimamo. Ob vsaki časovni točki izolacije je kaljivost semen bila večja od 80 %.

##### 3.1.2 Postopek izolacije gliv, pogostost kolonizacije semen in zastopanost glivnih rodov

Po predhodni 20-minutni površinski sterilizaciji semen v raztopini 30 % vodikovega peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) z dodanima 2 kapljicama detergenta Tween 80, smo semena prečno razpolovili s sterilnim skalpelom in inkubirali 2 do 4 tedne na plošči 2 % krompirjevega dekstroznega agarja (PDA) z dodanim antibiotikom kloramfenikol (50 mg l<sup>-1</sup>) pri 24 °C v temi. Glivne izolate smo večkrat zaporedno precepili do posameznih micelijev, dokler micelij ni bil čist. Vse izolate smo vizualno pregledali pod lupo in jih združili v skupine na osnovi morfološkega videza.

Pogostnost kolonizacije semen in zastopanost glivnih rodov v času smo izračunali po enačbi (1) in (2), in sicer:

$$\text{pogostost kolonizacije (\%)} = \left( \frac{\text{število koloniziranih semen}}{\text{število vseh semen}} \right) \times 100 \quad \dots (1)$$

$$\text{zastopanost glivnih rodov (\%)} = \left( \frac{\text{število glivnih izolatov}}{\text{število vseh semen}} \right) \times 100 \quad \dots (2)$$

### 3.1.3 Morfološki opis in molekulska identifikacija gliv

Z morfološko preiskavo izolatov, ki je vključevala opis barve, roba, oblike in ustroja kolonije micelija, smo opisali sedem glivnih skupin. Hitrost rasti gliv ( $\text{mm dan}^{-1}$ ) smo določili po inokulaciji PDA plošče z micelijem znane površine.

Glede na dostopno število izolatov na morfološko skupino, smo za molekulsko identifikacijo gliv naključno izbrali do štiri izolate na skupino. Po navodilih proizvajalca smo glivno genomsko deoksiribonukleinsko kislino (DNK) izolirali s pomočjo GenElute<sup>®</sup> kompletov (Sigma) za izolacijo rastlinske genomske DNK. Pomnoževanje ITS regije ribosomalne DNK gliv smo izvedli s tehniko verižne reakcije s polimerazo (PCR) v napravi za PCR (MJ Research) z uporabo polimeraze Taq DNA (Promega) in parom ITS1f/ITS4 začetnih oligonukleotidov. Reakcijske mešanice in pogoje PCR smo sledili iz raziskave Likar in Regvar (2013). Čiščenje in sekvenciranje produktov PCR so izvedli v podjetju Macrogen (Nizozemska). Za identifikacijo izolatov, smo nukleotidna zaporedja podvrgli Blast algoritmu Ameriškega nacionalnega centra za biotehnološko dokumentacijo (NCBI) in jih primerjali z nukleotidnimi zaporedji iz podatkovnih zbirk. Zaporedja smo analizirali z algoritmom združevanja sosedov in izrisali filogenetsko drevo s programsko opremo MEGA 5.

Iz vsake skupine gliv smo nato izbrali po enega predstavnika za identifikacijo na ravni vrste po kloniranju s p-GEMT-Easy vektorskim sistemom (Promega, Madison, WI, ZDA). Nazadnje smo glivne izolate deponirali v glivno banko Laboratorija za fiziologijo rastlin, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani, Slovenija. Za vse nadaljnje poskuse je bil izbran le en predstavnik za vsak rod, z izjemo *B. cinerea*, kjer smo zaradi morfološke raznolikosti uporabili 2 glivna izolata, enega iz skupine I in enega iz skupine II.

### 3.1.4 Zunajcelična encimska aktivnost gliv

Izbranim glivnim izolatom smo s presevnimi encimskimi testi določili amilazno, lipazno, polifenol oksidazno, proteazno in celulazno encimsko aktivnost. Vsi testi so bili kvalitativni in kvantitativni in so temeljili na uporabi trdnega agar gojišča s substratom za razgradnjo z omenjenimi encimi. Košček micelija (7 mm) iz roba enotedenskega micelija smo inokulirali na sredino vsake plošče in jih hranili v temi pri sobni temperaturi ter fotografirali na 5. in 14. dan po inokulaciji. Cono razbarvanosti oz. obarvanosti ( $\text{mm}^2$ ) (odvisno od testa) okoli micelija smo izmerili na 5. dan rasti z uporabo BioPhotonics ImageJ programske opreme (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Podatke smo predstavili v odstotkih površine obarvanja/razbarvanja v razmerju do površine micelija (%). Vsak encimski test smo izvedli v 10 ponovitvah na glivo, medtem ko so prazne plošče brez micelijev služile kot kontrola.

Gojišče za amilazno aktivnost je vsebovalo škrob in 5. dan po inokulaciji z glivo smo plošče obarvali z vodno raztopino joda (Trigiano in Ament, 2007). Za lipazno aktivnost smo uporabili modro obarvano gojišče s Spirit modrim in lipaznim reagentom (Difco)

(Trigiano in Ament, 2007). Za potrditev polifenol oksidazne aktivnosti smo gojišču dodali galno kislino (Trigiano in Ament, 2007). Proteazno aktivnost smo določili z uporabo komercialnega mlečnega agarja (Fluka Analitika) (Ningthoujam in sod., 2009). Celulazno aktivnost smo določili z uporabo modificiranega Melin-Norkrans-Marx gojišča brez glukoze in sladnega ekstrakta, z dodano dvojno količino agarja ( $20 \text{ g l}^{-1}$ ), in z 0,5 % karboksilno-metilcelulozo ( $5 \text{ g l}^{-1}$ ). Po 5. dneh smo inokulirane plošče obarvali z 0,03 % vodno raztopino barvila kongo rdeče za 10 minut, nato pa razbarvali z 1 M NaCl (Sunitha in sod., 2013).

### 3.1.5 Preučevanje interakcij med glivami

Za testiranje medsebojnih interakcij med glivnimi izolati smo se poslužili dveh vrst testov dvojnih kultur in vitro. Pri obeh smo izmerili površino micelija kot odgovor na neposredno izpostavljenost različnim micelijem na trdnih gojiščih, oz. posredno izpostavljenost morebitnim hlapnim organskim spojinam, ki jih proizvajajo glive.

Za neposredne interakcije med glivami smo se poslužili testa direktnih dvojnih kultur, kjer smo koščke micelijev (6 mm) dveh različnih glivnih izolatov izpostavili na plošči PDA nasproti drug drugemu v razdalji 7 cm (Li in sod., 2003). Plošče PDA inokulirane z dvema koščkoma iste glive smo uporabili kot kontrolo za dano glivo. Vsak par gliv je imel po pet ponovitev. Inokulirane plošče smo inkubirali 2 tedna pri  $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$  v temi. Zaradi različnih hitrosti rasti gliv smo plošče pregledali in fotografirali 6., 8. in 14. dan po inokulaciji. Površino micelija ( $\text{mm}^2$ ) smo izmerili na 8. dan rasti, z uporabo BioPhotonics ImageJ programske opreme (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Za posredno izpostavljenost gliv smo se poslužili metode "sendviča dveh plošč" (Zhang in sod., 2014). Košček micelija (6 mm) en teden stare glive smo inokulirali na ploščo PDA in jo inkubirali pri  $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$  v temi. Čez teden dni smo naredili sendvič plošč tako, da smo svežo ploščo PDA inokulirali s koščkom micelija drugega glivnega izolata, ki smo nato namestili obratno nad prvo ploščo z enotedensko glivo oz. čez prazno ploščo PDA v primeru kontrole. Vsaka glivna kombinacija je imela po šest ponovitev. Inokulirane sendviče plošč smo inkubirali pri  $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$  štiri tedne in jih fotografirali tedensko. Z izjemo hitrorastočih *B. cinerea* tipa I, kjer smo uporabili fotografije po 5. dnevu rasti, smo na fotografijah 10. dne po inokulaciji glivam določili površino ( $\text{mm}^2$ ) z uporabo programske opreme BioPhotonics ImageJ programske opreme (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

### 3.1.6 Vpliv gliv na kalitev semen in sekundarni metabolizem kalic

Učinke gliv na kalitev in razvoj kalic smo analizirali po Kirkpatrick in Bazzaz (1979). Deset površinsko steriliziranih semen navadne ajde smo imbibirali dve uri in jih sterilno namestili na rob en teden starega glivnega micelija, ki je rastla na PDA plošči. Plošče smo inkubirali v temi na  $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$  in dnevno šteli število kalečih oz. nekalečih semen. Po enem tednu smo preučili razvoj kalic, izmerili dolžino koreničic in kalice stehtali. Vsaka gliva je imela 10 plošč z 10 semeni, kot tudi kontrolne plošče (plošče PDA brez glive).

#### 3.1.6.1 Določanje vsebnosti sekundarnih metabolitov v kalicah ajde

Vsebnosti skupnih fenolnih spojin, flavonoidov in taninov smo določili z uporabo spektrofotometričnih testov. Najprej smo iz 200 mg prahu kalic ajde z 10 ml 60 % etOH preko noči na stresalniku ekstrahirali sekundarne metabolite. Ekstrakt smo nato centrifugirali pri 2000 g 10 minut in bister supernatant uporabili v sledečih protokolih. Skupne fenolne spojine smo določili z uporabo Folin-Ciocalteu reagenta in absorbanco raztopin izmerili pri 750 nm (Kreft in sod., 2013). Za določitev flavonoidov smo uporabili 5 % AlCl<sub>3</sub> v metanolu in absorbanco izmerili pri 425 nm (Kreft in sod., 2013). Vsebnost taninov v kalicah smo določili po metodi vanilin-HCl (Luthar, 1992).

#### 3.1.7 Statistična analiza podatkov

Uporabili smo analizo variance (ANOVA) s spremljajočim Duncan ali Tukey post-hoc testom ali Studentov t-test za primerjave vzorcev. Za testiranje statistično pomembnega vpliva različnih dejavnikov in njihovih interakcij smo uporabili faktorsko ANOVO. ANOVO in Studentov t-test smo izvedli s pomočjo programske opreme Statistica (Statsoft 8). Za testiranje vplive aktivnosti encimov na kalitev semen in kalic sekundarnih metabolitov smo uporabili multivariatno regresijsko analizo. Barvne diagrame z dodanim drevesom podobnosti na osnovi analize grozdov smo uporabili za preučevanje grupiranja oz. razporejanja različnih podatkov med tretmaji. Predhodno smo vrednosti Z-normalizirali, in sicer smo od vrednosti odšteli povprečno vrednost preučevanega dejavnika in nato delili s standardnim odklonom preučevanega dejavnika. Multivariatno regresijsko metodo in barvne diagrame z dodanim drevesom podobnosti na osnovi analize grozdov smo izvedli z R programsko opremo, in sicer s pomočjo MASS in gplots paketov.

### 3.2 REZULTATI

#### 3.2.1 Morfološki opis in identifikacija gliv

Glivne izolate iz semen navadne in tatarske ajde smo morfološko opisali in jih razvrstili v sedem različnih morfoloških skupin. Iz vsake skupine smo izbrali reprezentativnega predstavnika in opisali njegove makromorfološke lastnosti (**Priloga A**). Miceliji izolata *Aureobasidium pullulans* so bili na ploščah PDA okrogli, ravni in gladki ter obarvani enakomerno svetlo roza. Miceliji izolata *Fusarium oxysporum* so bili hitro rastoči, filamentozni in konveksni ter bele barve z rahlim vijoličnim odtenkom. *Epicoccum nigrum* miceliji so bili filamentozni in ploski, z gladkimi belimi robovi in proti sredini oranžno ali rumeno obarvane. Miceliji *Stereum hirsutum* so bili nitasti, beli z rahlo oranžnim odtenkom na sredini. Na plošči PDA so bili miceliji *Botrytis cinerea* I okrogli, filamentozni in dvignjeni ter bele barve z vlaknastim robom, medtem ko so bili miceliji izolata *Botrytis cinerea* I morfološko različni in smo jih uvrstili v drugo skupino, namreč bili so nepravilne oblike, ploski z krpastimi robovi in bele do sive barve. S staranjem so izolati *B. cinerea* II tvorili črne sklerocije. Miceliji *Alternaria alternata* so bili okrogli,

nitasti, rahlo dvignjeni in spreminjajoče se barve, od bele in modro-sive do sive in črne v sredini.

Z molekulsko identifikacijo naključnih izolatov iz vsake morfološke skupine smo določili šest različnih glivnih rodov (**Preglednica 4**). Molekulsko smo identificirali 23 izolatov (GenBank št. zaporedij KP985736-KP985758) in njihova nukleotidna zaporedja preverili ter vpisali v podatkovno bazo genskih zaporedij GenBank.

**Preglednica 4:** Molekulska identifikacija izbranih glivnih izolatov iz semen navadne ajde.

**Table 4:** Molecular identification of the selected fungal strains isolated from the common buckwheat seeds.  
 Ujemanje s podatkovno zbirko GenBank

Oznaka izolata	GenBank št. zaporedja	GenBank št. zaporedja	Tipski izolat	Podobnost (%)	Ekološka vloga <sup>a</sup>
BS1	KP985736	FJ150906	<i>Aureobasidium pullulans</i> CBS 584.75	99	E, S, P
BS2	KP985737	KR094464	<i>Fusarium oxysporum</i> G405 <sup>b</sup>	100	E, S, P, N
BS4	KP985739	FJ426996	<i>Epicoccum nigrum</i> CBS 173.73	99	E, S, P
BS7	KP985742	FN539063	<i>Stereum hirsutum</i> Isolate oak16 <sup>b</sup>	99	S, P
BS9 <sup>c</sup>	KP985744	KF859918	<i>Botrytis cinerea</i> CBS 131.28	99	E, S, P, N
BS10 <sup>c</sup>	KP985745	KF859918	<i>Botrytis cinerea</i> CBS 131.28	99	E, S, P, N
BS14	KP985749	KF465761	<i>Alternaria alternata</i> CBS 916.96	100	E, S, P, N

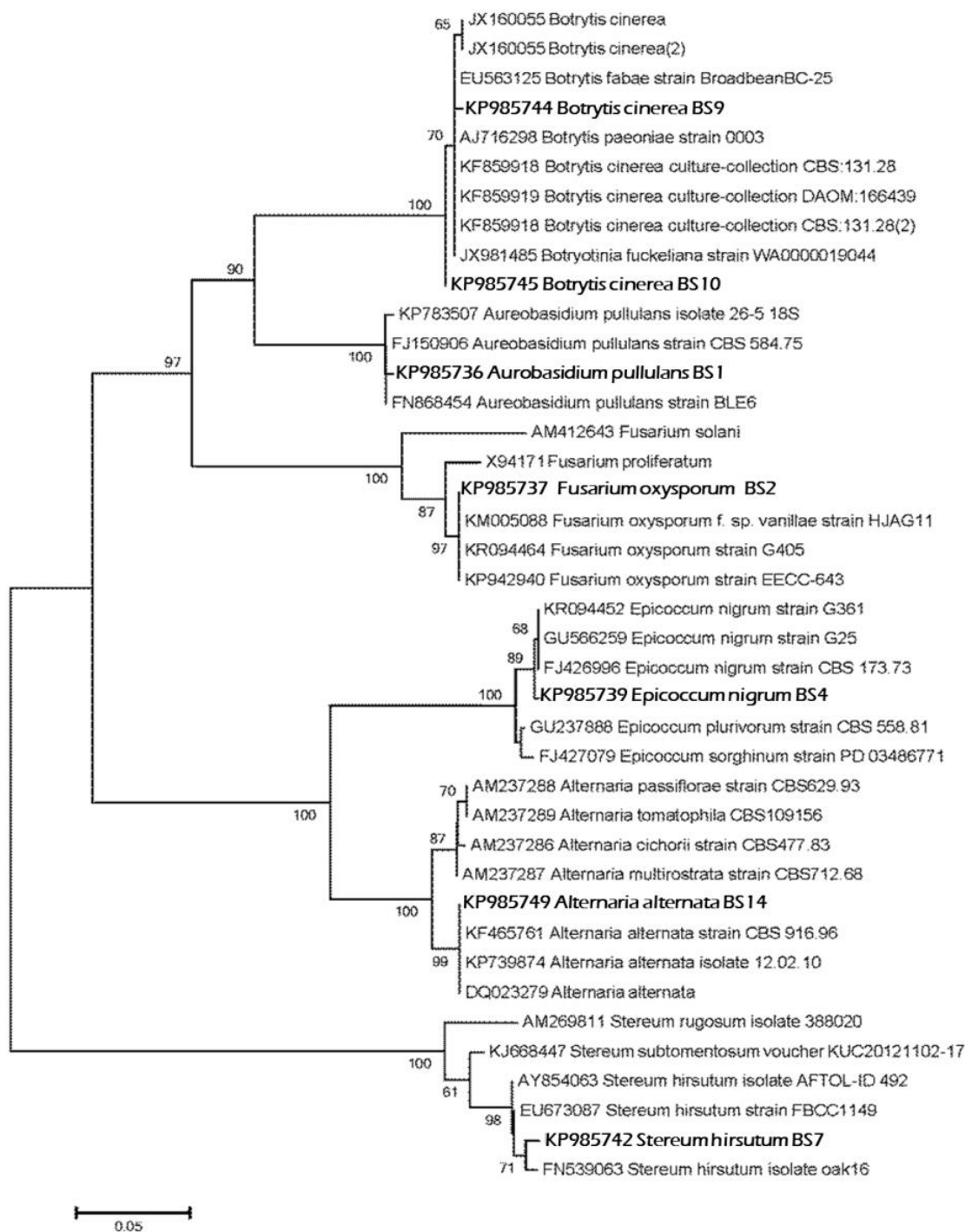
<sup>a</sup>E, endofit; S, saprofit; P, patogen; N, nekrotrof.

<sup>b</sup>Glivni sev, ki se najbolj ujema z zaporedjem našega izolata.

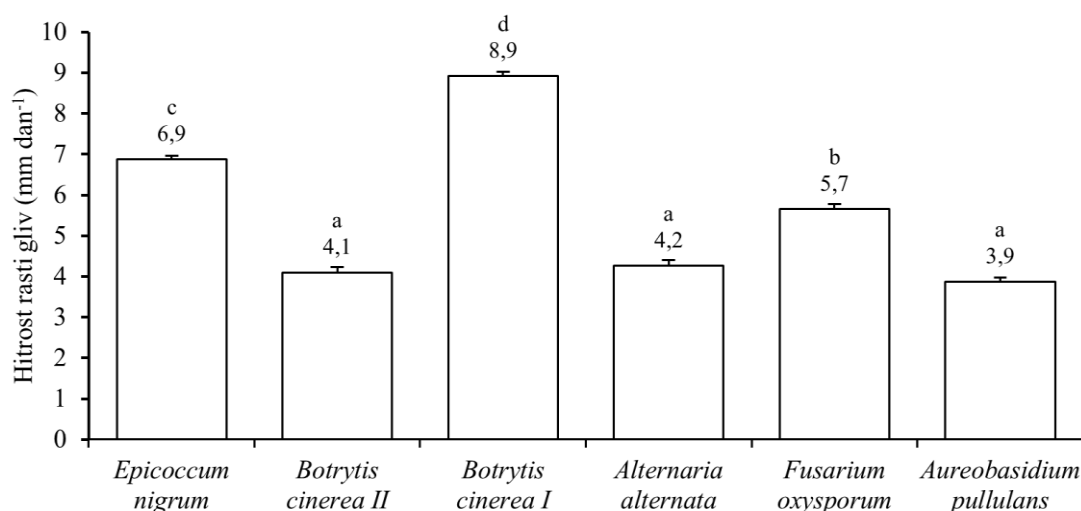
<sup>c</sup>Izolat BS9 je *B. cinerea* I in BS10 *B. cinerea* II.

Obenem smo izrisali filogenetsko drevo, s katerim smo potrdili rezultate primerjav zaporedij, ki so prikazana v Preglednici 4 (**Slika 3**). Vse glive so se izkazale kot kozmopolitanske in smo jih izolirali v različnih časovnih točkah izolacijskih poskusov. Z izjemo ene glive iz debla Basidiomycota, je vseh ostalih 198 izoliranih glivnih izolatov iz skupno 1125 semen navadne in tatarske ajde pripadalo deblu Ascomycota. Zaradi tega smo glivo *S. hirsutum*, edino Basidiomycoto, izključili iz nadaljnjih poskusov, saj smo po natančnem pregledu literature o njeni razširjenosti predvidevali, da bi bila lahko njena prisotnost posledica kontaminacije.

Hitrost rasti gliv je eden izmed pomembnih morfoloških podatkov, in sicer se je rast šestih različnih gliv, pripadajočih petim različnim vrstam, statistično značilno razlikovala (**Slika 4**). Najpočasneje so rasli izolati glive *A. pullulans*, *B. cinerea* II in *A. alternata*, katerim so sledili *F. oxysporum* in *E. nigrum* ter najhitreje rastoči *B. cinerea* I. Razlike med njimi so bile tudi več kot 2 cm v povprečnem polmeru v petih dneh rasti, kar lahko znaša ob predpostavki, da micelij raste v obliki kroga, tudi do 50 cm<sup>2</sup> razlike v površini micelija.



**Slika 3:** Filogenetsko drevo zaporedij izbranih glivnih izolatov s tipskimi sevi in sevi najbližjih ujemanj.  
**Figure 3:** Phylogenetic tree of selected fungal isolates with reference strains and closest match.



**Slika 4:** Hitrost rasti gliv (mm dan<sup>-1</sup>) na ploščah PDA (povprečje ± SN; n=8). Različne črke (a-d) označujejo statistično značilne razlike med glivnimi izolati (Duncanov test,  $p < 0,05$ ).

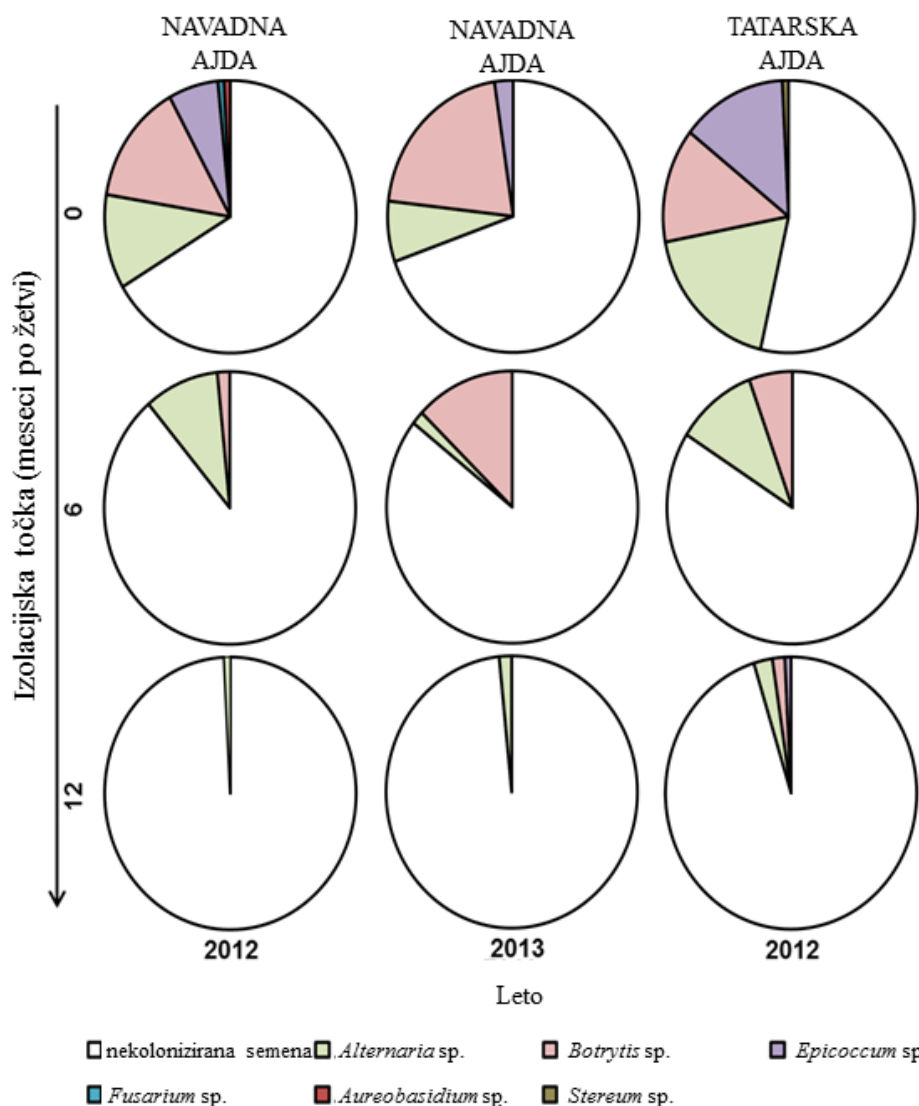
**Figure 4:** Fungal growth rate (mm day<sup>-1</sup>) on PDA plates (mean ± SE; n=8). Different letters (a-d) indicate significant differences between fungal isolates (Duncan test,  $p < 0,05$ ).

### 3.2.2 Zastopanost glivnih rodov v semenih ajde

Semena navadne in tatarske ajde imajo pod luščino obsežno tkivo, ki predstavlja primerno okolje za glivne kolonizatorje, zaradi česar so semena teh vrst primerni kandidati za raziskave prenosa gliv med generacijami. V naši raziskavi smo odkrili veliko število glivnih izolatov, ki so povezani z notranjimi tkivi semen ajde ter uspešno ovrednotili njihovo prisotnost oz. pogostost v semenih ob žetvi in 6 ter 12 mesecev kasneje (**Slika 5**).

V primeru semen obeh vrst, navadne in tatarske ajde pridelka 2012, se je frekvence koloniziranih semen zmanjševala s časom skladiščenja. Glive smo izolirali iz 33 % semen navadne ajde ob žetvi, delež katerih se je zmanjševal tekom skladiščenja, in sicer 11 % koloniziranih semen po 6 mesecih skladiščenja in 1 % koloniziranih semen po 12 mesecih skladiščenja (**Slika 5**). Pogostost kolonizacije v semenih tatarske ajde je bila nekoliko višja v vseh izolacijskih točkah, in sicer 46 % koloniziranih semen ob žetvi, 16 % po 6 mesecih skladiščenja in 5 % po enem letu skladiščenja (**Slika 5**).

Ob žetvi so bili izolati rodov *Alternaria* sp., *Botrytis* sp. in *Epicoccum* sp. prevladujoče glive v semenih obeh vrst ajd in v obeh letih pridelka (**Slika 5**). V pridelkih različnih rastnih sezon semen navadne ajde, 2012 in 2013, so bile statistično značilne razlike v pogostosti gliv rodu *Alternaria* sp. in *Botrytis* sp. (**Preglednica 5, Priloga B**). Primerjava okoljskih pogojev (**Priloga C**) je pokazala, da je bilo leto 2013 precej bolj suho in manj vlažno, še posebej v zadnjih 2 mesecih rastne sezone ajde (september, oktober). Naši podatki nakazujejo, da je suha sezona spodbujala razvoj gliv *Botrytis* sp. nad glivami *Alternaria* sp. in obratno.



**Slika 5:** Raznolikost gliv in njihova dinamika v semenih ajde. Glive smo izolirali 0, 6 in 12 mesecev po žetvi pridelka iz semen navadne ajde (2012, 2013) in tatarske ajde (2012). Grafi prikazujejo deleže semen (%) koloniziranih z glivami (različne barve predstavljajo različne rodove, glej legendo) in tiste, ki niso bila kolonizirana (bela) (n=125).

**Figure 5:** Fungal diversity and dynamics of buckwheat seeds. Fungi were isolated 0, 6 and 12 months after the harvest from the common buckwheat seeds (2012, 2013) and Tartary buckwheat seeds (2012). The pie charts show the portions of the seeds (%) that were colonised with fungi (different colours represents different fungal genera, see the legend) and those that were not colonised (white) (n=125).

Obdobje skladiščenja je močno vplivalo na pogostost gliv rodov *Botrytis* sp., *Alternaria* sp. in *Epicoccum* sp. v semenih obeh vrst ajde (**Preglednica 5, Priloga B**). Glive *Epicoccum* sp. so imele najhitrejši padec pogostosti v skladiščenih semenih, katerim so sledile glive *Botrytis* sp., ki so bile še vedno prisotne v drugi izolacijski točki (6 mesecev po žetvi), niso pa bile prisotne v zadnji (12 mesecev po žetvi), kjer smo izolirali le izolate glive *A. alternata* (z izjemo semen tatarske ajde pridelka leta 2012). Vrsta ajde je statistično



značilno vplivala na pogostost vseh glivnih rodov. V analizi posamičnih glivnih rodov pa le na glivo *Epicoccum* sp. ( $p \geq 0,03778$ ; **Preglednica 5, Priloga B**).

**Preglednica 5:** Dejavniki, ki vplivajo na kolonizacijo semen, analizirani s faktorsko ANOVO. Predstavljene so statistične značilnosti izbranih dejavnikov in njihovih interakcij na glivno številčnost in raznolikost (p-vrednosti, statistično značilne so v krepkem).

**Table 5:** Factors affecting seed colonisation, as analysed by factorial ANOVA. The influence of the factors and their interactions with their significance on the fungal abundance and diversity are presented (p-values, significant in bold).

a)	Vsi glivni rodovi	<i>Epicoccum</i> sp.	<i>Botrytis</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.
Vrsta ajde	<b>0,034</b>	<b>0,038</b>	0,361	0,156
Čas izolacije	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>
Vrsta ajde * čas izolacije	0,542	<b>0,043</b>	0,535	0,450

b)	Vsi glivni rodovi	<i>Epicoccum</i> sp.	<i>Botrytis</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.
Čas izolacije	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,002</b>
Leto pridelka	0,932	0,125	<b>0,004</b>	<b>0,042</b>
Čas izolacije * leto pridelka	0,700	0,096	0,074	0,146

### 3.2.3 Izvencelična encimska aktivnost gliv

Vsem izbranim šestim glivnim izolatom smo v kvalitativnih in kvantitativnih presevnih testih določili prisotnost in intenziteto sinteze izbranih izvenceličnih litičnih encimov, ki lahko pomembno prispevajo k patogenosti glive na rastlino in uspešnost njene kolonizacije. Ti encimi so bili amilaza, lipaza, proteaza, polifenol oksidaza in celulaza.

Prav vsak glivni izolat sintetizira vsaj enega ali več izbranih encimov, ki se izločajo v zunajcelični prostor (**Preglednica 6**). Aktivnost sinteze encima smo zaradi različne hitrosti rasti gliv predstavili v odstotkih (%), ki predstavljajo razmerje med obarvano/razbarvano površino gojišča in površino glivnega micelija. Glivni izolat *E. nigrum*, je bil edini predstavnik glive, ki je sintetiziral le en tip encima, lipazo. Obenem je bil tudi edin izmed izolatov, ki ni bil sposoben razgraditi substrata karboksilno-metilcelulozo, iz česar sklepamo, da v svoj zunajcelični prostor ni izločil celulaze in ni sposoben sinteze le-te. Izolat *A. pullulans* je imel najmočnejšo celulazno aktivnost, kateremu so sledili *A. alternata*, *B. cinerea* II, *F. oxysporum* in *B. cinerea* I. Zanimiv podatek je, da sta se morfološko različna izolata, iste vrste, *B. cinerea*, razlikovala v sintezi celulaze za en velikostni razred. Izolata sta se tudi statistično značilno razlikovala v sposobnosti sinteze lipaze, saj je bil izolat *B. cinerea* II edin izmed testiranih izolatov, ki ni bil sposoben razgraditi lipidov v gojišču (**Preglednica 6**). Sicer so si v lipazni aktivnosti izolati sledili od večje k manjši v sledečem vrstnem redu: *A. alternata*, *E. nigrum*, *F. oxysporum*, *A. pullulans* in *B. cinerea* I. Noben izmed testiranih izolatov ni bil sposoben razgraditi beljakovin v komercialnem mlečnem agarju (**Preglednica 6**). V testiranju sposobnosti razgradnje galne kisline, kot posledica sinteze in izločanja polifenol oksidaze v zunajcelični prostor, sta se izolata *A. pullulans* in *E. nigrum* izkazala za nesposobna razgradnje, medtem ko je *A. alternata* ponovno pokazala največjo aktivnost sinteze

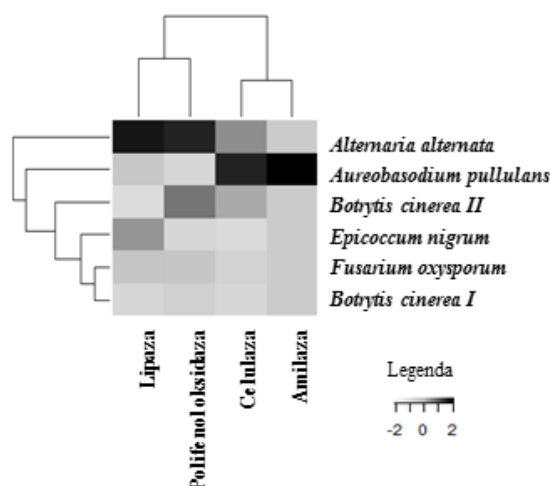
izbranega encima. Prav tako sta se izolata *B. cinerea* ponovno razlikovala v encimski aktivnosti polifenol oksidaze za en velikostni razred, in sicer *B. cinerea* II z višjo aktivnostjo kot *B. cinerea* I. Vse glive sposobne izločanja polifenol oksidaze lahko uvrstimo v skupino nekrotrofnih gliv, medtem ko noben izmed ne-nekrotrofnih izolatov ni pokazal sposobnosti sinteze izvencelične polifenol oksidaze (**Preglednica 4**). Med vsemi izbranimi glivnimi izolati je bil le *A. pullulans* sposoben razgradnje škroba s sintezo amilaze (**Preglednica 6**).

**Preglednica 6:** Presevni testi glivne sinteze izvenceličnih encimov (povprečje ± SN; n=6). Različne črke (a-e) označujejo statistično značilne razlike med encimskimi aktivnostmi glivnih izolatov (Duncanov test,  $p < 0,05$ ).

**Table 6:** Fungi screened for extracellular enzyme synthesis (mean ± SE; n=6). Different letters (a-e) indicate significant differences between the fungal isolates (Duncan test,  $p < 0.05$ ).

Glivni izolat	Glivna aktivnost sinteze encima (%)				
	Celulaza	Lipaza	Polifenol oksidaza	Amilaza	Proteaza
<i>E. nigrum</i>	0 a	265,6 ± 15,4 c	0 a	0 a	0
<i>B. cinerea</i> I	14,2 ± 0,2 ab	30,6 ± 1,6 ab	46,4 ± 3,8 b	0 a	0
<i>B. cinerea</i> II	148,7 ± 7,9 c	0 a	349,4 ± 10,1 d	0 a	0
<i>A. alternata</i>	188,7 ± 13,3 d	528,3 ± 87,6 d	545,2 ± 32,6 e	0 a	0
<i>F. oxysporum</i>	30 ± 0,9 b	131,8 ± 5,2 b	119,4 ± 10,0 c	0 a	0
<i>A. pullulans</i>	343,9 ± 15,2 e	122,2 ± 6,9 b	0 a	34,5 ± 0,6 b	0

Na osnovi hierarhičnega grupiranja podatkov sposobnosti sinteze in aktivnosti sinteze izvenceličnih encimov lahko povzamemo, da se glive grupirajo na podlagi dveh parov encimov, in sicer encimov lipaze in polifenol oksidaze ter encimov celuloze in amilaze (**Slika 6**). Na podlagi teh grupiranj lahko tudi sklepamo o glivnem vzorcu okužbe rastline, ki se med različnimi glivnimi vrstami razlikuje. Glivni izolati se grupirajo posredno glede na hitrost rasti, saj je bila le-ta uporabljena za normalizacijo vrednosti aktivnosti sinteze encimov.



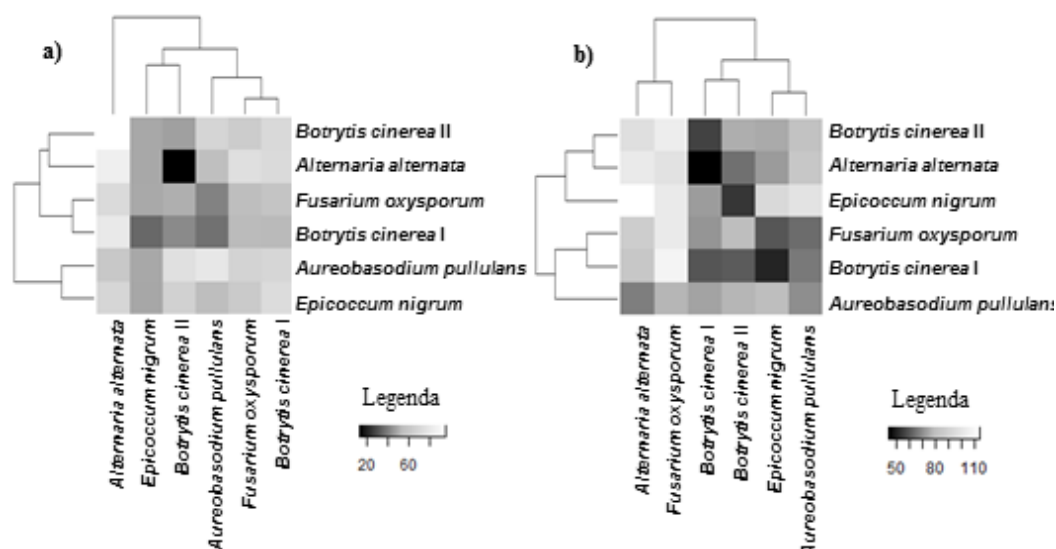
**Slika 6:** Aktivnost sinteze zunajceličnih encimov med izbranimi glivami, prikazana z barvnim diagramom z dodanim drevesom podobnosti na osnovi analize grozdov. Predstavljeni podatki so Z-normalizirani in centrirani, beli kvadrati predstavljajo nižje in črni višje vrednosti (glej legendo).

**Figure 6:** Heatmap of the tested extracellular enzyme production among the selected fungi. Presented data are Z-normalized and centred, white squares represent lower values, while black higher values (see the legend).

### 3.2.4 Medsebojne interakcije med glivami

Medsebojne interakcije gliv, ki kolonizirajo semena ajde, smo testirali v obliki dvojnih kultur in vitro. Z namenom, da bi ocenili možne interakcije med izolati in vpliv le-teh na pojavnost oz. zmanjševanje prisotnosti gliv v semenih med skladiščenjem, smo testirali tako neposredne kot posredne interakcije med glivami. Test neposrednega vpliva je predstavljal stik micelija z micelijem na isti agarni plošči, medtem ko smo vpliv hlapnih organskih spojin ocenjevali z metodo sendviča dveh agarnih plošč. Rast izolatov obeh testov smo predstavili v obliki barvnega diagrama z dodanim drevesom podobnosti na osnovi analize grozdov deleža rasti kontrole (**Slika 7**).

Glivni izolati so se razlikovali v odzivu na neposredno prisotnost micelija drugega izolata, s spremenjeno pigmentacijo ali inhibirano rastjo (**Priloga D**). Edini glivni izolat, ki svojega odziva na prisotnost druge glive ni izrazil v obliki spremenjene obarvanosti je bil *B. cinerea* I.



**Slika 7:** Glivne medsebojnih interakcije v a) testu dvojnih kultur neposredne izpostavljenosti (vrednosti predstavljajo relativne površine gliv (%) glede na kontrolo, ki je površina izolata izpostavljenega drugemu miceliju enakega izolata) in v b) testu dvojnih kultur posredne izpostavljenosti hlapnim organskim spojinam gliv (vrednosti predstavljajo relativne površine gliv (%) glede na kontrolo, ki je površina izolata izpostavljenemu neinokuliranemu gojišču), prikazane z barvnima diagramoma z dodanim drevesom podobnosti na osnovi analize grozdov. Beli kvadrati predstavljajo spodbujeno rast glive in črni zavirano rast glive (glej legendo). Predstavljeni so odzivi gliv napisanih na dnu, na vpliv gliv napisanih na desni strani.

**Figure 7:** Heatmaps of the fungal interactions in a) direct dual-culture antagonism bioassay (values are presented as relative fungal areas (%) to control, which is area of isolate opposite to mycelia of the same isolate) and for b) indirect dual-culture antagonism through exposure to fungal volatile organic compounds (values are presented as relative fungal areas (%) to control, which is area of isolate above non-inoculated media). White squares represent growth stimulation and black growth inhibition (see the legend). The heatmaps indicate responses of the strains listed along the bottom on the influences of the strains listed on the right.

Rast izolatov v testu neposredne izpostavljenosti smo predstavili v obliki barvnega diagrama z dodanim drevesom podobnosti na osnovi analize grozdov deleža rasti kontrole, katero je predstavljala agarna plošča z dvema micelijema enakega izolata (**Slika 7a**).

Najmočnejše zaviralne učinke na rast večine drugih izolatov sta imela *B. cinerea* I in *F. oxysporum*, medtem ko sta bila izolata *A. pullulans* in *E. nigrum* manj zaviralna (**Slika 7a**). Najvišjo stopnjo specifičnega neposrednega antagonizma je pokazal izolat *A. alternata* na rast *B. cinerea* II (86 % inhibirana rast, **Priloga E1**). *A. alternata* je bil tudi izolat, ki je bil najmanj prizadet in inhibiran ob prisotnosti drugih izolatov na agarju (povprečje inhibicije rasti 22 %). Obratno je bil izolat *E. nigrum* splošno najobčutljivejši ter najbolj inhibiran s strani drugih izolatov (povprečje inhibirane rasti je 53 %).

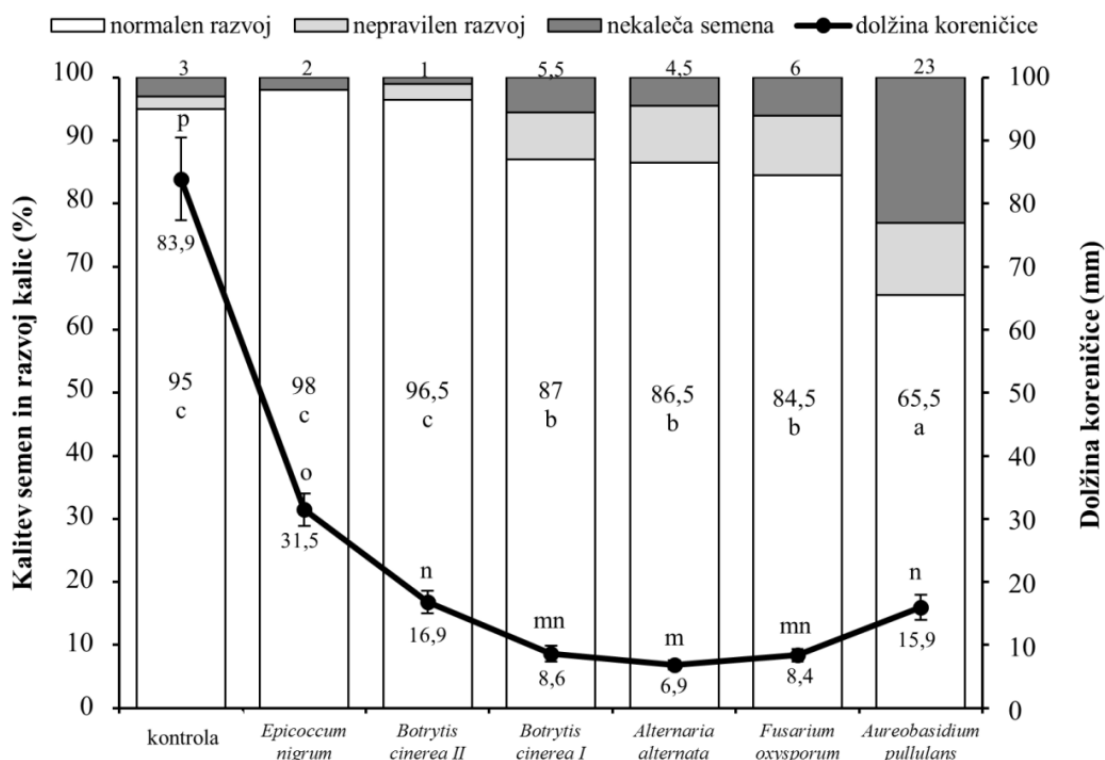
Nasprotno je v testu dvojnih kultur posrednega vpliva, ki se nanaša na sintezo hlapnih organskih spojin, izolat *A. pullulans* imel najširši razpon vpliva na druge izolate ter je deloval zmerno zaviralno na njihovo rast. Zanimiv vpliv so imele hlapne organske spojine izolata *E. nigrum*, in sicer so spodbujale rast drugih gliv v primerjavi s kontrolo, z izjemo izolatov *B. cinerea* (**Slika 7b, Priloga E2**). Najvišjo stopnjo specifičnega posrednega antagonizma je pokazal izolat *A. alternata* na rast izolata *B. cinerea* I. Glivna izolata vrst *A. alternata* in *F. oxysporum* sta se izkazala za najmanj občutljiva na vpliv hlapnih organskih spojin drugih gliv, saj je bila njuna rast pri vseh izpostavljenostih primerljiva s kontrolo (**Slika 7, Priloga E**).

V obeh testih, posredni in neposredni izpostavljenosti, je najmočnejši antagonistični vpliv pokazal izolat *A. alternata* na oba izolata *B. cinerea*, z močnejšim zaviralnim učinkom na rast izolata II v neposredni izpostavljenosti in izolata I v posredni izpostavljenosti (**Slika 7, Priloga E**).

### 3.2.5 Vpliv gliv na kalitev semen in sekundarni metabolizem kalic

Vpliv gliv na kalitev semen navadne ajde in razvoj kalic smo ocenili na podlagi dnevnega štetja kalečih semen, razvoj kalic na podlagi njihovega izgleda in velikosti korenčice ter odzivov kalic na prisotnost različnih vrst gliv z izmerjenimi koncentracijami in preračunanimi vsebnostmi skupnih fenolov, flavonoidov in taninov v kalicah.

Pri kalitvenih poskusih nas je zanimal odziv semen navadne ajde na prisotnost glivnih izolatov različnih rodov izoliranih iz semen navadne ajde. Le-ta so imela nižjo stopnjo kaljivosti ob prisotnosti izbranih gliv *A. pullulans* (77 %), *F. oxysporum* (94 %), *B. cinerea* I (94,5 %) in *A. alternata* (95,5 %), medtem ko je bila kaljivost v prisotnosti *E. nigrum* (98 %) in *B. cinerea* II (99 %) primerljiva s kontrolo (**Slika 8**). Izločanje amilaze, celulaze in polifenolnih oksidaze je imelo statistično značilen vpliv na zmanjšano kaljivost semen, medtem ko izločanje lipaze in hitrost rasti gliv nista pokazali nobenih pomembnih učinkov (**Preglednica 7**). Najmočnejšo inhibicijo kalitve semen smo opazili v prisotnosti glive *A. pullulans*, ki je obenem tudi izolat z močno celulazno aktivnostjo in edini s sintezo amilaze (**Preglednica 6**). Slednji je pomemben dejavnik, saj škrob lahko zavzema do 70 % mase semen ajde.



**Slika 8:** Vpliv gliv na kalitev semen in razvoj kalic ter dolžino korenčiče. Kalitev in razvoj kalic (leva os) so izražene glede na delež kontrole, pri dolžinah korenčič (črne pike; desna os) pa kot izmerjeni podatki (mm). Podatki so predstavljeni kot povprečje ± SN (razvoj kalic, n=20; dolžina korenčič, n=30). Različne črke pri normalnih kalicah (a-c) in dolžini korenčič (m-p), označujejo statistično značilne razlike med kalicami, vzgojenih v prisotnosti različnih gliv (Duncanov test,  $p < 0,05$ ).

**Figure 8:** Fungal impact on the seed germination, seedling development and root length. Seed germination and seedling development (left axis) are expressed as relative to the controls, with root lengths (black dots; right axis) given as direct measures. Data are presented as mean ± SE (seedling development, n=20; root length, n=30). Different letters for normal seedling development (a-c) and root length (m-p) indicate significant differences between the seedlings grown in the presence of different fungi (Duncan test,  $p < 0,05$ ).

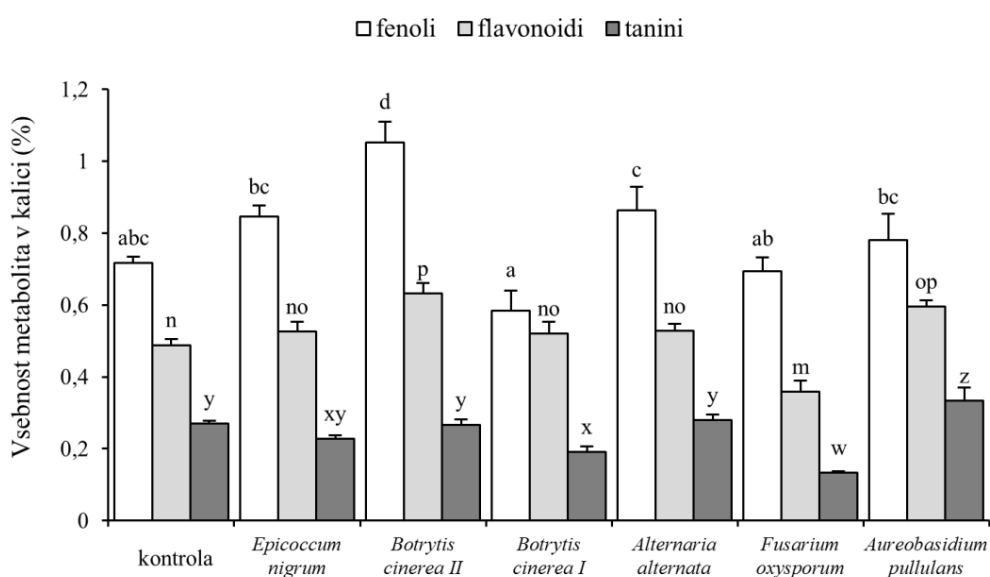
Razvoj kalic je bil oslabljen ob prisotnosti *A. pullulans* (11,5 %), *F. oxysporum* (9,5 %), *A. alternata* (9 %) in *B. cinerea I* (7,5 %), medtem ko so bili učinki *B. cinerea II* (2,5 %) zanemarljivi in nikakršni v primeru glive *E. nigrum* (**Slika 8**). Ponovno so se sinteza in izločanje amilaze, celulaze in polifenol oksidaze pokazale statistično značilen vpliv na razvoj kalic, medtem ko sinteza lipaze in sama hitrost rasti gliv na razvoj kalic nista pokazali nobenih učinkov (**Preglednica 7**). Kalice, ki so rasle v prisotnosti testiranih glivnih izolatov, so imele tudi veliko krajše korenčiče v primerjavi s kontrolnimi kalicami (**Slika 8**; črne pike). Poleg tega je bila sinteza zunajcelične celulaze edini dejavnik, ki je bil statistično značilno povezan z dolžino korenčič kalic, ki so rasle v prisotnosti izbranih izolatov (**Preglednica 7**). Dejansko se je dolžina korenčiče izkazala za najbolj občutljivo lastnost rastline pri preučevanju vpliva glivnih izolatov na kalitev semen in razvoj kalic ter se je statistično značilno zmanjšala pri vseh testiranih izolatih v primerjavi s kontrolo (**Slika 8**).

**Preglednica 7:** Pomen izločanja encimov glivnih izolatov in njihov učinek na kalitev semen in razvoj kalic ter dolžino korenčic (Studentov t-test; statistično značilni vplivi so v krepkem).

**Table 7:** Significance of effects of fungal isolate secreted enzymes and growth on seed germination, and seedling development and root length (Students' t-test; significant effects are in bold).

	Kalitev semen	Razvoj kalic	Dolžina korenčic
Celulaza	<b>0,0112</b>	<b>0,0014</b>	<b>0,0000</b>
Amilaza	<b>0,0000</b>	<b>0,0076</b>	0,5392
Polifenol oksidaza	<b>0,0000</b>	<b>0,0076</b>	0,5392
Lipaza	0,1559	0,2387	0,1359
Hitrost rasti gliv	0,2538	0,4761	0,1070

Koncentracije skupnih fenolov v kalicah, ki so rasle v prisotnosti *E. nigrum*, *B. cinerea* I, *A. alternata*, *F. oxysporum* in *A. pullulans* so bile primerljive s kontrolo (**Slika 9**). Ta rezultat nakazuje neodzivnost metabolizma skupnih fenolov kot morebitnega obrambnega odziva, na prisotnost izbranih gliv. Vsebnost skupnih fenolov v kalicah se je statistično značilno povečala le v tistih kalicah, ki so rasle v prisotnosti *B. cinerea* II, medtem ko se je vsebnost flavonoidov znatno povečala le v kalicah, ki so rasle v prisotnosti gliv *B. cinerea* II in *A. pullulans*. Koncentracije skupnih fenolov smo z multivariatno regresijsko analizo povezali s hitrostjo rasti glive (prilagojen  $R^2=0,2946$ ;  $\beta$  koeficient=-0,017;  $p=0,0069$ ; **Priloga F**), kar lahko pojasni razlike v odzivih na dva izolata rodu *Botrytis*.



**Slika 9:** Vpliv gliv na sekundarni metabolizem kalic. Vsebnost fenolov, flavonoidov in taninov (% SM) v kalicah ajde (povprečje  $\pm$  SN;  $n=7$ ). Različne črke nad stolpci za fenole (a-d), flavonoide (m-p) in tanine (w-z) označujejo statistično značilne razlike med kalicami, vzgojenih v prisotnosti različnih gliv (Duncanov test,  $p<0,05$ ).

**Figure 9:** Fungal impact on seedling secondary metabolism. Phenols, flavonoids and tannins levels (% DW) in buckwheat seedlings (mean  $\pm$  SE;  $n=7$ ). Different letters above columns for phenols (a-d), flavonoids (m-p) and tannins (w-z) indicate significant differences between seedlings grown in contact with different fungi (Duncan test,  $p<0.05$ ).

Vsebnost taninov v kalicah navadne ajde je bila statistično značilno povečana v prisotnosti *A. pullulans*, a zmanjšana v kalicah, ki so rasle v prisotnosti *F. oxysporum* in *B. cinerea* I (Slika 9). Z multiplo regresijsko analizo smo pokazali, da so bile vsebnosti taninov v kalicah ajde statistično značilno povezane z aktivnostjo sinteze glivnih zunajceličnih celuloz (prilagojeni  $R^2=0,4198$ ;  $\beta$  koeficient=0,004;  $p<0,0001$ ; **Priloga F**). Ta ugotovitev nakazuje, da prisotnost glivnih celuloz povzroča kopičenje taninov v kalicah, ne glede na testirani glivni izolat.

### 3.3 RAZPRAVA

Glivne seve iz semen navadne in tatarske ajde smo izolirali v treh časovnih točkah po žetvi in jih na podlagi molekulske identifikacije razvrstili v šest različnih glivnih rodov. Z izjemo ene glive iz debla Basidiomycota, je vseh ostalih 198 glivnih sevov izoliranih iz skupno 1125 semen navadne in tatarske ajde pripadalo deblu Ascomycota. Literatura, povezana z glivnimi združbami semen ajde je precej omejena in zastarela. Semena ajde so najpogosteje kolonizirana z glivami na polju (Mills in Wallace, 1972). Do sedaj so odkrili 36 različnih glivnih vrstah povezanih s semeni ajde, vključno z *Alternario alternato*, *Fusarium oxysporum* in *Botrytis cinerea* (Kalinova in sod., 2004; Mills in Wallace, 1972; Singh in sod., 1984; Zimmer, 1974). Njihovo prisotnost v semenih ajde smo potrdili tudi v naši raziskavi (Kovačec in sod., 2016).

Za glivo *A. alternata* je znano, da okuži semena, stebila in liste ajde ter povzroča klorozo na listih (Milevoj, 1989). V povezavi s semeni ajde *A. alternata* zavira kalitev semen in povzroča venenje kalic (Mills in Wallace, 1972; Zimmer, 1974). Do nedavnega smo bili prepričani, da se ta povsod navzoča gliva prenaša horizontalno, čeprav so pred kratkim dokazali, da se *A. alternata* lahko prenaša vertikalno od materinskih rastlin na seme in naprej na potomce (Hodgson in sod., 2014), kar je v skladu z našim ugotovitvami. To je izjemnega gospodarskega pomena, saj lahko semena delujejo kot potencialni viri začetnega inokuluma za mnoge glivne bolezni, ki vplivajo na kalitev semen, rast in razvoj rastlin in njihovo pridelavo (Halooin, 1983; Milevoj, 1989; Rioux in sod., 2014). Ko se gliva *Fusarium* spp. pojavi na semenih ajde, povzroči gnilobo korenin in stebila rastline (Milevoj, 1989). *Fusarium* spp. se običajno razvije na šibkih rastlinah zaradi mehanskih poškodb in/ali zaradi drugih razlogov, ki povzročijo zmanjšano odpornost rastlin. Glivni predstavniki rodu *Botrytis* sp. so lahko saprofitski, fitopatogeni in nekrotrofni. *B. cinerea* je razširjena gliva, ki lahko povzroči najhujše bolezni ajde (Milevoj, 1989), čeprav je njena virulenca odvisna od seva (Choquer in sod., 2007). Ta ekonomsko pomembna gliva lahko povzroči propad kalic ajde, kakor tudi njihovo kloroze in nekroze ter posledično veliko izgubo pridelka (Milevoj, 1989; Mills in Wallace, 1972). Že prej so opazili razlike v morfoloških tipih znotraj vrste *B. cinerea*, ki pretežno temeljijo na tvorbi sklerocijev (Martinez in sod., 2003). V tej raziskavi smo na podlagi morfoloških podatkov identificirali dva različna seva *B. cinerea* (tukaj podana kot I in II). Oba seva smo v

sledečih poskusih obdržali z namenom preučevanja vpliva intraspecifičnih variacij med izoliranimi glivnimi sevi *B. cinerea*.

To je prva raziskava, ki je dokazala prisotnost gliv *Aureobasidium pullulans*, *Epicoccum nigrum* in *Stereum hirsutum* v semenih ajde bodisi v rastlini (Kovačec in sod., 2016). Obe, *E. nigrum* in *A. pullulans* sta kozmopolitanski glivi prisotni vsepovsod in pogosto kolonizirata semena različnih vrst žit (Flannigan, 1970; Kurowski in sod., 2012). *E. nigrum* je povezana s primarnim rastlinskim razkrojem, prav tako znan rastlinski endofit z antagonističnim učinkom proti drugim mikroorganizmom (de Favaro in sod., 2012). *A. pullulans* ima potencial kot biokontrolno sredstvo proti mikrobnimi boleznimi, ki napadejo liste in seme po žetvi (Grube in sod., 2011; Sharma in sod., 2009; Sperandio in sod., 2015). Ima velik biotehnološki potencial povezan z visoko encimsko aktivnostjo (Chi in sod., 2009). Gliva *S. hirsutum* je edini izolat, ki pripada deblu Basidiomycota in je pogost razkrojevalec lesnih rastlin (Boddy in Rayner, 1983), medtem ko je povezana z boleznijo kapi vinske trte (Larignon in Dubos, 1997). Prisotnost drugih patogenih gliv, o katerih so že poročali, da kolonizirajo rastline in semena ajde, kot so *Sclerotium rolfsii*, *Bipolaris sorokiana*, *Peronospora fagopyri*, *Ascochyta fagopyri* in *Cladosporium* spp. (Milevoj, 1989), v naši raziskavi ni bila potrjena.

### 3.3.1 Kolonizacija semen in prevlada gliv

Pri obeh vrstah ajde so se frekvence koloniziranih semen manjšale s časom shranjevanja. Glivne izolate smo izolirali iz 33 % semen ajde ob žetvi (n=125). Glivna kolonizacija semen se je zmanjšala na 11 % po 6. mesecih skladiščenja (n=125) in na 1 % po 12. mesecih skladiščenja (n=125). Frekvence kolonizacije semen tatarske ajde so lahko bile večje zaradi hrapavosti semen in globljih vdolbin na površini semen (Campbell, 1997). Ta značilnost semen je verjetno zmanjšala učinkovitost površinske sterilizacije semen. Obsežna tkiva pod luščino semena navadne in tatarske ajde predstavljajo primerno okolje za glivno kolonizacijo, kar poveča potencial teh semen za prenos gliv med generacijami (Pongrac in sod., 2011, 2013).

Ob žetvi so bile prevladujoče glive izolirane iz semen obeh vrst ajd *Alternaria* sp., *Botrytis* sp. in *Epicoccum* sp. V drugih raziskavah so bile dominantne glive iz pripadajoče mikoflore semen ajde iz rodov *Alternaria*, *Botrytis* in *Cladosporium*, katerim je sledil *Epicoccum*, ter manj iz rodov *Fusarium*, *Gonatotrytis* in *Cephalosporium* (Mills in Wallace, 1971). *A. alternata* je bila dominantna gliva izolirana iz semen ječmena, sirka, soje, riža in pšenice (Broggi in sod., 2007; Mills in Wallace, 1972). To nakazuje na uspešno širjenje *A. alternata* na poljih, ne glede na gostitelja rastlin, ki raste v monokulturi.

Značilne razlike v frekvencah gliv *Alternaria* sp. in *Botrytis* sp. so se pokazale v kolonizaciji semen rastnih sezon med leti 2012 in 2013. Primerjava okoljskih pogojev je pokazala, da je bilo leto 2013 precej bolj suho in manj vlažno, še posebej v zadnjih 2 mesecih rastne sezone ajde (september in oktober). Naši podatki kažejo, da je suha sezona



spodbujala razvoj *Botrytis* sp. nad *Alternaria* sp. in obratno, kar je v skladu z ugotovitvami Hjelmroos (1993) in Burch in Levetin (2002). Podobno je leto pridelave tudi pomemben dejavnik za pojavljanje *Fusarium* spp. na semenih ajde (Kalinova in sod., 2004), prav tako pa so pomembni tudi klimatski pogoji (npr. temperatura, vlažnost), ki vplivajo na številčnost *Fusarium* spp. povezanih s semeni ajde (Singh in sod., 1984). Relativna zračna vlaga je najbolj pomembna klimatska lastnost, ki vpliva na mikofloro semen (Al-Askar in sod., 2014).

Obdobje shranjevanja močno vpliva na pogostost rodov *Botrytis* sp., *Alternaria* sp. in *Epicoccum* sp. v semenih obeh vrst ajde, kar je v skladu s poročili iz literature (Broggi in sod., 2007; Kremer, 1986; Mills in Wallace, 1972). Najhitreje se je znižala frekvenca kolonizacije semen tekom skladiščenja z *E. nigrum*, kateremu sledi *B. cinerea*, ki je bil še vedno prisoten v drugi izolacijski točki (6 mesecev), vendar ni bil prisoten v zadnji izolacijski točki (12 mesecev), kjer je bila prisotna le še gliva *A. alternata* (z izjemo semen tatarske ajde). Kratka življenjska doba spor teh gliv, bi lahko vplivala na zmanjšano stopnjo kolonizacije semen tekom skladiščenja (Kovačec in sod., 2016). Glive, ki proizvajajo konidije s tanko steno, kot *Botrytis* spp. in *Fusarium* spp., in močno pigmentirane glive z debelo steno konidijev, kot *Alternaria* spp., so pogosti kolonizatorji semen in lahko preživijo le kratek čas (Neergaard, 1977).

Vrsta ajde je bil dejavnik, ki je vplival na frekvenco pogostosti gliv rodu *Alternaria* sp. in *Epicoccum* sp. Obe vrsti ajde sta bogat vir flavonoidov in v luščini semen so prisotne protiglivne spojine, ki bi lahko vplivale na zmanjšano kolonizacijo semen (Kremer, 1986). Poleg tega so semena ajde bogata z inhibitorji proteaz, ki imajo sposobnost zavirati kalitev spor in rast glive *A. alternata* (Dunaevsky in sod., 2001).

Kljub temu, da smo opažene spremembe pripisali vrsti rastline in okoljskim dejavnikom, so glivne populacije semen ajde relativno stabilne in se njihova pogostost zmanjšuje z dolžino skladiščenja (Kovačec in sod., 2016). S tem delom raziskave smo potrdilo prvo hipotezo, da je seme navadne in tatarske ajde kolonizirano z različnimi vrstami endofitskih gliv, katerih sestava in pogostost se tekom skladiščenja spreminja. Podatki kažejo, da se kakovost semen ajde med skladiščenjem nenehno slabša, tako da je treba seme hitro prodati v nekaj mesecih po žetvi (Zepp in sod., 1996). Na drugi strani, seme ajde obdrži dobre lastnosti za reprodukcijo dve leti pri suhem skladiščenju (Jevdjović in Maletić, 2003), medtem ko ima shranjeno seme 10 let pri 4 °C znižano viabilnost za <5 % (Lee in sod., 2013a). Izgleda, da je prenos gliv na naslednjo generacijo mogoče odpraviti s podaljšanim suhim shranjevanjem semen pred uporabo za setev.

### **3.3.2 Ekstracelularna encimska aktivnost**

Vseh šest izbranih glivnih izolatov je imelo sposobnost sinteze enega ali več litičnih encimov, ki se izločajo v zunajcelični prostor. Glivni sevi s celulazno aktivnostjo predstavljajo grožnjo za rastlinske celice, saj predstavljajo latentne patogene ali

razkrojevalce rastlinskega materiala (Carroll in Petrini, 1983). Vendar so encimi za razgradnjo celične stene pomembni in bistveni pri vdoru glive v rastlino in vzpostavljanju simbioze (Cairney in Burke, 1998), saj to olajša vstop glive v gostiteljsko rastlino, in tako zagotavlja hranila, ki so potrebna za glivno rast. Pomen celulazne aktivnosti za glivno patogenost se kaže v višji proizvodnji celulolitičnih encimov v virulentnih izolatih *A. alternata* v primerjavi z avirulentnimi izolati (Anand in sod., 2008). Lipazna aktivnost gliv, ki pomeni razgradnjo lipidnih substratov na enostavne lipide in posamezne maščobne kisline nakazuje, da lahko glive lizirajo rastlinske kutikularne voske (Carroll in Petrini, 1983). Dejansko se lahko izločanje različnih zunajceličnih encimov razlikuje od seva do seva za iste vrste (Trigiano in Fergus, 1979). Sevi *B. cinerea*, ki spadajo v isto genetsko skupino ne izločajo skupnega izoencima (Cotoras in Silva, 2005). Čeprav *B. cinerea* vstopi v gostitelja predvsem s proizvodnjo encimov za razgradnjo in povzroča oksidativni stres (Choquer in sod., 2007), njegovo izločanje kutinaz in lipaz ni bilo priznано kot glavni dejavnik za rastlinsko patogenost (van Kan in sod., 2014; Reis in sod., 2005). Potrebno je poudariti, da so testirani sevi bili oz. ne bili sposobni razgradnje točno določenega substrata dodanega v gojišče. Tako lahko npr. nekatere glive proizvajajo lipaze, ki ne hidrolizirajo vseh vezi v lipidih (Trigiano in Fergus, 1979).

Nobena od izoliranih gliv ni razgrajevala beljakovin v komercialnem mlečnem agarju, čeprav so številne študije predlagale, da ima sinteza zunajceličnih proteaz svojo vlogo pri patogenosti gliv (Ball in sod., 1991; Dobinson in sod., 1997; Xia, 2004). Semena ajde so bogat vir inhibitorjev proteaz, ki lahko zavirajo kalitev spor in rast gliv, vključno z *A. alternata* (Dunaevsky in sod., 2001). Ker semena ajde ne vsebujejo veliko beljakovin (Campbell, 1997), izgleda, da izločanje proteaz ni bistvenega pomena za glive, ki kolonizirajo semena ajde (Kovačec in sod., 2016).

Splošna toleranca gliv na galno kisline predlaga široko odpornost na fenolne spojine prisotne v rastlinskem tkivu (Dix, 1979). To je pomemben dejavnik za glive povezane s semeni ajde, saj kot je znano, ajda vsebuje visoke koncentracije različnih fenolnih spojin (Bonafaccia in Fabjan, 2003). Med testiranimi glivami *A. pullulans* in *E. nigrum* nista izločala polifenol oksidaz, kar je v skladu s podatki iz strokovne literature v primeru *A. pullulans*, ne pa tudi za *E. nigrum* (Guiraud in sod., 1995). Nizka odpornost na galno kislino je lahko eden od razlogov, da je glavni vzorec kolonizacije *A. pullulans* po listnih žilah (McGrath in Andrews, 2006). Vse glive sposobne izločanja polifenol oksidaze lahko uvrstimo v skupino nekrotrofnih gliv, medtem ko nobena izmed gliv, ki ne kažejo nekrotrofnega načina življenja, ni pokazala sposobnosti sinteze polifenol oksidaze (Kovačec in sod., 2016).

Gliva *A. pullulans* je bila edina sposobna sinteze amilaze in je lahko razgradila škrob. V nasprotju z našimi rezultati, so *F. oxysporum* (Kwon in sod., 2007), *E. nigrum* (de Favaro in sod., 2011), *A. alternata* (Zaferanloo in sod., 2013) in *B. cinerea* (Shah in sod., 2009) v ostalih raziskavah bili sposobni amilolitične dejavnosti. Na splošno lahko prisotnost

sinteze amilaze kaže na uporabo rezerv škroba v semenih kot vir energije za glivno presnovo (npr. *A. pullulans*). Pokazatelj obrambe rastlin proti tej glivni dejavnosti je pogosto prisotnost inhibitorjev amilaze v ajdovih semen (Ikeda in sod., 1994).

Če povzamemo, lahko na osnovi hierarhičnega grupiranje podatkov opazimo dva vzorca okužbe gliv na podlagi prisotnosti teh encimske aktivnosti. *A. alternata* pokazala najvišjo aktivnost lipaze, ki omogoča prodiranje glivnih hif v rastlinsko tkivo (Carroll in Petrini, 1983) in polifenol oksidaz, ki ščitijo patogene pred obrambnim odzivom gostitelja. Na drugi strani pa je imel največjo aktivnost celulaze izolat *A. pullulans*, katera velja za pomemben dejavnik patogenosti, saj razgradi celično steno rastlin in omogoča prodor patogenu (Lebeda in sod., 1999; Wanjiru in sod., 2002). Tudi njegova sinteza amilaz vodi do konkurence za hranila med glivo in zarodkom semena.

### 3.3.3 Rast gliv in njihove medsebojne interakcije

Stopnja glivne rasti je pomemben dejavnik v okviru preučevanja kakovosti semen, saj lahko glivni miceliji pod luščino tekmujejo z zarodkom semena za kisik (Harper in Lynch, 1981). Naši glivni izolati so se značilno razlikovali v svoji stopnji radialne rasti na PDA gojišču. Opazili smo razlike med izolatoma *B. cinerea*, o katerih so že poročali Martinez in sod. (2003). Izgleda, da s to razliko nakazujeta na drugačne strategije kolonizacije (Kovačec in sod., 2016). Vseeno ne moremo izključiti morebitnega učinka prisotnosti bakterij na rast gliv, kljub uporabi antibiotika v začetni fazi raziskave (Seigle-Murandi in sod., 1996; Ruiz-Lozano in Bonfante, 2001).

Da bi ocenili medsebojne interakcije gliv, smo testirali njihov neposreden in posreden vpliv na rast micelijev. Rast izpostavljenih micelijev v testih neposredne izpostavljenosti je bila statistično značilno različna, opazili pa smo tudi razlike v pigmentaciji micelijev. Drevo podobnosti na osnovi analize grozdov neposrednega glivnega antagonizma je razkrilo največje zaviralne učinke *B. cinerea* I in *F. oxysporum* na večino testiranih sevov. Najvišja stopnja specifičnega neposrednega antagonizma je pokazala *A. alternata* na rast *B. cinerea* II (86 % zmanjšana rast), medtem ko je v primeru posrednega antagonizma in sintezo hlapnih organskih spojin, *A. alternata* pokazala najmočnejši zaviralni vpliv na sev *B. cinerea* I. Glede glivnih odzivov je bil izolat *A. alternata* najmanj zaviran s strani drugih gliv, medtem ko je bil *E. nigrum* splošno najbolj zavrt med vsemi testiranimi sevi (povprečno zmanjšanje rasti za 53 %). V nasprotju z našimi rezultati, so de Favaro in sod. (2012) ugotovili, da endofitski *E. nigrum* zmanjša radialno rast gliv *Fusarium verticillioides* za več kot 50 %, čeprav je morfološka manifestacija nezdržljivosti med miceliji različna med sevi številnih vrst (de Favaro in sod., 2011).

Interakcije, ki smo jih opazili med glivami, ki kolonizirajo semena ajde imajo potencial za biološko zatiranje rastlinskih patogenov (Kovačec in sod., 2016). Dobro je poznano dejstvo, da endofitske glive proizvajajo protibakterijske in protiglivne hlapne organske spojine (Corcuff in sod., 2011; Nutaratat in sod., 2014; Wheatley, 2002), z zaviralnimi

učinki proti mikrobnimi povzročitelji bolezni rastlin, npr. *B. cinerea* in *Sclerotinia sclerotiorum*, ki jih pogosto najdemo v semenih (Zhang in sod., 2014). V naši raziskavi je *A. alternata* pokazala najmočnejšo antagonistično interakcijo z *B. cinerea*. Očitno je, da sta ti dve glivi najpogostejša kolonizatorja semene ajde in je njun močni antagonizem lahko posledica njunih konkurenčnih strategij za ekološko nišo. Tako lahko tudi razložimo pojavnost in prevlado glive *Alternaria* sp. po enem letu skladiščenja (Kovačec in sod., 2016). Na drugi strani pa je ta ugotovitev še posebej pomembna, saj *Botrytis* spp. lahko povzroči veliko izgubo pridelka številnih gojenih rastlinskih vrst, vključno z ajdo (Burgess in Keane, 1997; Milevoj, 1989; Morrall in McKenzie, 1975). Gliva *Botrytis* spp. je še posebej občutljiva, predvsem zaradi svoje odvisnosti od eksogene oskrbe s hranili, ki jih potrebuje za kalitev, rast hif in okužbo (Elad in sod., 2007). Takšne razlike v stopnji rasti in metabolizmu seva *B. cinerea* I bi lahko razložilo milejše antagonistične učinke *A. alternata* nanj, v primerjavi z izolatom *B. cinerea* II. Številne študije so pokazale, da bi lahko ta vrsta bila kompleks, ki ga je mogoče razdeliti v dve genetsko različni skupini in med drugim kažeta razlike v izboru gostitelja, časovnem zaporedju okužbe in fenotipskih značilnostih (Choquer in sod., 2007; Fournier in sod., 2005; Giraud in sod., 1997; McAllister in sod., 2005). Nujno je potrebno upoštevati varstven vidik uporabe glive *Alternaria* spp. in/ali njenih proizvodov, saj je znano, da lahko sintetizira več strupenih snovi, kot so tenuazonična kislina, alternariol, altenuen in druge altertoksine (Logrieco in sod., 2009).

### 3.3.4 Vpliv gliv na kalitev semen in razvoj kalic

Semena navadne ajde so slabše kalila ob prisotnosti izbranih gliv, predvsem glive *A. pullulans* (77 %), medtem ko je bila kaljivost v prisotnosti *E. nigrum* (98 %) in *B. cinerea* II (99 %) primerljiva s kontrolami. Povečano izločanje amilaze, celulaze in polifenolnih oksidaze je povezana z zmanjšano kaljivostjo semen, medtem ko izločanje lipaze in glivna rast nista pokazali pomembnih učinkov (Kovačec in sod., 2016). Najmočnejše zaviranje kalitve smo opazili v prisotnosti *A. pullulans*, verjetno zaradi močne celulolitične aktivnosti in sposobnosti sinteze amilaze, saj škrob obsega do 70 % (m/m) semena ajde (Campbell, 1997). Podobno je Urošević (1961, cit. po Mittal in Wang, 1987) poročal, da *A. pullulans* zmanjšuje kalitev semen navadne smreke in rdečega bora. V nasprotju z našimi ugotovitvami, pa *F. oxysporum* lahko zmanjša kalitev semen za 30 % (Singh in sod., 1984), kar je skoraj 5-krat več kot v naši študiji. S temi ugotovitvami smo potrdili prvi del druge hipoteze, da se glivni izolati razlikujejo v učinkih na kalitev semen navadne ajde.

Razvoj kalic je bil oslabljen ob prisotnosti *A. pullulans* (11,5 %), *F. oxysporum* (9,5 %), *A. alternata* (9 %) in *B. cinerea* I (7,5 %), medtem ko so bili učinki *B. cinerea* II (2,5 %) zanemarljivi v primeru *E. nigrum*. Dolžina korenice se je izkazala za najbolj občutljivejšo lastnost rastline, saj se je precej skrajšala ob prisotnosti vseh testiranih izolatov v primerjavi s kontrolnimi kalicami. Sinteza zunajcelične celulaze je bil edini dejavnik statistično značilno povezan z dolžino korenice kalic. Ponovno so encimi amilaza,

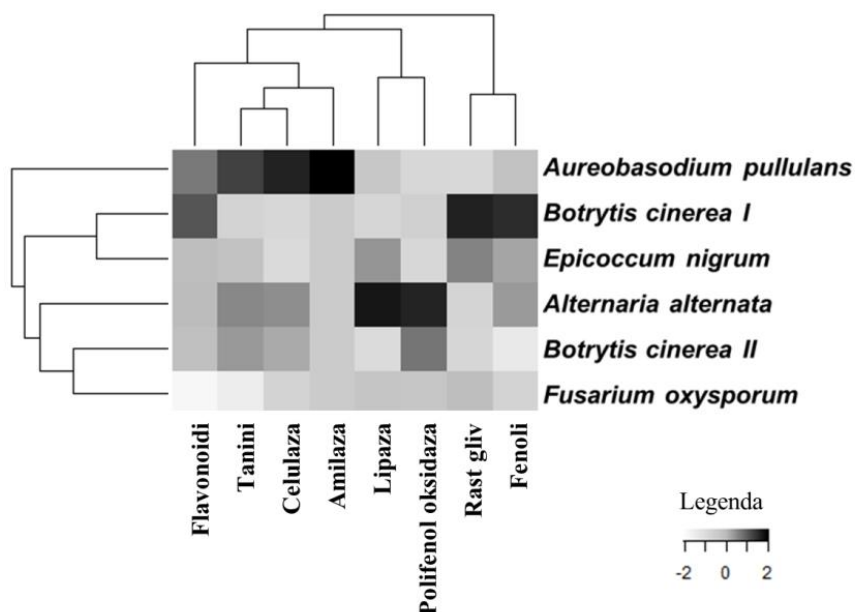
celulaza in polifenol oksidaza povezani z razvojem kalic, medtem ko izločanje lipaze in glivna rast nista pokazali nikakršnih učinkov (Kovačec in sod., 2016). Lahko potrdimo drugi del druge hipoteze, da se glivni izolati razlikujejo v učinkih na razvoj kalic navadne ajde.

### 3.3.5 Vpliv gliv na skupne fenolne spojine, flavonoide in tanine v kalicah

Mnoge fenolne spojine imajo protiglivne lastnosti (Lattanzio in sod., 2006) in rastlinski ekstrakti ajde so dokazano zavrla rast gliv *Aspergillus flavus*, *Fusarium culmorum* in *A. alternata* (Mosovška in Birošova, 2012). Koncentracije skupnih fenolov v kalicah so bile podobne tistim v kontroli, kar nakazuje na odsotnost odziva kalic na prisotnost teh gliv (Kovačec in sod., 2016). Koncentracije celotnih polifenolov v kalicah so se povečale le v kalicah, ki so rasle v prisotnosti *B. cinerea* II, koncentracije flavonoidov pa v prisotnosti *A. pullulans*. Glivni in bakterijski koreninski endofiti lahko spremenijo koncentracije rutina in katehina v koreninah navadne in tatarske ajde (Regvar in sod., 2012; Tao in sod., 2004). Kakorkoli, njihovi učinki med obrambo rastline niso tako jasni in enostavni. Koncentracije skupnih fenolov smo povezali s stopnjo glivne rasti, kar lahko pojasni razlike opažene za dva izolata *Botrytis* sp., vendar to ne velja za druge glivne vrste.

Vsebnost taninov v kalicah ajde se je povečala ob prisotnosti glive *A. pullulans*, a zmanjšala ob prisotnosti gliv *F. oxysporum* in *B. cinerea* I. Večkratna regresijska analiza je povezala koncentracije taninov v kalicah z glivnimi zunajceličnimi celulazami. To dokazuje, da prisotnost izločanja glivnih celulaz povzroča kopičenje tanina v kalicah (Kovačec in sod., 2016). Tanini so obrambne spojine in njihovo vlogo so pripisali nespecifični inhibiciji zunajceličnih encimov gliv, prikrajšanosti za hranila oz. substrat ter aktivnost na membranah gliv (Benoit in Starkey, 1968; Lattanzio in sod., 2006). Naši rezultati so podprli izsledke mnogih raziskav inhibitornih učinkov taninov na celulolitične glive (McSweeney in sod., 2001). Obenem je bil izolat glive *A. pullulans* edin sposoben sinteze amilaze, katere delovanje zavirajo ravno tanini (Luthar, 1992).

Drevo podobnosti na osnovi analize grozdov podatke sinteze taninov v kalicah ajde povezuje z močno celulazno aktivnostjo in sintezo amilaze *A. pullulans* (Slika 10). Na drugi strani sta bila hitrost rasti glive in vsebnost skupnih fenolov v kalicah povezana, kar se dobro vidi na primeru glive *B. cinerea* I. Patogenost glive *A. alternata* je morda povezana z visoko aktivnostjo lipaze in polifenol oksidaze, medtem ko je način delovanja *F. oxysporum* povezan z zmanjševanjem vsebnosti flavonoidov in kopičenja taninov (Kovačec in sod., 2016). Izgleda, da ni enostavnega razmerja med izločanjem glivnih encimov in patogenostjo, saj se glivni transkriptom in metabolom spremenita tekom prehodov med življenjskimi slogi (O'Connell in sod., 2012).



**Slika 10:** Aktivnost izločanja izvenseličnih encimov s stopnjo rasti gliv ter njihov vpliv na sekundarni metabolizem kalic ajde (fenoli, flavonoidi, tanini) med izbranimi glivami, prikazane z barvnim diagramom z dodanim drevesom podobnosti na osnovi analize grozdov. Predstavljeni podatki so Z-normalizirani in centrirani, beli kvadrati predstavljajo nižje in črni višje vrednosti (glej legendo).

**Figure 10:** Heatmap of fungal secreted enzyme activities and growth rates, and the secondary metabolite concentrations in buckwheat seedling among the selected fungi. Presented data are Z-normalized and centred, white squares represent lower values, while black higher values (see the legend).

## 4 INTERAKCIJE GLIV Z RAZLIČNIMI BAKROVIMI SPOJINAMI

V tem poglavju smo preučili interakcije med različnimi bakrovimi spojinami in dvema izbranimi glivnima izolatoma. Bakrove spojine uporabljene v raziskavi smo najprej okarakterizirali in jim določili stopnjo luženja bakrovega iona v tekočem gojišču za rast gliv. Odziv gliv smo spremljali z analizo razporeditve Cu vzdolž gojišča, kot tudi preko micelija, z določitvijo stopnje lipidne peroksidacije membran gliv, kot posledice oksidativnega stresa, z različnimi analitskimi metodami za preučevanje sinteze sideroforov, organskih kislin in zunajceličnih encimov ter analizo vezavnih stanj Cu s pomočjo rentgenske absorpcijske spektroskopije.

### 4.1 MATERIALI IN METODE

#### 4.1.1 Karakterizacija bakrovih delcev

Uporabljene bakrove spojine v raziskavi so bile mikrodenci CuO (MD CuO - Sigma Aldrich, Nemčija), nanodenci CuO (ND CuO - Aldrich, ZDA) in nanodenci Cu (ND Cu - Aldrich, ZDA). Na Odseku za sintezo materialov K8 (IJS) pod vodstvom prof. dr. Darka Makovca smo izmerili zeta potencial bakrovih delcev z zetametrom (Brook-haven Instruments Corp., ZetaPALS). Velikost, obliko in atomsko elementno sestavo površine delcev kupljenih kemikalij smo opazovali s presevnim elektronskim mikroskopom v kombinaciji z energijsko-disperzijsko spektroskopijo in elektronsko difrakcijo (TEM JEOL 2010F z EDX detektorjem Oxford Instruments ISIS300). Nečistoče v stisnjeni tableti bakrovih spojin smo določili z rentgensko fluorescenčno spektroskopijo (XRF) v Laboratoriju za rentgensko spektrometro analizo, Odseka za fizike nizkih in srednjih energij F2 (IJS), pod vodstvom dr. Marijana Nečemer. Za primarni vir vzbujanja atomov smo uporabili izotop Fe-55 (20 mCi) oz. Cd-109 (25 mCi) in energijsko-disperzijski-rentgenski spektrometer opremljen s Si (Li) detektorjem (Canberra, 157 Meriden, ZDA) za zbiranje oddanega sevanja. MD CuO so imeli na embalaži zabeležene nečistoče, medtem ko na embalaži ND CuO vsebnost nečistoč ni bila zabeležena.

#### 4.1.2 Zasnova poskusov s trdnimi in tekočimi gojišči

V tem delu raziskave smo se poslužili dveh eksperimentalnih pristopov. Prvi sklop so bili poskusi s trdnimi gojišči in drugi poskusi s tekočimi gojišči. Pri obeh smo uporabljali definirano Melin-Norkrans-Marx (MNM) gojišče (Marx, 1969) z dodanimi različnimi bakrovimi spojinami, vključno z MD CuO, ND CuO, ND Cu in Cu soli ( $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ). Izbrana glivna izolata za te poskuse sta bila rastlinska patogena, *Alternaria alternata* (GenBank št. zaporedja KP985749) in *Botrytis cinerea* (GenBank št. zaporedja KP985745).

V poskusih s trdnim gojiščem smo 30 ml trdnega MNM gojišča razlili v petrijevke premera 90 mm. Ko se je gojišče ohladilo in strdilo, smo površino enakomerno prekrili z 200  $\mu\text{l}$  suspenzije 96 % etOH in 50 mg Cu v različnih bakrovih spojinah, z izjemo soli, ki smo jo

raztopili v sterilni dH<sub>2</sub>O. Kontrole so bile plošče MNM gojišča prekrte s 200 µl čistega 96 % etOH. Naslednji dan, ko je etOH izhlapel, smo sredino plošče inokulirali s koščkom micelija (10 mm) z roba aktivno rastoče en teden stare glive. Plošče smo hranili v temi pri sobni temperaturi (24 °C) in fotografirali tedensko do 12. tedna. Poskus smo ponovili trikrat, vsakič z 10 ponovitvami na tretma. Poskusi s trdnimi gojišči so služili za analize vezavne oblike Cu in profiliranje porazdelitve Cu vzdolž agarne plošče.

V poskusih s tekočimi gojišči je ena testna enota predstavljala 100 ml tekočega MNM gojišča, z dodanimi 166 mg Cu v različnih oblikah, z namenom ohraniti enako koncentracijo Cu na volumen gojišča kot v poskusih s trdnim gojiščem. Edina izjema je bila Cu sol (CuSO<sub>4</sub>), ki smo jo dodali v koncentracijah 1 % ali 10 % določene vsebnosti Cu v trdnih gojiščih, saj je Cu<sup>2+</sup>, ki nastanejo po disociaciji soli v vodi izjemno strupen. Vsako erlenmajerico smo inokulirali z enim koščkom micelija (6 mm) z roba en teden stare glive in jo inkubirali na krožnem stresalniku pri 175 vrt. min<sup>-1</sup> in 24 °C v temi. Po dveh tednih smo poskus fotografirali, določili svežo maso (SvM) micelijev, nato smo micelije zamrznili v tekočem dušiku, liofilizirali in določili suho maso (SM). Del svežega micelija smo uporabili za oceno lipidne peroksidacije in del za profiliranje Cu vzdolž prečnega prereza micelija z LA-ICP-MS. Gojišče v katerem so rasle glive, smo filtrirali in uporabili za meritve pH, vsebnosti organskih kislin, sideroforov in določitev sinteze ekstracelularnih encimov. Vsak tretma je imel po pet ponovitev, poskus smo ponovili trikrat.

Za splošno določitev tolerance gliv na Cu smo poleg omenjenega testirali odziv obeh gliv na različne koncentracije (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,25; 1,5; 1,75 in 2 % določenega Cu) prostih Cu<sup>2+</sup> v tekočem MNM.

#### 4.1.3 Luženje bakrovih ionov v gojišču ob prisotnosti gliv

Luženje Cu<sup>2+</sup> s površine različnih bakrovih delcev v gojiščih, kjer so rasle glive, smo določili s kemijsko metodo za določanje Cu<sup>2+</sup> v raztopinah. Le-ta temelji na nastanku modroobarvanih kompleksov med bakrovimi (Cu<sup>2+</sup>, Cu<sup>+</sup>) in amonijevimi ioni (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (Prenesti, 2002). Standardno krivuljo smo pripravili z raztopinami CuSO<sub>4</sub> v koncentracijah 0,01; 0,1; 1; 5; 10; 50 in 100 mg Cu na 100 ml<sup>-1</sup> MNM. Dve kapljici 25 % amonijaka (NH<sub>3</sub>) smo dodali petim ml vsake raztopine in pomerili absorbanco pri 600 nm z uporabo spektrofotometra (HP-Hewlett Packard). Enak postopek smo izvedli v primeru gojišč, kjer smo 5 ml filtriranega gojišča dodali 2 kapljici koncentriranega amonijaka, raztopino premešali in pomerili absorbanco pri 600 nm. Nato smo iz izmerjenih absorbanc izračunali spektralno prepustnost ali transmitanco (T) po enačbi 3:

$$T = 10^{-A_{600}} \quad \dots (3)$$

#### 4.1.4 Razporeditev bakra po agarni plošči

Razporeditev elementov vzdolž agarne plošče smo določili z XRF na Odseku za fiziko nizkih in srednjih energij F2 (IJS). Uporabili smo prenosni rentgenski fluorescenčni spektrometer Peduzo P01 (Institut Jožef Stefan) z Rh rentgensko cevjo in SDD (Amptek)



detektorjem. Merili smo z žarkom premera 5 mm in energijsko ločljivostjo 140 eV pri 5,6 keV. Kvantitativna analizo smo opravili s programskim paketom za kvantitativno analizo razvitim v Lab View (Kump in sod., 2009). Rezultati smo potrdili s pomočjo certificiranega referenčnega materiala homogeniziranega praha listov paradižnika, NIST SRM 1573a (Nečemer in sod., 2008).

#### **4.1.5 Razporeditev bakra v glivnem miceliju**

Svež micelij iz tekočega gojišča smo sprali z destilirano vodo, osušili, zamrznili v tekočem dušiku in liofilizirali. Micelije smo nato s čisto britvico prerezali na mm debele rezine in jih pomerili z lasersko ablacijsko masno spektroskopijo z induktivno sklopljeno plazmo (LA-ICP-MS), da bi dobili informacije o razporeditvi elementov vzdolž prečnega prereza micelija (Debeljak in sod., 2013). Za mikroanalize Cu smo uporabili kvadrupolni ICP-MS (Agilent 7900) povezan z Analyte G2 sistemom za lasersko ablacijo (Cetac Technologies). Vzorce smo abilirali v ravni črti preko micelija z uporabo naslednjih pogojev: energijska gostota laserja  $0,75 \text{ J cm}^{-2}$ ; stopnja ponavljanja 10 Hz; laserski žarek premera  $40 \text{ }\mu\text{m}$ ; linija meritev s hitrostjo  $40 \text{ }\mu\text{m s}^{-1}$ . Za prenos abilirane materiala iz ablacijske komore v ICP sistem smo uporabili helij ( $0,95 \text{ l min}^{-1}$ ), medtem ko smo argon dodali kot donor elektronov pred baklo ICP. V plazmi nastale ione smo ekstrahirali v kvadrupolnem masnem spektrometru in jih ločili glede na razmerje med maso in nabojem. Masni spektrometer je s časovno ločljivostjo meril eno točko na maso in pridobil maso izbranega izotopa  $^{63}\text{Cu}$ . Meritev ozadja plinov (He/Ar mešanica) je služila kot referenčni signal za vse mase izotopov.

#### **4.1.6 Vezavne oblike bakra v novonastalih bakrovih spojinah**

Analiza speciacije in vezavnih oblik Cu smo opravili na novonastali modri spojini na trdnem agarnem gojišču, z uporabo absorpcijske rentgenske spektroskopije (XAS). Vzorci smo liofilizirali, spakirali med 2 plasti ultralen folije in pritrdili na nosilce za meritve absorpcije rentgenskih žarkov na Cu K-robu. Meritve smo opravili v presevnem načinu, in sicer na žarkovni liniji BM23 na The European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, Francija). Žarkovna linija je bila opremljena z Si 311 dvo-kristalnim monokromatorjem z energijsko ločljivostjo okoli 0,2 eV na Cu K-robu (8,98 keV). Intenzivnost monokromatiziranega žarka smo spremljali s 7-členskim Ge detektorjem. Ionizacijske komore smo napolnili s kriptonom, prva do tlaka 190 mbar, druga in tretja pa do 1000 mbar. Vzorce smo postavili med prvim parom ionizacijskih celic, z referenčno bakrovo kovinsko folijo med zadnjim parom z namenom preverjanja stabilnosti energijske lestvice. Absorpcijske spektre smo izmerili v intervalu [-250 eV in 1000 eV] glede na Cu K-rob. V regiji XANES smo spektre merili z enakimi energijski koraki 0,5 eV, medtem ko so v regiji EXAFS bili merjeni k-koraki ( $\Delta k \approx 0,03 \text{ \AA}^{-1}$ ) v enaki oddaljenosti, s časom 1s na korak. Referenčne vzorce (folija Cu, ND CuO, ND Cu, CuSO<sub>4</sub>, Cu-hitin, Cu-oksalat, Cu-citrat, Cu-malat, Cu-glukoza, Cu-cistein, Cu-karbonat, Cu-fosfat) smo pripravili v obliki homogene samostojne stisnjene tabletko z optimalno absorpcijsko debelino okoli 2 nad Cu

K-absorpcijskim robom. EXAFS spektre smo analizirali z IFEFFIT programskim paketom (Ravel in Newville, 2005), kot je podrobneje opisano v Vogel-Mikuš in sod. (2010).

#### 4.1.7 Lipidna peroksidacija gliv ob prisotnosti različnih bakrovih spojin

Količino malondialdehida (MDA), indikatorja za stopnjo peroksidacije lipidov celičnih membran, smo določili v svežih micelijih iz tekočega gojišča s TBA spektrofotometrično metodo (Hodges in sod., 1999). Metoda temelji na kislinski razgradnji lipidnih hidroperoksidov v malondialdehid (MDA), ki nato reagira s tiobarbiturno kislino tako, da nastane rdeč produkt. Na kratko, 0,2 g micelija smo homogenizirali in ekstrahirali s 5 ml 80 % etOH in centrifugirali. Supernatant smo razdelili na dva 800 µl podvzorca in prvemu dodali 800 µl 20 % trikloroocetne kisline z 0,01 % butilhidroksitoluena, medtem ko smo drugemu dodali 800 µl 20 % trikloroocetne kisline z 0,01 % butilhidroksitoluena in 0,65 % tiobarbiturne kisline. Vzorce smo segrevali 25 min na 95 °C in centrifugirali. Bistrim vzorcem smo nato izmerili absorbanco pri 440, 532 in 600 nm z uporabo spektrofotometra 8452A (HP-Hewlett Packard). Izračuni so bili narejeni po enačbi (4), (5) in (6), in sicer:

$$[(A_{563+TBA}) - (A_{600+TBA}) - ((A_{532-TBA}) - (A_{600-TBA}))] = A \quad \dots (4)$$

$$[((A_{440+TBA}) - (A_{600+TBA})) \times 0,0571] = B \quad \dots (5)$$

$$\text{MDA ekvivalent (nmol ml}^{-1}\text{)} = \left(\frac{A-B}{157000}\right) \times 10^6 \quad \dots (6)$$

#### 4.1.8 Glivna sinteza sideroforov

Najprej smo sintezo sideroforov testirali kvalitativno, in sicer z uporabo trdnih krom azuroil sulfonat (CAS) gojišč (Schwyn in Neilands, 1987) in z metodo prekrivnega CAS testa (Pérez-Miranda in sod., 2007). Sintezo sideroforov smo določali tudi v tekočih gojiščih, in sicer 4., 7. in 14. dan po inokulaciji. Najprej smo preizkusili test za dokazovanje prisotnosti sideroforov s FeCl<sub>3</sub> (Yeole in sod., 2001). Za kvantifikacijo sideroforov v tekočih gojiščih, pa smo se poslužili metode po Alexander in Zuberer (1991). Na kratko, 100 µl centrifugiranega gojišča brez celic smo dodali 100 µl reagenta CAS in absorbanco vzorca izmerili pri 630 nm (A<sub>v</sub>). Prav tako smo izmerili absorbanco slepega vzorca neinokuliranega MNM gojišča (A<sub>s</sub>). Vsebnost sideroforov smo izrazili kot odstotek siderofornih enot, izračunano po enačbi 7 (Kumar in sod., 2012):

$$\text{sideroforne enote (\%)} = A_s - \left(\frac{A_v}{A_s}\right) \times 100 \quad \dots (7)$$

#### 4.1.9 Glivna sinteza zunajceličnih encimov ob prisotnosti različnih bakrovih spojin

Encimsko prisotnost in količino zunajceličnih encimov v tekočih gojiščih smo ocenili z API ZYM<sup>®</sup> testnimi trakovi (Biomérieux). Da bi omogočili kvantifikacijo, smo vzorcem najprej določili vsebnost beljakovin z Nanodrop spektrofotometrom (Thermo Fischer Scientific, ZDA), in sicer z meritvijo absorbance pri 280 nm. Nato smo vzorce primerno redčili in dodali po 65 µl gojišča v vsako testno enoto na traku API ZYM s substratom za

razgradnjo (Martinez in sod., 2016). Rezultate smo predstavili v skladu z legendo proizvajalca za kvantifikacijo hidrolize substratov (1<5 nanomolov, 2<10 nanomolov, 3<20 nanomolov, 4<30 nanomolov, 5<40 nanomolov).

#### **4.1.10 Glivna sinteza organskih kislin ob prisotnosti različnih bakrovih spojin**

Za določitev koncentracij organskih kislin v tekočih gojiščih smo uporabili tekočinsko kromatografijo z visoko ločljivostjo (HPLC). Sistem je bil opremljen z UV-VIS detektorjem (SPD-10Avp, Shimadzu), kolono Agilent Hi-Plex Ligand Exchange (Agilent Technologies) in pečico (CTO-10ASvp, SHIMADZU), ki je ogrevala kolono na 70 °C. V sistem smo injicirali 10 µm filtriranega gojišča in ga spirali z 2 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kot mobilno fazo. Retencijski čas vsakega signala je bil zabeležen pri valovni dolžini 210 nm in 240 nm. Kromatograme smo primerjali z mešanico 11 referenčnih organskih kislin, in sicer oksalne, maleinske, citronske, glukonske, jabolčne, askorbinske, jantarne, itakonske, fumarične, oetne, levulinske kisline v MNM.

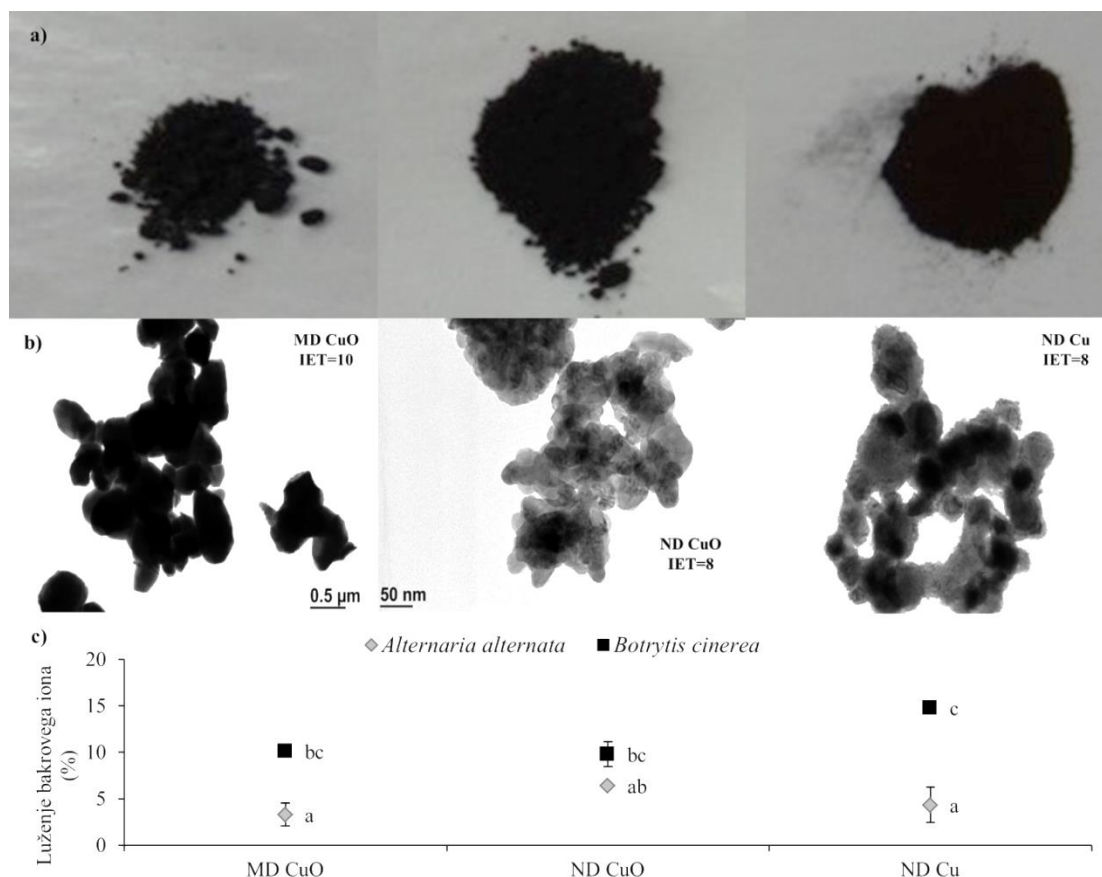
#### **4.1.11 Statistična analiza podatkov**

Uporabili smo analizo variance (ANOVA) s spremljajočim Duncan ali Tukey post-hoc testom. Za testiranje statistično pomembnega vpliva različnih dejavnikov in njihovih interakcij smo uporabili faktorsko ANOVO. Obe ANOVI smo izvedli s pomočjo programske opreme Statistica (Statsoft 8). Barvne diagrame z dodanim drevesom podobnosti na osnovi analize grozdov smo izvedli z R programsko opremo, s paketom gplots in jih uporabili za preučevanje grupiranja oz. razporejanja različnih podatkov med tretmaji. Predhodno smo vrednosti Z-normalizirali, in sicer smo od vrednosti odšteli povprečno vrednost preučevanega dejavnika in nato delili s standardnim odklonom preučevanega dejavnika.

## **4.2 REZULTATI**

### **4.2.1 Karakterizacija bakrovih delcev**

Vsi delci uporabljeni v naši raziskavi, MD CuO, ND CuO in ND Cu so bili v obliki črnega prahu (**Slika 11a**). Karakterizacija različnih bakrovih delcev s presevnim elektronskim mikroskopom je pokazala, da je velikost delcev nekaterih posameznih delcev večja od tiste, ki jo navaja proizvajalec. Opazovanje različnih bakrovih delcev pod presevnim elektronskim mikroskopom (**Slika 11b**) je pokazala, da so MD CuO manj okrogle oblike in večji velikosti v primerjavi s CuO in ND Cu, kjer so bili delci bolj okrogle in sferične oblike. EDX analiza površine ND Cu je pokazala prisotnost O in Si v spojini, kar bi lahko pomenilo obstoj bakrovih oksidov na površini teh delcev. Elektronska difrakcija v primeru ND Cu kaže razen obročev, ki se skladajo z kubičnim Cu, še dva dodatna obroča, ki ne pripadata Cu (**Priloga G1**) in možno bi bilo, da gre za oksid.



**Slika 11:** Opis lastnosti delcev z a) fotografijami enakih zateht (100 mg) različnih bakrovih spojin (od leve proti desni MD CuO, ND CuO in ND Cu), z b) posnetki presevne elektronske mikroskopije MD CuO, ND CuO in ND Cu, ki razkrijejo velikost in obliko delcev, s pripisano izoelektrično točko (IET) in z c) vrednostmi luženja bakrovega iona v gojiščih (predstavljene kot odstotek celotnega Cu dodanega gojišču v obliki MD CuO, ND CuO in ND Cu), po 2 tednih rasti micelijev *A. alternata* in *B. cinerea* (povprečje  $\pm$  SN;  $n=3$ ). Različne črke zraven simbolov predstavljajo statistično značilne razlike (Tukeyev test;  $p<0,05$ ).

**Figure 11:** The particles characteristics described with a) the photos of the same amount of different Cu compounds (from the left to the right MPs CuO, NPs CuO and NPs Cu), with b) TEM micrographs of MPs CuO, NPs CuO and NPs Cu to reveal size and shape, with isoelectric point (IET), and with c) values of copper ion leaching in media (presented as percent of whole Cu supplemented in media with MPs CuO, NPs CuO and NPs Cu) after 2 weeks inoculation with *A. alternata* and *B. cinerea* (mean  $\pm$  SE;  $n=3$ ). Different letters next to the symbols represent statistically significant differences (Tukey test;  $p<0.05$ ).

Izoelektrična točka (IET) kovinskih oksidov je običajno približno okoli nevtralnega pH. A naši rezultati meritev so pokazali, da je IET pri pH=10 za MD CuO, ki je višja od IET pri pH=8 za ND CuO in ND Cu. To pomeni, da je pri istem pH, površinski naboj MD CuO bolj pozitiven od naboja ND CuO in ND Cu. Prav tako kot rezultati površine delcev z EDX in elektronske difrakcije, tudi rezultati meritev IET nakazujejo, na veliko podobnost v površini ND CuO in ND Cu (**Priloga G2**).

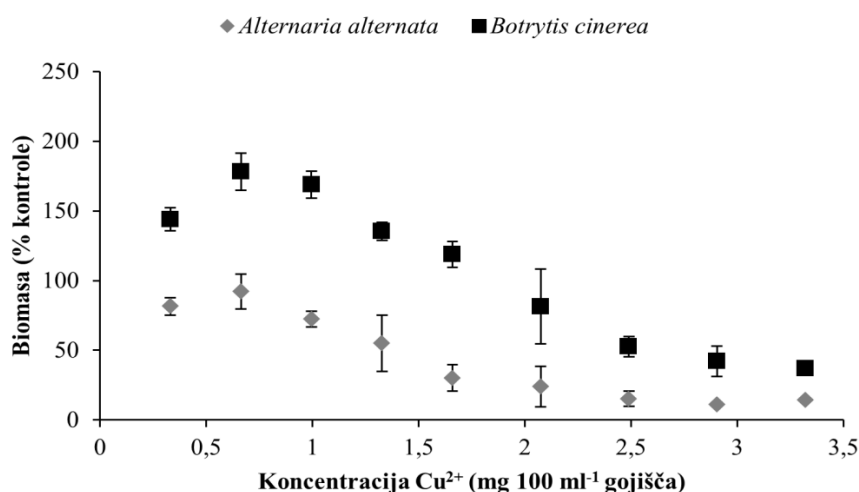
Pri izbranih bakrovih spojinah smo z XRF določili tudi prisotnost morebitnih nečistoč. Rezultati meritev so pokazali, da ND Cu vsebujejo sledi Sn (<1 %), Ca (<1 %) in Fe (<0,1 %). Podobno, ND CuO vsebujejo sledi Sn (<1 %), Ca (<1 %), Cr (<0,05 %), Mn (<0,05 %), Fe (<0,1 %), Ni (<0,05 %) in MD CuO sledi Sn (<1 %), Ca (<1 %), Fe (<0,1 %) in Ni

(<0,05 %). Za najčistejšo kemikalijo so se izkazali ND Cu, katerim so sledili MD CuO in zadnji, z največjo vsebnostjo različnih nečistoč, ND CuO.

Rezultati meritev  $\text{Cu}^{2+}$  v gojiščih, v katerih smo dodali različne bakrove spojine in miceliji dveh glivnih vrst, so pokazali na razlike v vplivu teh gliv na luženje  $\text{Cu}^{2+}$ . V gojiščih, v katerih je bil nacepljen micelij *A. alternata*, je bilo luženje  $\text{Cu}^{2+}$  iz površine izbranih bakrovih delcev nižje kot v gojiščih, v katerih je bil nacepljen *B. cinerea*. Povprečna vrednost vsebnosti  $\text{Cu}^{2+}$  v vseh gojiščih z micelijem *A. alternata* je bila 5,1 % dodanega Cu, medtem ko je bila ta vrednost za gojišča z micelijem *B. cinerea* 9,25 % (Slika 11c). Analiza faktorske ANOVE (Priloga H) je pokazala, da so na luženje  $\text{Cu}^{2+}$  v gojiščih z različnimi delci in različnimi glivami, imeli vpliv vrsta glive, oblika bakrove spojine kot tudi njuna interakcija ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2 Biomasa glivnega micelija

Glive, ki smo jih izpostavili različnim bakrovim spojinam v tekočih gojiščih, smo določili svežo in suho biomaso. Najprej smo sintezo biomase ocenili pri poskusih z različnimi koncentracijami bakrove soli, kot vira  $\text{Cu}^{2+}$ . Tako smo lahko okarakterizirali glivi na njuno vsesplošno prilagojenost bakru. V teh poskusih je glivni izolat *B. cinerea* pokazal povečano biomaso v nižjih koncentracijah Cu v primerjavi s kontrolo (Slika 12). To nakazuje, da je ta gliva nagnjena k toleranci in/ali odvisnosti k manjšim koncentracijam bakrovega iona. Na drugi strani je glivni izolat *A. alternata* imel nižjo biomaso v vseh gojiščih z dodatkom bakrovega iona.

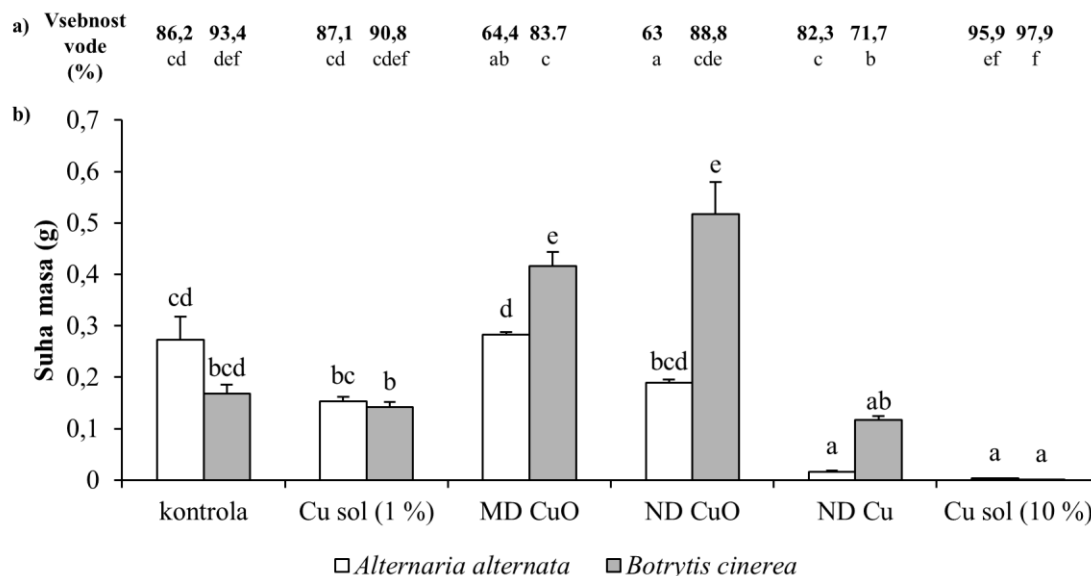


**Slika 12:** Biomasa glivnega micelija (% kontrole) izpostavljenih gliv *A. alternata* in *B. cinerea* različnim koncentracijam  $\text{Cu}^{2+}$  v gojišču (povprečje  $\pm$  SN; n=3).

**Figure 12:** Fungal biomass (% of control) of exposed fungi *A. alternata* and *B. cinerea* to different concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$  in media (mean  $\pm$  SE; n=3).

Namen glavnega sklopa poskusov je bil oceniti biomase gliv v tekočih gojiščih z dodatkom različnih bakrovih spojin, a enakimi vsebnosti bakra. Rezultati vsebnosti vode v micelijih so pokazali, da imajo statistično značilno nižjo vsebnost vode miceliji glive *A. alternata* iz

gojišč, katerim smo dodali MD CuO in ND CuO, kot tudi miceliji *B. cinerea* iz gojišč z dodanimi ND Cu (**Slika 13a**). Ti rezultati nakazujejo na oprijemanje delcev micelija, in leti znatno prispevajo k sveži kot tudi suhi masi micelija, saj so bile mase micelijev v primerjavi z natehtano bakrovo spojino precej nizke (masa micelijev nekaj 100 mg, medtem ko je natehta delcev minimalno 166 mg).



**Slika 13:** Odziv gliv na tretiranje z bakrovimi spojinami s prikazom a) vsebnosti vode v micelijih in b) suhe biomase micelijev (povprečje ± SN; n=3), iz gojišč z dodatkom MD CuO, ND CuO, ND Cu in Cu soli v koncentracijah 1 % in 10 % določene vsebnosti Cu v drugih tretmajih, po 2 tednih rasti. Različne črke nad stolpci predstavljajo statistično značilne razlike med tretmaji (Tukeyev test;  $p < 0,05$ ).

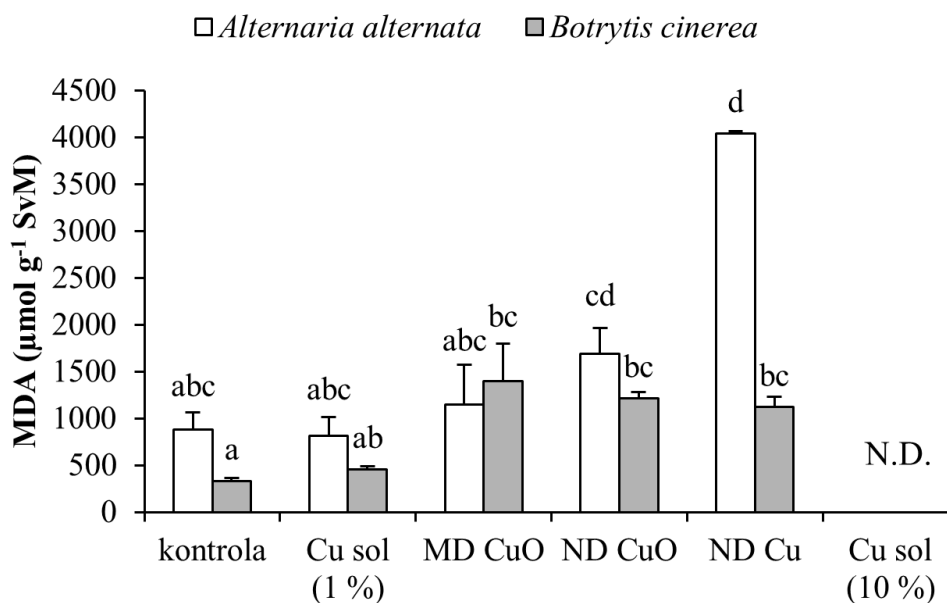
**Figure 13:** Fungal response on treatment with different Cu compounds, presented with a) the water content in mycelia and b) dry biomass of mycelia (mean ± SE; n=3), grown in suspensions of MPs CuO, NPs CuO, NPs Cu and Cu salt 1 % and 10 % for 2 weeks. Different letters above columns represent statistically significant differences between the treatments (Tukey test;  $p < 0,05$ ).

Odziv obeh glivnih izolatov je pokazal, da je *A. alternata* občutljiva, medtem ko je *B. cinerea* bolj toleranten do različnih bakrovih delcev (**Slika 13b**). Namreč povprečna biomasa *A. alternata* se je v vseh bakrovih tretmajih zmanjšala za 55 % v primerjavi s kontrolo, medtem ko se je povprečna biomasa *B. cinerea* v vseh bakrovih tretmajih povečala za 56 % v primerjavi s kontrolo. Rezultati factorske ANOVE so pokazali statistično značilen vpliv vrste glive, oblike bakrove spojine ter njunih interakcij na sintezo biomase, kot tudi na vsebnost vode v miceliju ( $p < 0,05$ ) (**Priloga H**).

Strupenost testiranih bakrovih spojin se je v primeru rasti *A. alternata* izrazila v pričakovanem vrstnem redu, od Cu soli (1 %), MD CuO, ND CuO, ND Cu do Cu soli (10 %) (**Slika 13b**). Na drugi strani, pa se je biomasa micelija *B. cinerea* v gojiščih z dodatkom MD CuO povečala za 147 % in v primeru ND CuO za 207 % v primerjavi s kontrolo. Izgleda, da je gliva *B. cinerea* favorizirala gojišče s tema dvema oblikama bakrovih delcev, in da poseduje določene tolerančne mehanizme na CuO delce.

### 4.2.3 Lipidna peroksidacija v glivnih micelijih

Pri glivah, ki smo jih izpostavili različnim bakrovim spojinam v tekočih gojiščih, smo določili stopnjo lipidne peroksidacije celičnih membran preko koncentracij malondialdehida (MDA), da bi ocenili stopnjo oksidativnega stresa v tretiranih glivah. Ponovno se je izkazalo, da je bila stopnja strupenosti različnih bakrovih spojin v micelijih *B. cinerea* nižja kot v *A. alternata* (Slika 14). Rezultati faktorске ANOVE so pokazali statistično pomemben vpliv vrste glive, oblike bakrove spojine in njune interakcije na koncentracije MDA v tretiranem miceliju ( $p < 0,05$ ) (Priloga H).



**Slika 14:** Lipidna peroksidacija v tretiranih micelijih *A. alternata* in *B. cinerea*. Podatki so predstavljeni kot vsebnost malondialdehida (MDA) v glivi (povprečje ± SN; n=4) iz gojišč z dodatkom MD CuO, ND CuO, ND Cu in Cu soli v koncentraciji 1 % določene vsebnosti Cu v ostalih tretmajih, po 2 tednih rasti. Različne črke nad stolpci predstavljajo statistično značilne razlike med tretmaji (Tukeyev test;  $p < 0,05$ ).

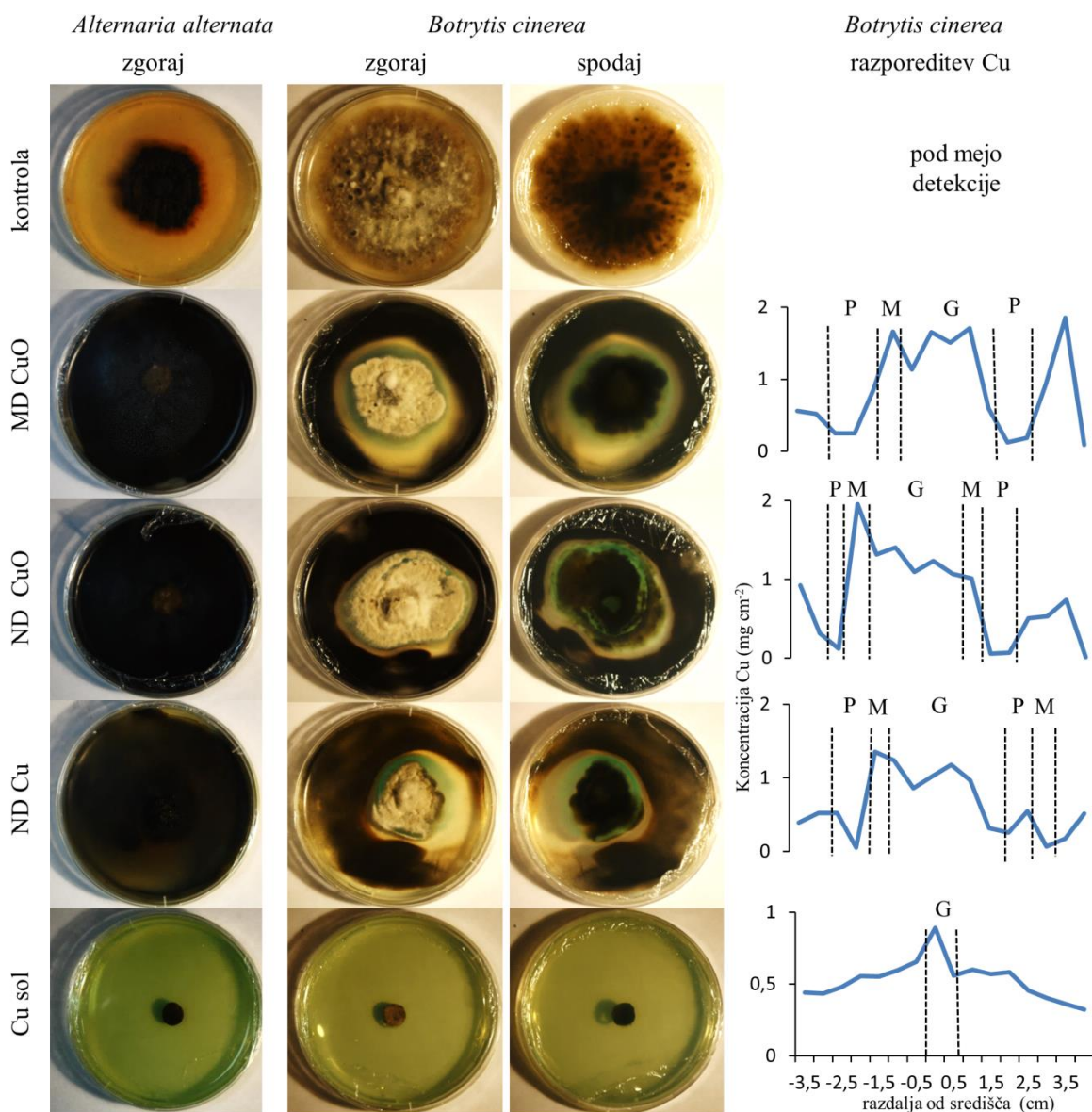
**Figure 14:** Lipid peroxidation in treated mycelia *A. alternata* and *B. cinerea*. Data of biomass are presented as malondialdehyde (MDA) concentrations in fungi (mean ± SE; n=4) grown in media supplemented with MPs CuO, NPs CuO, NPs Cu and Cu salt in 1 % of fixed Cu amount in other treatments, after 2 weeks of growth. Different letters above columns represent statistically significant differences between treatments (Tukey tests;  $p < 0.05$ ).

Najnižje koncentracije MDA so bile v micelijih *B. cinerea* iz gojišča brez dodanega Cu, medtem ko so bile najvišje v micelijih *A. alternata* iz gojišča z dodanimi ND Cu (skoraj 3 mmol MDA g<sup>-1</sup> SvM več v primerjavi z micelijem *B. cinerea*, ki je rasel v enakih pogojih) (Slika 14).

Strupenost oblike bakrove spojine se je večala od Cu soli (1 %), MD CuO, ND CuO do ND Cu. Kljub temu med MDA vrednostmi v micelijih *B. cinerea* tretiranimi z različnimi bakrovimi spojinami ni bilo bistvenih razlik, kar nakazuje na podobno raven stresa. Tretiranje gliv z višjo koncentracijo soli (10 %) ni rezultiralo v zadostni količini biomase, zato podatkov o MDA vrednostih v teh tretmajih nimamo (N.D.).

#### 4.2.4 Izgled gliv na trdnem gojišču in razporeditev bakra vzdolž agarne plošče

Glive, ki smo jih izpostavili različnim bakrovim spojinam na trdnem gojišču, smo fotografirali in z rentgensko spektroskopijo določili razporeditev Cu vzdolž agarne plošče z rastočim glivnim micelijem (Slika 15).



**Slika 15:** Izgled gliv *A. alternata* in *B. cinerea* in razporeditev Cu vzdolž agarne plošč z *B. cinerea* z XRF. Fotografije smo posneli 12 tednov po inokulaciji plošč z različnimi bakrovimi spojinami, MD CuO, ND CuO, ND Cu in Cu sol, od zgoraj in od spodaj agarne plošč. Razporeditev Cu je predstavljena kot koncentracija Cu (mg cm<sup>-2</sup>) v razdaljah 0,5 cm od sredine inokulirane agarne plošče, črtkane črte prikazujejo meje med prozornim (P), modrim (M) in glivnim (G) delom.

**Figure 15:** The appearance of fungi *A. alternata* and *B. cinerea* and Cu distribution across *B. cinerea* agar plates with XRF. Photographs were taken 12 weeks after the inoculation of plates with different Cu compounds MPs CuO, NPs CuO, NPs Cu and Cu salt inoculation, from top and bottom of the plates. Cu distribution is presented as Cu concentrations (mg cm<sup>-2</sup>) in half cm distances from centre of inoculated agar plates, dotted lines represent borders between transparent (P), blue (M) and fungal (G) part.



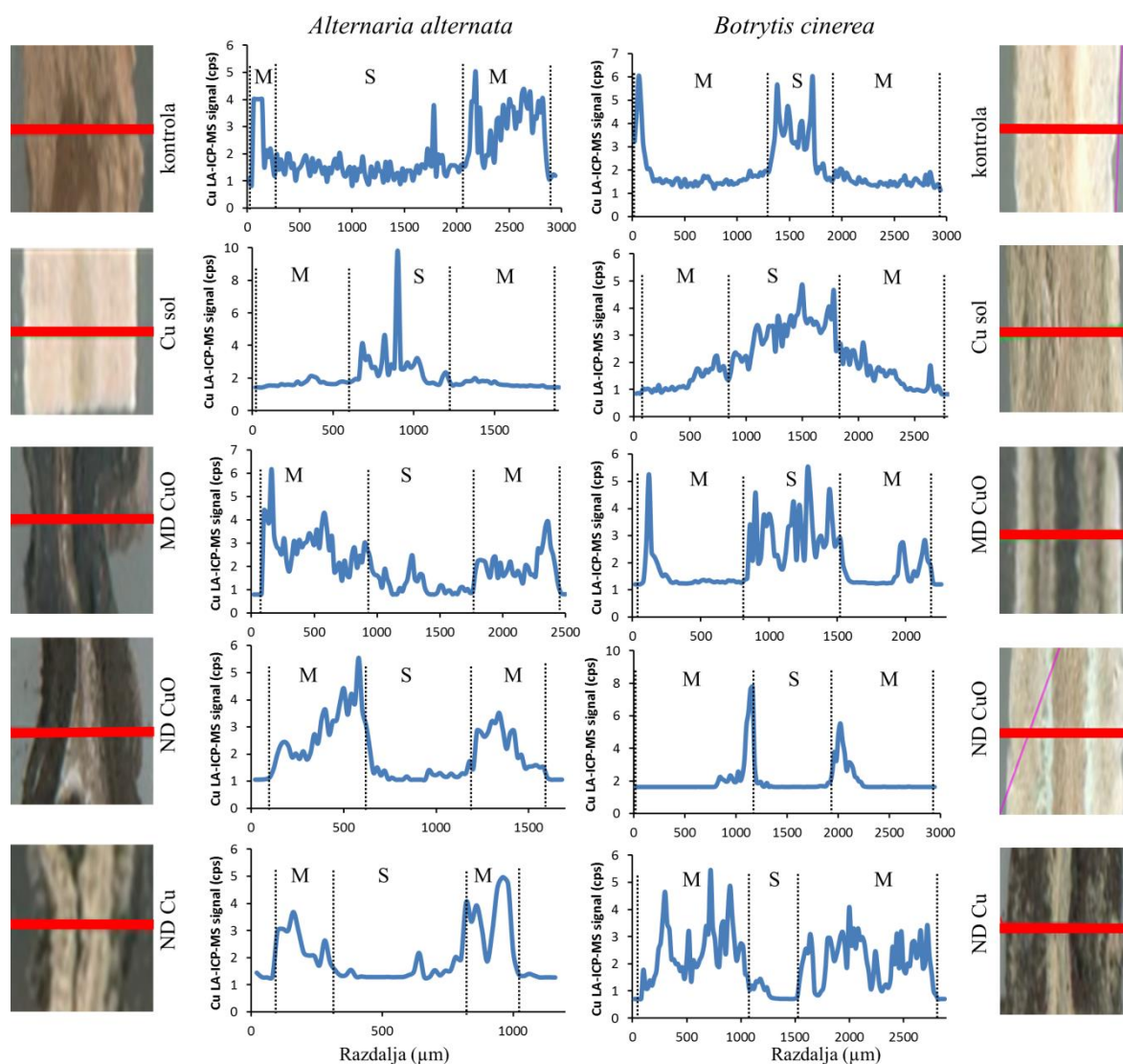
Na kontrolni agarni plošči je *B. cinerea* v času 12. tednih rasti tvoril črne sklerocije. Prav tako je micelij prerastel celotno ploščo in je segal do samih robov (**Slika 15**). Nasprotno, pa je nanešana Cu sol v celoti inhibirala rast glive, kar je verjetno posledica previsoke koncentracije  $\text{Cu}^{2+}$ , ki so izredno strupeni. Različni bakrovi delci uporabljeni v teh poskusih so bili črni in enakomerno porazdeljeni po celotni površini agarnih plošč (**Slika 11a**). Ko je micelij *B. cinerea* rasel od sredine plošče proti robu, se je tik ob miceliju pojavila svetlo modra nova spojina, katero je obdajal prozoren pas brez Cu (**Slika 15**). Ta pojav je bil opazen na ploščah s površinsko dodanimi MD CuO, ND CuO in ND Cu.

Če primerjamo rast glive na teh treh spojinah je najpočasneje rasla na ND Cu. Da bi ugotovili spremembe v razporeditvi Cu, smo njegove koncentracije izmerili v 0,5 cm razdaljah vzdolž celotne agarne plošče po 12. tednih rasti gliv. Njegova razporeditev je pokazala povečanje koncentracije Cu v regiji micelija z vrhom na robu, kar ustreza položaju modro obarvane spojine, ki tesno obdaja micelij (**Slika 15**). Temu vrhu je proti robovom sledilo znatno zmanjšanje skoraj do ničelne vrednosti, kar je ustrezalo 15prosojnemu pasu med modrimi in črnimi območji (**Slika 6**). Tem je ponovno sledil zmerni dvig, ki je sovpadal s enakomerno nanesenimi črnimi delci.

#### 4.2.5 Razporeditev bakra vzdolž prečnega prereza tretiranih micelijev

V micelijih iz tekočih gojišč smo porazdelitev Cu vzdolž glivnega micelija izmerili s pomočjo LA-ICP-MS. Razporeditev Cu vzdolž micelija je bila odvisna od oblike bakrove spojine, kot tudi vrste glive (**Slika 16**). Prisotnost Cu soli je povzročilo primerljive razporeditve elementov v starem in mladem delu micelija, s Cu v sredini (**Slika 16**).

Baker je bil prisoten na robu micelija in ne v centru micelija glive *A. alternata*, ko je rasla v gojišču z dodanimi MD CuO, ND CuO in ND Cu kot tudi micelija *B. cinerea* iz gojišča z ND Cu. Prav tako so bila ta območja črna barve, kar nakazuje na oprijemanje in pritrditev delcev na površino micelijev (**Slika 16**). Po drugi strani pa je bil Cu v miceliju *B. cinerea* porazdeljen v centru le pri tretiranju z MD CuO. Najbolj zanimivo pa je bil Cu razporejen v micelijih *B. cinerea*, tretiranih z ND CuO, in sicer v tankem pasu na meji med mladim micelijem in sredino oz. starim micelijem. Ta pas ni bil črne barve, pač pa svetlo moder, kar nakazuje biotransformacijo teh delcev.



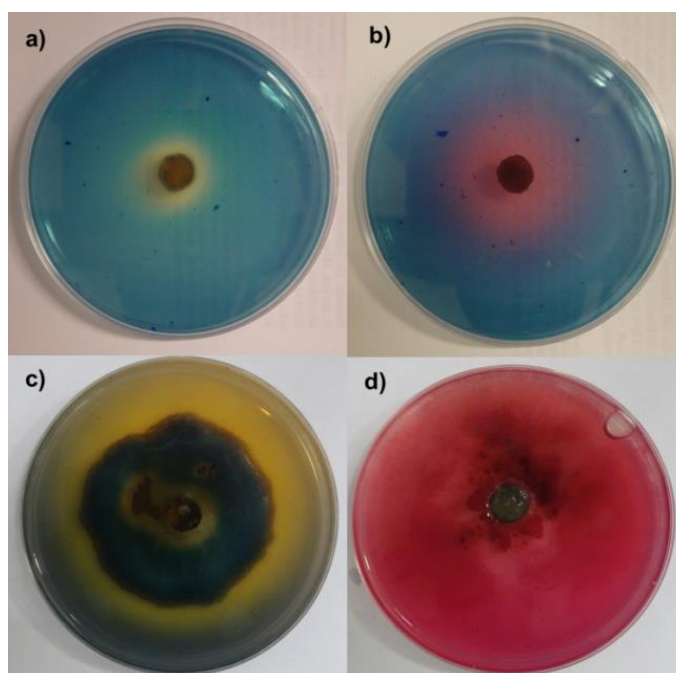
**Slika 16:** Izgled glivnih micelijev in razporeditev Cu vzdolž tretiranih micelijev. Predstavljene so vrednosti Cu (cps) vzdolž micelijev *A. alternata* in *B. cinerea*, ki so rasli v tekočih gojiščih brez dodanega bakra, z dodanimi Cu soljo (1 %), MD CuO, ND CuO in ND Cu, kjer črtkane črte označujejo mejo med starim (S) in mladim (M) delom glivnega micelija.

**Figure 16:** The appearance of fungal mycelia and distribution of Cu across treated mycelia. Data of Cu (cps) across mycelia *A. alternata* and *B. cinerea* grown in control liquid media, supplemented with Cu salt (1 %), MPs CuO, NPs CuO and NPs Cu, are presented, where the dotted lines represent borders among old (S) and young (M) part of fungal mycelia.

#### 4.2.6 Glivna sinteza sideroforov

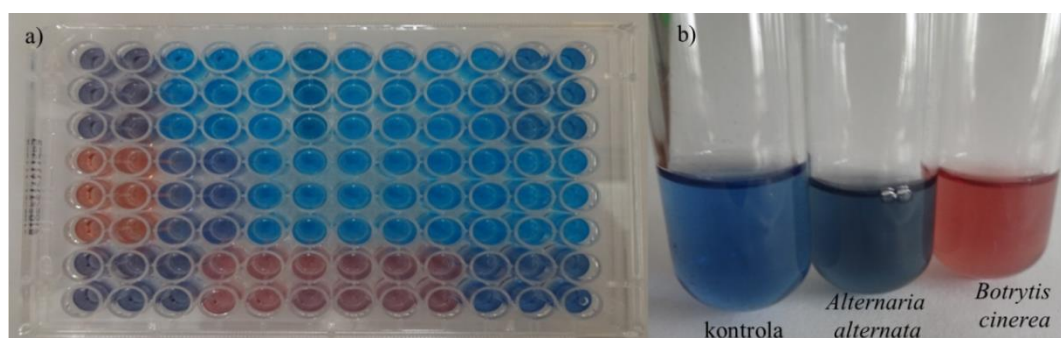
Sintezo sideroforov gliv smo ovrednotili s krom azurol sulfonat (CAS) gojišči, tako na trdnem CAS agarju, kot tudi v tekočem CAS gojišču. Na trdnih CAS agar gojiščih sta obe glivi pokazali sintezo sideroforov, saj je prišlo do spremembe barve drugače modro obarvanega gojišča. Dva dni po inkuluaciji CAS agarnih plošč, je micelij *A. alternata* tvoril rumeno obarvan obroč gojišča okoli micelija s povprečno površino  $224 \pm 13 \text{ mm}^2$  (Slika 17a). V primeru rasti micelija *B. cinerea*, je le-ta tvoril 6-krat večji obroč s povprečno površino  $1353 \pm 45 \text{ mm}^2$ , in sicer vijolične barve (Slika 17b). To nakazuje na

manjšo proizvodnjo in koncentracijo izločenih sideroforov v primeru glive *A. alternata*. Razlike v obarvanosti obroča okoli micelijaja pomenijo sintezo dveh različnih tipov sideroforov, in sicer rumena barva velja za hidroksamatni tip, medtem ko je vijolična značilna za kateholni tip sideroforov. Micelijaji *A. alternata* tako sintetizirajo hidroksimatni tip sideroforov, micelijaji *B. cinerea* pa kateholni tip sideroforov. Enake rezultate smo dobili tudi na 1 teden starih micelijajih z metodo prekrivnega CAS gojišča (Slika 17c, d).



**Slika 17:** Sinteza in izločanje sideroforov gliv *A. alternata* in *B. cinerea*, določena s CAS agarjem 2 dni po inokulaciji z a) micelijem *A. alternata* z rumenim obročem in b) micelijem *B. cinerea* z vijoličnim obročem ter z metodo prekrivajočega CAS agarja, 7 dni po inokulaciji z c) *A. alternata* in d) *B. cinerea*.

**Figure 17:** Production and secretion of siderophores of fungi *A. alternata* and *B. cinerea*, assessed on CAS agar 2 days post-inoculation with a) *A. alternata* mycelia with yellow halos and b) *B. cinerea* mycelia with purple halos, and by overlay-CAS method after inoculation with c) *A. alternata* and d) *B. cinerea*.



**Slika 18:** Detekcija glivne sinteze sideroforov v tekočih gojiščih, v a) mikrotitrni plošči z različnimi tekočimi gojišči z dodanimi različnimi bakrovimi spojinami in CAS reagentom ter b) s prikazano obarvanostjo gojišča po dodatku CAS reagenta v epruveti (neinokulirano gojišče, kontrolno gojišče *A. alternata* in kontrolno gojišče *B. cinerea*).

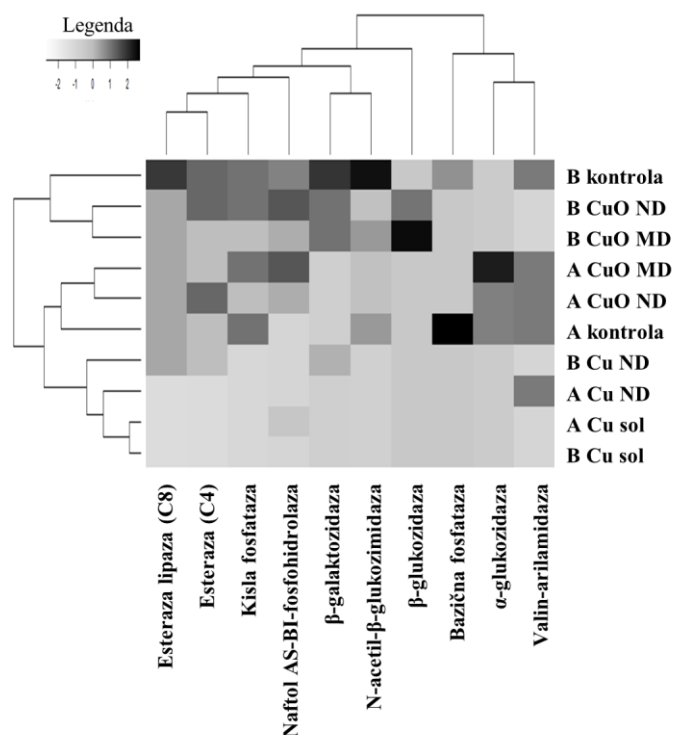
**Figure 18:** Detection of fungal siderophores synthesis in liquid media, in a) the microtiter plate with media, supplemented with different copper forms and addition of CAS reagent and b) presented with changes in colouration of growing media after addition of CAS reagent (uninoculated media, *A. alternata* control media and *B. cinerea* control media).

Sintezo sideroforov smo določevali tudi v tekočih gojiščih. Test z uporabo  $\text{FeCl}_3$  ni dal pozitivnih rezultatov. Z uporabo CAS reagenta smo želeli določiti sintezo sideroforov in jo tudi kvantificirati. Žal, pa so bakrove spojine uporabljene v raziskavi, kljub centrifugiranju in filtriranju vzorcev gojišč, očitno reagirale z eno izmed spojin v CAS reagentu (verjetno heksadeciltrimetilamonij kot vir amonijevega iona). Tako so se vsa gojišča z dodanimi bakrovimi spojinami po dodatku CAS reagenta obarvala enako intenzivno svetlo modro (**Slika 18a**). Siderofore smo tako lahko izmerili in določili le v kontrolnih gojiščih, brez dodatka bakrovih spojin. Rezultat je bil pozitiven le v gojišču *B. cinerea*, in sicer se je njihova vsebnost zviševala z dnevi rasti glive v gojišču (**Slika 18b**). Vrednosti 7 dni po inokulaciji so bile  $4,3 \pm 1,2$ ; 10 dni po inokulaciji  $57,1 \pm 2,1$ ; 14 dni po inokulaciji pa  $70,5 \pm 0,9$  siderofornih enot. Iz tega lahko sklepamo, da micelij *A. alternata* ni sintetiziral sideroforov v tekočem gojišču, bodisi je bilo njihove izločanje prešibko, bodisi ta test ni primeren za hidroksimatni tip sideroforov.

#### 4.2.7 Sinteza in izločanje izvenceličnih encimov tretiranih gliv

Glivam, ki smo jih izpostavili različnim bakrovim spojinam v tekočih gojiščih, smo po 2-tedenski rasti določili in kvantificirali sintezo zunajceličnih encimov. Izmed 20 testiranih encimov v tekočih gojiščih z encimskimi testi API ZYM, je bila razgradnja substrata, kot posledica sinteze encimov, zaznana v polovici testov, v vsaj enem gojišču (**Priloga I**). Rezultate sinteze in izločanja izvenceličnih encimov smo prikazali z barvnim diagramom z dodanim drevesom podobnosti na osnovi analize grozdov. Le tri encimi, esteraza, kislja fosfataza in naftol-AS-BI-fosfohidrolaza, so bili pozitivni v vsakem gojišču, obeh vrst gliv. Drevo podobnosti je pokazalo, da so si med seboj podobni po izločanju glede na tretiranje z različnimi bakrovimi spojinami encimi bazična fosfataza,  $\alpha$ -glukozidaza in vanilin-akrilamidaza ter esteraza lipaza (C8), esteraza C4, kislja fosfataza in naftol AS-BI-fosfohidrolaza ter  $\beta$ -galaktozidaza, N-acetil- $\beta$ -glukozimidaza in  $\beta$ -glukozidaza (**Slika 19**).

Encim bazična fosfataza je bila pozitivna le v kontrolnih gojiščih, višja v primeru *A. alternata* (**Priloga I**). Izločanje  $\beta$ -glukozidaze in  $\beta$ -galaktozidaze je bilo prisotno le v gojiščih *B. cinerea*, medtem ko je bilo izločanje  $\alpha$ -glukozidaze prisotno samo v gojiščih z *A. alternata*. Pozitivni so bili tudi testi za encime esterazo, esterazo lipazo (C8), valin-amilamidazo in N-acetil-P-glukozaminidazo, kjer so ND Cu in Cu sol zavrla njihovo izločanje. Na podlagi hierarhičnega grupiranja lahko zaključimo, da sta tretmaja ND Cu in Cu sol v primeru obeh gliv zavrla sintezo encimov, kar je verjetno posledica nižje glivne biomase micelija zaradi strupenosti teh dveh tretmajev (**Slika 19**).



**Slika 19:** Sinteza in izločanje izvenceličnih encimov prikazana z barvnim diagramom z dodanim drevesom podobnosti na osnovi analize grozdov. Predstavljene so vrednosti vsebnosti encimov, glede na referenčno tabelo proizvajalca, v gojiščih z dodanimi različnimi bakrovimi spojinami (MD CuO, ND CuO, ND Cu, sol Cu) in inokuliranimi z miceliji *A. alternata* (A) in *B. cinerea* (B). Predstavljeni podatki so Z-normalizirani in centrirani, beli kvadrati predstavljajo nižje in črni višje vrednosti (glej legendo).

**Figure 19:** Heatmap of the fungal extracellular enzymes synthesis and secretion. Hierarchical clustering of values determined according to manufacturer's instructions, among different copper treatment (MPs CuO, NPs CuO, NPs Cu and salt Cu) for *A. alternata* (A) and *B. cinerea* (B). The presented data are Z-normalized and centred, white squares represent lower values, while black higher values (see the legend).

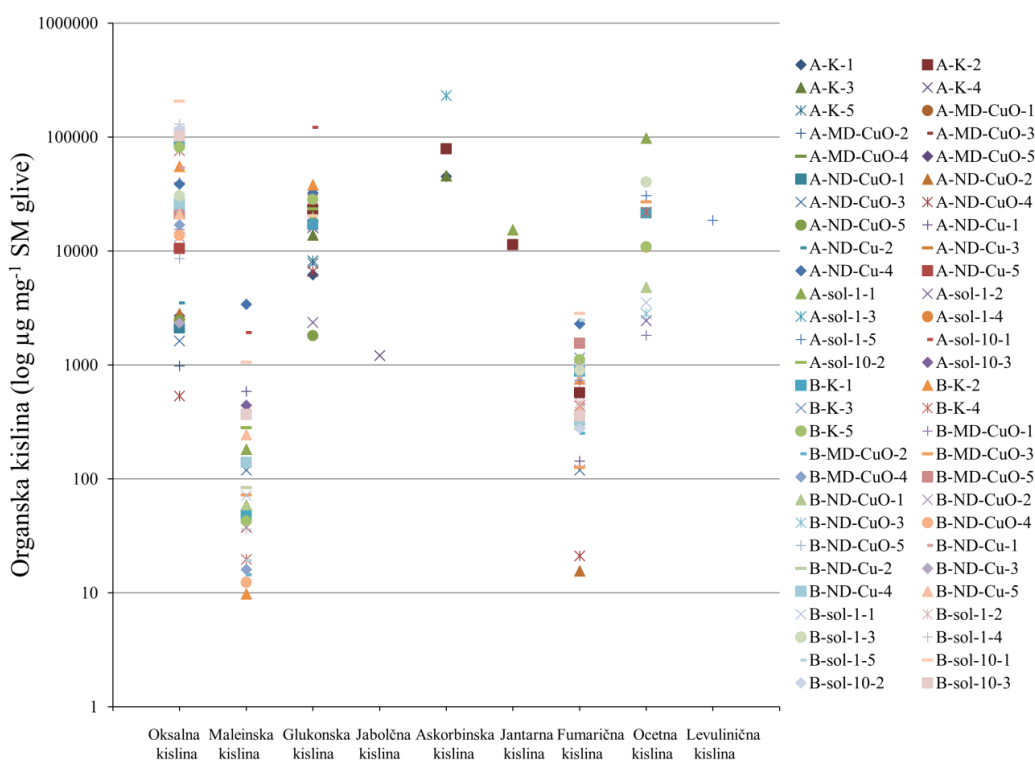
#### 4.2.8 Sinteza in izločanje organskih kislin tretiranih gliv

Glivam, ki so bile izpostavljene različnim bakrovim spojinam v tekočih gojiščih, smo določili in kvantificirali sintezo organskih spojin s HPLC. Med vsemi testiranimi organskimi kislinami se je oksalna kislina izkazala za najpomembnejšo, saj so vrednosti njenega izločanja veliko višje v gojiščih *B. cinerea* (povprečje vseh tretmajev  $60521 \mu\text{g mg}^{-1} \text{ SM}$ ) v primerjavi z gojišči *A. alternata* ( $3536 \mu\text{g mg}^{-1} \text{ SM}$ ). Rezultati faktorске ANOVE so pokazali statistično pomemben vpliv vrste glive, oblike bakrove spojine in njune interakcije na sintezo oksalne kisline ( $p < 0,05$ ) (**Priloga J**). Koncentracije oksalne kisline so bile nižje v gojiščih *B. cinerea* z dodanimi MD CuO, Cu soljo (1 %) in ND CuO ter višje v gojiščih z ND Cu in Cu soljo (10 %) v primerjavi s kontrolo (**Preglednica 8**). Pri *A. alternata* je bila sinteza oksalne kisline povečana v gojiščih z dodano Cu soljo (1 %), MD CuO in ND CuO, medtem ko ni bilo nikakršne sinteze v kontrolnih gojiščih, gojiščih z dodanimi ND CuO in Cu soljo (10 %).

**Preglednica 8:** Glivna sinteza oksalne kisline in pH vrednosti gojišč. Podatki so predstavljeni kot povprečje  $\pm$  SN (n=5), kjer različne črke (a-f) desno vrednosti predstavljajo statistično značilne razlike med tretmaji (Tukeyev test;  $p < 0,05$ ).

**Table 8:** Oxalic acid production by fungi and media pH. Data are mean  $\pm$  SE (n=5), where different letters (a-f) on right side of values represent statistically significant differences among treatments (Tukey tests;  $p < 0,05$ ).

Tretma	Oksalna kislina ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ SM)		pH	
	<i>A. alternata</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>A. alternata</i>	<i>B. cinerea</i>
Kontrola	0 $\pm$ 0 a	78500 $\pm$ 6410 b	3,3 $\pm$ 0 a	3,3 $\pm$ 0,1 a
Cu sol (1 %)	0 $\pm$ 0 a	98500 $\pm$ 17700 bc	3,2 $\pm$ 0 a	3,1 $\pm$ 0,2 a
MD CuO	0 $\pm$ 0 a	19900 $\pm$ 1730 a	4,4 $\pm$ 0 bc	4,1 $\pm$ 0,2 b
ND CuO	1480 $\pm$ 614 a	16700 $\pm$ 3290 a	4,8 $\pm$ 0 cd	4,5 $\pm$ 0,1 bc
ND Cu	15700 $\pm$ 9600 a	25600 $\pm$ 8560 a	5,9 $\pm$ 0 f	5,8 $\pm$ 0,1 ef
Cu sol (10 %)	0 $\pm$ 0 a	142000 $\pm$ 32300 c	5,2 $\pm$ 0 de	5,5 $\pm$ 0,2 def



**Slika 20:** Logaritmirane vrednosti vsebnosti organskih kislin v gojiščih z dodanimi različnimi bakrovimi spojinami (MD CuO, ND CuO, ND Cu, sol Cu) in inokuliranimi z micelijem *A. alternata* (A) in *B. cinerea* (B).  
**Figure 20:** Logarithmic values of organic acids content in media among different copper treatment (MPs CuO, NPs CuO, NPs Cu, salt Cu) inoculated with *A. alternata* (A) and *B. cinerea* (B).

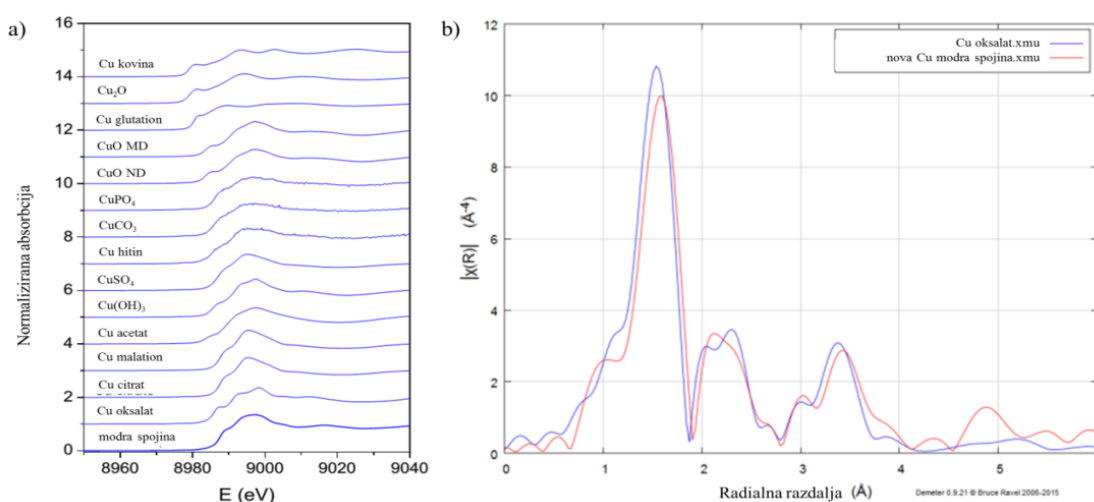
Preračunane vrednosti ostalih organskih kislin v gojiščih z različnimi dodatki in glivami so prikazane na **Sliki 20** oz. izmerjene vrednosti v **Prilogi J**. Glukonska kislina je bila prisotna v skoraj vseh gojiščih, a nad mejo kvantifikacije le v kontrolnih gojiščih obeh gliv, z vrednostmi 10600  $\mu\text{g mg}^{-1}$  SM *A. alternata* in 18900  $\mu\text{g mg}^{-1}$  SM *B. cinerea*. Fumarna kislina smo zaznali v gojiščih obeh gliv in različnih tretmaji, vendar pod mejo kvantifikacije, z izjemo gojišč *B. cinerea* z dodanimi ND CuO in Cu soljo (1 %). Ocetno kislino smo zaznali v kontrolnem gojišču *B. cinerea*, gojiščih z dodanimi ND CuO in Cu

soljo (1 %), vendar nad mejo kvantifikacije le v gojiščih *B. cinerea* z dodanimi MD CuO in gojiščih *A. alternata* z dodano Cu soljo (1 %). Maleinska kislina je bila prisotna v vseh vzorcih, razen kontrolnega gojišča *A. alternata* in gojišča z MD CuO, a pod mejo kvantifikacije, ki je bila  $0,71 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Jabolčna kislina je bila prisotna samo pri kontrolnih gojiščih *A. alternata*, vendar pod mejo kvantifikacije, ki je bila  $28,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Askorbinska in jantarna kislina sta bili prisotni le v kontrolnih gojiščih in gojiščih z dodano Cu soljo (1 %) *A. alternata*, vendar pod mejo kvantifikacije, ki je bila  $227 \mu\text{g ml}^{-1}$  za obe organski kislini. Citronske (meja detekcije  $14,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), itakonične (meja detekcije  $1,42 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) in levulinične kisline (meja detekcije  $28,4 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) nismo zaznali v nobenem vzorcu.

Na koncu 2-tedenskega poskusa so bile razlike v pH vrednostih gojišč statistično značilne (**Preglednica 8**), medtem ko so rezultati factorske ANOVE pokazali statistično značilni vpliv le oblike bakrove spojine na razlike v pH med tretmaji ( $p < 0,05$ ) (**Priloga H**). Najnižje vrednosti so bile v gojiščih z dodano Cu soljo (1 %), katerim sledijo gojišča z MD CuO, ND CuO, Cu soljo (10 %) in presenetljivo gojišča z ND Cu z najvišjo vrednostjo pH med gojišči.

#### 4.2.9 Vezavna oblika bakra in njegovo molekularno okolje

V poskusih s trdnim gojiščem, smo določili vezavno obliko Cu v novonastali modri spojini. Rezultati modeliranja z linearno kombinacijo izmerjenih XANES spektrov različnih bakrovih spojin so potrdili domnevo, da je neznan modra spojina, ki jo tvori *B. cinerea* po izpostavljenosti MD CuO, ND CuO in ND Cu, potrjeno Cu-oksalat (**Slika 21**). Njegova kristalna konformacija rahlo razlikuje od tistih, ki jih tvorijo  $\text{Cu}^{2+}$  iz Cu soli in referenčno spojino oksalne kisline (**Priloga K**).



**Slika 21:** Analiza XAS spektrov z a) linearno kombinacijo XANES spektrov neznanne modre spojine in izbranih spektrov različnih bakrovih spojin ter b) analizo EXAFS meritev modre spojine in primerjava s koordinacijo referenčne spojine Cu-oksalata.

**Figure 21:** Analyses of XAS spectra with a) the linear combination fit of unknown blue compound XANES spectra and XANES spectra of different Cu compounds and b) analyses of EXAFS measurements of blue compound and its comparison to atoms coordination of Cu-oxalate reference compound.

Kljub vsemu smo s preprostim testom, kjer smo zmešali različne bakrove spojine z vodo in oksalno kislino, dokazali, da le prisotnost oksalne kisline ni dovolj za sintezo modrega kompleksa (predvsem vidno v primeru ND Cu) (**Slika 22**).



**Slika 22:** Topnost različnih bakrovih spojin v dH<sub>2</sub>O in oksalni kislini. Fotografije smo posneli 24 ur po reakciji, z leve proti desni: Cu sol, MD CuO, ND CuO in ND Cu v dH<sub>2</sub>O ter Cu sol, MD CuO, ND CuO in ND Cu v oksalni kislini.

**Figure 22:** Solubility of different Cu compounds in dH<sub>2</sub>O and oxalic acid. The photographs were taken after 24 hours of samples from left to right: Cu salt, MPs CuO, NPs CuO, NPs Cu in dH<sub>2</sub>O and Cu salt, MPs CuO, NPs CuO, NPs Cu in oxalic acid.

### 4.3 RAZPRAVA

#### 4.3.1 Karakterizacija bakrovih delcev

Karakterizacija bakrovih delcev s presevnim elektronskim mikroskopiranjem je pokazala, da je velikost nekaterih posameznih zrn večja od tiste, ki jo določa proizvajalec, kar je že poznan in objavljen pojav (Zhao in sod., 2011; Buffet in sod., 2011). V skladu z opazovanjem drugih, so bili delci pretežno okrogle in sferične oblike (Dimkpa in sod., 2012a). EDX meritve in elektronska difrakcija ND Cu je pokazala na prisotnost kisika, kar nakazuje na obstoj bakrovih oksidov na površini delcev, kot je že bilo ugotovljeno (Gattinoni in Michaelides, 2015). Prav tako rezultati meritev IET nakazujejo, na veliko podobnost v površini ND CuO in ND Cu. Elektrostatični odboj je pomemben stabilizacijski mehanizem, saj so ND kovinskih oksidov nagnjeni k agregaciji, ko se pH približa njihovi IET (Ghosh in sod., 2008), kar pa ni bistvenega pomena v našem primeru, saj smo pH gojišč izmerili med 3 in 6. Pozitivno nabiti ND so elektrostatično privlačni za negativno nabite membrane in celične stene gliv, tako da posledično meritve zeta potenciala lahko služijo kot pokazatelj strupenosti slabo topnih ND. Kljub vsemu odnos med IET in interakcijami ND s celicami še ni povsem razjasnjen (Djurišić in sod., 2015; Dimkpa in sod., 2012a).

Razlog za višjo vrednost IET MD CuO bi lahko bila prisotnost nečistoč v kemikaliji, saj smo izmerili vsebnosti Sn, Ca, Fe in Ni. V nasprotju z našimi ugotovitvami, so Zhao in sod. (2011) poročali o MD in ND CuO z čistočo večjo od 99,9 %. Odziv bioloških celic je odvisen od kemične sestave in redoks potenciala ND CuO (Fahmy in Cormier, 2009). Tako lahko razlog za nasprotujoče si rezultate glede strupenosti ND pripišemo razlikam v sintezi nanomateriala, koncentraciji, topnosti in prisotnosti aditivov oz. nečistoč (Djurišić in sod., 2015). Na drugi strani pa so za strupenost ND pomembne tudi razlike v okoljskih pogojih, kot so temperatura, pH, zračenje in koncentracija ND (Rispoli in sod., 2010)

Rezultati meritev bakrovega iona v gojiščih so pokazali, da je bila v gojišču z *A. alternata* nižja stopnja luženja Cu s površine izbranih bakrovih delcev kot v gojiščih z *B. cinerea*.



Kot poročajo številni avtorji, se luženje  $\text{Cu}^{2+}$  s površine delcev do neke mere pojavlja naravno, samo od sebe, in je odvisno od velikosti delcev (Gunawan in sod., 2011; Buffet in sod., 2011; Aruoja in sod., 2009; Blinova in sod., 2010; Shi in sod., 2011, Ding in sod., 2013). Ker so bili pri obeh glivah uporabljeni enaki bakrovi delci, povišano luženje v primeru prisotnosti *B. cinerea* nakazuje na določeno presnovno aktivnost glive, ki spodbuja to luženje. Prav tako je bila za vplivni dejavnik s pomočjo factorske ANOVE spoznana vrsta glive. Stopnja luženja  $\text{Cu}^{2+}$  je pomemben dejavnik, saj to velja za enega izmed predlaganih mehanizmov strupenosti ND kovinskih oksidov (Gajewicz in sod., 2015; Gunawan in sod., 2011). Pri podrobnem pregledu Bodarenko in sod. (2013) je ravno sprostitvev iona s površine razlog za strupenost ND Ag in ZnO, medtem ko to ne velja za ND CuO. Bakrovi ioni s površine ND tvorijo Cu-proteinski kompleks, ki je bolj citotoksičen v primerjavi z Cu-proteinskimi kompleksi, ki nastanejo iz Cu s Cu soli (Gunawan in sod., 2011). Luženje  $\text{Cu}^{2+}$  z ND CuO je odvisno od pH vrednosti gojišča (Soltani Nezhad in sod., 2014), a to luženje ne vpliva na spremembe vrednost pH gojišča, kot so ugotovili na primeru povišanih koncentracij Cu soli (Gunawan in sod., 2011).

#### **4.3.2 Odziv glivnega micelija na tretiranje z bakrovimi spojinami**

Najprej smo glivno biomaso ocenili v poskusih z različnimi koncentracijami  $\text{Cu}^{2+}$ , kjer je gliva *B. cinerea* pokazala povečano rast pri nižjih koncentracijah Cu v primerjavi s kontrolo, kar bi lahko pomenilo favoriziranje in/ali odvisnost te glive od manjše vsebnosti  $\text{Cu}^{2+}$ . Povezava med *B. cinerea* in Cu obstaja, saj kalitev spor te glive ni spremenjena ob prisotnosti manjših koncentracij  $\text{Cu}^{2+}$  in je le zakasnjena v primeru višjih koncentracij (Judet-Correia in sod., 2011), ker naj bi nekatere spore vezale Cu na svojo površino in s tem očistile gojišče Cu. Dokazali so, da *B. cinerea* lahko razvije odpornost na Cu v laboratorijskih razmerah (Parry in Wood, 1958). Nekateri avtorji so poročali, da ni očitnih povezav med odpornostjo *B. cinerea* na Cu in njegovo koncentracijo v vinogradih (Jacometti in sod., 2010), medtem ko so drugi poročali na obstojnost te glive tudi v ekosistemih, kamor so bile vnešene visoke koncentracije fungicidov na osnovi kovin (Komarek in sod., 2010). Kljub vsemu izgleda, da ne obstaja nikakršna neposredna povezava med sintezo glivne biomase in biosorpcijo Cu (Andreazza in sod., 2011).

V nadaljnjih poskusih z različnimi bakrovimi spojinami, se je *A. alternata* izkazala za občutljivo, kar je v skladu z objavljeno literaturo (Zafar in sod., 2007; Ouda in sod., 2014; Hartikainen in sod., 2012; Kanhed in sod., 2015) in *B. cinerea* za bolj tolerantno na MD in ND CuO ter ND Cu. Pomemben dejavnik vpliva na biomaso gliv je bila med drugim tudi oblika bakrove spojine, s čimer smo potrdili tretjo hipotezo in dokazali, da so učinki bakrovih spojin na rast glivnih izolatov pogojeni z obliko spojine. Različne molekule, npr. zunanji polisaharidi, organske kisline in proteini, lahko reagirajo s površino ND, kar vpliva na agregacijo netopnih ND in njihovo nadaljnjo usodo v okolju in prenosu (Soltani Nezhad in sod., 2014; Ghosh in sod., 2008). Vse študije strupenosti na različnih organizmih so pokazale večjo strupenost ND CuO v primerjavi s MD CuO (Aruoja in sod., 2009, Rousk

in sod., 2012; Shi in sod., 2014; Dimkpa in sod., 2012b; Atha in sod., 2012; Karlsson in sod., 2009; Mortimer in sod., 2010), kar zanimivo ne velja v primeru naše glive *B. cinerea*. Rezultati meritev vsebnosti vode v micelijih je pokazala znatno nižjo vsebnostjo vode v micelijih *A. alternata* tretiranega z MD CuO in ND CuO ter micelijih *B. cinerea* tretiranih z ND Cu, kar bi lahko bila posledica oprijemanja delcev na površino glivnih celic. Imobilizacija Cu na površini celic zmanjšuje njegovo razpoložljivost in strupenost, na katero pa imata pomemben vpliv sestava celične stene in vsebnost hitina (Anand in sod., 2006; Judet-Correia in sod., 2011). Bakterije lahko po daljši izpostavljenosti razvijejo odpornost na nanomaterial (Gunawan in sod., 2013). V preglednem članku Civardi in sod. (2015) so opisane mnoge intra- in inter-specifične razlike v razstrupljanju Cu, kar nakazuje na posamezne strategije preživetja organizmov.

Ker je lipidna peroksidacija merljiva na dokaj preprost način, spektrofotometrično, je odličen pokazatelj stopnje oksidativnega stresa glive in s tem posledično tudi strupenosti testirane spojine. Najnižje koncentracije MDA smo izmerili v micelijih *B. cinerea* brez dodatka Cu, medtem ko smo najvišje v micelijih *A. alternata* tretiranih z ND Cu. Strupenost tretmajev je naraščala od Cu soli (1 %), MD CuO, ND CuO do ND Cu. Med tretiranimi miceliji *B. cinerea* ni prišlo do značilnih razlik v koncentracijah MDA. Znano je, da ND CuO poškoduje celične membrane preko specifičnih in/ali nespecifičnih interakcij ali z oprijemanjem na membrano (Nel in sod., 2009). Oprijemanju ND kovinskih oksidov na membrano sledijo poškodbe membrane in spremenjena ekspresija membranskih proteinov (Gogniat in sod., 2006; Zhao in sod., 2015). Sposobni so oksidacije membranskih proteinov (Fahmy in Cormier, 2009) in lahko preko sinteze ROS lahko spremenijo ali porušijo zgradbo celične membrane, kar pa vodi do okvare vitalnih celičnih procesov (Maness in sod., 1999). V bakterijah MD CuO spremenijo prepustnost membrane, kar povzroči sprostitvev lipopolisaharidov, membranskih proteinov in znotrajceličnih biomolekul (Azam in sod., 2012). Dokazali smo, da je odziv gliv na tretiranje z bakrovimi spojinami vrstno specifičen, s čimer lahko potrdimo četrto hipotezo.

#### **4.3.3 Vpliv različnih bakrovih spojin na izgled gliv in razporeditev bakra**

Glive so razvile edinstvene in kompleksne odnose do kovin v okolju, saj jih lahko oksidirajo, reducirajo, metilirajo in dealkalizirajo, z aktivnimi in pasivnimi procesi. Zelo malo informacij je na voljo o povprečnih koncentracijah elementov v glivah, kar je posledica pomanjkanja sistematičnih raziskav, vendar naj bi bila P in K najpogostejša elementa v glivnih hifah (Adriano, 2001). Potrebe po Cu so lahko višje zaradi njegove vloge kot sestavni del mnogih encimov (Adriano, 2001). V primeru 12-tedenske rasti *B. cinerea* je nanešena Cu sol na trdno agarno gojišče v celoti inhibirala rast glive, kar je verjetno posledica previsoke koncentracije  $\text{Cu}^{2+}$ , ki so izredno strupeni (Adriano, 2001). Vsi bakrovi delci (MD in ND CuO ter ND Cu) uporabljeni v teh poskusih so bili črni, a posledica rasti *B. cinerea* na vseh teh delcih je bila tvorba nove svetlo modre spojine tik ob miceliju. Temu pasu je sledil prozored del brez vidno zaznavnih spojin in nato ponovno

prvotno nanešeni bakrovi delci, kar nakazuje, da je biotransformacija posledica izločanja nekega metabolita v okolico glivnega micelija in ne neposrednega stika. Najpočasneje je gliva rasla na ND Cu, kar pomeni, da so bili ti delci za to glivo najbolj strupeni in težavni za biotransformacijo. Da bi ugotovili spremembe v razporeditvi Cu, smo izmerili njegovo koncentracijo v 0,5 cm razdaljah vzdolž celotne agarne plošče po 12. tednih rasti glive. Razporeditev Cu je pokazala povečanje koncentracije Cu v regiji micelija z vrhom na robu, kar ustreza položaju modro obarvane spojine, kateremu je proti robovom sledilo znatno zmanjšanje Cu skoraj do vrednosti pod mejo detekcije XRF, kar je ustrezalo prosojnemu pasu med modrimi in črnimi območji in pomeni, da ima gliva mehanizme za odstranitev bakrovih delcev in njihovo biotransformacijo. Gliva *A. alternata*, le-ta ni bila sposobna rasti na gojišču s Cu soljo, medtem ko je bila njena rast na gojiščih z MD in ND CuO ter ND Cu minimalna. Prav tako ni bilo opaziti nikakršnih drugih sprememb delcev ali glive, kar je dokaz o pomanjkanju tolerančnih oz. razstrupljevalnih mehanizmov te glive in potrditev njene občutljivosti na različne bakrove spojine.

V micelijih iz tekočih gojišč smo porazdelitev Cu izmerili s pomočjo LA-ICP-MS. V primeru glive *A. alternata*, ko je rasla v gojišču z dodanimi MD CuO, ND CuO in ND Cu kot tudi micelija *B. cinerea* iz gojišča z ND Cu, je bil izmerjen Cu bil prisoten na robu micelija in ne v centru micelija, kar sovпада s podatki o vsebnosti vode v micelijih in potrjuje našo teorijo o oprijemanju delcev na površino, kar nakazuje že črna barva površine micelijev. V skladu z našimi rezultati, so ND ostali čvrsto pritrjeni na bakterije tudi po spiranju le-teh (Applerot in sod., 2009). Baker se lahko veže na površino spor med kaljivostjo, tako da je potreben čas za proces razstrupljanja in izbor preživelih spor (Anand in sod., 2006). Na adsorpcijo ND na celično membrano vplivajo viskoznost in izmenjevalni transport preko membrane (Thill in sod., 2006). Nekateri raziskovalci omenjajo potencialni mehanizem strupenosti ND v njihovi vezavi na različne elemente in s tem posledično pomanjkanje hranil (Gogniat in sod., 2006; Gerber in sod., 2012; Ng in sod., 2013).

Na drugi strani pa bil Cu v miceliju *B. cinerea* porazdeljen v centru le pri tretiranju z MD CuO. Najbolj zanimivo, pa je bil Cu razporejen v micelijih *B. cinerea*, tretiranih z ND CuO, in sicer v tankem pasu na meji me mladim micelijem in starim micelijem. Ta pas ni bil črne barve, pač pa svetlo modre in nakazuje na biotransformacijo teh delcev. Dokazali so, da so zaradi dolgotrajne izpostavljenosti gliv različnim bakrovim spojinam, nekatere razvile odpornost na Cu (Cervantes in Gutierrez-Corona, 1994). Tako lahko številne bakterije in glive ob izpostavljenosti Cu soli lahko tvorijo ND Cu različnih velikosti, oblik in sestave (Rubilar in sod., 2013), kar se ni izkazalo v našem primeru. V skladu z objavljeno raziskavo Judet-Correia in sod. (2010), smo tudi mi nakazali na povezavo med glivo *B. cinerea* in Cu, ter na sposobnost te glive za vezavo Cu in njegovo odstranjevanje. Ker smo dokazali, da ima naš izolat *B. cinerea* sposobnost biotransformacije različnih bakrovih delcev, ima velik potencial za uporabo v biotehnoloških procesih sinteze različnih materialov ali čiščenja (Zafar in sod., 2007).

#### 4.3.4 Glivna sinteza sideroforov, zunajceličnih encimov in organskih kislin kot potencialni razstrupljevalni mehanizmi

Siderofori so sposobni oblikovati močne kelate s kovinami in lahko neposredno vplivajo na njihovo relativno razpoložljivost (Elad in sod., 2007; Chen in sod., 2014). Običajno imajo dvovalentni kationi, kot v našem primeru, manjšo afiniteto za vezavo na siderofore kot trivalentni kationi, npr. železo (Dimkpa in sod., 2009). Kljub temu je dobro znano, da siderofori vežejo tudi Cu (Koh in Henderson, 2015). Na trdnih CAS agar gojiščih sta obe glivi pokazali sposobnost za sintezo sideroforov, saj je prišlo do spremembe barve sicer modro obarvanega gojišča. Miceliji *A. alternata* sintetizirajo hidroksimatni tip sideroforov in miceliji *B. cinerea* kateholni tip sideroforov (Pérez-Miranda in sod., 2007). Nasprotujoče splošnemu prepričanju v razstrupljevalno vlogo sideroforov, lahko te kateholnega tipa delujejo kot Cu (II) reducent, kar še poveča strupenost Cu (Grass in sod., 2004), a to očitno ne velja v našem primeru. Sintezo sideroforov smo določili tudi v tekočih gojiščih, v katerem je bil pozitiven rezultat le v kontrolnih gojiščih glive *B. cinerea*, saj so vsa gojišča s prisotnostjo Cu reagirala z reagentom v protokolu in so bili izmerjeni rezultati nepravilni. Micelij *A. alternata* ni sintetiziral sideroforov v tekočem gojišču, bodisi je bilo njihove izločanje prešibko, bodisi ta test ni primeren za hidroksimatni tip sideroforov. Zanimivo MD CuO in  $\text{Cu}^{2+}$  v koncentracijah enakovrednim tistim sproščenim s površine ND CuO niso spremenili sinteze specifičnega fluorescenčnega siderofora v *Pseudomonas chlororaphis*, medtem ko so nižje koncentracije ND CuO spremenili sintezo tega istega siderofora (Dimkpa in sod., 2012a). Na tem mestu bi lahko analizirali tudi prisotnost različnih metalotioninov, ki imajo dokazano pomembno vlogo pri tolerantnosti gliv na Cu (Cervantes in Gutierrez-Corona, 1994).

Izmed 20 testiranih encimov v tekočih gojiščih z encimskimi testi API ZYM, je bila razgradnja substrata, kot posledica sinteze encimov, zaznana v polovici testov, v vsaj enem gojišču. Izločanje  $\beta$ -glukozidaze in  $\beta$ -galaktozidaze je bilo prisotno le v gojiščih *B. cinerea*, medtem ko je bilo izločanje  $\alpha$ -glukozidaze prisotno samo v gojiščih z *A. alternata*, kar je največja razlika med preučevanima glivama in nakazuje na razlike v sposobnosti sinteze encimov med posameznimi glivnimi vrstami (Trigiano in Fergus, 1979; Cotoras in Silva, 2005). Tri od testiranih encimov, esteraza, kislja fosfataza in naftol-AS-BI-fosfohidrolaza so bili pozitivni v vsakem gojišču, obeh vrst gliv. Encim bazična fosfataza je bila pozitivna le v kontrolnih gojiščih, kar pomeni, da jo je dodajanje Cu v kakršnikoli obliki v gojišče inhibiralo. Dokazali smo, da ND Cu in Cu sol zmanjšajo izločanje encimov esteraze, esteraze lipaze (C8), valin-arilamidaze in N-acetil-P-glukozaminidaze. Verjetno je to posledica nižje glivne biomase micelija zaradi strupenosti teh dveh tretmajev. Na voljo je veliko literature o prilagojenem izločanju proteinov gliv kot odziv na prisotnost različnih kovin, kar so pokazali tudi v proteomski študiji na glivi *B. cinerea* (Cherrad in sod., 2012). Encimi lahko vežejo kovine in imajo posledično vpliv na dostopnost kovine in s tem varovalno vlogo pri strupenem vplivu kovin (Wei in sod., 2001) ali so odgovorni za

preureditev celične stene gliv in odstranjevanje reaktivnih kisikovih spojin. Na primeru lignocelulitičnih encimov so znanstveniki potrdili, da oblika kovine, bodisi ionska ali v obliki ND lahko vpliva na profil sinteze teh encimov (Shah in sod., 2010).

Nekateri izmed testiranih encimov imajo pomembno vlogo pri biogeokemičnem kroženju mineralnih hranil, npr.  $\beta$ -galaktozidaza,  $\beta$ -glukozidaza, bazična in kislja fosfataza... Drevo podobnosti je pokazalo, da so si med seboj podobni po izločanju glede na tretiranje z različnimi bakrovimi spojinami encimi bazična fosfataza,  $\alpha$ -glukozidaza in vanilin-akrilamidaza ter esteraza lipaza (C8), esteraza C4, kislja fosfataza in naftol AS-BI-fosfohidrolaza ter  $\beta$ -galaktozidaza, N-acetil- $\beta$ -glukozimidaza in  $\beta$ -glukozidaza. Ta delitev temelji predvsem na obliki bakrove spojine in ne vrsti glive. Pomemben dejavnik je pH gojišč, saj npr. *B. cinerea* pri nizkih pH vrednostih gojišč poveča sintezo nekaterih encimov (Manteau in sod., 2003), kar bi lahko bil tudi eden izmed razlogov za razlike v sintezi kislje fosfataze med gojišči z dodanimi različnimi oblikami bakrovih spojin. Neželeni učinki Cu, ki se uporablja v vinogradih in v tleh ostane še dolgo časa se vidijo na encime dehidrogenaze,  $\beta$ -glukozidaze in fosfataze, kar velja tudi v naši raziskavi (Fernandez-Calvino in sod., 2010). Aktivnost fosfataz v zemlji velja za najboljši pokazatelj strupenosti kovine Cu (Fernandez-Calvino in sod., 2010). Aktivnost kisljih fosfataz kvasa se poveča s povečanjem  $\text{Cu}^{2+}$  koncentracije (Ito in sod., 2007), vendar pa nasprotno Cu zavre aktivnost prostih kisljih fosfataz v tleh, kar je odvisno od njene oblike kot tudi pH (Huang in Shindo, 2000). Slednje velja tudi v naši raziskavi za obe, kisljo in alkalno fosfatazo. Na drugi strani bi lahko imeli določeni encimi (npr. esteraza in esteraza lipaza) pomembno vlogo pri različnih biokemijskih poteh, saj je njihov produkt lahko prekurzor določene spojine (npr. glikolat in glioksilata kot prekurzorja za oksalat).

Na koncu 2-tedenskega poskusa so bile razlike v pH vrednostih gojišč statistično značilne in odvisne od oblike bakrove spojine. Predvidevamo, da je nižji pH gojišča pri tretmajih z manj Cu posledica večje biomase glive in njene metabolne aktivnosti, kot je npr. sinteza organskih kislin in različnih encimov. Zaradi grobosti uporabljene metode lahko trdimo, da v skupnem ni omembe vrednih razlik med gojišči z *A. alternata* in *B. cinerea*, a vseeno bi lahko prišlo do večjih sprememb v mikookolju glivnega micelija.

Med vsemi testiranimi organskimi kislinami, se je oksalna kislina izkazala za najpomembnejšo, saj so vrednosti njene sinteze veliko višje v gojiščih z *B. cinerea* v primerjavi z *A. alternata*. Pomemben dejavnik vpliva na sintezo oksalne kisline so bili vrste glive, oblika bakrove spojine in njune interakcije. Koncentracije oksalne kisline so bile nižje v gojiščih *B. cinerea* z dodanimi MD CuO, soljo Cu (1 %) in ND CuO ter višje v gojiščih z ND Cu in soljo Cu (10 %) v primerjavi s kontrolo. V gojiščih *A. alternata* je bila sinteza oksalne kisline povečana v gojiščih z dodano soljo Cu (1 %), MD CuO in ND CuO, medtem ko ni bilo nikakršne sinteze v kontrolnih gojiščih, gojiščih z dodanimi ND CuO in soljo Cu (10 %). V okviru meritev ostalih organskih kislin, ni omembe vrednih razlik. Glukonska kislina je bila prisotna v skoraj vseh gojiščih, a v najvišjih koncentracijah pri

kontolah. Ocetno kislino smo zaznali v kontrolnem gojišču z *B. cinerea*, gojiščih z dodanimi ND CuO in Cu soljo (1 %) obeh gliv. Maleinska kislina je bila prisotna v vseh vzorcih, razen kontrolnega gojišča z *A. alternata* in gojišča z MD CuO. Jabolčna kislina je bila prisotna samo pri kontrolnih gojiščih *A. alternata*. Askorbinska in jantarna kislina sta bili prisotni le v kontrolnih gojiščih in gojiščih z dodano Cu soljo (1 %) in *A. alternata*.

Znano je, da gliva *B. cinerea* sintetizira oksalat in vitro kot tudi in vivo (Dutton in Evans, 1996; Verhoeff in sod., 1988; van Kan, 2005). Znano je tudi, da je oksalna kislina sposobna biotransformirati minerale v Cd-, Cu- in Zn-oksalate (Fomina in sod., 2005). Posledično je pH okolja kislo in kemija kovinskih ionov je spremenjena, bodisi z neposrednim kompleksiranjem ali s pH spodbujenimi specifičnimi spremembami (Elad in sod., 2007). S preprostim stranskim poskusom smo pokazali, da je čista oksalna kislina sposobna preoblikovati MD in ND CuO in ND Cu v Cu-oksalat, a se barva novo nastale spojine ne ujema s tisto, opaženo v povezavi z glivami. To pomeni, da le oksalna kislina ni dovolj za sintezo modre novonastale spojine ob glivah. V tretiranem lesu s Cu so izmerili povečane vsebnosti oksalne kisline v primerjavi z netretiranim lesom, česar namen bi lahko bil lovljenje strupenih  $\text{Cu}^{2+}$  (Ohno in sod., 2015). Tudi gliva *Beauveria bassiana*, ki tvori Cu-oksalat, izloča velike količine oksalne kisline in nobene izmed ostalih 11 testiranih organskih kislin v raziskavi (Joseph in sod., 2012). Bistvena je preobrazba Cu v Cu-oksalat, vendar naj to ne bi bil edini mehanizem odgovoren za tolerantnost gliv na Cu, saj naj bi tudi druge kisline odgovorne za povečano izpiranja Cu (Humar in sod., 2004). Citronska in mlečna kislina sta pokazali najvišjo, vinska, jabolčna in očetna kislina zmerno in oksalna kislino slabšo aktivnost v topljenju Cu direktno iz rude (Rao in sod., 2002).

#### 4.3.5 Vezavne oblike bakra v novonastali modri spojini

Rezultati XAS analiz so potrdili našo domnevo, da je neznana modra spojina, ki jo tvori gliva *B. cinerea* ob prisotnosti različnih bakrovih delcev, Cu-oksalat. Njena kristalna konformacija se rahlo razlikuje od tiste, ki jo referenčna oksalna kislina tvori s  $\text{Cu}^{2+}$  iz Cu soli. Kisikovi ligandi igrajo pomembno vlogo pri koordinaciji kovin v glivni biomasi v času kopičenja različnih strupenih kovin (Fomina in sod., 2005). Znano je, da se lahko oksalna kislina veže neposredno na Cu (Elad in sod., 2007) in njena vloga pri razstrupljanju Cu iz okolja je dobro uveljavljena kljub temu, da se včasih sinteza oksalne kisline ne izkaže za bistven dejavnik pri toleranci na Cu (Clausen in sod., 2000). Količina glivnega Cu-oksalata se povečuje z višanjem vsebnosti Cu v gojiščih (Joseph in sod., 2012). Na drugi strani pa je Lewisova kislina Cu (II) znana, da tvori komplekse z aminokislinami kot so histidin, cistein in lizin, zaradi svoje visoke afinitete do stranskih verig in posledično zmanjšanju strupenosti Cu (Dharsana in sod., 2015). Izkazalo se je, da se iz bakrovega oksida ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) lahko tvori kompleks Cu-peptida (Meghana in sod., 2015). Če povzamemo, ima oksalna kislina v naši raziskavi glavno vlogo pri biotransformaciji bakrovih delcev v Cu-oksalat, a tvorba le-tega ni posledica nižjih pH vrednosti gojišč, kot so poročali nekateri (Humar in sod., 2005).

## 5 ODZIV SEMEN IN RASTLIN NAVADNE TER TATARSKE AJDE NA PRISOTNOST RAZLIČNIH BAKROVIH SPOJIN

### 5.1 MATERIALI IN METODE

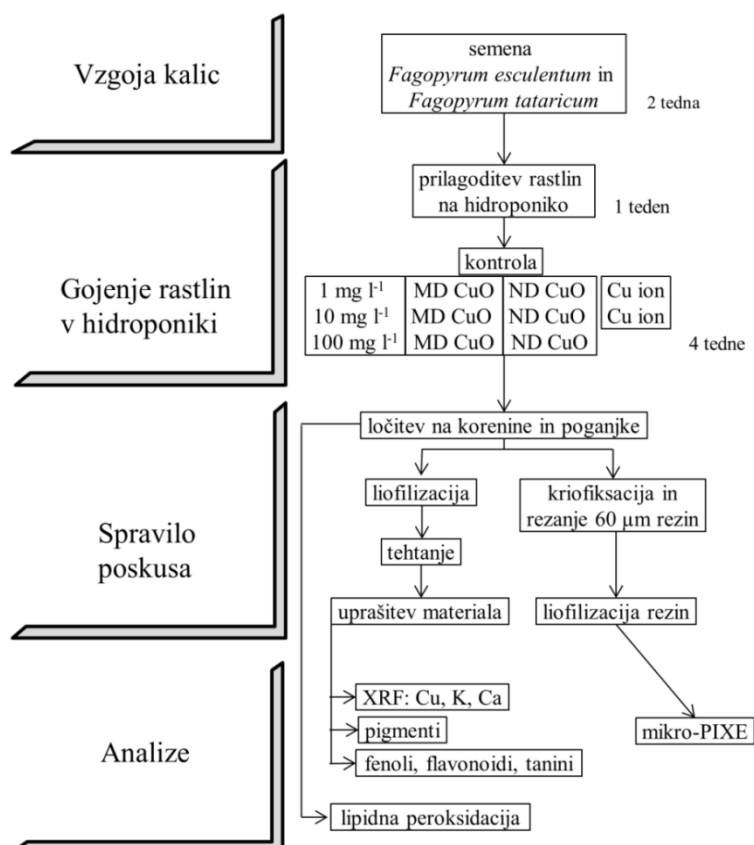
Za testiranje strupenosti različnih bakrovih spojin na ajdo smo se poslužili kalitvenega testa ter hidroponskega gojenja. Pri obeh testih lahko natančno nadzorujemo količino hranil oz. bakrovih spojin, ki bodo rastle na razpolago. Pri kalitvenem testu smo primerjali vpliv različnih koncentracij nanodelcev CuO, mikrodelcev CuO in CuSO<sub>4</sub> soli, kot vira Cu<sup>2+</sup> iona, na stopnjo kaljivosti semen navadne in tatarske ajde, na rast in razvoj kalic (masa korenin, masa poganjkov, dolžina korenin) ter na sekundarni metabolizem kalic (fenoli, flavonoidi, tanini). V primeru hidroponskega gojenja rastlin smo rastlinam določili biomase, del materiala pa porabili za analize fizioloških parametrov rastline (vsebnost klorofilov, karotenoidov, fenolov, flavonoidov in taninov) ter določitev lipidne peroksidacije membran poganjkov, ki je posledica oksidativnega stresa. Rastlinam smo izmerili privzem izbranih elementov in določili njihovo razporeditev v prečnih prerezi korenin in listov.

#### 5.1.1 Kalitveni test

Pri kalitvenem testu smo primerjali odziv semen in kalic navadne in tatarske ajde na tretiranje z različnimi koncentracijami MD CuO, ND CuO in Cu soli, kot vira Cu<sup>2+</sup> iona. Semena navadne in tatarske ajde, ki smo jih uporabili v naši raziskavi, smo dobili iz mlina Rangus, pridelak leta 2012. Najprej smo semena sterilizirali s 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in jih na stresalniku 2 uri tretirali v raztopinah različnih koncentracij MD CuO (0,1; 1; 5; 10; 50; 100 in 150 mg l<sup>-1</sup>), ND CuO (0,1; 1; 5; 10; 50; 100 in 150 mg l<sup>-1</sup>), bakrove soli (CuSO<sub>4</sub>; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 10 in 100 mg l<sup>-1</sup>) in destilirane vode, ki je služila kot kontrola. Delali smo v treh paralelkah in za vsak tretma uporabili 5 petrijevk s 5 semeni. Semena smo prenesli v petrijevke z dvema filter papirjema in jih zalili z raztopino ustreznega tretmaja. Prvih 8 dni smo gojili rastline v temi pri 22 °C in dnevno spremljali odstotek kaljivosti. Po 8 dneh smo kalicam izmerili dolžino glavnih korenčic, jih stehtali, posušili in jim določili njihovo SM ter spektrofotometrično izmerili vsebnost fenolov, flavonoidov in taninov v kalicah (glej poglavje 3.1.6.1).

#### 5.1.2 Hidroponski poskus

Semena obeh vrst ajd smo površinsko sterilizirali s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in jih kalili v navlaženi sterilni petrijevki ter občasno kalice poškopili z destilirano vodo.



**Slika 23:** Zasnova poskusa gojenja ajde v hidroponiki.

**Figure 23:** Experimental design of growing buckwheat hydroponically.

Po dveh tednih rasti smo kalice prestavili na hidroponiko, kjer so rasle v Yoshida hranilni raztopini z naslednjo sestavo (Quinet in sod., 2004):

Makroelementi:

- 1,4 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,
- 0,3 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ,
- 0,7 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,
- 1,6 mM  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,
- 0,5 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ .

Mikroelementi:

- 43  $\mu\text{M}$  Fe-EDTA,
- 58  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,
- 0,1  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ,
- 0,4  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ ,
- 0,4  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ,
- 11  $\mu\text{M}$   $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ .

pH hranilne raztopine smo umerili na  $5,5 \pm 0,1$ . V vsako čašo, ki smo jo napolnili z 800 ml hranilne raztopine, smo položili stiroporni plavec s štirimi enako velikimi kalicami. Rastline smo gojili v rastnih komorah pri temperaturi 23 °C, 40 % relativni zračni vlagi in pod neonsko svetlobo s 16-urnim svetlobnim ciklom ter vsako čašo prepihavali z zrakom po cevki, ki je bila povezana z zračno črpalko. Raztopino smo vsak dan mešali, vodo, ki je izhlapela, pa smo nadomeščali z destilirano vodo, da bi preprečili koncentriranje hranilnih



snovi v raztopini. Hranilno raztopino smo menjali 1-krat tedensko. Prvih 7 dni so rastline rasle samo na hranilni raztopini, nato pa smo pričeli s tretiranjem (**Slika 23**). V primeru kontrole nismo hranilni raztopini dodali ničesar, medtem ko smo tretmajem dodali različne koncentracije nanodelcev CuO (Aldrich chemistry, ZDA) ali mikrodolge CuO (Sigma Aldrich, Nemčija) ali Cu sol v obliki CuSO<sub>4</sub>. Koncentracije CuO v raztopinah so bile 1 mg l<sup>-1</sup>, 10 mg l<sup>-1</sup> in 100 mg l<sup>-1</sup>. Vsako koncentracijo smo pripravili v dveh paralelkah. Po štirih tednih smo s tretiranjem zaključili, rastlinam določili SvM in SM. Večino materiala smo liofilizirali in s pomočjo tekočega dušika uprašili v terilnici.

#### 5.1.2.1 Določanje vsebnosti karotenoidov in klorofilov v rastlinah ajde

S 5 ml 80 % acetona smo iz 30 mg suhih in strtih poganjkov ekstrahirali pigmente. Vzorce smo zvrtnčili in jih čez noč shranili v hladilniku v temi pri 4 °C. Naslednji dan smo vzorce ponovno premešali in jih 3 minute centrifugirali na 2500 obratih pri sobni temperaturi. Nato smo s spektrofotometrom 8452A (HP-Hewlett Packard) izmerili absorbance pri valovnih dolžinah 470 nm, 647 nm in 664 nm. Iz dobljenih absorbanc smo preračunali koncentracije pigmentov v μmol l<sup>-1</sup> po enačbi 8 za klorofil a, 9 za klorofil b in enačbi 10 za karotenoide. Pretvorbo v enote mg g<sup>-1</sup> smo naredili po enačbi 11 (Graan in Ort, 1984).

$$kl_a (\mu\text{mol l}^{-1}) = (13,19 \times A_{664}) - (2,57 \times A_{647}) \quad \dots (8)$$

$$kl_b (\mu\text{mol l}^{-1}) = (22,10 \times A_{647}) - (2,24 \times A_{664}) \quad \dots (9)$$

$$\Sigma\text{kar} (\mu\text{mol l}^{-1}) = \frac{(1000 \times A_{470}) - (1,82 \times kl_a) - (85,02 \times kl_b)}{198} \quad \dots (10)$$

$$X = \frac{\text{konc}_{\text{pigmenta}} \times V_{\text{ekstrakta}}}{m_{\text{poganjkov}} \times 1000} \quad \dots (11)$$

#### 5.1.2.2 Lipidna peroksidacija v rastlinah ajde

V svežih poganjkih smo določili stopnjo lipidne peroksidacije membran po že opisanem protokolu (glej poglavje 4.1.7)

#### 5.1.2.3 Sinteza sekundarnih metabolitov v rastlinah ajde

V etanolnem ekstraktu posušenih in homogeniziranih poganjkov rastlin, smo spektrofotometrično izmerili vsebnosti fenolov, flavonoidov in taninov po že opisanem protokolu (glej poglavje 3.1.6.1).

#### 5.1.2.4 Meritve mineralne sestave korenin in poganjkov ajde

Iz uprašenega materiala korenin in poganjkov tretiranih ajd smo s pomočjo ročne preše vzorce stisnili v tablete. Vsebnost elementov v vsaki tableti smo določili z XRF na Odseku za fiziko nizkih in srednjih energij F2 (IJS). Uporabili smo prenosni rentgenski fluorescenčni spektrometer Peduzo P01 (Institut Jožef Stefan) z Rh rentgensko cevjo in SDD (Amptek) detektorjem. Uporabljen žarek je bil premera 5 mm in energijska ločljivost 140 eV pri 5,6 keV. Kvantitativno analizo smo opravili s programskim paketom za

kvantitativno analizo razvitim v programskem okolju Lab View (Kump in sod., 2009). Rezultate smo potrdili s pomočjo certificiranega referenčnega materiala NIST SRM 1573a (homogeniziran prah listov paradižnika) (Nečemer in sod., 2008).

#### 5.1.2.5 Priprava mikronskih rezin in meritve $\mu$ -PIXE

Po štirih tednih tretiranja smo korenine sprali z destilirano vodo ter rastlinam odrezali koščke korenin in listov z osrednjo žilo. Vpeli smo jih v aluminijaste cevke z zamrzovalnim vklopnim medijem Jung tissue freezing medium (Leica, Nemčija) ter hitro zamrznili najprej v tekočem propanu s temperaturo tališča  $-187,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ter jih po 1 minuti prestavili v tekoči dušik s temperaturo tališča  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po nekaj minutah smo jih prestavili v rotacijski mikrokriotom CM 3050 (Leica, Nemčija), kjer je bila temperatura komore  $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Z novim jeklenim nožem (Leica, Nemčija) smo z rezalno roko serijsko rezali zamrzovalni medij, dokler nismo prišli do vzorca, ki se giblje vertikalno vzdolž noža kriotoma in se pomika naprej za nastavljeno debelino po vsakem odrezu. Debelino reza smo nastavili na  $60\text{ }\mu\text{m}$  za prečne prereze vzorcev za meritve z  $\mu$ -PIXE. Izbrali smo nepoškodovane rezine in jih previdno prenesli v očiščene in ohlajene kovinske lončke ter jih pokrili z ohlajenim kovinskim pokrovčkom. Ko smo z rezanjem zaključili, smo komplet lončkov prenesli v jekleno posodo, dolili tekoči dušik ter posodo čim hitreje prenesli v liofilizer in posušili. Suhe rezine smo previdno preložili v steklene petrijevke, jih pokrili z objektnimi stekli in tako preprečili zvijanje rezin ter jih shranili v eksikator. Ko smo pregledali vse rezine pod lupo, smo izbrali najlepše in jih vpeli med dve pioloformski foliji na aluminijaste nosilce (Vogel-Mikuš in sod., 2009).

Za vsak tretma smo posneli mape elementov in analize naredili v računalniškem programu BioPhotonics ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). S pomočjo orodja ROI Manager smo označili področja posameznih tkiv in izračunali koncentracije posameznega elementa ter določili Pearsonov korelacijski koeficient med posameznimi elementi (Singh in sod., 2014).

#### 5.1.3 Statistična analiza podatkov

Uporabili smo analizo variance (ANOVA) s spremljajočim Duncan ali Tukey post-hoc testom. Za testiranje statistično pomembnega vpliva različnih dejavnikov in njihovih interakcij smo uporabili faktorsko ANOVO. ANOVO, postopno linearno diskriminantno analizo in klastersko analizo smo izvedli s pomočjo programske opreme Statistica (Statsoft 8). Barvne diagrame z dodanim drevesom podobnosti na osnovi analize grozdov smo uporabili za preučevanje grupiranja oz. razporejanja različnih podatkov med tretmaji. Predhodno smo vrednosti Z-normalizirali, in sicer smo od vrednosti odšteli povprečno vrednost preučevanega dejavnika in nato delili s standardnim odklonom preučevanega dejavnika. Metodo barvnih diagramov z dodanim drevesom podobnosti in določevanje učinkovitih koncentracij bakrovih spojin smo izvedli z R programsko opremo, in sicer s

paketoma gplots ter drm, medtem ko smo diagrame diskriminantne analize narisali z Excell-ovim dodatkom XLStat.

## 5.2 REZULTATI

### 5.2.1 Odziv semen in kalic v kalitvenem testu

V kalitvenem testu smo semena navadne in tatarske ajde izpostavili različnim koncentracijam MD in ND CuO ter Cu soli, z namenom preučevanja njihovega vpliva na kalitev semen, razvoj kalic ter vsebnost sekundarnih metabolitov v kalicah (fenoli, flavonoidi in tanini). V **Prilogi L** so podatki povprečij s standardno napako in pripadajočo statistiko vseh izmerjenih spremenljivk odziva semen in kalic navadne (**Priloga L1**) in tatarske ajde (**Priloga L2**) v kalitvenem testu ob prisotnosti različnih bakrovih spojin. Podatke smo analizirali s pomočjo linearne diskriminantne analize, klastrske analize, analize korelacij, factorske ANOVE in določevanja učinkovitih koncentracij različnih bakrovih spojin.

Postopna diskriminantna linearna analiza vseh izmerjenih parametrov (kalitev na 1. in 8.dan, št. SvM kalic, SM kalic, dolžina koreničic, vsebnost fenolov, flavonoidov in taninov v kalicah) je pokazala, da med najpomembnejše diskriminantne spremenljivke odziva semen in kalic navadne ajde sodijo vse podane, z izjemo kalitve 8.dne in SM kalic (**Preglednica 9a, Priloga M1**). Izmerjeni parametri so se po pomembnosti za razlago razlik med tretmaji razvrstili v sledečem vrstnem redu: SvM kalic, fenoli, dolžina koreničine, flavonoidi, tanini in kalitev semen na 1.dan poskusa (**Preglednica 9a, Priloga M1**).

**Preglednica 9:** Diskriminantne spremenljivke odziva semen in kalic a) navadne ajde in b) tatarske ajde na tretiranje z različnimi bakrovimi spojinami s postopno linearno diskriminantno analizo (9 spremenljivk, 24 skupin). Odebeljene črke in številke predstavljajo statistično značilen vpliv spremenljivk ( $p < 0,05$ ).

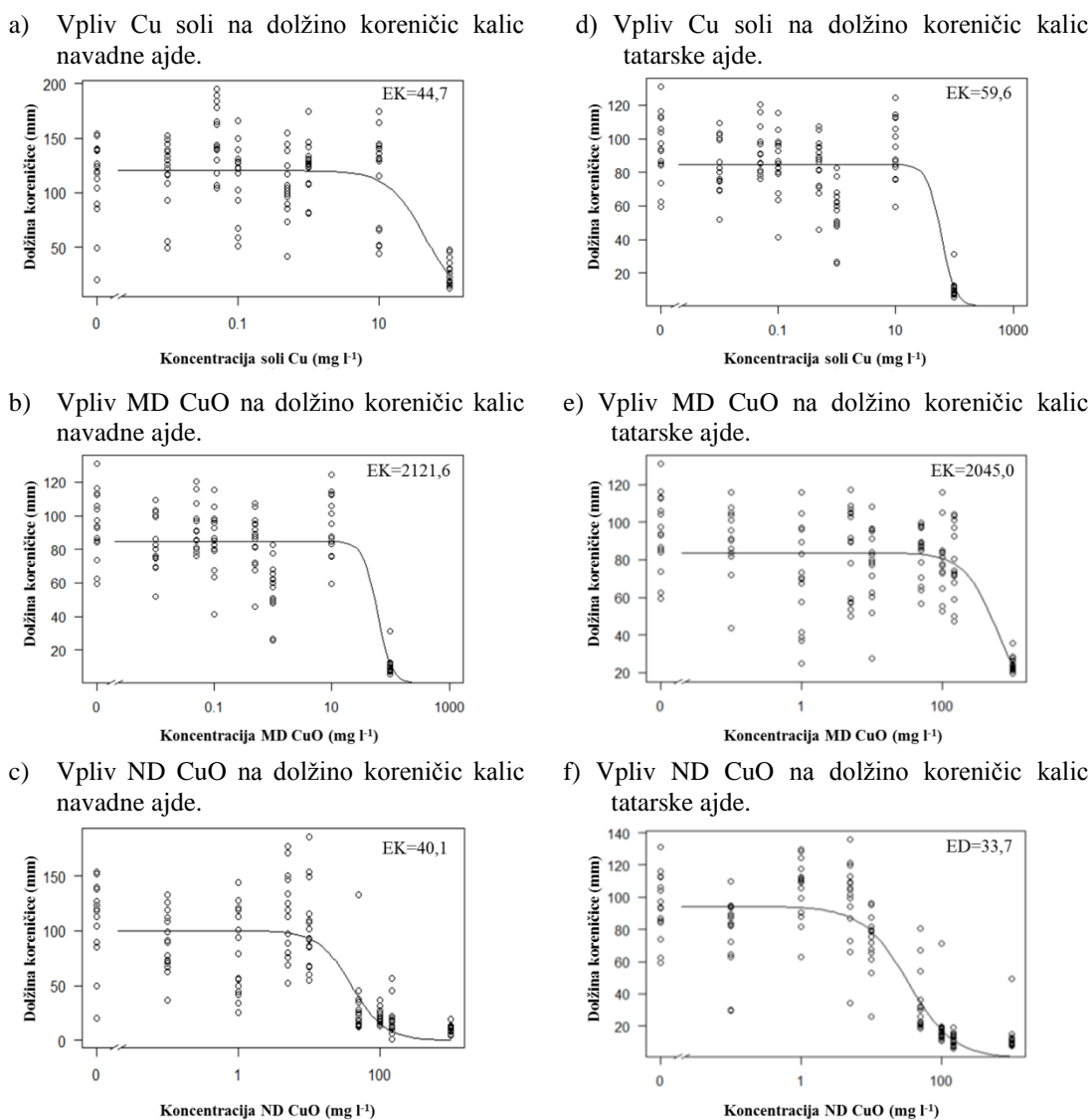
**Table 9:** Discriminant variables of a) common buckwheat and b) Tartary buckwheat seeds and seedlings response to treatment with different Cu compounds with stepwise linear discriminant analysis (9 variables, 24 groups). Letters and numbers in bold represent statistically significant variables ( $p < 0,05$ ).

a) Navadna ajda	F	p	b) Tatarska ajda	F	p
<b>SvM</b>	<b>5,476137</b>	<b>0,000000</b>	<b>Dolžina koreničic</b>	<b>5,578265</b>	<b>0,000000</b>
<b>Fenoli</b>	<b>4,369982</b>	<b>0,000000</b>	<b>Kalitev 1.dan</b>	<b>5,333378</b>	<b>0,000000</b>
<b>Dolžina koreničic</b>	<b>3,081644</b>	<b>0,000080</b>	<b>Fenoli</b>	<b>2,991909</b>	<b>0,000121</b>
<b>Flavonoidi</b>	<b>3,353548</b>	<b>0,000023</b>	<b>SvM</b>	<b>6,085751</b>	<b>0,000000</b>
<b>Tanini</b>	<b>2,634895</b>	<b>0,000630</b>	<b>Tanini</b>	<b>2,588111</b>	<b>0,000781</b>
<b>Kalitev 1.dan</b>	<b>2,218165</b>	<b>0,004257</b>	<b>SM</b>	<b>2,249098</b>	<b>0,003699</b>
Kalitev 8. dan	1,422822	0,123145	<b>Flavonoidi</b>	<b>2,005615</b>	<b>0,011041</b>
SM	1,095383	0,366606	Kalitev 8. dan	1,035758	0,432218

Podoben rezultat analize je pri izmerjenih parametrih odziva semen in kalic tatarske ajde, le da med statistično neznačilne diskriminantne spremenljivke sodi št. kalečih semen na 8.dan testa (**Preglednica 9b, Priloga M2**). V primeru tatarske ajde si izmerjeni parametri po pomembnosti za razlago razlik med tretmaji sledijo v naslednjem vrstnem redu: dolžina

korenčine, kalitev semen na 1.dan poskusa, fenoli, SvM kalic, tanini, SM kalic in flavonoidi.

Ker se je dolžina korenčic obeh ajd izkazala za enega izmed najpomembnejših izmerjenih parametrov, smo izrisali krivulje strupenosti za vsako obliko bakrove spojine pri obeh ajdah in določili efektivno koncentracijo (EK) vsake oblike spojine glede na dolžino korenčic polovice testnih organizmov (**Slika 24, Priloga N**).



**Slika 24:** Vpliv različnih bakrovih spojin na dolžino korenčic tretiranih kalic ajde s pripadajočo efektivno koncentracijo (EK) za a) sol Cu in navadno ajdo, b) MD CuO in navadno ajdo, c) ND CuO in navadno ajdo, d) sol Cu in tatarsko ajdo, e) MD CuO in tatarsko ajdo in f) ND CuO in tatarsko ajdo.

**Figure 24:** The effects of different Cu compounds on root length of treated buckwheat seedlings with effective concentration (EK) for a) Cu salt on common buckwheat, b) MD CuO on common buckwheat, c) ND CuO on common buckwheat, d) Cu salt on Tartary buckwheat, e) MD CuO on Tartary buckwheat and f) ND CuO on Tartary buckwheat.

Pri obeh ajdah so najmanj strupeni MD CuO, katerim sledita Cu sol in najbolj strupeni ND CuO (**Slika 24**). Vrednosti EK različnih bakrovih spojin na dolžine korenčic se med vrstama precej razlikujejo. Navadna ajda se je izkazala za občutljivejšo na tretiranje s Cu soljo, medtem ko je bila tatarska ajda občutljivejša na tretiranje z MD CuO in ND. Pri EK<sub>90</sub> se je tatarska ajda izkazala za občutljivejšo na Cu sol in MD CuO, a manj občutljivo na ND CuO v primerjavi z navadno ajdo (**Priloga N**).

V analizi korelacij izmerjenih parametrov odzivov semen in kalic obeh ajd, le pri kalicah navadne ajde pozitivno korelirata SvM z dolžino korenine (0,61), medtem ko med drugimi dejavniki ni omembe vrednih korelacij.

Rezultati faktorске ANOVE so pokazali, da imata najpogostejši vpliv na izbrane merjene parametre vrsta ajde in vrsta ajde skupaj s koncentracijo dodanega Cu (**Preglednica 10, Priloga O**). Vrsta ajde ima statistično značilen vpliv na 6 od 10-ih izmerjenih parametrov, vrsta ajde z obliko Cu na 6, oblika Cu na 5 in koncentracija Cu ter oblika Cu z koncentracijo Cu na 3 izmerjene parametre. Statistično značilen vpliv vrste ajde, koncentracije Cu in oblike Cu ter njihovih interakcij je opazen predvsem na SvM kalic, dolžino korenčice in vsebnost fenolov. Največja razlika med vrstama ajde je vsebnost fenolov v kalicah, kjer so imele kontrolne kalice navadne ajde (1,33 %) za 1-krat nižjo vsebnost fenolnih spojin v primerjavi s kontrolnimi kalicami tatarske ajde (2,60 %). Učinki bakrovih spojin na razvoj kalic ajde so najbolj pogojeni z vrsto ajde in obliko bakrove spojine.

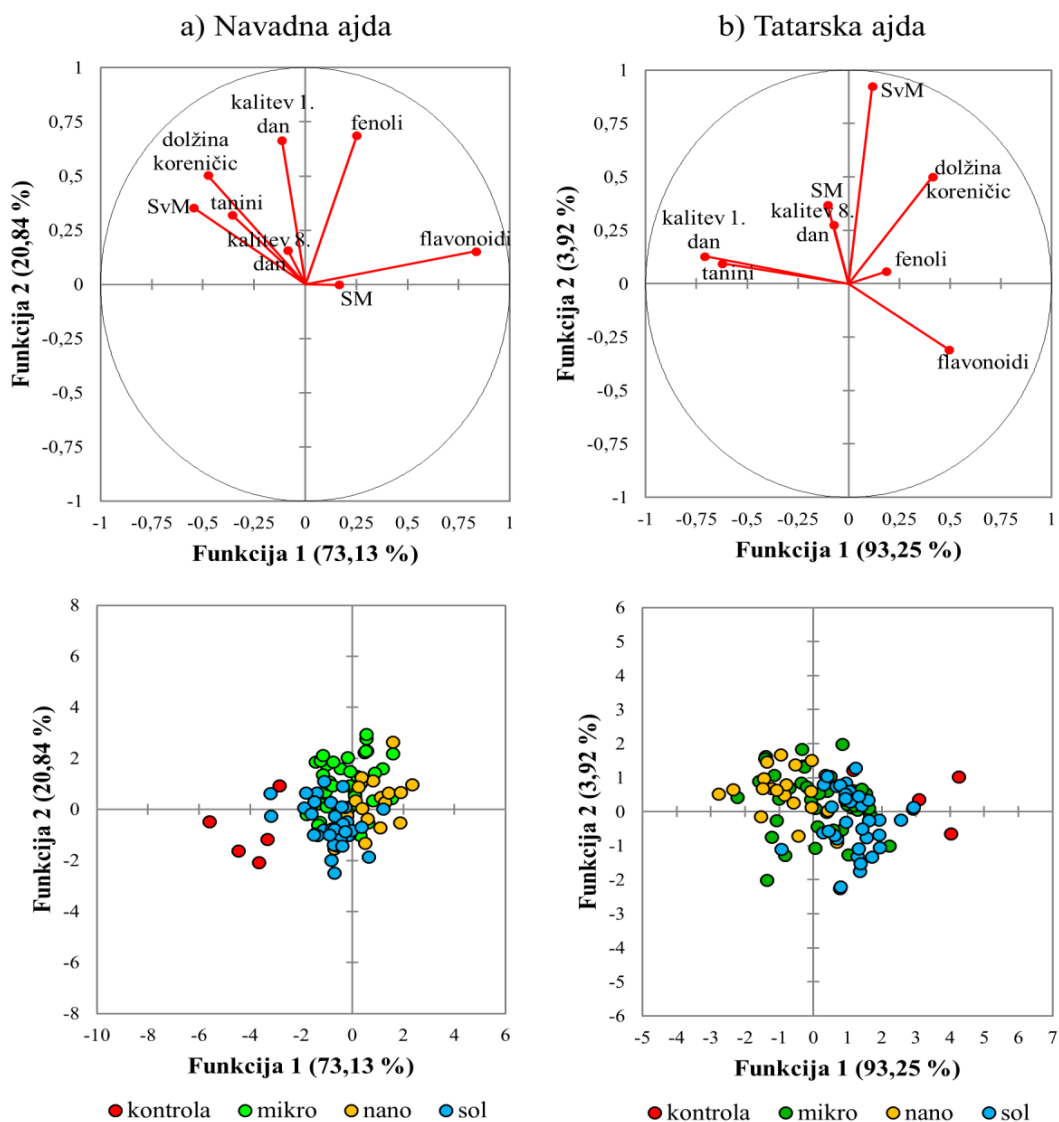
**Preglednica 10:** Vpliv dejavnikov vrste ajde, oblike Cu in koncentracije Cu ter njihovih interakcij na izmerjene parametre odziva semen in kalic navadne ter tatarske ajde. Rezultati so podani kot p-vrednosti (faktorška ANOVA), kjer odebeljene številke predstavljajo statistično značilen vpliv dejavnika na izbran parameter ( $p < 0,05$ ).

**Table 10:** Impact of different factors, buckwheat species, Cu form, Cu concentration and their interactions on measured parameters of common and Tartary buckwheat seeds and seedlings responses. Results are represented as p-values (factorial ANOVA), where numbers in bold represent statistically significant influence of factor on selected variable ( $p < 0.05$ ).

Izbran dejavnik	Kalitev 1. dan	Kalitev 8. dan	SvM	SM	Dolžina korenčice	Fenoli	Flavonoidi	Tanini	Vsota
Vrsta ajde	0,1033	<b>0,0172</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	0,1162	<b>6</b>
Oblika Cu	<b>0,0082</b>	0,9765	<b>0,0146</b>	0,9067	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	0,0619	<b>0,0003</b>	<b>5</b>
Konc. Cu	0,1033	0,5400	<b>0,0000</b>	0,1765	<b>0,0000</b>	<b>0,0011</b>	0,5415	0,6424	<b>3</b>
Vrsta ajde*oblika Cu	<b>0,0000</b>	0,6388	<b>0,0110</b>	0,7396	<b>0,0144</b>	<b>0,0100</b>	<b>0,0008</b>	<b>0,0234</b>	<b>6</b>
Vrsta ajde*konc. Cu	0,4641	0,5400	<b>0,0207</b>	0,8114	0,9470	0,2200	0,2224	0,4118	<b>1</b>
Oblika Cu * konc. Cu	0,2434	0,0968	<b>0,0000</b>	0,6319	<b>0,0001</b>	<b>0,0181</b>	0,9604	0,2193	<b>3</b>
Vrsta ajde*oblika Cu*konc. Cu	0,0666	0,0511	0,7081	<b>0,0478</b>	0,8303	0,0512	0,6718	0,6616	<b>1</b>

V nadaljevanju smo z linearno diskriminantno analizo (LDA) celostno preučili odziv semen in kalic navadne in tatarske ajde na tretiranje z različnimi bakrovimi spojinami (**Slika 25**). Na podlagi LDA lahko pri navadni ajdi s funkcijo 1 in 2 pojasnimo 93,96 % skupne variabilnosti (**Slika 25a**). Pri tem opazimo, da so se na podlagi vseh izmerjenih

parametrov odziva jasno zgrupirali posamezni tretmaji skupaj. Kontrolni je najpodobnejši tretma Cu sol, nato MD CuO in nazadnje ND CuO. K temu najbolj prispeva funkcija 1, na katero imajo pozitivni vpliv izmerjeni flavonoidi in fenoli v kalicah ter SM kalic in močan negativen vpliv SvM kalic, dolžina korenčič in tanini (**Priloga P**). Rezultati potrjujejo, da so prav vse vsebnosti fenolov vseh tretmajev značilno višje od vsebnosti fenolov v kontrolnih kalicah (**Priloga L1**). Vse tretirane kalice so imele nižjo SvM v primerjavi s kontrolo (**Priloga L1**).

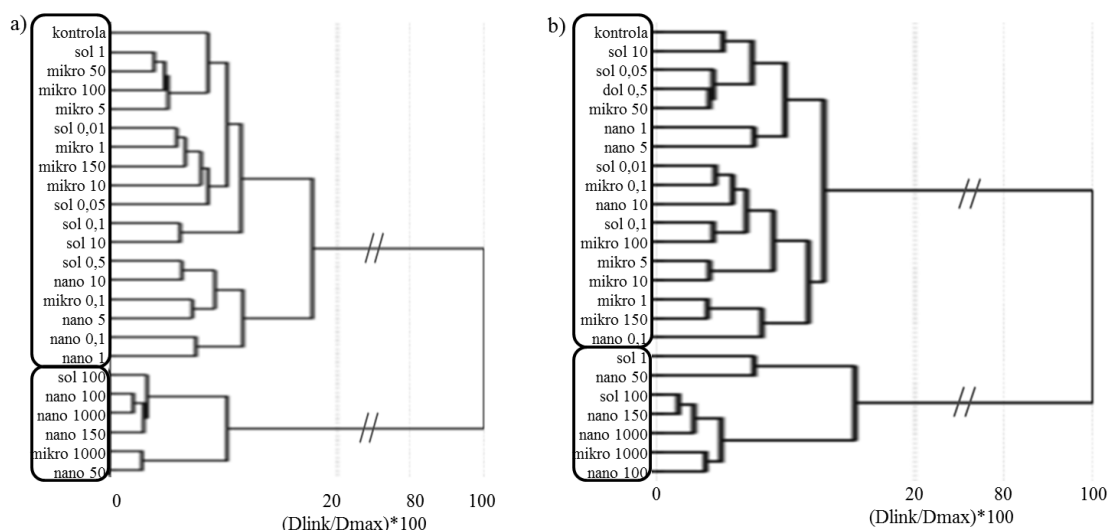


**Slika 25:** Graf linearne diskriminantne analize za izmerjene parametre odziva (kalitev 1. dan, kalitev 8. dan, SvM, SM, fenoli, flavonoidi, tanini) semen in kalic a) navadne in b) tatarske ajde, tretiranih z različnimi bakrovimi spojinami (mikro-MD CuO, nano-ND CuO, sol-Cu sol).

**Figure 25:** Linear discriminant analysis plot for measured parameters (germination on 1. day, germination on 8. day, FW, DW, phenols, flavonoids, tannins) of a) common and b) Tartary buckwheat seeds and seedlings response to exposure to different Cu compounds (mikro-MPs CuO, nano-NPs CuO, sol-Cu salt).

V primeru semen in kalic tatarske ajde, pa LDA s funkcijo 1 in 2 pojasni kar 97,16 % skupne variabilnosti (**Slika 25b**). Tukaj je ločitev med tretmaji manj jasna, tudi sami tretmaji so manj centrirani in bolj raztreseni, a vseeno se ohrani podoben trend kot v primeru navadne ajde. K funkciji 1, ki pojasni kar 93,25 %, najbolj negativno vpliva kalitev 1. dan in vsebnost taninov v kalicah, saj so vsa tretirana semena imela višjo kaljivost od kontrole, le tretmaji nižjih koncentracij Cu soli niso bili statistično značilno različni od št. kalečih semen kontrole (**Priloga L2**). Vsebnost flavonoidov in dolžina korenčic močno pozitivno korelirajo ter vsebnost fenolov in SvM kalic rahlo pozitivno s funkcijo 1 (**Priloga L2**). Zaradi tega ima kontrola najbolj pozitivne vrednosti, saj ima najdaljše korenčice in vsebnost flavonoidov v primerjavi s tretiranimi kalicami (**Priloga L2**). Pri tatarski ajdi se vsebnost fenolov v tretiranih kalicah glede na kontrolne značilno zvišuje do srednjih vrednosti in znižuje proti višjim koncentracijam Cu, kar nakazuje na pozitiven učinek nižjih koncentracij Cu in strupenostni učinek višjih koncentracij Cu (**Priloga L2**).

Glede na vse izmerjene parametre odziva semen in kalic na prisotnost različnih bakrovih spojin, lahko tretmaje po strupenosti razdelimo v dve skupini (**Slika 27**). Pri semenih in kalicah navadne ajde tretmaji višjih koncentracij ND CuO in najvišjih koncentracij MD CuO in Cu soli tvorijo najbolj podobno skupino (ND 50, 100, 150, 1000 mg l<sup>-1</sup>; MD 1000 mg l<sup>-1</sup> in Cu sol 100 mg l<sup>-1</sup>) (**Slika 26a**), kar velja podobno za tretmaje v primeru tatarske ajde, kjer se v skupino zgoraj omenjenih tretmajev višjih koncentracij pridruži še tretma Cu sol 1 mg l<sup>-1</sup> (**Slika 26b**).



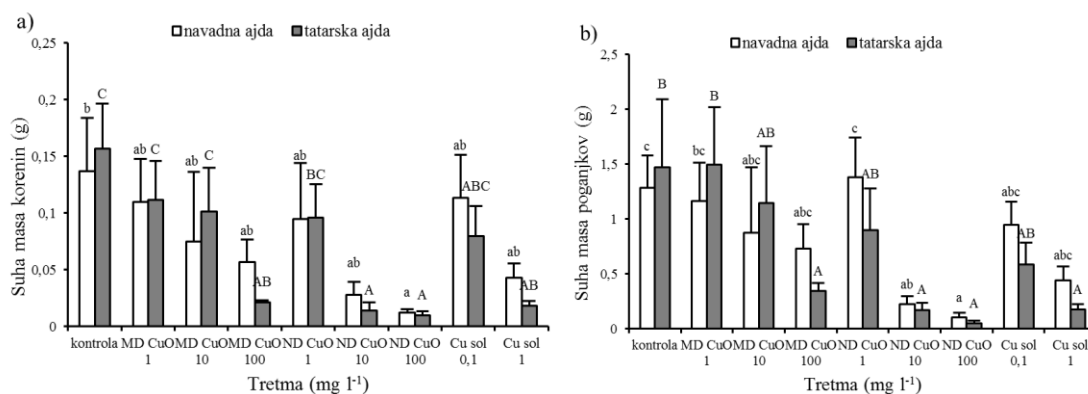
**Slika 26:** Grupiranje kalic kontrole in vseh bakrovih tretmajev na podlagi vseh izmerjenih rastlinskih parametrov odziva a) navadne ajde in b) tatarske ajde. Analizo smo opravili z Wardovo metodo. Obkroženi so tretmaji (mikro-MD CuO, nano-ND CuO, sol-Cu sol), ki se grupirajo v dve ločeni skupini.

**Figure 26:** The clustering of controls and all Cu treatments based on the data of all measured parameters of a) common buckwheat and b) Tartary buckwheat. The analysis was performed with Ward's method. The treatments (mikro-MPs CuO, nano-NPs CuO, sol-Cu salt) that are separated in two distinguished groups are encircled.

## 5.2.2 Odziv rastlin v hidroponskem poskusu

Za hidroponsko gojenje rastlin je značilno, da rastline izpostavimo točno določenim koncentracijam hranil, v našem primeru želenim koncentracijam različnih bakrovih spojin. Po enomesečnem tretiranju rastlin z različnimi koncentracijami MD in ND CuO ter Cu soljo, smo na svežem rastlinskem materialu izmerili stopnjo lipidne peroksidacije in s pomočjo kriofiksacije narezali mikronske rezine listov za meritve prostorske porazdelitve elementov. Preostali del rastlin smo zamrznili v tekočem dušiku ter liofilizirali. Rastni odziv rastlin smo ocenili na podlagi biomase, analize fizioloških parametrov rastline (vsebnost klorofilov, fenolov, flavonoidov oz. taninov) in koncentracij ter preračunanih vsebnosti elementov v različnih delih rastline. V **Prilogi R** so podatki povprečij s standardno napako in pripadajočo statistiko vseh izmerjenih spremenljivk odziva semen in kalic navadne (**Priloga R1**) in tatarske ajde (**Priloga R2**) v kalitvenem testu ob prisotnosti različnih bakrovih spojin. Podatke smo analizirali s pomočjo linearne diskriminantne analize, analize korelacij in factorske ANOVE.

Rastni odziv rastline, suha masa korenin, se je značilno zmanjšala v rastlinah navadne ajde, ki smo jih izpostavili ND CuO  $100 \text{ mg l}^{-1}$ , medtem ko se je SM korenin tatarske ajde značilno zmanjšala pri tretiranju z MD CuO  $100 \text{ mg l}^{-1}$ , ND CuO 10 in  $100 \text{ mg l}^{-1}$  ter Cu soljo  $1 \text{ mg l}^{-1}$  (**Slika 27a**). Med SM poganjkov rastlin, izpostavljenim istim tretmajem, je prišlo do značilnega pomanjšanja SM le v primeru ND CuO 10 in  $100 \text{ mg l}^{-1}$  pri obeh ajdah in MD  $100 \text{ mg l}^{-1}$  ter Cu soljo  $1 \text{ mg l}^{-1}$  pri tatarski ajdi (**Slika 27b**).



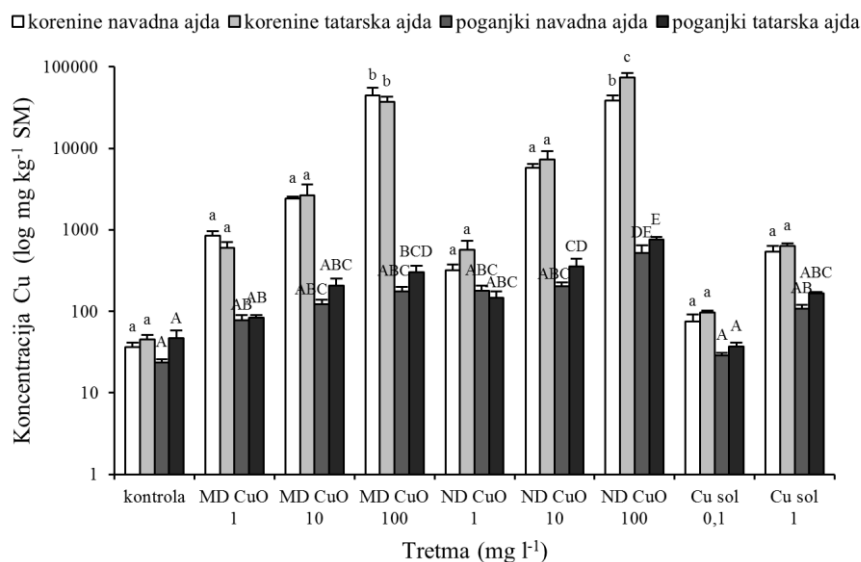
**Slika 27:** Suha masa (g) a) korenin in b) poganjkov tretiranih rastlin navadne in tatarske ajde z MD CuO in ND CuO v koncentracijah 1, 10 in  $100 \text{ mg l}^{-1}$  ter Cu soljo 0,1 in  $1 \text{ mg l}^{-1}$  (povprečje  $\pm$  SN;  $n=5$ ). Različne črke nad stolpci predstavljajo statistično značilne razlike med tretmaji (Duncanov test;  $p < 0,05$ ).

**Figure 27:** Dry biomass (g) of a) roots and b) shoots of common and Tartary buckwheat treated with MPs CuO and NPs CuO 1, 10 in  $100 \text{ mg l}^{-1}$  and Cu salt 0.1 in  $1 \text{ mg l}^{-1}$  (mean  $\pm$  SE;  $n=5$ ). Different letters above columns represent statistically significant differences between treatments (Duncan tests;  $p < 0.05$ ).

Za oceno privzema in prenos različnih bakrovih spojin, smo izmerili tudi koncentracije Cu v liofiliziranih koreninah in poganjkih izpostavljenih rastlin. Izmerjene koncentracije Cu v koreninah tretiranih rastlin obeh vrst ajd so pokazale, da sta si tretmaja najvišjih koncentracij ND in MD CuO  $100 \text{ mg l}^{-1}$  najbolj podobna in najbolj različna od ostalih tretmajev (**Slika 28**). V primeru poganjkov velja, da se od kontrol statistično značilno



razlikujejo le poganjki tatarske ajde tretmaja MD CuO 100 mg l<sup>-1</sup> ter ND 10 mg l<sup>-1</sup> ter poganjki obeh ajd v primeru tretiranja z ND CuO 100 mg l<sup>-1</sup>. Baker v poganjkih navadne ajde negativno korelira s Fe, S in K v koreninah in pozitivno z Zn, P, S in Fe v koreninah, medtem ko v koreninah in poganjkih tatarske ajde Cu negativno korelira z vsebnostjo fenolov v tretiranih poganjkih (**Priloga R3**).



**Slika 28:** Izmerjene koncentracije Cu (log mg kg<sup>-1</sup> SM) v a) koreninah in b) poganjkih navadne in tatarske ajde tretiranih z MD CuO in ND CuO v koncentracijah 1, 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> ter Cu soljo 0,1 in 1 mg l<sup>-1</sup> (povprečje ± SN; n=5). Različne črke nad stolpci predstavljajo statistično značilne razlike med tretmaji (Duncanov test; *p*<0,05).

**Figure 28:** The measured concentrations of Cu (log mg kg<sup>-1</sup> DW) in a) roots and b) shoots of treated common and Tartary buckwheat plants with MPs CuO and NPs CuO 1, 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> and Cu salt 0.1 in 1 mg l<sup>-1</sup> (mean ± SE; n=5). Different letters above columns represent statistically significant differences between treatments (Duncan tests; *p*<0.05).

Najpomembnejši izmerjeni rastlinski parametri odziva rastlin pri navadni ajdi na podlagi postopne linearne diskriminantne analize, kjer smo testirali kar 26 izmerjenih spremenljivk rastlinskega odziva. so bili Fe v koreninah, koncentracija MDA v poganjkih in vsebnost Zn in K v koreninah. Poleg omenjenih, so bile pomembni izmerjene spremenljivke za razlago razlik med tretmaji še vsebnost taninov, flavonoidov in karotenoidov, Cu, S in Mn v koreninah ter Cu, S in P v poganjkih (**Preglednica 11a, Priloga S1**). Kalcij v koreninah in poganjkih, kl<sub>a</sub>, P v koreninah in K ter Fe v poganjkih so bili vključeni v model, a brez statistično značilnega vpliva (**Priloga S1**). Spremenljivke, ki niso bile vključeni v diskriminantni model so SM korenin in poganjkov, kl<sub>b</sub>, kl<sub>ab</sub>, fenoli ter Mn in Zn v poganjkih.

Podobno velja za tretirane rastline tatarske ajde, kjer so se za najpomembnejše izmerjene spremenljivke rastlinskega odziva izkazali vsebnost karotenoidov in koncentracije Ca in Zn v koreninah (**Preglednica 11b, Priloga S2**). Poleg omenjenih so bili za razlago razlik med tretmaji pomembne še vsebnosti kl<sub>a</sub>, kl<sub>b</sub>, flavonoidov in P, Fe, Cu in S v koreninah ter Fe, P, K, Cu, Zn in Ca v poganjkih. Parametri, ki niso bili vključeni v diskriminantni

model so SM korenin in poganjkov, kl<sub>ab</sub>, S v poganjkih in Mn v koreninah in poganjkih. Pri tatarski ajdi vsebnost MDA, K v koreninah, fenoli in tanini niso značilno pomembno prispevali k modelu LDA.

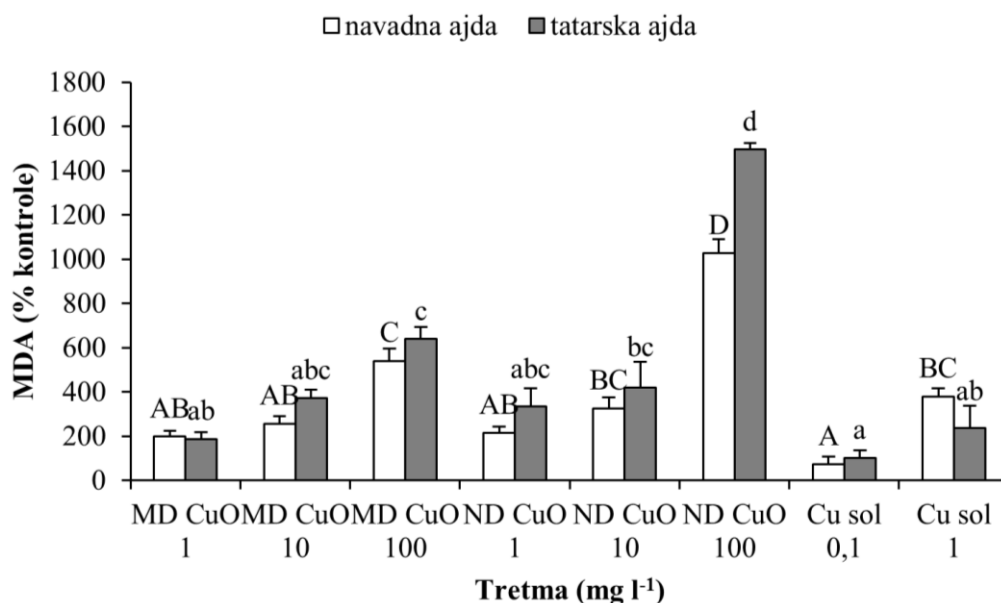
**Preglednica 11:** Diskriminantne spremenljivke odziva rastlin a) navadne ajde in b) tatarske ajde na hidroponsko tretiranje z različnimi bakrovimi spojinami s postopno linearno diskriminantno analizo (26 spremenljivk, 9 skupin). Odebeljene črke in številke predstavljajo statistično značilen vpliv spremenljivk ( $p < 0,05$ ).

**Table 11:** Discriminant variables of a) common buckwheat and b) Tartary buckwheat plants response to hydroponically treatment with different Cu compounds with the stepwise linear discriminant analysis (26 variables, 9 groups). Letters and numbers in bold represent statistically significant variables ( $p < 0,05$ ).

a) Navadna ajda	F	p	b) Tatarska ajda	F	p
<b>Fe v koreninah</b>	<b>51,64459</b>	<b>0,000309</b>	MDA	43,07306	0,383573
<b>MDA</b>	<b>30,64445</b>	<b>0,000340</b>	<b>Karotenoidi</b>	<b>26,84857</b>	<b>0,000002</b>
<b>Zn v koreninah</b>	<b>25,90074</b>	<b>0,002488</b>	K v koreninah	20,54919	0,101254
<b>K v koreninah</b>	<b>22,37502</b>	<b>0,000955</b>	<b>Ca v koreninah</b>	<b>17,29998</b>	<b>0,000208</b>
<b>Cu v koreninah</b>	<b>18,82797</b>	<b>0,005011</b>	<b>Zn v koreninah</b>	<b>15,10721</b>	<b>0,000308</b>
<b>S v koreninah</b>	<b>16,82138</b>	<b>0,036244</b>	<b>Klorofil a</b>	<b>13,11806</b>	<b>0,000123</b>
<b>Tanini</b>	<b>15,56381</b>	<b>0,017194</b>	<b>Flavonoidi</b>	<b>11,98573</b>	<b>0,032146</b>
<b>Cu v poganjkih</b>	<b>14,61098</b>	<b>0,047727</b>	<b>Klorofil b</b>	<b>10,87947</b>	<b>0,000141</b>
<b>S v poganjkih</b>	<b>13,54976</b>	<b>0,011900</b>	<b>P v koreninah</b>	<b>10,11264</b>	<b>0,000000</b>
<b>Flavonoidi</b>	<b>12,87949</b>	<b>0,030832</b>	<b>Fe v koreninah</b>	<b>10,32330</b>	<b>0,000001</b>
Ca v koreninah	12,17387	0,069318	<b>Fe v poganjkih</b>	<b>10,26114</b>	<b>0,000025</b>
<b>P v poganjkih</b>	<b>11,52940</b>	<b>0,003545</b>	<b>P v poganjkih</b>	<b>10,85633</b>	<b>0,000290</b>
Ca v poganjkih	11,17259	0,064240	<b>Cu v koreninah</b>	<b>10,90334</b>	<b>0,000762</b>
<b>Mn v koreninah</b>	<b>10,81953</b>	<b>0,012486</b>	<b>K v poganjkih</b>	<b>10,96455</b>	<b>0,007361</b>
<b>Karotenoidi</b>	<b>10,62272</b>	<b>0,031487</b>	<b>Cu v poganjkih</b>	<b>10,46805</b>	<b>0,014907</b>
Klorofil a	10,15642	0,328491	<b>Zn v poganjkih</b>	<b>10,20809</b>	<b>0,008014</b>
P v koreninah	9,65893	0,157004	<b>Ca v poganjkih</b>	<b>10,14290</b>	<b>0,000782</b>
K v poganjkih	9,18267	0,178524	<b>S v koreninah</b>	<b>10,40917</b>	<b>0,011732</b>
Fe v poganjkih	8,82781	0,249247	Fenoli	10,02718	0,233433
			Tanini	9,64361	0,272003

Pri obeh rastlinah se je koncentracija MDA izkazala za najpomembnejšo diskriminantno spremenljivko, kar je potrdila tudi faktorska ANOVA (**Preglednica 11, 12 in 13**). Značilno višje vrednosti imajo poganjki tretmajev MD in ND CuO 100 mg l<sup>-1</sup> obeh ajd (**Slika 29**). Izračunali smo korelacije med vsebnostmi MDA v poganjkih in vsemi ostalimi izmerjenimi parametri odziva hidroponsko tretiranih rastlin navadne in tatarske ajde (**Priloga R3**). Vsebnosti MDA v svežih poganjkih navadne ajde negativno korelirajo s SM korenin in poganjkov, vsebnostmi klorofilov in karotenoidov v poganjkih rastlin ter S in K v koreninah in K v poganjkih. Pozitivno pa vsebnosti MDA korelirajo z P, Ca, Mn, Fe, Cu in Zn v koreninah in S, Ca in Cu v poganjkih navadne ajde. Podobno velja v primeru tatarske ajde, kjer vsebnost MDA negativno korelira s SM korenin in poganjkov, vsebnostmi klorofilov, flavonoidov in fenolov v poganjkih rastlin ter enako s S in K v koreninah. Pozitivno MDA korelira z Cu, Zn, Ca, Fe, Mn v koreninah in Cu, S, Ca in Zn v

poganjkih. V obeh primerih so najmočnejše korelacije ravno s Cu v poganjkih in Cu v koreninah (**Priloga R3**).



**Slika 29:** Lipidna peroksidacija v svežih poganjkih tretiranih rastlin. Podatki so predstavljeni kot vsebnosti malondialdehida (MDA) v poganjku (povprečje  $\pm$  SN; n=5) tretiranih rastlin navadne in tatarske ajde z MD CuO in ND CuO v koncentracijah 1, 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> ter Cu soljo 0,1 in 1 mg l<sup>-1</sup> relativno glede na kontrolo (%). Različne črke nad stolpci predstavljajo statistično značilne razlike med tretmaji (Tukeyev test;  $p < 0,05$ ).

**Figure 29:** Lipid peroxidation in fresh shoots of treated plants. Data are presented as malondialdehyde (MDA) concentrations in shoots (mean  $\pm$  SE; n=5) of treated plants with MPs CuO and NPs CuO 1, 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> and Cu salt 0.1 in 1 mg l<sup>-1</sup>, relative to the control (%). Different letters above columns represent statistically significant differences between treatments (Tukey tests;  $p < 0.05$ ).

Za oceno vpliva različnih dejavnikov na odziv tretiranih rastlin, smo vse izmerjene podatke hidroponsko tretiranih rastlin analizirali s faktorsko ANOVO. V prvem delu zaradi narave izbora tretmajev nismo mogli primerjati koncentracij vseh izbranih bakrovih spojin, zato smo najprej primerjali le vpliv vrste ajde in oblike Cu (**Preglednica 12**), ter v drugem delu analize, primerjali tudi vpliv koncentracije, a le za parametre izmerjene na rastlinah tretiranih z MD CuO in ND ter brez Cu soli (**Preglednica 13**).

Vrsta ajde je bil statistično značilen dejavnik vpliva na koncentracije klorofilov, fenolov in flavonoidov, medtem ko je bila oblika Cu značilen dejavnik vpliva na mase korenin in poganjkov, kl<sub>a</sub> in kl<sub>b</sub> ter vsebnost taninov (**Preglednica 12a**). Vpliv vrste ajde na izmerjene koncentracije elementov v koreninah, smo opazili le na koncentracije K in Zn, medtem ko je bila oblika Cu spojine značilna za koncentracije P, K, Fe, Cu in Zn v koreninah (**Preglednica 12b**). Na izmerjene koncentracije elementov v poganjkih je imela vrsta ajde vpliv na Fe, medtem ko oblika Cu na P, S, Ca in Cu (**Preglednica 12c**). Če povzamemo, je bila vrsta ajde dejavnik vpliva na 8 izmerjenih parametrov, oblika Cu spojine na 17 izmerjenih parametrov ter njuna interakcija na 8 izmerjenih parametrov izmed vseh 26 izmerjenih parametrov odziva tretiranih rastlin. Potrdili smo, da je bila oblika Cu v

testiranih spojinah najvplivnejši dejavnik, a vsekakor tudi vrsta ajde ni zanemarljiv dejavnik pliva.

**Preglednica 12:** Vpliv dejavnikov vrste ajde, oblike Cu ter njunih interakcij na a) rastne parametre, b) koncentracije elementov v koreninah in c) koncentracije elementov v poganjkih obeh ajd. Rezultati so podani kot p-vrednosti (faktorska ANOVA), kjer odebeltene številke predstavljajo statistično značilen vpliv dejavnika na izbran parameter ( $p < 0,05$ ).

**Table 12:** Impact of different factors, buckwheat species, Cu form and their interactions on a) growth parameters, b) elements concentrations and c) elements concentration in shoots of both buckwheat. Results are represented as p-values (factorial ANOVA), where numbers in bold represent statistically significant factor affecting selected variables ( $p < 0,05$ ).

a) Rastni parametri rastlin.

Izbran dejavnik	SM korenin	SM poganjkov	MDA	Kl <sub>a</sub>	Kl <sub>b</sub>	Kl <sub>ab</sub>	Karotenoidi	Flavonoidi	Fenoli	Tanini	Vsota
Vrsta ajde	0,779	0,623	0,194	<b>0,000</b>	<b>0,003</b>	<b>0,000</b>	0,383	<b>0,022</b>	<b>0,008</b>	0,581	<b>5</b>
Oblika Cu	<b>0,044</b>	<b>0,014</b>	0,109	<b>0,000</b>	<b>0,015</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,092	0,675	<b>0,015</b>	<b>7</b>
Vrsta ajde*oblika Cu	0,896	0,472	0,068	<b>0,009</b>	0,218	0,039	<b>0,001</b>	0,071	0,795	<b>0,014</b>	<b>3</b>

b) Koncentracije elementov v koreninah.

Izbran dejavnik	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Vsota
Vrsta ajde	0,715	0,736	<b>0,011</b>	0,743	0,387	0,403	0,694	<b>0,003</b>	<b>2</b>
Oblika Cu	<b>0,034</b>	0,127	<b>0,000</b>	0,180	0,492	<b>0,000</b>	<b>0,050</b>	<b>0,004</b>	<b>5</b>
Vrsta ajde*oblika Cu	0,257	<b>0,023</b>	0,085	0,213	0,734	0,092	0,077	<b>0,019</b>	<b>2</b>

c) Koncentracije elementov v poganjkih.

Izbran dejavnik	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Vsota
Vrsta ajde	0,141	0,268	0,159	0,336	0,769	<b>0,011</b>	0,492	0,302	<b>1</b>
Oblika Cu	<b>0,014</b>	<b>0,024</b>	0,084	<b>0,000</b>	<b>0,025</b>	0,577	<b>0,000</b>	0,851	<b>5</b>
Vrsta ajde*oblika Cu	<b>0,007</b>	<b>0,000</b>	0,969	<b>0,000</b>	0,252	0,174	0,063	0,428	<b>3</b>

V drugem delu analize vpliva dejavnikov smo preučili vpliv vrste ajde, oblike Cu, koncentracije Cu ter njihovih interakcij. Na fiziološke rastne parametre rastlin, je imela vrsta ajde pomemben vpliv na vsebnosti klorofilov in karotenoidov, oblika Cu v testiranih spojinah na prav vse izmerjene parametre (SM poganjkov in korenin, vsebnost MDA, klorofilov, karotenoidov, flavonoidov, fenolov in taninov) ter koncentracija bakrove spojine na vse poleg karotenoidov, fenolov in flavonoidov (**Preglednica 13a**). Ponovno se je za najpogostejši vpliv izkazala oblika Cu, kateri je sledila koncentracija Cu, interakcija oblike Cu s koncentracijo Cu ter vrsta ajde z interakcijami vseh treh preučevanih dejavnikov. Na Cu v koreninah je pomembno vplivala oblika in koncentracija Cu v testiranih spojinah, medtem ko je na koncentracije Cu v poganjkih imela vrsta ajde tudi statistično značilen vpliv (**Preglednica 13b, c**). Na koncentracije elementov v koreninah je najpogosteje vplivala oblika Cu in koncentracija Cu, katerima je sledila njuna interakcija (**Preglednica 13b**). Na koncentracije elementov v poganjkih je imela najpogostejši vpliv interakcija med obliko in koncentracijo Cu, oblika Cu, katerim sta nato sledila še vrsta ajde in koncentracija Cu (**Preglednica 13c**).

**Preglednica 13:** Vpliv dejavnikov vrste ajde, oblike Cu in koncentracije Cu v uporabljenih spojinah ter njihovih interakcij na a) vse rastne parametre, b) koncentracije elementov v koreninah in c) koncentracije elementov v poganjkih. Rezultati so podani kot p-vrednosti (faktorska ANOVA), kjer odebeljene številke predstavljajo statistično značilen vpliv dejavnika na izbran parameter ( $p < 0,05$ ).

**Table 13:** Impact of different factors, buckwheat species, Cu form, Cu concentration and their interactions on a) all growth parameters, b) elements concentrations and c) elements concentration in shoots of both buckwheat. Results are represented as p-values (factorial ANOVA), where numbers in bold represent statistically significant factor on selected variables ( $p < 0.05$ ).

a) Rastni parametri rastlin.

Izbran dejavnik	SM korenin	SM poganjkov	MDA	Kl <sub>a</sub>	Kl <sub>b</sub>	Kl <sub>ab</sub>	Karotenoidi	Flavonoidi	Fenoli	Tanini	Vsota
Vrsta ajde	0,833	0,755	0,111	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,506	0,194	0,122	<b>4</b>
Oblika Cu	<b>0,003</b>	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,009</b>	<b>0,000</b>	<b>0,009</b>	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>10</b>
Konc. Cu	<b>0,047</b>	<b>0,015</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,089	0,066	0,505	<b>0,001</b>	<b>7</b>
Vrsta ajde* oblika Cu	0,835	0,789	0,467	0,799	0,377	0,653	0,080	0,623	<b>0,000</b>	<b>0,016</b>	<b>2</b>
Vrsta ajde* konc. Cu	0,945	0,494	0,094	0,657	0,882	0,781	0,153	0,126	0,486	0,358	<b>0</b>
Oblika Cu* konc. Cu	0,480	0,427	<b>0,000</b>	<b>0,026</b>	0,353	0,056	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,020</b>	<b>0,001</b>	<b>6</b>
Vrsta ajde* oblika Cu* konc. Cu	0,710	0,488	0,228	<b>0,006</b>	0,204	<b>0,013</b>	<b>0,000</b>	<b>0,009</b>	0,360	0,697	<b>4</b>

b) Koncentracije elementov v koreninah.

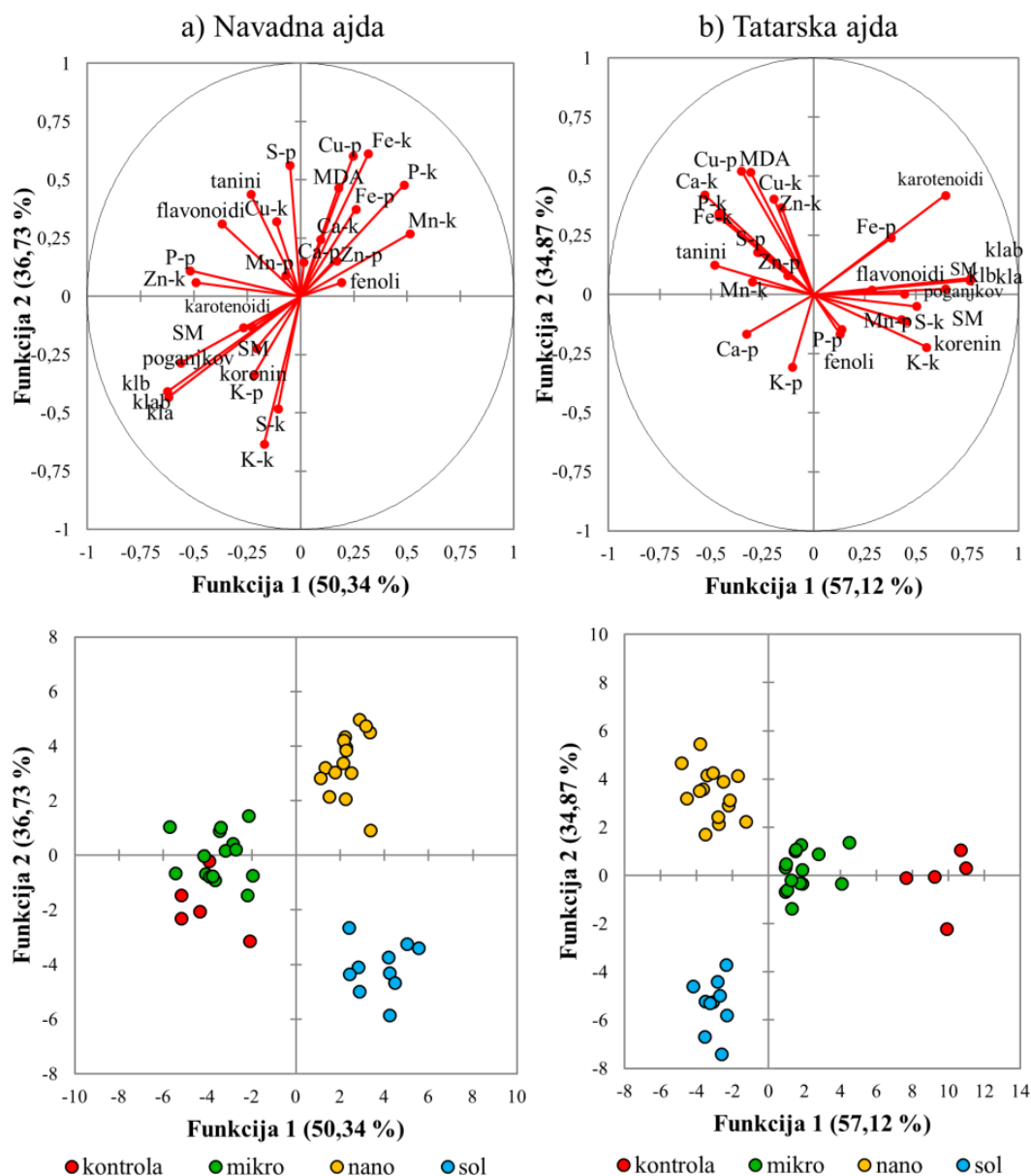
Izbran dejavnik	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Vsota
Vrsta ajde	0,282	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,087	0,095	0,527	0,094	0,741	<b>2</b>
Oblika Cu	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,403	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>7</b>
Konc. Cu	<b>0,000</b>	<b>0,002</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,037</b>	0,921	<b>7</b>
Vrsta ajde* oblika Cu	0,053	0,392	0,075	0,777	0,865	0,188	0,097	<b>0,000</b>	<b>1</b>
Vrsta ajde* konc. Cu	0,501	0,491	0,141	<b>0,000</b>	0,813	0,570	<b>0,015</b>	<b>0,000</b>	<b>3</b>
Oblika Cu* konc. Cu	<b>0,001</b>	0,154	0,547	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	0,094	<b>0,004</b>	<b>5</b>
Vrsta ajde* oblika Cu* konc. Cu	0,149	0,072	<b>0,002</b>	0,498	0,540	0,097	<b>0,007</b>	<b>0,017</b>	<b>3</b>

c) Koncentracije elementov v poganjkih.

Izbran dejavnik	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Vsota
Vrsta ajde	0,936	0,577	<b>0,000</b>	0,919	0,107	<b>0,000</b>	<b>0,005</b>	0,345	<b>3</b>
Oblika Cu	<b>0,037</b>	<b>0,000</b>	0,320	<b>0,000</b>	<b>0,034</b>	0,674	<b>0,000</b>	0,374	<b>5</b>
Konc. Cu	0,246	<b>0,000</b>	0,133	0,196	0,633	<b>0,018</b>	<b>0,000</b>	0,147	<b>3</b>
Vrsta ajde* oblika Cu	0,345	0,106	0,155	<b>0,021</b>	0,074	0,151	0,056	0,438	<b>1</b>
Vrsta ajde* konc. Cu	0,062	0,252	0,407	0,453	0,130	<b>0,021</b>	0,499	0,498	<b>1</b>
Oblika Cu* konc. Cu	<b>0,003</b>	<b>0,000</b>	0,053	<b>0,014</b>	<b>0,006</b>	<b>0,012</b>	<b>0,000</b>	0,576	<b>6</b>
Vrsta ajde* oblika Cu* konc. Cu	0,239	0,798	0,596	0,654	0,503	0,918	0,656	0,407	<b>0</b>

Vsi izmerjeni rastni parametri tretiranih rastlin (SM korenin in poganjkov, vsebnosti MDA, kl<sub>a</sub>, kl<sub>b</sub>, kl<sub>ab</sub>, karotenoidov, flavonoidov, fenolov in taninov v poganjkih, koncentracije P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu in Zn v koreninah ter koncentracije P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu in Zn v poganjkih) lahko skupaj služijo za prikaz prostorske razporeditve tipa spojine in vpliva posameznih spremenljivk z analizo linearne diskriminantne analize (LDA). Na podlagi vseh izmerjenih parametrov lahko z LDA pri navadni ajdi s funkcijo 1 in 2 pojasnimo 87,07 % skupne variabilnosti (**Slika 30a, Priloga T1**). Pri tem opazimo, da so se na podlagi vseh izmerjenih parametrov odziva jasno zgrupirali posamezni tipi, kjer so si tremaji kontrola in MD CuO najbolj podobni. V primeru rastlin tatarske ajde, pa nam LDA s funkcijo 1 in 2 pojasni kar 91,99 % skupne variabilnosti (**Slika 30b**). Tukaj je ločitev med tretmaji še bolj pregledna, saj se tretmaji kontrole in MD CuO jasno ločita, predvsem

na račun funkcije 1, ki pozitivno korelira s klorofili, SM ter S in K v koreninah, ki vplivajo na odmik kontrole v pozitivno (**Priloga T1**).

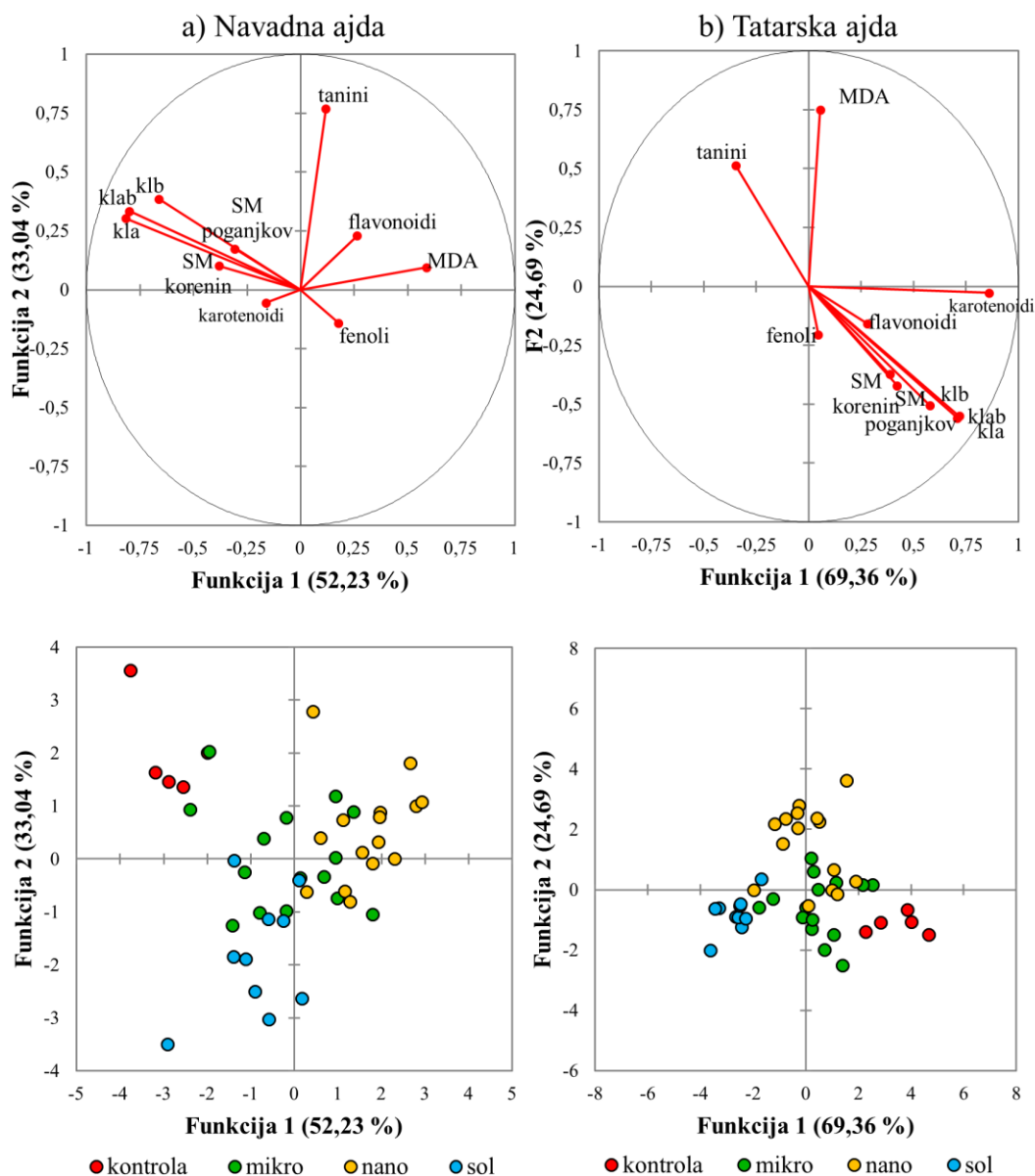


**Slika 30:** Graf linearne diskriminantne analize za izmerjene parametre odziva (SM korenin, SM poganjkov, kl<sub>a</sub>, kl<sub>b</sub>, kl<sub>ab</sub>, karotenoidi, fenoli, flavonoidi, tanini, priveznm elementov v korenine in poganjke za P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn) rastlin a) navadne in b) tatarske ajde, tretiranih z različnimi bakrovimi spojinami (mikro-MD CuO, nano-ND CuO, sol-Cu sol).

**Figure 30:** Linear discriminant analysis plot for measured parameters (roots DW, shoots DW, chl<sub>a</sub>, chl<sub>b</sub>, chl<sub>ab</sub>, carotenoids, phenols, flavonoids, tannins and uptake of P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn in roots and shoots) of a) common and b) Tartary buckwheat response to treating with different Cu compounds (mikro-MPs CuO, nano-NPs CuO, sol-Cu salt).

Nadaljno nas je zanimal vpliv tretmajev le na rastni in fiziološki odziv rastlin, kjer z LDA lahko pri navadni ajdi s funkcijo 1 in 2 pojasnimo 85,27 % skupne variabilnosti (**Slika 31a, Priloga T2**) in v primeru tatarske ajde 94,04 % (**Slika 31b, Priloga T2**). Pri tem opazimo,

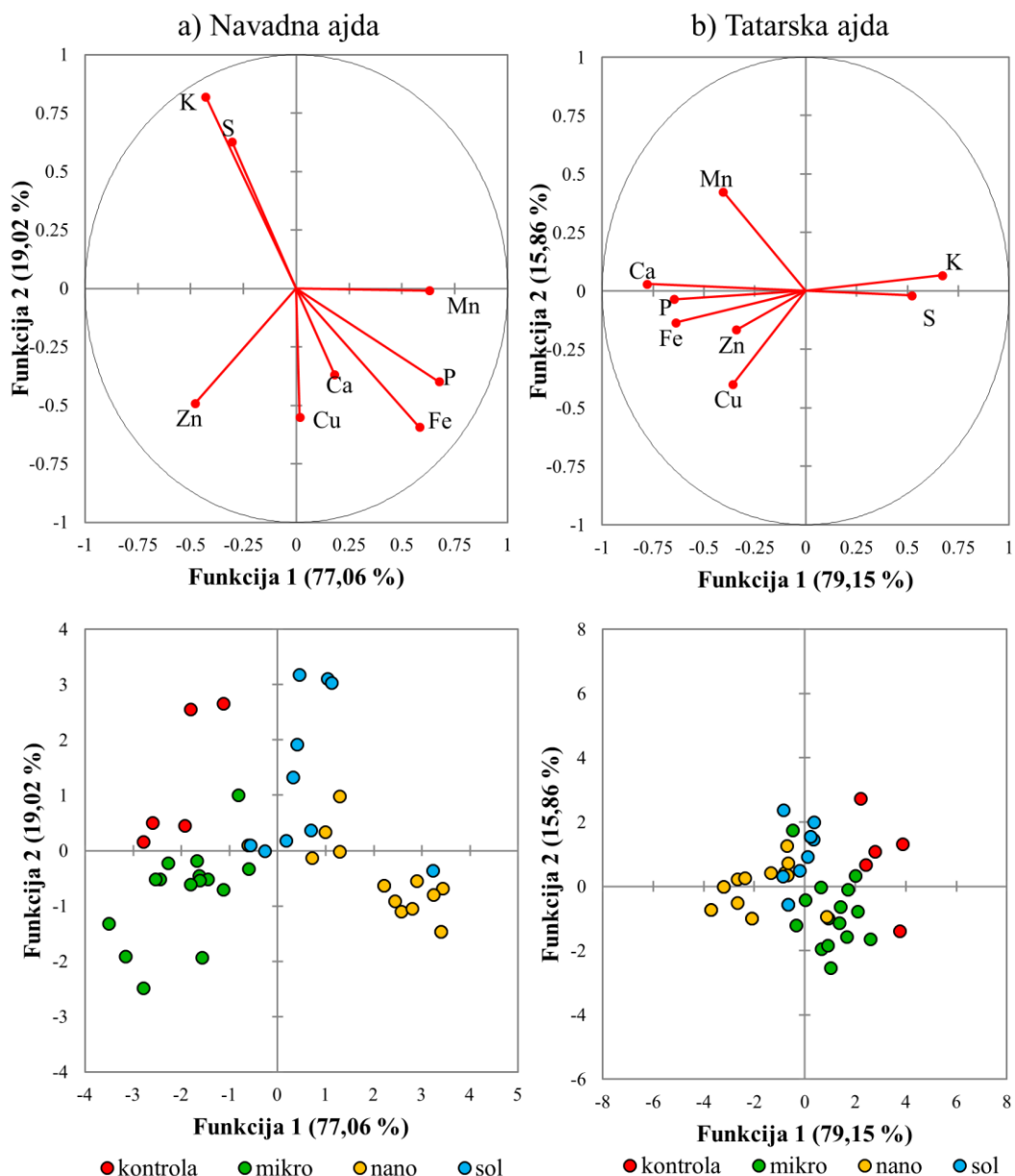
da prihaja do rahlega prekrivanja bakrovih spojin, a še vedno lahko opazimo ločitve med njimi. Na oddaljenost tretmajev ND CuO pri obeh ajdah najbolj vpliva vsebnost MDA in taninov v poganjkih, v primeru navadne ajde tudi flavonoidi in fenoli, saj so vrednosti vseh teh parametrov najnižje pri kontrolnih rastlinah (**Slika 31, Priloga R1, R2**). Rastline kontrole imajo nasprotno najvišje SM korenin in poganjkov ter vsebnosti klorofilov, kar prav tako pomembno prispeva k funkciji 1 (**Priloga R1, R2**).



**Slika 31:** Graf linearne diskriminantne analize za rastne in fiziološke parametre odziva (SM korenin, SM poganjkov, kl<sub>a</sub>, kl<sub>b</sub>, kl<sub>ab</sub>, karotenoidi, fenoli, flavonoidi, tanini) rastlin a) navadne in b) tatarske ajde, tretiranih z različnimi bakrovimi spojinami (mikro-MD CuO, nano-ND CuO, sol-Cu sol).

**Figure 31:** Linear discriminant analysis plot for growth and physiological parameters (roots DW, shoots DW, chl<sub>a</sub>, chl<sub>b</sub>, chl<sub>ab</sub>, carotenoids, phenols, flavonoids, tannins) of a) common and b) Tartary buckwheat response to treating with different Cu compounds (mikro-MPs CuO, nano-NPs CuO, sol-Cu salt).

Na podlagi LDA izmerjenih koncentracij elementov v koreninah lahko pri navadni ajdi s funkcijo 1 in 2 pojasnimo 96,08 % skupne variabilnosti navadne ajde in 95,01 % tatarske ajde (**Priloga T3**). Na podlagi funkcije 1 in 2 se v primeru navadne ajde oblika bakrove spojine loči izraziteje kot v primeru tatarske ajde (**Slika 32**). Pri obeh korelirata K in S v koreninah, ki oddaljita tretmaje ND CuO od kontrole, saj imajo slednji višje vsebnosti (**Slika 32, Priloga T3**). Vsi ostali elementi, P, Ca, Mn, Fe, Cu in Zn, se v koreninah kontrolnih rastlin nahajajo v nižjih koncentracijah (**Priloga R1, R2**).

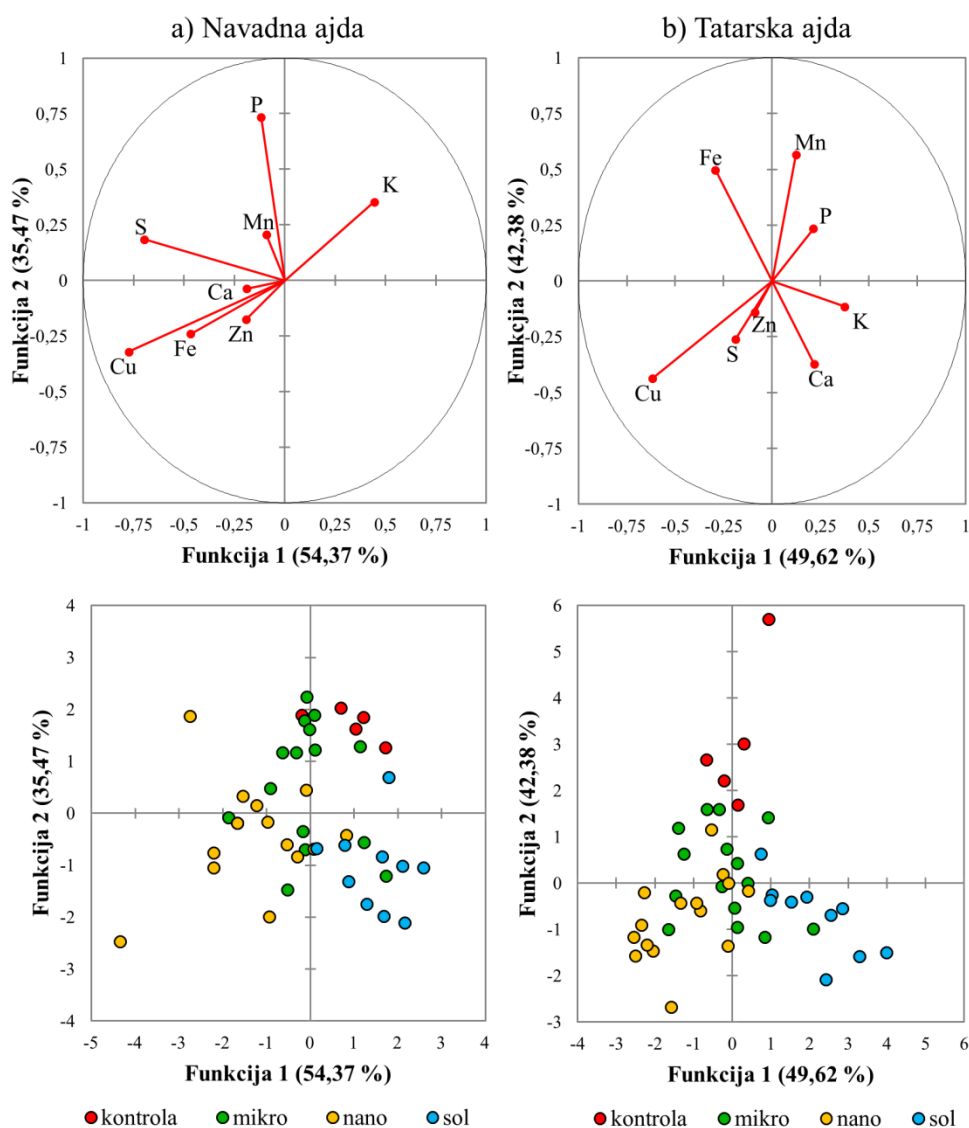


**Slika 32:** Graf linearne diskriminantne analize za privzem elementov v korenine (P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn) rastlin a) navadne in b) tatarske ajde, tretiranih z različnimi bakrovimi spojinami (mikro-MD CuO, nano-ND CuO, sol-Cu sol).

**Figure 32:** Linear discriminant analysis plot for uptake of minerals in roots (P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn) of a) common and b) Tartary buckwheat response to treating with different Cu compounds (mikro-MPs CuO, nano-NPs CuO, sol-Cu salt).



Glede izmerjenih koncentracij elementov v poganjkih tretiranih rastlin in analiziranih z LDA, lahko pri navadni ajdi s funkcijo 1 in 2 pojasnimo 89,85 % skupne variabilnosti in v primeru tatarske ajde 92,01 % (**Priloga T4**). Tretmaji se ločijo manj jasno kot v primeru izmerjenih koncentracij elementov v koreninah, a vseeno je opazen trend podobnosti tretmaja kontrole in MD CuO (**Slika 33**). Na razporeditev oblik bakrovih spojin pri navadni ajdi najbolj vplivajo K in S, ki ga je več v poganjkih kontrol in Cu, Fe in Zn, ki ga je več predvsem v tretmajih ND CuO (**Priloga R1**). Koncentracije elementov, predvsem Mn, Fe in P, v poganjkih tatarske ajde pa vplivajo na oddaljenost kontrole, saj so vrednosti teh elementov pri vseh ostalih tretmajih nižje (**Priloga R2**).

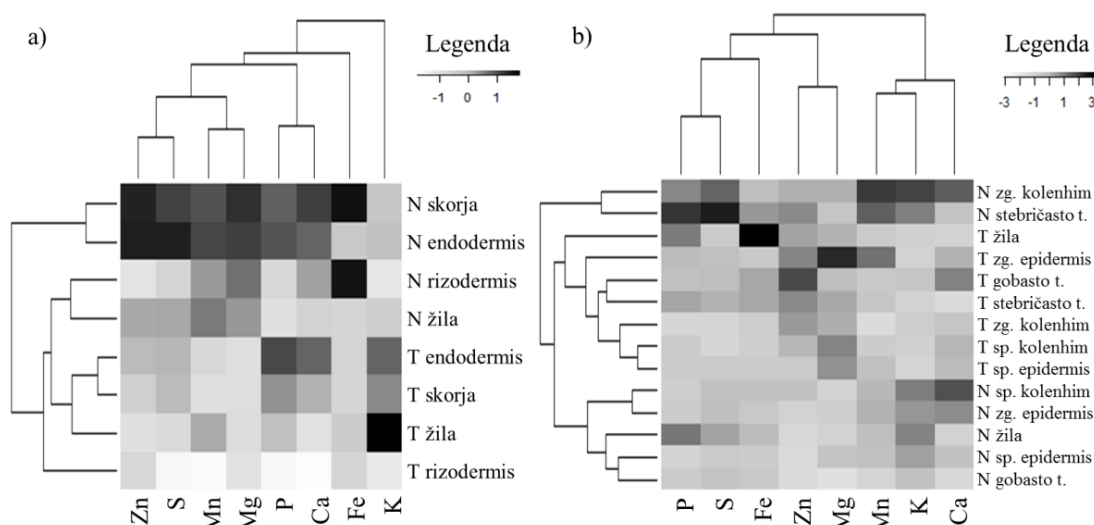


**Slika 33:** Graf linearne diskriminantne analize za privzem elementov v poganjke (P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn) rastlin a) navadne in b) tatarske ajde, tretiranih z različnimi bakrovimi spojinami (mikro-MP CuO, nano-ND CuO, sol-Cu sol).

**Figure 33:** Linear discriminant analysis plot for uptake of minerals in shoots (P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn) of a) common and b) Tartary buckwheat response to treating with different Cu compounds (mikro-MPs CuO, nano-NPs CuO, sol-Cu salt).

Prostorsko razporeditev elementov v prečnih prerezi tretiranih korenin in listov ajde so razkrile mape, ki so produkt analize  $\mu$ -PIXE, katere smo naknadno analizirali in pridobili informacije o koncentracijah elementov v posameznih tkivih opazovanih rastlinskih organov (**Priloga U, V**). Obenem smo primerjali razporeditve elementov v kontrolnih rastlinah navadne in tatarske ajde ter na drugi strani preučili razporeditve elementov v koreninah in listih navadne ajde, ki smo jih tretirali z MD CuO 10 mg l<sup>-1</sup>, ND CuO 10 mg l<sup>-1</sup> in Cu soljo 1 mg l<sup>-1</sup>. Z analizo map smo določili koncentracije elementov v posameznih tkivih prečnega prereza lista, to so zgornji kolenhim, zgornja povrhnjica, stebričasti mezofil, glavna žila, gobasti mezofil, spodnja povrhnjica in spodnji kolenhim ter v rizodermisu, skorji, endodermisu in žili korenin.

S pomočjo barvnih diagramov z dodanim drevesom podobnosti na osnovi analize grozdov smo ugotovili, da prihaja do bistvenih razlik že v razporeditvi in koncentracijah izbranih elementov med kontrolnimi rastlinami navadne in tatarske ajde, tako v koreninah, kot tudi v listih (**Slika 34**). V primeru korenin so največje razlike med vrstama ajde v razporeditvi Fe in K (**Slika 34a**). V primeru listov gre razliko pripisati na račun razporeditve Ca, K in Mn, opazne pa so tudi posebnosti v primeru stebričastega tkiva in zgornjega kolenhima navadne ajde (**Slika 34b**).

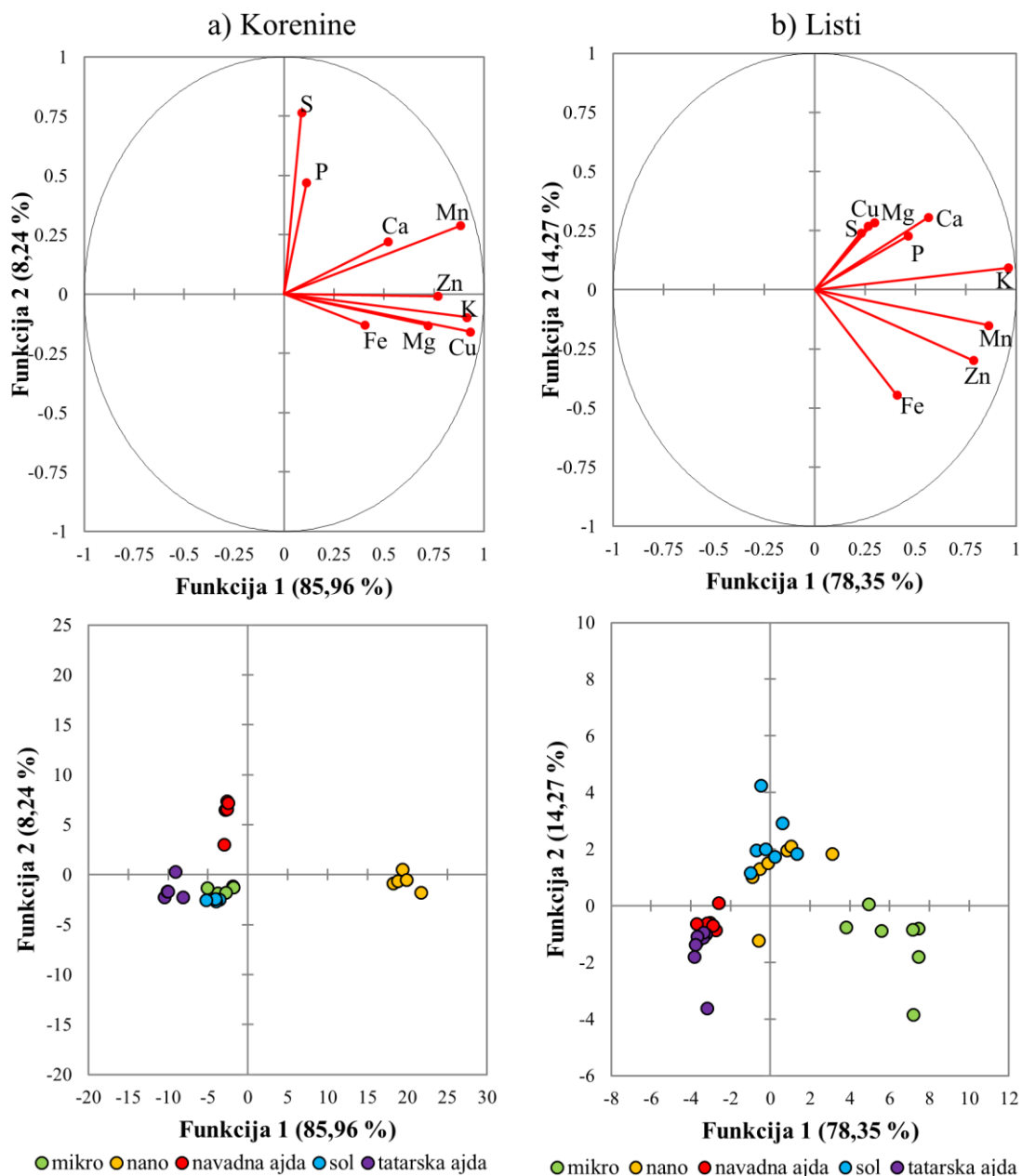


**Slika 34:** Razporeditev izbranih elementov na prečnih prerezih z  $\mu$ -PIXE med tkivi ajde, prikazana z barvnim diagramom z dodanim drevesom podobnosti na osnovi analize grozdov. Izmerjene vrednosti v a) koreninah in b) listih rastline navadne (N) in tatarske (T) ajde tretiranih z MD in ND CuO 10 mg l<sup>-1</sup> in Cu soljo 1 mg l<sup>-1</sup>. Predstavljeni podatki so Z-normalizirani in centrirani, beli kvadrati predstavljajo nižje in črni višje vrednosti (glej legendo).

**Figure 34:** Heatmap of the selected elements distribution on cross sections with  $\mu$ -PIXE among buckwheat tissues. Measured values in a) roots and b) leaves of common (N) and Tartary (T) buckwheat plants treated with MPs and NPs CuO 10 mg l<sup>-1</sup> and Cu salt 1 mg l<sup>-1</sup>. Presented data are Z-normalized and centred, white squares represent lower values, while black higher values (see the legend).

Tudi podatke prostorske razporeditve elementov v koreninah in listih kontrolnih rastlin navadne in tatarske ajde ter navadne ajde tretirane z MD CuO, ND CuO in Cu soljo smo z LDA razložili kar 94,20 % oz 92,62 % variabilnosti podatkov. V primeru korenin se

tretmaji razporedijo veliko bolj centrirano, kot v primeru listov (Slika 35). Ponovno smo dokazali, da med obema vrstama prihaja do razlik že v primeru kontrol, medtem ko se pri koreninah od kontrole najbolj razlikujejo ND CuO, v primeru poganjkov na MD CuO (Slika 35). Prvo gre na račun predvsem povečanih vsebnosti Cu, K, Mn, Zn in Mg, v primeru listov pa na račun K, Mn in Zn (Priloga Z).



**Slika 35:** Graf linearne diskriminantne analize razporeditve elementov (Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn) v a) koreninah in b) listih rastlin navadne in tatarske ajde ter navadne ajde tretirane z različnimi bakrovimi spojinami (mikro-MD CuO, nano-ND CuO, sol-Cu sol).

**Figure 35:** Linear discriminant analysis plot for distribution of minerals (Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn) in a) roots and b) shoots of common and Tartary buckwheat plants and common buckwheat plants treated with different Cu compounds (mikro-MPs CuO, nano-NPs CuO, sol-Cu salt).

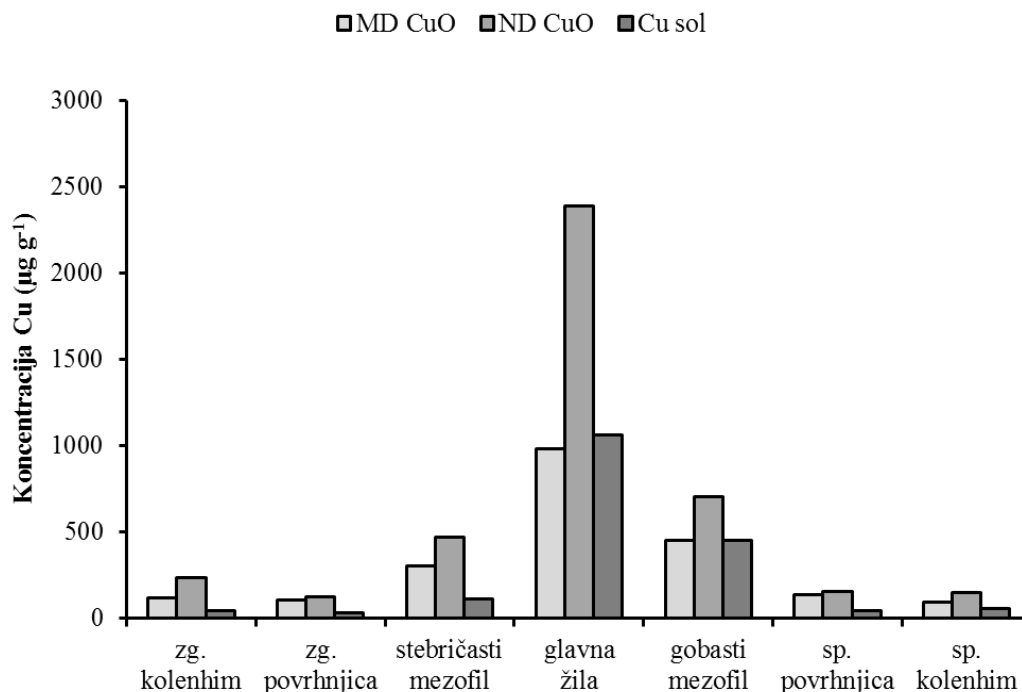
Analizirali smo tudi koncentracije izbranih elementov v oblogah na površini korenin rastlin, tretiranih z MD CuO in ND CuO, saj smo na porazdelitvenih mapah opazili koncentriranje določenih elementov (**Priloga U1**). V primeru skoraj vseh elementov so koncentracije višje pri ND CuO v primerjavi z MD CuO, kar bi lahko pripisali večji površini obloge v primeru MD CuO (**Preglednica 14**). Več je le Mg v oblogah MD CuO, sicer pa ni razlik v koncentraciji Mn, manjše pa so pri Mg, K in Ca. V grobem lahko trdimo, da se v oblogi korenin nahaja največ Cu in Fe, katerim sledijo P, K in Ca.

**Preglednica 14:** Koncentracije izbranih elementov ( $\mu\text{g g}^{-1}$  SM) v oblogah na površini korenin navadne ajde tretirane z MD CuO in ND CuO  $10 \text{ mg l}^{-1}$  ( $n=1$ ;  $SN=10 \%$  v primeru lahkih elementov in  $SN=5-10 \%$  v primeru težkih elementov).

**Table 14:** The concentrations of the chosen elements ( $\mu\text{g g}^{-1}$  DW) in the plaque on surface of common buckwheat roots treated with MPs CuO and NPs CuO  $10 \text{ mg l}^{-1}$  ( $n=1$ ;  $SE=10 \%$  for light elements and  $SE=5-10 \%$  for heavy elements).

	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn
MD CuO	1705	2973	1274	2753	1193	102	3903	4285	116
ND CuO	1420	11846	2916	2576	1837	105	21393	30212	404

Pri razporeditvi Cu v listih smo opazili trend najvišjih koncentracij v glavni žili, z zmanjševanjem koncentracij proti robovom listov. Najvišje koncentracije Cu se nahajajo v glavni žili lista tretiranega z ND CuO in tudi sicer je v vseh tkivih najvišja vsebnost Cu pri tretmaju ND CuO (**Slika 36**).



**Slika 36:** Koncentracije Cu ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) v izbranih listnih tkivih ajde pomejenih na liofiliziranih prečnih rezinah listov z metodo  $\mu$ -PIXE ( $n=1$ ).

**Figure 36:** Concentrations of Cu ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) in selected leaf tissues of buckwheat on freeze-dried cross sections with  $\mu$ -PIXE analysis ( $n=1$ ).

Najvišje koncentracije Fe smo izmerili pri tretmaju MD CuO, predvsem stebričastem tkivu ter v glavni žili tatarske ajde (**Priloga V2**). Najvišje vsebnosti Zn, Mn in K so bile v listih tretiranih z MD CuO, katerim so sledila tkiva listov tretiranih z ND CuO (**Priloga V2**). Najvišje koncentracije Zn so prisotne v obeh mezofilih in zg. kolenhimu. Najnižje koncentracije K imajo vsa tkiva tatarske ajde, katerim sledi kontrolni list navadne ajde. Kalcija je bilo nekoliko več v listih tretiranih z MD in ND CuO in spodnjem kolenhimu listov tretiranih s Cu soljo, na drugi strani pa je opazno zniževanje vsebnosti Ca proti notranjosti lista (**Priloga V2**). Žvepla je bilo največ v stebričastem in gobastem mezofilu (**Priloga V2**). Najvišje koncentracije P so bile v listih tretiranih z MD CuO in ND CuO (**Priloga V2**). Magnezija je bilo največ v listih tretmaja Cu soli (**Priloga V2**).

Izračunali smo Pearsonov korelacijski koeficient med izmerjenimi elementi na prečnih prerezi korenin in listov navadne in tatarske ajde ter tretiranih listov navadne ajde z različnimi bakrovimi spojinami (**Priloga AB**). V kontrolni korenini navadne ajde ni omembe vrednih korelacij, medtem ko v listu navadne ajde pozitivno korelirajo ( $R > 0,5$ ) element Mg z K, P in S, element S s K in P, medtem ko negativnih korelacij ( $R < -0,5$ ) ni (**Priloga AB1**). V koreninah navadne ajde tretirane z MD CuO pozitivno korelirata K in Mg, medtem ko v listu navadne ajde tretiranih z MD CuO, element Cu močno korelira s Zn ( $R = 0,824$ ), medtem ko negativnih korelacij ni (**Priloga AB2**). Na prečnem prerezu korenine navadne ajde tretirane z ND CuO pozitivno korelira Fe z P in Cu, na prečnem prerezu lista navadne ajde ni ne pozitivnih ne negativnih korelacij (**Priloga AB3**). V primeru tretiranih korenin navadne ajde s Cu soljo močno pozitivno korelira Fe s P ( $R = 0,82$ ) in K z Mg ( $R = 0,63$ ), medtem ko v listu navadne ajde tretirane s Cu soljo element S pozitivno korelira s K in P, element K pozitivno z Mg in P ter element Fe pozitivno s Ca (**Priloga AB4**). V kontrolni korenini tatarske ajde ni negativnih korelacij, medtem ko so močno pozitivne v primeru Fe s Zn ( $R = 0,89$ ), K s Mg, P in S, P s S in Mg s P in S. V listu tatarske ajde pozitivno korelirajo element Mg s P in S ter element S s P, medtem ko negativnih korelacij ni (**Priloga AB5**).

Izračunali smo korelacije med koncentracijami Cu v mezofilu prečnih prerezov tretiranih listov navadne ajde s skupnimi vsebnostmi  $Kl_a$ ,  $Kl_b$ ,  $Kl_{ab}$  in karotenoidov v poganjkih. S klorofili so vse korelacije negativne ( $Kl_a = -0,5$ ,  $Kl_b = -0,52$ ,  $Kl_{ab} = -0,52$ ), medtem ko ima korelacija s karotenoidi vrednost 0,11.

Z analizo faktorske ANOVE smo preučili vpliv različnih dejavnikov na razporeditev elementov na prečnih prerezi listov. V primerjavi kontrolnih listov navadne in tatarske ajde smo prišli do zaključka, da so tako vrsta ajde kot tkivo ter njuna interakcija pomembni dejavniki vpliva (**Preglednica 15a, Priloga AC**). Le v primeru Zn tkivo in interakcija vrste ajde s tkivom nista imela značilnega vpliva ter v primeru Mg interakcija vrste ajde s tkivom. Z analizo vpliva tretmaja, tkiva in njune interakcije na razporeditev elementov na prečnih prerezi navadne ajde tretirane z MD CuO, ND CuO in Cu soljo, smo ugotovili, da imajo vsi na prav vse izmerjene elemente značilno pomemben vpliv, z izjeme vpliva

interakcije emd ajdo in tkivom na izmerjene vsebnosti Mg (**Preglednica 15b, Priloga AC**).

**Preglednica 15:** Vpliv dejavnikov a) vrste ajde, tkiva in njihovih interakcij na razporeditev Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu in Zn na prečnih prerezi navadne in tatarske ajde ter b) dejavnikov tretmaja, tkiva in njihovih interakcij na razporeditev Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu in Zn na prečnih prerezi navadne ajde tretiranih z MD CuO, ND CuO in Cu soljo. Rezultati so podani kot p-vrednosti (faktorska ANOVA), kjer odebeljene številke predstavljajo statistično značilen vpliv dejavnika na izbran parameter ( $p < 0,05$ ).

**Table 15:** Impact of different factors, buckwheat species, tissue and their interaction on distribution of Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu and Zn in cross section of common and Tartary buckwheat leaves, and b) impact of factors, treatment, tissue and their interaction on distribution of Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu, and Zn in cross section of treated common buckwheat leaves with NPs CuO, NPs CuO and Cu salt. Results are represented as p-values (factorial ANOVA), where numbers in bold represent statistically significant factor affecting selected variables ( $p < 0.05$ ).

a)	Korenine							Listi						
	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Fe
Vrsta ajde	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
Tkivo	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
Ajda*tkivo	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	0,07	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>

b)	Korenine										
	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn		
Tretma	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
Tkivo	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
Tretma*tkivo	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>

	Listi										
	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn		
Tretma	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
Tkivo	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>
Tretma*tkivo	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,04</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>

## 5.3 RAZPRAVA

### 5.3.1 Vpliv različnih bakrovih spojin na kalitev semen in razvoj kalic navadne in tatarske ajde

Preučili smo ali z izpostavitvijo semen navadne ajde in tatarske ajde trem različnim oblikam bakrovih spojin, MD CuO, ND CuO in Cu soli, v različnih koncentracijah, nastanejo razlike v kaljivosti semen in odzivu kalic ter ali se te razlike kažejo tudi v vsebnosti sekundarnih metabolitov v kalicah. Rezultati tovrstnih raziskav nam lahko nudijo potencialno pomembne informacije o vplivu različnih bakrovih spojin, ki bi so potencialna fungicidna sredstva za oblaganje semen, na kalitev semen in sekundarni metabolizem kalic ajde. Predpostavili smo, da so učinki bakrovih spojin na kalitev semen in razvoj kalic ajde pogojeni z vrsto ajde in obliko Cu v uporabljenih spojinah. Poleg spremljanja dnevne kaljivosti semen in razvoja kalic, smo kalicam določili mase in vsebnost sekundarnih metabolitov v kalicah (fenoli, flavonoidi in tanini).

Za odziv semen in kalic navadne in tatarske ajde velja, da so najpomembnejše spremenljivke odziva vsebnost fenolov, dolžina korenčic obeh ajd, SvM kalic navadne ajde in kalitev na 1. dan poskusa tatarske ajde. Na podlagi izračunanih efektivnih koncentracij vsake oblike spojine na dolžino korenčice so najmanj strupeni MD CuO, katerim sledita Cu sol in najbolj strupeni ND CuO. Dolžina korenčic se je zniževala s strupenostjo Cu tretmaja, kar so dokazali že na kalicah pšenice, fižola, bučk in riža (Lee in sod., 2008; Stampoulis in sod., 2009; Yang in sod., 2015). Na primeru koruze so pokazali, da višje koncentracije Cu zaradi strupenih učinkov na morfolgijo kromosomov inhibirajo delitve celic, medtem ko nižje koncentracije stimulirajo njeno rast (Jiang in sod., 2001). Podobno velja za kalice ajde, ki so bile izpostavljene  $Pb^{2+}$  in  $Cd^{2+}$  (Horbowicz in sod., 2013). V koreninah riža je višek Cu spremenil gene vpletene v metabolizem maščobnih kislin in biogenezo celičnih komponent (Lin in sod., 2009). Nanodelci Cu in ND CuO so zmanjšali dolžino korenčic kalic solate, lucerne (Hong in sod., 2015) in riža (Da Costa in Sharma, 2015) ter povzročili zaostalost koreninske rasti, večjo lignifikacijo in citotoksičnost v koreninskih celicah (Nair in Chung, 2014). Ker ND Cu in  $Cu_2O$  lahko zaradi adsorbcije na rastlinsko površino blokirajo vodne kanale in posledično povečajo svoj vdor v korenine, povzročijo poškodbe membran in okvarijo celične delitve (Atha in sod., 2012; Lee in sod., 2013b,c). Zaradi genotoksičnosti ND se lahko v rastlinah poveča produkcija ROS in oksidativno spremenjene komponente celice se kopičijo ter povzročijo mutagenozo in zavirano rast (Atha in sod., 2012).

Navadna ajda se je izkazala za občutljivejšo na tretiranje s Cu soljo, medtem ko je bila tatarska ajda občutljivejša na tretiranje z MD CuO in ND CuO. Morda gre razlike v odzivu pripisati medvrstni razliki v morfolgiji luščine semena, ki lahko vpliva na njeno prepustnost (Moise in sod., 2005), kot tudi fizikalne in kemijske lastnosti različnih kovin (Kranner in Colville, 2011). Znano je tudi, da je odziv rastlin na oksidativni stres odvisen od vrste rastlin, kot tudi od sorte (Adrees in sod., 2015).

Med prvimi tremi najpomembnejšimi ravnimi odzivi na tretiranje z bakrovimi spojinami se je pri obeh ajdah izkazala vsebnost fenolov v kalicah. Rezultati potrjujejo, da so pri navadni ajdi prav vse vsebnosti fenolov vseh tretmajev značilno višje od vsebnosti fenolov v kontrolnih kalicah, medtem ko se pri tatarski ajdi vsebnost fenolov zvišuje z višanjem koncentracije Cu, a se pri višjih koncentracijah pomembno zniža glede na kontrolo. To nakazuje na pozitiven učinek nižjih koncentracij Cu in strupenostni učinek višjih koncentracij Cu na antioksidativni odziv rastline, kar so pokazali že na solati in lucerni (Hong in sod., 2015). Kljub temu, da so raziskave vpliva ND na encimski del antioksidativnega sistema rastlin pogostejše (Adrees in sod., 2015) in poročajo o povečani aktivnosti antioksidativnih encimov v kumari izpostavljeni ND Cu (Kim in sod., 2012), manjši katalazni aktivnosti v koreninah in poganjkih lucerne in povečani aktivnost askorbat peroksidaze v koreninah solate in lucerne (Hong in sod., 2015), smo mi preučili vpliv bakrovih spojin na neencimski del antioksidativnega sistema rastline, saj le-ta tekom kalitve omogoča embriju preživetje v onesnaženem okolju in omogoča odpornost na Cu

(Kranner in Colville, 2011; Wang in sod., 2013). Nižje koncentracije  $\text{Cu}^{2+}$  so povečale vsebnost totalnih flavonoidov v kalicah tatarske ajde, tudi za 30 %, medtem ko se je njihova vrednost znižala v koncentracijah Cu med 60 in 200  $\text{mg l}^{-1}$  (Wang in sod., 2013). Povečane vsebnosti fenolov so našli v ajdi izpostavljeni Al (Smirnov in sod., 2015). Tretiranje semen ajde z 2% klorholin kloridom so povečale vsebnosti skupnih fenolov v steblih, listih in socvetjih (Syta in sod., 2014). V raziskavi Horbowicz in sod. (2013) so ugotovili, da je sorta ajde, ki je bolj odporna na tretiranje s težkimi kovinami vsebovala več flavonoidov v kotiledonih, kot občutljive sorte. Znanstveniki so potrdili, da se flavonoidi v tatarski ajdi povečajo v primeru povišanega abiotskega stresa, natančneje UV sevanja, kar pa je drugačna oblika stresa za rastline (Regvar in sod., 2012). Kovačik in sod. (2009) so predlagali, da ima sinteza polimeriziranih fenolov vlogo pri kompleksiranju Cd ionov. Tudi naši rezultati potrjujejo vlogo fenilpropanoidne metabolne poti v odzivu rastlin na kovine (Pawlak-Sprada in sod., 2011; Horbowicz in sod., 2013). Sintetizirani sekundarni metaboliti lahko vplivajo direktno na kompleksacijo kovin ali na odstranjevanje ROS.

V skoraj vseh tretiranih kalicah navadne ajde se je SvM kalic znižala, močneje opazno pri tremajih z višjimi koncentracijami ND CuO ter najvišjimi koncentracijami Cu soli in MD CuO. Tudi ND Cu so zmanjšali rast fižola in pšenice, raziskovalci pa so njihov vpliv pripisali strupenosti ND samih in dokazali, da je vpliv sproščenih  $\text{Cu}^{2+}$  ionov s površine delcev zanemarljiv (Lee in sod., 2008). Enako, so ND CuO zmanjšali rast korenin in poganjkov kalic soje (Nair in Chung, 2014) ter riža (Da Costa in Sharma, 2015).

Na drugi strani, pa je število kalečih semen tatarske ajde na 1. dan kalitvenega poskusa druga najpomembnejša spremenljivka odziva semen tatarske ajde na tretiranje z različnimi bakrovimi spojinami, saj so prav vsa tretirana semena imela višjo kaljivost od kontrole, kar je v skladu z ugotovitvami s Foti in sod. (2008). Na drugi strani so Altomani Neves Dias in sod. (2015) ugotovili, da semena koruze tretirana s Cu kalijo počasneje, a je na koncu poskusa njihova kaljivost primerljiva s kontrolo. Ogljikove nanoceevke so povečale kalitev semen riža in paradižnika kot tudi rast kalic (Srinivasan in Saraswathi, 2010), kar naj bi bila posledica povečanja privzema vode v semena. Nasprotno nekateri avtorji poročajo o negativnem vplivu ND CuO na kalitev semen solate, redkve in kumare (Wu in sod., 2012) ter riža (Da Costa in Sharma, 2015), Cu pa na kalitev pšenice (Gang in Vyas, 2013; Singh in sod., 2007), trte (Muccifora in Bellani, 2013) in koruze (Luchese in sod., 2004, cit. po Altomani Neves Dias in sod., 2015). Manjšo kaljivost semen zaradi ND CuO lahko pripišemo uničenju shranjenih biomolekul v semenu in spremenjeni prepustnosti membrane (Krug in Wick, 2011). Na kalitev semen buč niso vplivali MD in ND Ag, Cu, Si, ZnO ali ogljikove nanoceevke (Stampoulis in sod., 2009), kot tudi na kalitev koruze in riža ne ND  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SiO}_2$ , CeO,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , ZnO in CuO (Yang in sod., 2015). Vpliv na spremembe v kalitvi se je verjetno pojavil v procesu inkubacije semen in ne začetnega namakanja (Lin in Xing, 2007).



Nepomembne spremenljivke odziva so kalitev semen na 8.dan poskusa in suha masa v primeru kalic navadne ajde. Podobno z našimi ugotovitvami, so semena paradižnika kontrole kalila kasneje kot tista tretirana z Ag ND (Karami Mehrian in sod., 2016), a po 8. dneh kalitvenega poskusa ni več zaznati vpliva bakrovih spojin na kalitev semen ajde. Verjetno tretirana semena kalijo hitreje zaradi povečanega privzem vode in elementov v semena (Savithramma in sod., 2012), medtem ko so tretirana semena pšenice s 100 ppm Cu po 14 dneh še vedno kalila 40 % manj kot kontrole (Singh in sod., 2007).

Z linearno diskriminantno analizo smo pokazali, da so kontroli najpodobnejši tretmaji Cu sol, nato MD CuO in nazadnje ND CuO, a je ta ločitev manj jasna pri tatarski ajdi. Tretmaje smo glede na odziv semen in kalic na prisotnost različnih bakrovih spojin s klastersko analizo razvrstili v dve skupini, bolj in manj strupene. V primeru tatarske ajde se je bolj strupenim tretmajem pridružil še tretma Cu sol  $1 \text{ mg l}^{-1}$ . Tudi rezultati faktorске ANOVE so potrdili, da imajo najpogostejši vpliv na izbrane izmerjene parametre vrsta ajde, oblika bakrove spojine ter njuna interakcija. Velja, da se vpliv Cu na kalitev semen močno razlikuje od vrste rastlin, znotrajvrstnih razlik v tolerantnosti in debeline luščine semen (Adrees in sod., 2015; Yasur in Rani, 2013; Yin in sod., 2012). Predvidevamo, da do teh razlik pride zaradi genetske predizpozicije in fenotipske plastičnosti navadne ajde v primerjavi s tatarsko ajdo. Prva je že dolgo kultivirana v okoljih, kjer lahko pride v stik z onesnažili, medtem ko tatarska ajda velja bolj za specialista in je zaradi višjih nadmorskih višin, kjer jo gojijo bolj prilagojena na UV sevanje kot onesnažila (Regvar in sod., 2012). Tudi naši rezultati dokazujejo, da v primeru tatarske ajde hitreje pride do ugasnitve sekundarnega metabolizma. Dokazali smo, da so učinki bakrovih spojin na kalitev semen in razvoj kalic navadne in tatarske ajde pogojeni z vrsto rastline in obliko bakrove spojine, s čimer smo potrdili peto hipotezo.

### **5.3.2 Vpliv različnih bakrovih spojin na rast in razvoj rastlin navadne in tatarske ajde, privzem in porazdelitev Cu ter nekaterih drugih esencialnih elementov**

Pri hidroponskem gojenju smo rastline navadne in tatarske ajde izpostavili določenim koncentracijam hranil in različnim bakrovim spojinam, MD CuO, ND CuO in Cu soli, z namen preučevanja vpliva teh spojin na fiziološki odziv rastlin (sinteza biomase, lipidna peroksidacija, vsebnost pigmentov in sekundarnih metabolitov v poganjkih) ter privzem in porazdelitev Cu in nekaterih ostalih esencialnih elementov. Želeli smo ugotoviti, kateri izmerjeni parameter rastlinskega odziva je najprimernejši za razlago strupenosti bakrovih spojin ter obenem preučiti stopnjo strupenosti različnih oblik Cu. Predpostavili smo, da bo fiziološki odziv rastlin navadne in tatarske ajde in privzem Cu pogojen z obliko bakrove spojine in njeno koncentracijo.

Na podlagi linearne diskriminantne analize, lahko zelo jasno razložimo razlike med tretmaji, ki v primeru kontrole temelji predvsem na višji suhi masi korenin in poganjkov ter višjimi vsebnostmi pigmentov v poganjkih. Tretmaju kontrole so najpodobnejši tretmaji z MD CuO, medtem ko se tretmaji z ND CuO razlikujejo najbolj, predvsem na podlagi

visokih vsebnosti MDA. Najvišje koncentracije MD CuO in ND CuO so znižale biomaso korenin obeh vrst ajd, kot tudi najvišje koncentracije Cu soli korenine tatarske ajde. Ponovno se je tatarska ajda izkazala za občutljivejšo na višje koncentracije Cu soli v primerjavi z rastlinami navadne ajde. Znano je, da se zmanjšana biomasa korenin razlikuje med vrstami rastlin, kot tudi različnimi ND (Lin in Xing, 2007; Yin in sod., 2012).

Izmerjene koncentracije privzema Cu v koreninah in poganjkih izpostavljenih rastlin so pokazale, da sta si tretmaja najvišjih koncentracij ND CuO in MD 100 mg l<sup>-1</sup> po koncentracijah izmerjenega Cu v/na koreninah najbolj podobna, in sicer imata najvišje koncentracije Cu. Naše rezultate visokih koncentracij Cu v koreninah najvišjih tretmajev ND CuO in MD CuO lahko pripišemo lepljenju delcev na korenine rastlin, kjer nadaljnjo povzročajo strupenostne fizikalne in/ali kemične učinke na rastline (Parveen in Rao, 2015). ND lahko tvorijo komplekse z membranskimi transporterji ali koreninskimi eksudati še preden so privzeti v rastlino. Večina kovinskih ND, ki jih rastline privzemajo imajo identificirane ionske transporterje (Tani in Barrington, 2006), sicer pa lahko celično membrano prečkajo le ND s premerom manjšim od pore v celični steni. Ko je ND enkrat v rastlini pa se lahko transportira bodisi po apoplastu ali simplastu iz ene celice v drugo preko plazmodezem. V celicah povzročijo tvorbo reaktivnih kisikovih spojin, ki poškodujejo celične membrane, zato se poveča verjetnost vstopa ND v celico (Masarovičova in Kralova, 2013). Podobno kot v naši raziskavi, so v večini raziskav koncentracije Cu višje v koreninah kot v poganjkih in listih, kar je deloma tudi posledica omejene sposobnosti rastline za prerazporeditev Cu iz korenin v poganjke (Broadley in sod., 2012), na drugi strani pa rastline v izobilju določenega minerala zmanjšajo njegov privzem (Baligar in sod., 2001). Seveda je koncentracija Cu v poganjkih odvisna od količine ND v hranilni raztopini (Da Costa in Sharma, 2015).

Odziv sekundarnega metabolizma rastlin navadne in tatarske ajde je pokazal, da se s tretiranjem z bakrovimi spojinami vrednosti taninov v primerjavi s kontrolami znižajo pri obeh ajdah, medtem ko se vsebnost fenolov in deloma flavonoidov pri navadni ajdi poveča in vrednost fenolov in flavonoidov pri tatarski ajdi zmanjša. Znano je, da se prosti tanini v tretiranih rastlinah s Cu znižajo, saj kelirajo Cu ion (Karamač, 2007). Nasprotno naši tatarski ajdi, so ND TiO<sub>2</sub> povečali količino skupnih polifenolov v spirulini (Casazza in sod., 2015). Izgleda, da je odziv sekundarnega metabolizma odvisen že od prvotne koncentracije sekundarnih metabolitov, ki se med rastlinami pomembno razlikuje.

Pri obeh ajdah je bil en izmed najpomembnejši izmerjenih rastlinskih parametrov odziva rastline in najboljši pokazatelj strupenosti tretmajev koncentracija MDA. Splošno je znano, da se z večanjem koncentracije Cu v hranilni raztopini poveča oksidativni stres, ki vodi do lipidne peroksidacije membran kalice pšenice (Azooz in sod., 2012) in rastlin pšenice (Gajewska in Sklodowska, 2010), koruze (Aly in Mohamed, 2012; Sanchez-Pardo in sod., 2014), oljne repice (Ivanova in sod., 2010) in kumare (Iseri in sod., 2011), kot tudi v povečano sintezo supeoksidnega radikala (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) v kalicah redkve (Lukatkin in sod., 2014).

Vrednosti MDA so bile izjemno povišane le v skrajnih tretmajih MD in ND CuO. To pomeni, da se do neke mere rastlini uspešno spopadeta z reaktivnimi kisikovimi spojinami, verjetno zaradi prisotnih mnogih antioksidativnih spojin, ki preprečujejo lipidno peroksidacijo (Hodges in sod., 1999; Tsuda in sod., 1996; Nair in Chung, 2014). Nasprotno z našimi rezultati Da Costa in Sharma (2015) nista našla značilnih razlik med koncentracijami MDA v tretiranih rastlinah riža z ND CuO, sta pa dokazala povišano stopnjo kopičenja neencimskega antioksidanta askorbata. Z analizo korelacij smo ugotovili, da je bila ena najmočnejših pozitivnih korelacij MDA s koncentracijami Cu v koreninah in poganjkih obeh vrst ajd. Poleg tega MDA v primeru navadne ajde negativno korelira s S in K v koreninah ter pozitivno s P, v primeru tatarske ajde pa MDA negativno korelira s flavonoidi in tanini. To ponovno nakazuje pomembne razlike med vrstama, predvsem v odzivu sekundarnega metabolizma.

Privzem in razporeditev potrebnih koncentracij esencialnih elementov je bistvenega pomena za rast in razvoj rastline. Precej pogost in znan učinek strupenosti Cu na rastline je zmanjšan privzem in kopičenje ostalih mineralnih hranil (Adrees in sod., 2015). Baker v poganjkih navadne ajde negativno korelira s Fe, S in K v koreninah in pozitivno s Cu, Zn, P, S in Fe v koreninah, medtem ko v koreninah in poganjkih tatarske ajde Cu negativno korelira z vsebnostjo fenolov v tretiranih poganjkih. Izmerjene vsebnosti elementov v koreninah tretiranih rastlin navadne in tatarske ajde so pokazale zmanjšanje S in K ter povišanje Ca in Fe. V poganjkih ni opaznih tako jasnih trendov. Glede na kontrolo se je vsebnost P višjih vsebnosti Cu v hranilni raztopini pri obeh ajdah znižala, v primeru navadne ajde tudi K in Fe v tatarski ajdi. Tudi vsebnost S se zniža, a ne pri tretmajih 10 in 100 mg l<sup>-1</sup> ND CuO obeh ajd, MD CuO 1 mg l<sup>-1</sup> navadne ajde in MD CuO 10 mg l<sup>-1</sup> in Cu sol 1 mg l<sup>-1</sup> tatarske ajde. Vzrok bi lahko bil v odgovoru žveplovega metabolizma na prisotnost Cu, saj je pogost pojav vključitve različnih proteinov s pripadajočimi -SH skupinami v detoksifikacijo Cu (Cobbett in Goldsbrough, 2002; Xue in sod., 2009; Lee in sod., 2004; Guo in sod., 2008). Prav tako smo opazili trend višjih vsebnosti bolj v poganjkih tretiranih z ekstremnimi tretmaji, kar bi lahko pomenilo mehanizem rastline, da zaščiti poganjke in posledično fotosintezni aparat, ki je bistven za preživetje rastline (Cestone in sod., 2012). Skladno z našimi rezultati pri višjih koncentracijah Cu v hranilni raztopini, se poveča vsebnost S v tretiranih poganjkih kitajskega zelja, za kar bi lahko bila odgovorna povečana sinteza sulfatnih transporterjev (Shahbaz in sod., 2010). Za primerjavo, so visoke koncentracije Cu v koruzi znižale vsebnost Ca, K in Fe (Ouzounidou in sod., 1995) ter N, P in K v koruzi (Ali in sod., 2002) kot tudi P, Zn in Fe v koruzi druge raziskave (Azeez in sod., 2015). Vsebnost Fe je linearno povečana s koncentracijo Cu (Ali in sod., 2002), kar velja v primeru korenin in ne poganjkov. Nasprotno so ugotovili, da presežek Cu v prsti zniža vsebnost Fe v pšenici (Kumar in sod., 2009), cvetači (Chatterjee in Chatterjee, 2000) in soji (Sanchez-Pardo in sod., 2014), kar potrjuje naše ugotovitve. Podobno presežek Cu zniža privzem Fe (Michaud in sod., 2008), Mn in Zn (Keller in sod., 2015) pri pšenici ter Zn, Fe, Mn in Co v gorčici in repici (Feigl in sod., 2013), K, Ca, Mg

in Fe v fižolu (Kopittke in Menzies, 2006), Ca, K, Mg in Mn v travi (Sheldon in Menzies, 2005) ter Zn pri repici (Ivanova in sod., 2010). Na drugi strani pa poviša privzem Ca in Mg v pšenici (Azooz in sod., 2012) ter Mn v poganjkih riža (Ando in sod., 2013). Z faktorsko ANOVO vseh izmerjenih parametrov odziva rastline smo pokazali, da je bila oblika bakrove spojine vodilni dejavnik vpliva na izmerjene parametre, kateremu so sledili koncentracija bakrove spojine, njuna interakcija in nazadnje vrsta ajde.

Prostorsko razporeditev elementov v prečnih prerezi tretiranih korenin in listov ajde smo razkrili z metodo  $\mu$ -PIXE. Z analizo map razporeditve elementov smo določili koncentracije elementov v posameznih tkivih prečnega prereza lista, to so zgornji kolenhim, zgornja povrhnjica, stebričasti mezofil, glavna žila, gobasti mezofil, spodnja povrhnjica in spodnji kolenhim, kot tudi v rizodermisu, skorji, endodermisu in glavni žili na prečnem prerezu korenin. Dokazali smo, da prihaja do bistvenih razlik že v razporeditvi in koncentracijah izbranih elementov med kontrolnimi rastlinami navadne in tatarske ajde, tako v koreninah, kot tudi v listih. Na podlagi linearne diskriminantne analize smo opazili, da v primeru listov prihaja do večje razpršenosti podatkov, kar pomeni večjo variabilnost v koncentracijah elementov v posameznih tkivih listov. Od kontrole se najbolj razlikuje korenina tretmaja ND CuO predvsem na račun povečanih vsebnosti Cu, K, Mn, Zn in Mg ter na račun K Mn in Zn v primeru tretiranih listov.

Pri razporeditvi Cu v listih je bil Cu v najvišjih koncentracijah v glavni žili, z zmanjševanjem koncentracij proti robovom listov. Že Cestone in sod. (2012) so dokazali, da rastline posedujejo aktivni mehanizem za črpanje Cu v glavno žilo lista in s tem preprečitev prenosa v fotosintezno aktivna tkiva. Najvišje koncentracije Cu se nahajajo v glavni žili lista tretiranega z ND CuO in tudi sicer je v vseh tkivih najvišja vsebnost Cu pri tretmaju ND CuO. Da so ND Cu vstopili v korenine intaktni so dokazali že Lee in sod. (2008) in Kim in sod. (2012) s presevnim elektronskim mikroskopom, prav tako velja enako za ND CuO v poganjkih koruze in pšenice (Dimkpa in sod., 2013; Wang in sod., 2012), zato predvidevamo, da je Cu v žili lahko tudi v obliki ND CuO ali morda vezan na kakšen organski ligand, kar bi bilo potrebno potrditi z tehnikami rentgenske absorpcijske spektrometrije.

Privzem, kopičenje in vgraditev ND v rastlinska tkiva se razlikuje v odvisnosti od velikosti in tipa ND, kot tudi organske sestave rastline (Aslani in sod., 2014). V zmernih koncentracij Cu poveča privzem mikronutrientov v rastlinah, medtem ko imajo višje koncentracije obraten učinek (Manivasagaperumal in sod., 2011). K se poveča v vseh tkivih razen žile v listu tatarske ajde, medtem ko se pri vseh tretmajih vsebnost K v tkivih zniža, kar so pokazali že Wang in sod. (2012) v koreninah in poganjkih koruze. Kalcija je nekoliko več v listih tretiranih z MD in ND CuO in spodnjem kolenhimu listov Cu soli, na drugi strani pa je opazno zniževanje vsebnosti Ca proti notranjosti lista. Žvepla je bilo največ v stebričastem in gobastem mezofilu, a se vrednosti povečajo glede na kontrolo predvsem v obeh kolenhimih. Najvišje koncentracije P so bile v listih tretiranih z MD CuO

in ND CuO, kar je skladno z ugotovitvami Hong in sod. (2015). Najvišje koncentracije Fe so bile pri tretmaju MD CuO, predvsem v stebričastem tkivu ter v glavni žili tatarske ajde. Najvišje koncentracije Zn so prisotne v mezofilu in zg. kolenhimu. Korelacije elementov so pokazale, da v listu navadne ajde Mg pozitivno korelira z K, P in S, kar nakazuje na zdrav fotosintezni aparat, v listu navadne ajde tretiranim z MD CuO pa Cu močno korelira s Zn. Na prečnem prerezu korenine navadne ajde tretirane z ND CuO Fe pozitivno korelira z P in Cu ter v listu navadne ajde tretirane s Cu soljo S s K in P, K z Mg in P ter Fe s Ca. Porazdelitev elementov je odvisna od vrste rastline, Cu koncentracije v hranilni raztopini, dolžini izpostavitve, doze in pogoji gojenj (Adrees in sod., 2015). ND CuO znižajo vsebnost Mn, Fe, Ca in Mg v listih fižola (Dimkpa in sod., 2015), Mn, P, Ca in Mg v solati (Trujillo-Reyes in sod., 2014) ter P in Fe v poganjkih lucerne in solate (Hong in sod., 2015). Na drugi strani pa povišajo vsebnosti Cu, Al, Zn, Ca in S v poganjkih solate (Trujillo-Reyes in sod., 2014). V kumari se spremeni razporeditev Ca, K in Mg v koreninah in poganjkih, katerih koncentracija se zniža v listih, v koreninah pa ostanejo enake (Alaoui-Sossé in sod., 2004). Najmočnejši antagonističen mehanizem je opazen med Cu in Fe (Adrees in sod., 2015), kar ne velja v našem primeru meritev  $\mu$ -PIXE, pač pa le v primeru meritev skupnih koncentracij elementov v poganjkih. Manj Fe pomeni, da je ostal v koreninah kot netopna spojina, oksid, hidroksid ali fosfat, ali pa je reagiral s proteini, organskimi kislinami in celičnimi eksudati v mediju. Z analizo elementov v oblogah na površini korenin rastlin, tretiranih z MD CuO in ND CuO, smo dokazali, da se v oblogi korenin nahaja največ Cu in Fe, kar bi lahko bistveno prispevalo k večjemu zadrževanju teh elementov na koreninah in manjšemu prenosu v liste tretiranih rastlin. ND CuO so znižali vsebnosti Mn, Zn in Ca, povečali Na, medtem ko niso imeli vpliva na Mg in K (Dimkpa in sod., 2015). Ker ni prišlo do sprememb v K, bi to lahko nakazalo na odsotnost težav s puščanjem membrane.

Vsebnost klorofilov v navadni in tatarski ajdi s po tretiranju z različnimi bakrovimi spojinami znižajo v primerjavi s kontrolami. Enako velja za karotenoide, z le nekaj rahlimi dvigi v primeru nižjih koncentracij. Z analizo korelacij smo dokazali, da vsebnost Cu v mezofilu tretiranih listov negativno korelira s skupnimi vsebnostmi klorofila a in klorofila b v listih. O vplivu Cu na zmanjšano biosintezo klorofila so poročali pri špinači, koruzi, cvetači, sončnici, Indijski gorčici, repici in zelju, ter vzrok pripisali oviranemu razvoju kloroplastom in pa poškodbam fotosinteznega aparata na ravni tilakoid. Strupenostni vpliv Cu na sintezo klorofila se razlikuje tako med vrstami rastline, kot tudi med rastlinami znotraj ene vrste (Adrees in sod., 2015). Kopičenje ND CuO so opazili v celicah riža, še posebno v kloroplastih, ki se je posledično odražalo v nižji stopnji fotosinteze kot tudi manjšim vsebnostim klorofilov (Da Costa in Sharma, 2015).

Dokazali smo, da so vrsta ajde, tkivo, kot tudi tretma pomembni dejavniki vpliva na vsebnosti elementov v posameznih tkivih. Lahko povzamemo, da na vse interakcije rastlin z ND, tako na strupenost ND, njihov privzem, prerazporejanje in kopičenje vpliva vrsta rastline ter velikost, tip, kemijska sestava in stabilnost ND (Aslani in sod., 2014). Za večjo

strupenost ND CuO nad MD CuO je verjetno odgovorna njihova majhnost in posledično povečana površina, ki je na voljo za interakcije s površinami rastlin, kar so predvideli v mnogih študij strupenosti ND (Aslani in sod., 2014). Izpostavljene rastline ND Cu in CuO so tudi spremenile sposobnosti za privzem in prenos nekaterih mineralov, kar so že predhodno dokazali (Trujillo-Reyes in sod., 2014). Lahko potrdimo zadnjo, šesto hipotezo, da so fiziološki odziv rastlin navadne in tatarske ajde, vsebnost sekundarnih metabolitov in privzem Cu pogojeni z obliko bakrove spojine in njeno koncentracijo.

## SKLEPI

Preučili smo sestavo glivnih združb semen navadne in tatarske ajde tekom skladiščenja in ugotovili, da se pogostost kolonizacije semen s časom skladiščenja zmanjšuje. Populacije gliv v teh semenih so bile relativno stabilne z značilnim vzorcem spremembe v pogostosti rodov *Epicoccum* sp., *Botrytis* sp. in *Alternaria* sp.

Omenjene spremembe smo povezali s preučevanjem neposrednih in posrednih interakcij med glivami in ugotovili, da ima *A. alternata* močan inhibitorni učinek na rast gliv *B. cinerea*, ki predstavlja najpogostejšega in najmočnejšega tekmovalca za zasedbo ekološke niše.

Vpliv gliv na kalitev semen in razvoj kalic ajde smo povezali s sposobnostjo in intenzivnostjo sinteze določenih izvenceličnih encimov gliv, natančneje s sintezo amilaze, celulaze in polifenol oksidaze. Ugotovili smo, da sposobnost sinteze določenih encimov odraža življenjski slog glive, saj lahko vse glive sposobne izločanja polifenol oksidaze uvrstimo v skupino nekrotrofnih gliv in nobena izmed gliv brez te oblike preživetja ni pokazala sposobnosti sinteze polifenol oksidaze. Vsebnost fenolov v kalicah, ki so bile izpostavljene glivnim izolatom, smo povezali s hitrostjo rasti gliv in koncentracije taninov s celulazno aktivnostjo gliv, kar pomeni, da je fizični vdor glive skozi tkivo gostitelja verjetno spodbuda za aktivacijo rastlinskega obrambnega sistema.

Ob izpostavitvi gliv različnim bakrovim spojinam smo ugotovili, da se glive odzivajo različno in imajo razvite določene razstrupljevalne mehanizme. Glivni izolat *B. cinerea* je bil sposoben razgradnje in biotransformacije mikrodelcev in nanodelcev CuO ter nanodelcev Cu, in sicer je na novo sintetiziral spojino Cu-oksalat. Preučili smo mehanizem strupenosti Cu soli, mikrodelcev in nanodelcev CuO in nanodelcev Cu, ki vključuje stopnjo oksidativnega stresa, sintezo zunajceličnih encimov, sideroforov in organskih kislin, saj je razumevanje njihovega antimikrobnega delovanja eden izmed ključnih izzivov pri ocenjevanju njihovega vpliva na okolje.

V naši raziskavi smo odpornost izolata *B. cinerea* povezali z njegovo sintezo oksalne kisline in s tem pokazali, da so fungicidi, ki temeljijo na mikrodelcih ali nanodelcih CuO neprimerni za zatiranje *B. cinerea*, kot verjetno tudi ostalih gliv s sposobnostjo sinteze oksalne kisline v visokih koncentracijah.

V delu raziskave preučevanja interakcij med mikrodelci in nanodelci CuO ter Cu soljo s semeni, kalicami in rastlinami navadne in tatarske ajde smo ugotovili, da sta vrsta ajda in oblika bakrove spojine najpomembnejša dejavnika za izmerjene rastne parametre kalic. Izkazalo se je, da je dolžina korenice kalic najbolj občutljivejši in najboljši pokazatelj strupenosti bakrovih spojin. Efektivna koncentracija je bila najvišja pri nanodelcih CuO, katerim je sledila Cu sol in najmanj strupeni mikrodelci CuO.

V primeru hidroponskega gojenja rastlin, smo ugotovili, da se tatarska in navadna ajda med seboj razlikujeta že v osnovi, npr. v vsebnosti sekundarnih metabolitov in mineralov ter njihovi razporeditvi.

Tretiranje rastlin navadne in tatarske ajde z različnimi bakrovimi spojinami je spremenilo privzem in razporeditev elementov v koreninah in poganjkih, na kar imajo pomemben vpliv predvsem oblika in koncentracija bakrove spojine. Privzem Cu v poganjke je koreliral z vsebnostjo malondialdehida, produkta lipidne peroksidacije membran in pokazatelja stopnje oksidativnega stresa.

Tudi na primeru odraslih rastlin navadne in tatarske smo dokazali, da je tretma nanodelcev CuO najvišjih koncentracij najbolj strupen in se najbolj razlikuje od ostalih tretmajev. Z razporeditvijo elementov na prečnem prerezu tretiranih listov z metodo  $\mu$ -PIXE smo opazili, da se Cu v primeru tretiranja z nanodelci CuO v največji meri nahaja v žili, s čimer bi lahko bila ogrožena prehrabna varnost človeka.



## 6 POVZETEK

### 6.1 POVZETEK

V raziskavi smo želeli identificirati glivne populacije v povezavi s semeni navadne (*Fagopyrum esculentum*) in tatarske ajde (*F. tataricum*), saj le-te vplivajo na več parametrov kakovosti semen v vseh fazah njihove pridelave, od razvoja semen do skladiščenja po žetvi in kalitvi. Naš cilj je bil opisati glivno raznolikost in dinamiko glivnih skupnosti semen obeh vrst ajd, od žetve do enega leta skladiščenja. Pričakovali smo, da se bodo tekom skladiščenja glivne populacije spremenile. Ugotovili smo, da so glivne populacije v semenih relativno stabilne in sestavljene predvsem iz gliv, ki seme naselijo že na polju. Pojavnost gliv je najverjetneje določena z neposrednimi interakcijami med glivnimi vrstami, kot tudi njihovo sintezo hlapnih organskih spojin. Najvidnejše antagonistične interakcije smo opazili med najpogosteje izoliranimi glivnima vrstama, *Alternaria alternata* na *Botrytis cinerea*, s čimer smo lahko tudi razložili prevlado glive *A. alternata* po enem letu skladiščenja. Z opisom sposobnosti in intenzivnosti sinteze izbranih zunajceličnih encimov smo pokazali, da le-ta odraža življenski slog glive, saj so vse nekrotrofne glive imele sposobnost sinteze polifenol oksidaze. Škodljive učinke gliv na kalitev in razvoj kalic smo povezali z zunajcelično encimsko aktivnostjo gliv, zlasti z amilazo, celulazo in polifenol oksidazo. Koncentracije fenolov v kalicah ajde smo z multivariatno regresijsko analizo povezali s stopnjo rasti gliv in tanine z intenzivnostjo glivne celulazne aktivnosti, kar nakazuje, da je fizično prodiranje gliv preko tkiva gostitelja verjetno spodbuda za aktiviranje obrambnih reakcij v kalicah.

Vpliv Cu na različne mikroorganizme je zaradi njegovih močnih protibakterijskih in protiglivnih lastnosti poznan že stoletja. Zaradi vnosa bakrovih spojin v agrikulturne ekosisteme, je pričakovati, da so se in se bodo interakcije organizmov z njimi povečale. Kar se danes pojavljajo tehnologije, ki razvijajo in izdelujejo nove protimikrobne spojine, kot so CuO in Cu nanodelci ali izdelki z njuno prisotnostjo, je bistvenega pomena poznavanje lastnosti teh spojin in njihovih interakcij z živimi bitji.

Najprej smo različnim bakrovim spojinam (Cu sol, CuO mikrodenci, CuO nanodelci in Cu nanodelci) izpostavili dve rastlinski patogeni glivi *Alternaria alternata* in *Botrytis cinerea*, kot možna ciljna organizma novih protimikrobnih preparatov v bližnji prihodnosti. Poskusi po pokazali, da *B. cinerea* poseduje določene mehanizme za toleranco na različne bakrove delce. Z različnimi modernimi tehnološkimi pristopi (LA-ICP-MS, XRF) smo določili porazdeljevanje Cu po micelijju, tako na trdnem, kot na tekočem gojišču. Testiranim glivam smo določili sintezo zunajceličnih encimov, sideroforov in organskih kislin z metodo HPLC. Toleranco izolata *B. cinerea* na Cu in biotransformacijo bakrovih delcev smo povezali predvsem z zunajcelično sintezo oksalne kisline. S sinhrotronsko tehniko rentgenske absorpcijske spektroskopije smo določili vezavno obliko Cu v novonastalem glivnem produktu in potrdili, da je ta spojina Cu-oksalat. Nakazali smo na obstoj povezave

med *B. cinerea* in Cu, ki pa jo je treba dodatno raziskati, če želimo razkriti njen izvor in pomen.

Da bi sklenili krog interakcij nas je nazadnje zanimala še interakcija med mikrodelci in nanodelci CuO ter Cu soljo s semeni in rastlinami navadne in tatarske ajde. Tako smo s kvalitvenim testom preučili vpliv izbranih bakrovih spojin na kalitev semen, razvoj kalic ter vsebnost sekundarnih metabolitov v kalicah (fenole, flavonoide in tanine). Podatke smo analizirali s pomočjo klastrske analize, linearne diskriminantne analize, določevanja učinkovitih koncentracij testiranih spojin, analizami korelacij in faktorjske ANOVE. Prišli smo do zaključka, da sta vrsta ajde in oblika Cu v uporabljenih spojinah pri kalicah najvplivnejša dejavnika za izmerjene rastne parametre. Izkazalo se je, da je dolžina koreničice kalic najbolj občutljivejši in najboljši pokazatelj strupenosti bakrovih spojin. Pri določevanju učinkovitih koncentracij je prišlo do precejšnjih razlik med spojinami, z najvišjimi vrednostmi pri nanodelcih CuO, katerim sledi Cu sol in najmanj strupeni mikrodelci CuO. V primeru hidroponskega gojenja rastlin, smo po enomesečnem tretiranju rastlin z različnimi koncentracijami mikrodelcev in nanodelcev CuO ter Cu soljo, na svežem rastlinskem materialu izmerili stopnjo lipidne peroksidacije in s pomočjo kriofiksacije narezali mikronske rezine korenin in listov za meritve prostorske porazdelitve elementov. Rastni odziv rastlin smo ocenili na podlagi biomase, analize fizioloških parametrov rastline (vsebnost klorofilov, fenolov, flavonoidov in taninov) in koncentracij ter preračunanih vsebnosti elementov v različnih delih rastline. Pokazali smo, da se tatarska in navadna ajda med seboj razlikujeta že v osnovi, npr. v vsebnosti sekundarnih metabolitov in mineralov ter njihovi razporeditvi. Tretiranje rastlin navadne in tatarske ajde z različnimi bakrovimi spojinami je spremenilo privzem in razporeditev elementov v koreninah in poganjkih, na kar imajo pomemben vpliv predvsem oblika in koncentracija bakrove spojine. Na podlagi linearne diskriminantne analize smo ugotovili, da se tretmaji z nanodelci CuO najbolj razlikujejo od kontrole. Privzem Cu v poganjke je koreliral z vsebnostjo malondialdehida, produkta lipidne peroksidacije membran in pokazatelja stopnje oksidativnega stresa. Z razporeditvijo elementov na prečnem prerezu tretiranih listov z metodo  $\mu$ -PIXE smo opazili, da se Cu v primeru nanodelcev CuO v največji meri nahaja v žili, s čimer bi lahko bila ogrožena prehrabna varnost človeka.

## 6.2 SUMMARY

In this study our aim was to identify fungal communities associated with seeds of common (*Fagopyrum esculentum*) and Tartary buckwheat (*F. tataricum*), since those interactions affect multiple parameters of seed quality in all stages of productions, from seed development to seed storage after harvest and germination. Therefore we described fungal diversity and dynamics of fungal communities from both common and Tartary buckwheat seeds from harvest to 1 year of storage. We expected that fungal populations will change during the storage. We found out that fungal communities in buckwheat seeds are relatively stable and are comprised from fungi that invade the seeds already on the field. Fungal incidence is most likely determined by direct and indirect fungal interactions. The most significant antagonistic interactions were present between the most often isolated fungi, *Alternaria alternata* on *Botrytis cinerea*, which can help to explain the dominance of *A. alternata* after 1 year of storage. With determination of extracellular enzymes synthesis and activity we can predict fungal lifestyle, in example all necrotrophic fungi were capable of polyphenol oxidase synthesis. Furthermore, the harmful effects of fungi on seed germination and seedling development was connected with the extracellular enzymes activities, in particularly to amylase, cellulase and polyphenol oxidase. With multivariate regression analysis, the phenols concentrations in buckwheat seedlings were linked to fungal growth rate and tannins concentrations to intensity of cellulase activity, which indicates that physical penetration of fungi trough host tissue stimulate the defence reactions in plants.

Effect of Cu on a variety of microorganisms has been known for centuries, because of its strong antibacterial and antifungal properties. The realistic expectations are that interactions of organisms with different copper compounds have already and will increase, due to the introduction of Cu compounds in agricultural ecosystem. Today newly emerging technologies try to develop and produce new antimicrobial compounds, such as CuO and Cu nanoparticles or products with their involvement, so it is essential to gain the knowledge on the properties of these compounds and their interactions with different living organisms.

In our study, first two plant pathogenic fungi as potential target organisms for new antimicrobial preparations in the near future, *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea* were exposed to different Cu compounds (Cu salt, microparticles CuO, nanoparticles CuO and nanoparticles Cu). In our experiments, *B. cinerea* isolate showed the possession of the tolerance and biotransformation mechanisms for different Cu particles. With various modern techniques (LA-ICP-MS, XRF), the distribution of Cu across the mycelium, on solid as well as from liquid medium, was determined. The synthesis of extracellular enzymes, siderophores and organic acids by HPLC was analysed in order to reveal the tolerance mechanism of isolate *B. cinerea*. The proposed mechanism is the extracellular synthesis of oxalic acid, since with the synchrotron X-ray absorption spectroscopy we

investigated the binding form of Cu in the newly-formed fungal product and confirmed that final biotransformed form of Cu compound is Cu-oxalate. We have indicated a strong link between *B. cinerea* and Cu, but it needs to be further explored to reveal the origin and importance of these link.

To conclude the web of our research, we were interested in studying the interactions between the microparticles and nanoparticles CuO and Cu salt with the seeds and plants of common and Tartary buckwheat. Thus, germination test was carried out with the aim to reveal the impact of selected compounds on seed germination, the development of seedlings and content of secondary metabolites in seedlings (phenols, flavonoids and tannins). Data were analysed using cluster analysis, linear discriminant analysis, estimating the effective concentration of tested compounds, correlation analysis and factorial ANOVA. The conclusions are that the buckwheat species with Cu form were the most influential factor for measured growth parameters. The root length of seedlings was the most sensitive plant parameter measured and the best indicator of the toxicity of copper compounds. In determining the effective concentrations, there was a significant difference between the tested compounds. The highest values were for nanoparticles CuO, followed by Cu salt, and less toxic microparticles CuO. In the case of hydroponic cultivation after one month treatment of plants with different concentrations of the microparticles and nanoparticles CuO and Cu salt, fresh plant material was used to measure the degree of lipid peroxidation and for crio-fixation to cut the few micron thick samples for the measurements of the spatial distribution of elements. Growth response of plants was estimated from the biomass, the analysis of the physiological parameters of plants (chlorophylls, phenols, flavonoids and tannin content) and concentrations of elements in different parts of plants. It was seen that common and Tartary buckwheat differ fundamentally, in example content of secondary metabolites, content of minerals and their distribution. Treating the plants with different Cu compounds resulted in altered uptake of minerals as well as their distribution in roots and shoots, which were influenced by form and concentration of used Cu compound. Based on the linear discrimination analysis we showed that nanoparticles CuO treatments were the most different from the control. Cu uptake in shoots was correlated with the malondialdehyde and consequently with the degree of the oxidative stress. With the  $\mu$ -PIXE measured distribution of elements in the cross-section of the treated leaves, we observed that the Cu in the case of nanoparticles CuO treatment is mainly located in the vessel, which may be harmful and may compromise the human food safety.

## 7 VIRI

- Adhikari T., Kundu S., Biswas A.K., Tarafdar J.C., Rao A.S. 2012. Effect of copper oxide nano particle on seed germination of selected crops. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2: 815–823
- Adhikari T., Kundu S., Rao A.S. 2015. Zinc delivery to plants through seed coating with nano zinc oxide particles. *Journal of Plant Nutrition*, 39, 1: 136–146
- Adriano C.D. 2001. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. 2nd ed. New York, Springer: 879 str.
- Adrees M., Ali S., Rizwan M., Ibrahim M., Abbas F., Farid M., Zia-ur-Rehman M., Irshad M.K., Bharwana S.A. 2015. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 11: 8148–8162
- Al Aboound M.A., Alawlaqi M.M. 2011. Biouptake of copper and their impact on fungal fatty acids. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5, 11: 283–290
- Alaoui-Sossé B., Genet P., Vinit-dunand F., Toussaint M.L., Epron D., Badot P.M. 2004. Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. *Plant Science*, 166, 5: 1213–1218
- Al-Askar A.A., Ghoneem K.M., Rashad Y.M., Abdulkhair W.M., Hafez E.E., Shabana Y.M., Baka Z.A. 2014. Occurrence and distribution of tomato seed-borne mycoflora in Saudi Arabia and its correlation with the climatic variables. *Microbial Biotechnology*, 7, 6: 556–569
- Alexander D.B., Zuberer D. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12, 1: 39–45
- Ali N.A., Bernal M.P., Ater M. 2002. Tolerance and bioaccumulation of copper in *Phragmites australis* and *Zea mays*. *Plant and Soil*, 239, 1: 103–111
- Altomani Neves Dias M., Cicero S.M., Dionísia A., Coelho L. 2015. Uptake of seed-applied copper by maize and the effects on seed vigor. *Bragantia*, 74, 3: 241–246
- Aly A.A., Mohamed A.A. 2012. The impact of copper ion on growth, thiol compounds and lipid peroxidation in two maize cultivars (*Zea mays* L.) grown in vitro. *Australian Journal of Crop Science*, 6, 3: 541–549
- Anand P., Isar J., Saran S., Saxena R.K. 2006. Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. *Bioresource Technology*, 97, 8: 1018–1025
- Anand T., Bhaskaran R., Raguchander T., Karthikeyan G., Rajesh M., Senthilraja G. 2008. Production of cell wall degrading enzymes and toxins by *Colletotrichum capsici* and *Alternaria alternata* causing fruit rot of chillies. *Journal of Plant Protection Research*, 48, 4: 437–451
- Ando Y., Nagata S., Yanagisawa S., Yoneyama T. 2013. Copper in xylem and phloem saps from rice (*Oryza sativa*): the effect of moderate copper concentrations in the growth medium on the accumulation of five essential metals and a speciation analysis of copper-containing compounds. *Functional Plant Biology*, 40, 1: 89–100
- Andreazza R., Pieniz S., Okeke B.C., Camargo F.A.O. 2011. Evaluation of copper resistant bacteria from vineyard soils and mining waste for copper biosorption. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 1: 66–74
- Anjum N.A., Gill S.S., Duarte A.C., Pereira E., Ahmad I. 2013. Silver nanoparticles in soil–plant systems. *Journal of Nanoparticle Research*, 15: 1896–1922
- Applerot B.G., Lipovsky A., Dror R., Perkash N., Nitzan Y., Lubart R., Gedanken A. 2009. Enhanced antibacterial activity of nanocrystalline ZnO due to increased ROS-mediated cell injury. *Advanced Functional Materials*, 19, 6: 842–852
- Arhiv - opazovani in merjeni meteorološki podatki po Sloveniji. 2015. Agencija Republike Slovenije za Okolje. <http://meteo.arso.gov.si/met/sl/archive/> (12. maj 2015)

- Aruoja V., Dubourguier H.-C., Kasemets K., Kahru A. 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the Total Environment*, 407, 4: 1461–1468
- Aslani F., Bagheri S., Julkapli N.M., Juraimi A.S., Sadat F., Hashemi G., Baghdadi A. 2014. Effects of engineered nanomaterials on plants growth: an overview. *The Scientific World Journal*, 2014: 1–28
- Atha D.H., Wang H., Petersen E.J., Cleveland D., Holbrook R.D., Jaruga P., Dizdaroglu M., Xing B., Nelson B. 2012. Copper oxide nanoparticle mediated DNA damage in terrestrial plant models. *Environmental Science & Technology*, 46, 3: 1819–1827
- Azam A., Ahmed A.S., Oves M., Khan M.S., Memic A. 2012. Size-dependent antimicrobial properties of CuO nanoparticles against Gram-positive and -negative bacterial strains. *International Journal of Nanomedicine*, 7: 3527–3535
- Azeez M.O., Adesanwo O.O., Adepetu J.A. 2015. Effect of Copper (Cu) application on soil available nutrients and uptake. *African Journal of Agricultural Research*. 10, 5: 359–64
- Azooz M.M., Abou-Elhamd M.F., Al-Fredan M.A. 2012. Biphasic effect of copper on growth, proline, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of wheat (*Triticum aestivum* cv. Hasaawi) at early growing stage. *Australian Journal of Crop Science*, 6, 4: 688–694
- Baligar V.C., Fageria N.K., He Z.L. 2001. Nutrient use efficiency in plants. *Communication in Soil Science and Plant Analysis*, 32, 7&8: 921–950
- Ball A.M., Ashby A.M., Daniels M.J., Ingram D.S., Johnstone K. 1991. Evidence for the requirement of extracellular protease in the pathogenic interaction of *Pyrenopeziza brassicae* with oilseed rape. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 38, 2: 147–161
- Bennett R.N., Wallsgrove R.M. 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*, 127, 4: 617–633
- Benoit R.E., Starkey R.L. 1968. Inhibition of decomposition of cellulose and some other carbohydrates by tannin. *Soil Science*, 105, 5: 291–296
- Bernhardt E.S., Colman B.P., Hochella M.F., Bradley J.C., Nisbet R.M., Richardson C.J., Yin L. 2010. An ecological perspective on nanomaterial impacts in the environment. *Journal of Environmental Quality*, 39, 6: 1954–1965
- Bishnoi N.R., Garima A. 2005. Fungus - an alternative for bioremediation of heavy metal containing wastewater: a review. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 64, 2: 93–100
- Blinova I., Ivask A., Heinlaan M., Mortimer M., Kahru A. 2010. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. *Environmental Pollution*, 158, 1: 41–47
- Bodarenko O., Juganson K., Ivask A., Kasemets K., Mortimer M., Kahru A. 2013. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. *Archives of Toxicology*, 87, 7: 1181–1200
- Boddy L., Rayner A.D.M. 1983. Ecological roles of basidiomycetes forming decay communities in attached oak branches. *New Phytologist*, 93, 1: 77–88
- Bonafaccia G., Fabjan N. 2003. Nutritional comparison of tartary buckwheat with common buckwheat and minor cereals. *Zbornik Biotehniške Fakultete Univerze v Ljubljani Kmetijstvo*, 81, 2: 349–355
- 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
- Broadley M., Brown P., Cakmak I., Rengel Z., Zhao F. 2012. Function of nutrients: micronutrients. V: *Marchner's mineral nutrition of higher plants*, Maschner P. (eds.), 3 ed. London, Elsevier: 191–248
- Broggi L.E., González H.H.L., Resnik S.L., Pacin A. 2007. *Alternaria alternata* prevalence in cereal grains and soybean seeds from Entre Ríos, Argentina. *Revista iberoamericana de micología*, 24, 1: 47–51

- Brundrett M.C. 2006. Understanding the roles of multifunctional mycorrhizal and endophytic fungi. V: Microbial Root Endophytes, Schulz B.J.E., Boyle C.J.C., Sieber T.N.S. (eds), 1st ed. Berlin, Springer: 281–298
- Buffet P.E., Fossi O., Pan J.F., Berhanu D., Herrenknecht C., Poirier L., Amiard-Triquet C., Amiard J.C., Bérard J.B., Risso C., Guibbolini M., Roméo M., Reip P., Valsami-Jones E., Mouneyrac C. 2011. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. *Chemosphere*, 84, 1: 166–174
- Burch M., Levetin E. 2002. Effects of meteorological conditions on spore plumes. *International Journal of Biometeorology*, 46, 3: 107–117
- Burgess D.R., Keane P.J. 1997. Biological control of *Botrytis cinerea* on chickpea seed with *Trichoderma* spp. and *Gliocladium roseum*: indigenous versus non-indigenous isolates. *Plant Pathology*, 46, 6: 910–918
- Cairney J.W.G., Burke R.M. 1998. Extracellular enzyme activities of the ericoid mycorrhizal endophyte *Hymenoscyphus ericae* (Read) Korf & Kernan: their likely roles in decomposition of dead plant tissue in soil. *Plant and Soil*, 205, 2: 181–192
- Cakmak I. 2002. Plant nutrition research: priorities to meet human needs for food in sustainable ways. *Plant and Soil*, 1, 247: 3–24
- Campbell C.G. 1997. Buckwheat. *Fagopyrum esculentum* Moench. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome. 1st ed. Manitoba, Kade Research Ltd.: 93 str.
- Carnes C.L., Klabunde K.J. 2003. The catalytic methanol synthesis over nanoparticle metal oxide catalysts. *Journal of Molecular Catalysis A*, 194, 1-2: 227–236
- Carroll G., Petrini O. 1983. Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. *Mycologia*, 75, 1: 53–63
- Casazza A.A., Ferrari P.F., Aliakbarian B., Converti A., Perego P. 2015. Effect of UV radiation or titanium dioxide on polyphenol and lipid contents of *Arthrospira (Spirulina) platensis*. *Algal Research*, 12: 308–315
- Cervantes C., Gutierrez-Corona F. 1994. Cooper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology reviews*, 14, 2: 121–137
- Cestone B., Vogel-Mikuš K., Quartacci M.F., Rascio N., Pograc P., Pelicon P., Vavpetič P., Grlj N., Jeromel L., Kump P., Nečemer M., Regvar M., Navari-Izzo F. 2012. Use of micro-PIXE to determine spatial distributions of copper in *Brassica carinata* plants exposed to CuSO<sub>4</sub> or CuEDDS. *Science of the Total Environment*, 427-428: 339–346
- Chang M.H., Liu H.S., Tai C.Y. 2011. Preparation of copper oxide nanoparticles and its application in nanofluid. *Powder Technology*, 207, 1-3: 378–386
- Chanway C.P. 1996. Endophytes: they're not just fungi! *Canadian Journal of Botany*, 74, 3: 321–322
- Chatterjee J., Chatterjee C. 2000. Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. *Environmental Pollution*, 109, 1: 69–74
- Chen L.H., Yang S.L., Chung K.R. 2014. Resistance to oxidative stress via regulating siderophore-mediated iron acquisition by the citrus fungal pathogen *Alternaria alternata*. *Microbiology*, 160, 5: 970–979
- Chen Z.Y., Jiao R., Ma K.Y. 2008. Cholesterol-lowering nutraceuticals and functional foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 19: 8761–8773
- Cherrad S., Girard V., Dieryckx C., Gonçalves I.R., Dupuy J.W., Bonneau M., Rascle C., Job C., Job D., Vacher S., Poussereau N. 2012. Proteomic analysis of proteins secreted by *Botrytis cinerea* in response to heavy metal toxicity. *Metallomics*, 4, 8: 835–846

- Chi Z., Wang F., Chi Z., Yue L., Liu G., Zhang T. 2009. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 5: 793–804
- Choquer M., Fournier E., Kunz C., Levis C., Pradier J.M., Simon A., Viaud M. 2007. *Botrytis cinerea* virulence factors: New insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiology Letters*, 277, 1: 1–10
- Cioffi N., Torsi L., Ditaranto N., Tantillo G., Ghibelli L., Sabbatini L., Bleve-Zacheo T., Alessio M.D., Zambonin P.G., Traversa E. 2005. Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. *Chemistry of Materials*, 17, 21: 5255–2562
- Civardi C., Schwarze F.W.M.R., Wick P. 2015. Micronized copper wood preservatives: an efficiency and potential health risk assessment for copper-based nanoparticles. *Environmental Pollution*, 200: 126–132
- Clausen C.A., Green III F., Woodward B.M., Evans J.W., Degroot R.C. 2000. Correlation between oxalic acid production and copper tolerance in *Wolfiporia cocos*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46, 1: 69–76
- Cobbett C., Goldsbrough P. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 159–182
- Corcuff R., Mercier J., Tweddell R., Arul J. 2011. Effect of water activity on the production of volatile organic compounds by *Muscodor albus* and their effect on three pathogens in stored potato. *Fungal Biology*, 115, 3: 220–227
- Cotoras M., Silva E. 2005. Differences in the initial events of infection of *Botrytis cinerea* strains isolated from tomato and grape. *Mycologia*, 97, 2: 485–492
- Da Costa M.V.J., Sharma P.K. 2016. Effect of copper oxide nanoparticles on growth, morphology, photosynthesis, and antioxidant response in *Oryza sativa*. *Photosynthetica*, 54, 1: 110–119
- Dat J., Vandenamee S., Vranova E., Van Montagu M., Inze D., Van Breusegem F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57, 5: 779–795
- de Fávoro L.C.L., de Melo F.L., Aguilar-Vildoso C.I., Araújo W.L. 2011. Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species. *PLoS ONE*, 6, 8, e14828: 18 str.
- de Fávoro L.C.L., de Sebastianes F.L.S., Araújo W.L. 2012. *Epicoccum nigrum* P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. *PLoS ONE*, 7, 6, e36826: 10 str.
- Debeljak, van Elteren J.T., Vogel-Mikuš K. 2013. Development of a 2D laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry mapping procedure for mercury in maize (*Zea mays* L.) root cross-sections. *Analytica Chimica Acta*, 787: 155–162
- Delgado K., Quijada R., Palma R., Palza H. 2011. Polypropylene with embedded copper metal or copper oxide nanoparticles as a novel plastic antimicrobial agent. *Letters in Applied Microbiology*, 53, 1: 50–54
- Dharsana U.S., Sai Varsha M.K.N., Ahmed K.B.A., Veerappan A., Thiagarajan R. 2015. Sulfidation modulates the toxicity of biogenic copper nanoparticles. *Royal Society of Chemistry Advances*, 5: 30248–30259
- Dimkpa C.O., Latta D.E., McLean J.E., Britt D.W., Boyanov M.I., Anderson A.J. 2013. Fate of CuO and ZnO nano- and microparticles in the plant environment. *Environmental Science & Technology*, 47, 9: 4734–4742
- Dimkpa C.O., Mclean J.E., Britt D.W., Anderson A.J. 2015. Nano-CuO and interaction with nano-ZnO or soil bacterium provide evidence for the interference of nanoparticles in metal nutrition of plants. *Ecotoxicology*, 24, 1: 119–129



- Dimkpa C.O., Mclean J.E., Britt D.W., Anderson A.J. 2012. CuO and ZnO nanoparticles differently affect the secretion of fluorescent siderophores in the beneficial root colonizer, *Pseudomonas chlororaphis* O6. *Nanotoxicology*, 6, 6: 635–642
- Dimkpa C.O., McLean J.E., Latta D.E., Manangón E., Britt D.W., Johnson W.P., Boyanov M.I., Anderson A.J. 2012. CuO and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. *Journal of Nanoparticle Research*, 14: 1125–1141
- Dimkpa C.O., Merten D., Svatoš A., Büchel G., Kothe E. 2009. Metal-induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores. *Soil Biology & Biochemistry*, 41, 1: 154–162
- Ding X., Meneses M.B., Albukhari S.M., Richter D.L., Matuana L.M., Heiden P.A. 2013. Comparing leaching of different copper oxide nanoparticles and ammoniacal copper salt from wood. *Macromolecular Materials and Engineering*, 298, 12: 1335–1343
- Dix N.J. 1979. Inhibition of fungi by gallic acid in relation to growth on leaves and litter. *Transactions of the British Mycological Society*, 73, 2: 329–336
- Djurišić A.B., Leung Y.H., Ng A.M.C., Xu X.Y., Lee P.K.H., Degger N., Wu R.S.S. 2015. Toxicity of metal oxide nanoparticles: mechanisms, characterization, and avoiding experimental artefacts. *Small*, 11, 1: 26–44
- Dobinson K.F., Lecomte N., Lazarovits G. 1997. Production of an extracellular trypsin-like protease by the fungal plant pathogen *Verticillium dahliae*. *Canadian journal of microbiology*, 43, 3: 227–233
- Drobne D. 2007. Nanotoxicology for safe and sustainable nanotechnology. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 8, 4: 471–478
- Dunaevsky Y.E., Beliakova G.A., Belozersky M.A. 2001. Protease inhibitors in buckwheat seeds: possible performance of defense functions. *The proceeding of the 8<sup>th</sup> ISB*: 46–49
- Dutta A., Das D., Grilli M.L., Di Bartolomeo E., Traversa E., Chakravorty D. 2003. Preparation of sol-gel nano-composites containing copper oxide and their gas sensing properties. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 26: 1085–1089
- Dutton M. V, Evans C.S. 1996. Oxalate production by fungi: its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Canadian Journal of Microbiology*, 42, 9: 881–895
- Eapen S., D'Souza S.F. 2005. Prospects of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotechnology Advances*, 23, 2: 97–114
- Elad Y., Williamson B., Tudzynski P., Delen N. 2007. *Botrytis: Biology, pathology and control*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 403 str.
- El-Trass A., ElShamy H., El-Mehasseb I., El-Kemary M. 2012. CuO nanoparticles: Synthesis, characterization, optical properties and interaction with amino acids. *Applied Surface Science*, 258: 2997–3001
- Fabjan N., Rode J., Košir I.J., 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
- Fahmy B., Cormier S.A. 2009. Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *Toxicology in Vitro*, 23, 7: 1365–1371
- FAOSTAT. 2015. Food and agriculture organization of the United nations.  
<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> (31. november 2015)
- Feigl G., Kumar D., Lehotai N., Tugyi N., Molnár Á., Ördög A., Szepesi Á., Gémes K., Laskay G., Erdei L., Kolbert Z. 2013. Ecotoxicology and environmental safety physiological and morphological responses of the root system of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.) and rapeseed (*Brassica napus* L.) to copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 94: 179–189

- Fernández-Calviño D., Soler-Rovira P., Polo A., Diaz-Ravina M., Arias-Estévez M., Plaza C. 2010. Enzyme activities in vineyard soils long-term treated with copper-based fungicides. *Soil Biology & Biochemistry*, 42, 12: 2119–2127
- Flannigan B. 1970. Comparison of seed-borne mycofloras of barley, oats and wheat. *Transactions of the British Mycological Society*, 55, 2: 371–379
- Fomina M.A., Alexander I.J., Colpaert J. V., Gadd G.M. 2005. Solubilization of toxic metal minerals and metal tolerance of mycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry*, 37, 5: 851–866
- Foti R., Abureni K., Tigere A., Gotosa J., Gere J. 2008. The efficacy of different seed priming osmotica on the establishment of maize (*Zea mays* L.) caryopses. *Journal of Arid Environments*, 72, 6: 1127–1130
- Fournier E., Giraud T., Albertini C., Brygoo Y. 2005. Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia*, 97, 6: 1251–1267
- Fujimori Y., Sato T., Hayata T., Nagao T., Nakayama M., Nakayama T., Sugamata R., Suzuki K. 2012. Novel antiviral characteristics of nanosized copper (I) iodide particles showing inactivation activity against 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 4: 951–955
- Gabbay J., Borkow G., Mishal J., Magen E., Zatcoff R., Shemer-Avni Y. 2006. Copper oxide impregnated textiles with potent biocidal activities. *Journal of industrial Textiles*, 35, 4: 323–335
- Gadd G.M. 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist*. 124, 47: 25–60
- Gajewicz A., Schaeublin N., Rasulev B., Hussain S., Leszczynska D., Puzyn T., Leszczynski J. 2015. Towards understanding mechanisms governing cytotoxicity of metal oxides nanoparticles: hints from nano-QSAR studies. *Nanotoxicology*, 9, 3: 313–325
- Gajewska E., Sklodowska M. 2010. Differential effect of equal copper, cadmium and nickel concentration on biochemical reactions in wheat seedlings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 5: 996–1003
- Galindo T.P.S., Pereira R., Freitas A.C., Santos-Rocha T.A.P., Rasteiro M.G., Antunes F., Rodriguez D., Soares A.M.V.M., Goncalves F., Duarte A.C., Lopes I. 2013. Toxicity of organic and inorganic nanoparticles to four species of white-rot fungi. *Science of the Total Environment*, 458-460: 290–297
- Gang A., Vyas A., Vyas H. 2013. Toxic effects of heavy metals on germination and seedling growth of wheat. *Journal of Environmental Research And Development*, 8, 2: 206–213
- Ganley R.J., Newcombe G. 2006. Fungal endophytes in seeds and needles of *Pinus monticola*. *Mycological Research*, 110, 3: 318–327
- Gao F.K., Dai C.C., Liu X.Z. 2010. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research*, 4, 13: 1346–1351
- Gao Y., Luo Z., He N., Wang M.K. 2013. Metallic nanoparticle production and consumption in China between 2000 and 2010 and associative aquatic environmental risk assessment. *Journal of Nanoparticle Research*, 15: 1681–1689
- Gattinoni C., Michaelides A. 2015. Atomistic details of oxide surfaces and surface oxidation: the example of copper and its oxides. *Surface Science Reports*, 70, 3: 424–447
- Gerber L.C., Moser N., Luechinger N.A., Stark W.J., Grass R.N. 2012. Phosphate starvation as an antimicrobial strategy: the controllable toxicity of lanthanum oxide nanoparticles. *Chemical Communications*, 48, 32: 3869–3871
- Ghosh S., Mashayekhi H., Pan B., Bhowmik P., Xing B. 2008. Colloidal behavior of aluminum oxide nanoparticles as affected by pH and natural organic matter. *Langmuir*, 24, 21: 12385–12391

- Giraud T., Fortini D., Levis C., Leroux P., Brygoo Y. 1997. RFLP markers show genetic recombination (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. *Molecular Biology and Evolution*, 14, 11: 1177–1185
- Gogniat G., Thyssen M., Denis M., Pulgarin C., Dukan S. 2006. The bactericidal effect of TiO<sub>2</sub> photocatalysis involves adsorption onto catalyst and the loss of membrane integrity. *FEMS Microbiology Letters*, 258, 1: 18–24
- Gogos A., Knauer K., Bucheli T.D. 2012. Nanomaterials in plant protection and fertilization: current state, foreseen applications, and research priorities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 39: 9781–9792
- Graan T., Ort D.R. 1984. Quantitation of the rapid electron donors to P700, the functional plastoquinone pool, and the ratio of the photosystems in spinach chloroplasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 259, 22: 14003–14010
- Grass G., Thakali K., Klebba P.E., Thieme D., Muller A., Wildner F., Rensing C. 2004. Linkage between catecholate siderophores and the multicopper oxidase CueO in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 186, 17: 5826–5833
- Grube M., Schmid F., Berg G. 2011. Black fungi and associated bacterial communities in the phyllosphere of grapevine. *Fungal biology*, 115, 10: 978–986
- Guiraud P., Steiman R., Seigle-Murandi F., Benoit-Guyod J.L. 1995. Comparison of the toxicity of various lignin-related phenolic compounds toward selected fungi perfecti and fungi imperfecti. *Toxicology and environmental safety*, 32, 1: 29–33
- Gunawan C., Teoh W.Y., Marquis C.P., Amal R. 2011. Cytotoxic origin of copper(II) oxide nanoparticles: comparative studies with micron-sized particles, leachate, and metal salts. *ACS Nano*, 5, 9: 7214–7225
- Gunawan C., Teoh W.Y., Marquis C.P., Amal R. 2013. Antimicrobial resistance: induced adaptation of *Bacillus* sp. to antimicrobial nanosilver. *Small*, 9, 21: 3554–3560
- Guo W.J., Meetam M., Goldsbrough P.B. 2008. Examining the specific contributions of individual *Arabidopsis* metallothioneins to copper distribution and metal tolerance. *Plant Physiology*, 146, 4: 1697–1706
- Hagels H., Wagenbreth D., Schilcher H. 1995. Phenolic compounds of buckwheat herb and influence of plant and agricultural factors (*Fagopyrum esculentum* Moench and *Fagopyrum tataricum* Gartner). *Current Advances in Buckwheat Research*: 801–809
- Halloin J.M. 1983. Deterioration resistance mechanisms in seeds. *Phytopathology*, 73, 2: 335–339
- Harms H., Schlosser D., Wick L.Y. 2011. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 3: 177–192
- Harper S.H.T., Lynch J.M. 1981. Effects of fungi on barley seed germination. *Microbiology*, 122: 55–60
- Hartikainen E.S., Lankinen P., Rajasärkkä J., Koponen H., Virta M., Hatakka A., Kähkönen M.A. 2012. Impact of copper and zinc on the growth of saprotrophic fungi and the production of extracellular enzymes. *Boreal Environmental Research*, 17, 3-4: 210–218
- Hegedüs A., Erdei S., Horvath G. 2001. Comparative studies of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Science*, 160, 6: 1085–1093
- Hjelmroos M. 1993. Relationship between airborne fungal spore presence and weather variables: *Cladosporium* and *Alternaria*. *Grana*, 32, 1: 40–47
- Hodges D.M., DeLong J.M., Forney C.F., Prange R.K. 1999. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207, 4: 604–611
- Hodgson S., Cates C., Hodgson J., Morley N.J., Sutton B.C., Gange A.C. 2014. Vertical transmission of fungal endophytes is widespread in forbs. *Ecology and Evolution*, 4, 8: 1199–1208

- Hong J., Rico C.M., Adeleye A.S., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. 2015. Toxic effects of copper-based nanoparticles or compounds to lettuce (*Lactuca sativa*) and alfalfa (*Medicago sativa*). *Environmental Science: Processes & Impacts*, 17, 1: 177–185
- Horbowicz M., Dębski H., Wiczowski W., Szawara-Nowak D., Koczkodaj D., Mitrus J., Sytykiewicz H. 2013. The impact of short-term exposure to Pb and Cd on flavonoid composition and seedling growth of common buckwheat cultivars. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22, 6: 1723–1730
- Hou W., Chen X., Song G., Wang Q., Chang C.C. 2007. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 45, 1: 62–69
- Huang Q., Shindo H. 2000. Effects of copper on the activity and kinetics of free and immobilized acid phosphatase. *Soil Biology & Biochemistry*, 32, 13: 1885–1892
- Humar M., Bokan M., Amartej S.A., Šentjurs M., Kalan P., Pohleven F. 2004. Fungal bioremediation of copper, chromium and boron treated wood as studied by electron paramagnetic resonance. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 53, 1: 25–32
- Humar M., Šentjurs M., Amartej S.A., Pohleven F. 2005. Influence of acidification of CCB (Cu/Cr/B) impregnated wood on fungal copper tolerance. *Chemosphere*, 58, 6: 743–749
- Humar M., Pohleven F. 2005. Bakrovi pripravki in zaščita lesa. *Les*, 57, 3: 57–62
- Humar M., Pohleven F., Kalan P., Amartej S. 2002. Translokacija bakra iz zaščitenege lesa, izpostavljenega glivam razkrojevalkam lesa. *Zbornik gozdarstva in lesarstva*, 67: 159–171
- Hunt J.R. 2003. Bioavailability of iron, zinc, and other trace minerals from vegetarian diets. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 3: 633–639
- Hura K., Hura T., Dziurka K., Dziurka M. 2014. Biochemical defense mechanisms induced in winter oilseed rape seedlings with different susceptibility to infection with *Leptosphaeria maculans*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 87: 42–50
- Ikeda S., Yamashita Y. 1994. Buckwheat as a dietary source of zinc, copper and manganese. *Fagopyrum*, 14: 29–34
- Ingle A.P., Duran N., Rai M. 2014. Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 3: 1001–1009
- Ingle A., Gade A., Pierrat S., Sönnichsen C., Rai M. 2008. Mycosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium acuminatum* and its activity against some human pathogenic bacteria. *Current Nanoscience*, 4, 2: 141–144
- Iseri O.D., Korpe D.A., Yurtcu E., Sahin F.I., Haberal M. 2011. Copper-induced oxidative damage, antioxidant response and genotoxicity in *Lycopersicon esculentum* Mill and *Cucumis sativus* L. *Plant Cell Reports*, 30, 9: 1713–1721
- Ito H., Inouhe M., Tohyama H., Joho M. 2007. Effect of copper on acid phosphatase activity in yeast *Yarrowia lipolytica*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 62, 1-2: 70–76
- Ivanova E.M., Kholodova V.P., Kuznetsov V.V. 2010. Biological effects of high copper and zinc concentrations and their interaction in rapeseed plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 57, 6: 806–814
- Jacometti M.A., Wratten S.D., Walter M. 2010. Alternatives to synthetic fungicides for *Botrytis cinerea* management in vineyards. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16, 1: 154–172
- Jellison J., Connolly J., Goodell B., Doyle B., Illman B., Fekete F., Ostrofsky A. 1997. The role of cations in the biodegradation of wood by the brown rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 39, 2-3: 165–179
- Jevdjović R., Maletić R. 2003. Effect of buckwheat seed storage duration on its quality. *Journal of Agricultural Sciences, Belgrade*, 48, 2: 135–141

- Jiang W., Liu D., Liu X. 2001. Effects of copper on root growth, cell division, and nucleolus of *Zea mays*. *Biologia Plantarum*, 44, 1: 105–109
- Joseph E., Cario S., Simon A., Wörle M., Mazzeo R., Junier P., Job D. 2012. Protection of metal artifacts with the formation of metal-oxalates complexes by *Beauveria bassiana*. *Frontiers in Microbiology*, 2: 270–278
- Judet-Correia D., Charpentier C., Bensoussan M., Dantigny P. 2011. Modelling the inhibitory effect of copper sulfate on the growth of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea*. *Letters in Applied Microbiology*, 53, 5: 558–564
- Judy J.D., Unrine J.M., Bertsch P.M. 2011. Evidence for biomagnification of gold nanoparticles within a terrestrial food chain. *Environmental Science & Technology*, 45, 2: 776–781
- Judy J.D., Unrine J.M., Rao W., Bertsch P.M. 2012. Bioaccumulation of gold nanomaterials by *Manduca sexta* through dietary uptake of surface contaminated plant tissue. *Environmental Science & Technology*, 46, 22: 12672–14678
- Junker C., Draeger S., Schulz B. 2012. A fine line-endophytes or pathogens in *Arabidopsis thaliana*. *Fungal Ecology*, 5, 6: 657–662
- Kalinova J., Triska J., Vrchotova N. 2006. Distribution of vitamin E, squalene, epicatechin, and rutin in common buckwheat plants (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 15: 5330–5335
- Kalinova J., Voženilkova B., Moudry J. 2004. Occurrence of *Fusarium* spp and bacteria on surface of buckwheat achenes (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Proceedings of the 9th International Symposium on Buckwheat*: 491–493
- Kalinova J., Vrchotova N. 2009. Level of catechin, myricetin, quercetin and isoquercitrin in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench), changes of their levels during vegetation and their effect on the growth of selected weeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7: 2719–2725
- Kanhed P., Birla S., Gaikwad S., Gade A., Seabra A.B., Rubilar O., Duran N., Rai M. 2015. In vitro antifungal efficacy of copper nanoparticles against selected crop pathogenic fungi. *Materials Letters*, 115: 13–17
- Karamać M. 2007. Fe(II), Cu(II) and Zn(II) chelating activity of buckwheat and buckwheat groats tannin fractions. *Polish Journal of Food and Nutrition Science*, 57, 3: 357–362
- Karami Mehrian S., Heidari R., Rahmani F., Najafi S. 2016. Effect of chemical synthesis silver nanoparticles on germination indices and seedlings growth in seven varieties of *Lycopersicon esculentum* Mill (tomato) plants. *Journal of Cluster Science*, 27, 1: 327–340
- Karlsson H.L., Gustafsson J., Cronholm P., Möller L. 2009. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicology Letters*, 188, 2: 112–118
- Kasemets K., Ivask A., Dubourguier H., Kahru A. 2009. Toxicology in vitro toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology in Vitro*, 23, 6: 1116–1122
- Kaulich B., Gianoncelli A., Beran A., Eichert D., Kreft I., Pongrac P., Regvar M., Vogel-Mikuš K., Kiskinova M. 2009. Low-energy X-ray fluorescence microscopy opening new opportunities for bio-related research. *Journal of the Royal Society, Interface*, 6: 641–647
- Kay J.G., Owen H. 1973. Transmission of *Rhynchosporium secalis* on barley grain. *Transaction British Mycology Society*, 60, 3: 405–411
- Keller A.A., McFerran S., Lazareva A., Suh S. 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research*, 15: 1692–1708
- Keller C., Rizwan M., Dividian J.C., Pokrovsky O.S., Bovet N., Chaurand P., Meunier J.D. 2015. Effect of silicon on wheat seedlings (*Triticum turgidum* L.) grown in hydroponics and exposed to 0 to 30 μM Cu. *Planta*, 241, 4: 847–860

- Khan Z., Guelich G., Phan H., Redman R., Doty S. 2012. Bacterial and yeast endophytes from poplar and willow promote growth in crop plants and grasses. *ISRN Agronomy*, 2012: 1–11
- Kida T., Oka T., Nagano M. 2007. Synthesis and application of stable copper oxide nanoparticle. *Journal of the American Ceramic Society*, 90, 1: 107–110
- Kim S.J., Zaidul I.S.M., Suzuki T., Mukasa Y., Hashimoto N., Takigawa S., Noda T., Matsuura-Endo C., Yamauchi H. 2008. Comparison of phenolic compositions between common and tartary buckwheat (*Fagopyrum*) sprouts. *Food Chemistry*, 110, 4: 814–820
- Kim S., Lee S., Lee I. 2012. Alteration of phytotoxicity and oxidant stress potential by metal oxide nanoparticles in *Cucumis sativus*. *Water, Air & Soil Pollution*, 223, 5: 2799–2806
- 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
- Koh E.I., Henderson J.P. 2015. Copper-binding siderophores at the host-pathogen interface. *The Journal of Biological Chemistry*, 290, 31: 18967–18974
- Koide R.D., Mosse B. 2004. A history of research on arbuscular mycorrhiza. *Mycorrhiza*, 14, 3: 145–163
- Komárek M., Čadkova E., Chrástný V., Bordas F., Bollinger J.C. 2010. Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects. *Environmental International*, 36, 1: 138–151
- Kopittke P.M., Menzies N.W. 2006. Effect of Cu toxicity on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant and Soil*, 279, 1: 287–296
- 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
- Kováčik J., Klejdus B., Hedbavny J., Štork F., Bačkor M. 2009. Comparison of cadmium and copper effect on phenolic metabolism, mineral nutrients and stress-related parameters in *Matricaria chamomilla* plants. *Plant and Soil*, 320: 231–242
- Kranner I., Colville L. 2011. Metals and seeds: biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. *Environmental and Experimental Botany*, 72, 1: 93–105
- Kreft I. 1995. Ajda. Ljubljana, Kmečki glas: 112 str.
- Kreft I., Fabjan N., Yasumoto K. 2006. Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products. *Food Chemistry*, 98, 3: 508–512
- 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
- Kreft S., Štrukelj B., Gaberščik A., Kreft I. 2002. Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method. *Journal of Experimental Botany*, 53, 375: 1801–1804
- Kremer R.J. 1986. Antimicrobial activity of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) seeds. *Weed Science*, 34, 4: 617–622
- Krug H.F., Wick P. 2011. Nanotoxicology: an interdisciplinary challenge. *Angewandte Chemie International Edition*, 50, 6: 1260–1278
- Kumar G.P., Kishore N., Amalraj E.L.D., Ahmed S.K.M.H., Rasul A., Desai S. 2012. Evaluation of fluorescent *Pseudomonas* spp. with single and multiple PGPR traits for plant growth promotion of sorghum in combination with AM fungi. *Plant Growth Regulation*, 67, 2: 133–140
- Kumar R., Mehrotra N.K., Nautiyal B.D., Kumar P., Singh P.K. 2009. Effect of copper on growth, yield and concentration of Fe, Mn, Zn and Cu in wheat plants (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Environmental Biology*, 30, 4: 485–488

- Kumar V., Brainard D.C., Bellinder R.R. 2008. Suppression of powell amaranth (*Amaranthus powellii*), shepherd's-purse (*Capsella bursa-pastoris*), and corn chamomile (*Anthemis arvensis*) by buckwheat residues: role of nitrogen and fungal pathogens. *Weed Science*, 56, 2: 271–280
- Kump P., Nečemer M., Rupnik Z., Pelicon P., Ponikvar D., Vogel-Mikuš K., Regvar M., Pongrac P. 2011. Improvement of the XRF quantification and enhancement of the combined applications by EDXRF and Micro PIXE. V: Integration of nuclear spectrometry methods as a new approach to material research final report of a coordinated research project 2006-2009, Dunaj, International Atomic Energy Agency: 101–110
- Kurowski T.P., Damszel M., Wysocka U. 2012. Fungi colonizing the grain of the spring wheat grown in the conventional and organic systems. *Phytopathologia*, 63: 39–50
- Kwon H.W., Yoon J.H., Kim S.H., Hong S.B., Cheon Y., Ko S.J. 2007. Detection of extracellular enzyme activities in various *Fusarium* spp. *Mycobiology*, 35, 3: 162–165
- Larignon P., Dubos B. 1997. Fungi associated with esca disease in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 2: 147–157
- Lattanzio V., Lattanzio V.M.T., Cardinali A. 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. V: *Phytochemistry: advances in research*, Imperato F. (eds). Kerala, Research Signpost: 23–67
- Lebeda A., Jančová D., Luhová L. 1999. Enzymes in fungal plant pathogenesis. *Phyton - Annales Rei Botanicae*, 39, 3: 51–56
- Lee H.S., Jeon Y.A., Lee Y., Lee S.Y., Kim Y.G. 2013. Comparison of seed viability among 42 species stored in a genebank. *Korean Journal of Crop Science*, 58, 4: 432–438
- Lee J., Shim D., Song W., Hwang I., Lee Y. 2004. Arabidopsis metallothioneins 2a and 3 enhance resistance to cadmium when expressed in *Vicia faba* guard cells. *Plant Molecular Biology*, 54, 6: 805–815
- Lee S., Chung H., Kim S., Lee I. 2013. The genotoxic effect of ZnO and CuO nanoparticles on early growth of buckwheat, *Fagopyrum esculentum*. *Water, Air & Soil Pollution*, 224: 1668–1678
- Lee S., Kim S., Kim S., Lee I. 2013. Assessment of phytotoxicity of ZnO NPs on a medicinal plant, *Fagopyrum esculentum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 2: 848–854
- Lee W.M., An Y.Y., Yoon H., Kweon H.S. 2008. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 9: 1915–1921
- Lehner A., Meimoun P., Errakhi R., Madiona K., Barakate M., Bouteau F. 2008. Toxic and signalling effects of oxalic acid. *Plant Signaling & Behavior*, 3, 9: 746–748
- Lešnik M., Gaberšek V., Kurnik V. 2009. Perspektive uporabe fungicidov na podlagi bakra. Zbornik predavanj in referatov 9 slovenskega posvetovanj o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo: 47–58
- Li S.Q., Zhang Q.H. 2001. Advances in the development of functional foods from buckwheat. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 41, 6: 451–464
- Li, G.Q., Huang H.C., Acharya S.N. 2003. Antagonism and biocontrol potential of *Ulocladium atrum* on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biological Control*, 28, 1: 11–18
- Likar M., Bukovnik U., Kreft I., Chrungoo N., Regvar M. 2008. Mycorrhizal status and diversity of fungal endophytes in roots of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) and tartary buckwheat (*F. tataricum*). *Mycorrhiza*, 18, 6-7: 309–315
- Likar M., Regvar M. 2013. Isolates of dark septate endophytes reduce metal uptake and improve physiology of *Salix caprea* L. *Plant and Soil*, 370, 1: 593–604
- Lin D., Xing B. 2008. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, 42, 15: 5580–5585
- Lin D., Xing B. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*, 150, 2: 243–250

- Lin S., Reppert J., Hu Q., Hudson J.S., Reid M.L., Ratnikova T.A., Rao A.M., Luo H., Ke P.C. 2009. Uptake, translocation, and transmission of carbon nanomaterials in rice plants. *Small*, 5, 10: 1128–1132
- 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
- Lombi E., Scheckel K.G., Kempson I.M. 2011. In situ analysis of metal(loid)s in plants: state of the art and artefacts. *Environmental and Experimental Botany*, 72, 1: 3–17
- Lukatkin A., Egorova I., Michailova I., Malec P., Strzałka K. 2014. Effect of copper on pro- and antioxidative reactions in radish (*Raphanus sativus* L.) in vitro and in vivo. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28, 1: 80–86
- Lukšič L. 2013. Antioksidativni potencial otrobov pire, navadne in tatarske ajde. *Acta agriculturae Slovenica*, 101, 1: 117–124
- Luthar Z. 1992. Polyphenol classification and tannin content buckwheat seeds (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Fagopyrum*, 12: 36–42
- Luthar Z. 2012. Genska banka ajde - vir slovenske genetske variabilnosti. *Acta agriculturae Slovenica*, 99, 3: 307–316
- Ma J.F., Hiradate S. 2000. Form of aluminium for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Planta*, 211, 3: 355–360
- Ma X., Geisler-Lee J., Deng Y., Kolmakov A. 2010. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the Total Environment*, 408, 16: 3053–3061
- Mahapatra O., Bhagat M., Gopalakrishnan C., Arunachalam K.D. 2008. Ultrafine dispersed CuO nanoparticles and their antibacterial activity. *Journal of Experimental Nanoscience*, 3, 3: 185–193
- Manceau A., Nagy K.L., Marcus M.A., Geoffroy N., Jacquet T., Kirpichtchikova T. 2008. Formation of metallic copper nanoparticles at the soil-root interface. *Environmental Science & Technology*, 42, 5: 1766–1772
- Maness P., Smolinski S., Blake D.M., Huang Z., Wolfrum E.J., Jacoby W.A. 1999. Bactericidal activity of photocatalytic TiO<sub>2</sub> reaction: toward an understanding of its killing mechanism. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 9: 4094–4098
- Manivasagaperumal R., Vijayarangan P., Balamurugan S., Thiyagarajan G. 2011. Effect of copper on growth, dry matter yield and nutrient content of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Journal of Phytology*, 3, 3: 53–62
- Manteau S., Aboune S., Lambert B., Legendre L. 2003. Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Ecology*, 43, 3: 359–366
- Markowicz A.A. 1993. X-ray in physics. V: Handbook of X-ray spectrometry, Van Grieken R.E., Markowicz A.A. (eds.). New York, Marcell Dekker Inc.: 1–74
- Martínez D., Molina M.J., Sánchez J., Moscatelli M.C., Marinari S. 2016. API ZYM assay to evaluate enzyme fingerprinting and microbial functional diversity in relation to soil processes. *Biology and Fertility of Soils*, 52, 1: 77–89
- Martinez F., Blancard D., Lecomte P., Levis C., Dubos B., Fermaud M. 2003. Phenotypic differences between vacuola and transposon subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 5: 479–488
- Marx D.H. 1969. The influence of ectotrophic fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, 59:153–163
- Masarovičova E., Kralova K. 2013. Metal nanoparticles and plants. *Ecological Chemistry and Engineering S*, 20, 1: 9–22



- McAllister T.A., Martinez T., Bae H.D., Muir A.D., Yanke L.J., Jones G.A. 2005. Characterization of condensed tannins purified from legume forages: chromophore production, protein precipitation, and inhibitory effects on cellulose digestion. *Journal of Chemical Ecology*, 31, 9: 2049–2068
- McGrath M.J., Andrews J.H. 2006. Temporal changes in microscale colonization of the phylloplane by *Aureobasidium pullulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 9: 6234–6241
- McSweeney C.S., Palmer B., McNeill D.M., Krause D.O. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 91, 1-2: 83–93
- Meghana S., Kabra P., Chakraborty S., Padmavathy N. 2015. Understanding the pathway of antibacterial activity of copper oxide nanoparticles. *Royal Society of Chemistry*, 5, 16: 12293–12299
- Merela M., Pelicon P., Vavpetič P., Regvar M., Vogel-Mikuš K., Serša I., Poličnik H., Pokorný B., Levanič T., Oven P. 2009. Application of micro-PIXE, MRI and light microscopy for research in wood science and dendroecology. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 267, 12-13: 2157–2162
- Michaud A.M., Chappellaz C., Hinsinger P. 2008. Copper phytotoxicity affects root elongation and iron nutrition in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.). *Plant and Soil*, 310, 1: 151–165
- Milevoj L. 1989. Buckwheat diseases. *Fagopyrum*, 9: 31–40
- Miller J.D. 1995. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. *Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-product Protection*, 2: 971–977
- Mills J.T., Wallace H.A.H. 1971. Microflora of buckwheat seed, changes in storage and effect of seed treatments on seedling emergence. *Canadian Plant Disease Survey*, 51, 4: 154–158
- Mills J.T., Wallace H.A.H. 1972. Differential action of fungicides upon fungi occurring on wheat, barley, buckwheat, and oil seeds. *Canadian Journal of Plant Science*, 52, 3: 281–290
- Mittal R.K., Wang B.S.P. 1987. Fungi associated with seeds of eastern white pine and white spruce during cone processing and seed extraction. *Canadian journal of forest research*, 17, 9: 1026–1034
- Moise J.A., Han S., Gudynaite-Savitch L., Johnson D.A., Miki B.L.A. 2005. Seed coats: structure, development, composition, and biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41, 5: 620–644
- Monica R.C., Cremonini R. 2009. Nanoparticles and higher plants. *Caryologia*, 62, 2: 161–165
- Morrall R.A.A., McKenzie D.L. 1975. Diseases of specialty crops in Saskatchewan: 1. notes on buckwheat and sunflower 1972-73. *Canadian Plant Disease Survey*, 55, 2: 69–72
- Mosovška S., Birošova L. 2012. Antimycotic and antifungal activities of amaranth and buckwheat extracts. *Asian Journal of Plant Sciences*, 11, 3: 160–162
- Muccifora S., Bellani L.M. 2013. Effects of copper on germination and reserve mobilization in *Vicia sativa* L. seeds. *Environmental Pollution*, 179: 68–74
- Nair P.M.G., Chung I.M. 2014. A mechanistic study on the toxic effect of copper oxide nanoparticles in soybean (*Glycine max* L.) root development and lignification of root cells. *Biological Trace Element Research*, 162, 1-3: 342–352
- Navarro E., Baun A., Behra R., Hartmann N.B., Filser J., Miao A.J., Quigg A., Santschi P.H., Sigg L. 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants and fungi nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17, 5: 372–386
- Nečemer M., Kump P., Ščančar J., Jačimović R., Simčič J., Pelicon P., Budnar M., Jeran Z., Pongrac P., Regvar M., Vogel-Mikuš K. 2008. Application of X-ray fluorescence analytical techniques in phytoremediation and plant biology studies. *Spectrochimica Acta Part B*, 63, 11: 1240–1247
- Neergaard P. 1977. Seed pathology. London, Macmillan Press Ltd.: 1187 str.

- Nel A.E., Mädler L., Velegol D., Xia T., Hoek E.M. V, Somasundaran P., Klaessig F., Castranova V., Thompson M. 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature Materials*, 8: 543–557
- Ng A.M.C., Chan C.M.N., Guo M.Y., Leung Y.H., Djurišić A.B., Hu X., Chan W.K., Leung F.C.C., Tong S.Y. 2013. Antibacterial and photocatalytic activity of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanomaterials in phosphate buffer and saline solution. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 12: 5565–5573
- Nikolić D.B., Samaradžić J.T., Bratić A.M., Radin I.P., Gavrilović S.P., Rausch T., Maksimović V.R. 2010. Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) FeMT3 gene in heavy metal stress: protective role of the protein and inducibility of the promoter region under Cu<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> treatments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6: 3488–3494
- Ningthoujam D.S., Kshetri P., Sanasam S., Nimaichand S. 2009. Screening, identification of best producers and optimization of extracellular proteases from moderately halophilic alkalithermotolerant indigenous actinomycetes. *World applied sciences journal*, 7, 7: 907–916
- Nutarat P., Srisuk N., Arunrattiyakorn P., Limtong S. 2014. Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. *Fungal Biology*, 118, 8: 683–694
- O'Connell R.J.O., Thon M.R., Hacquard S., Amyotte S.G., Kleemann J., Torres M.F., Damm U., Buiate E.A., Epstein L., Alkan N., Altmüller J., Alvarado-Balderrama L., Bauser C.A., Becker C., Birren B.W., Chen Z., Choi J., Crouch J.A., Duvick J.P., Farman M.A., Gan P., Heiman D., Henrissat B., Howard R.J., Kabbage M., Koch C., Kracher B., Kubo Y., Law A.D., Lebrun M.H., Lee Y.H., Miyara I., Moore N., Neumann U., Nordström K., Panaccione D.G., Panstruga R., Place M., Proctor R.H., Prusky D., Rech G., Reinhardt R., Rollins J.A., Rounsley S., Schardl C.L., Schwartz D.C., Shenoy N., Shirasu K., Sikhakolli U.R., Stüber K., Sukno S.A., Sweigard J.A., Takano Y., Takahara H., Trail F., van Der Does H.C., Voll L.M., Will I., Young S., Zeng Q., Zhang J., Zhou S., Dickman M.B., Schulze-Lefert P., Ver E., Ver Loren van Themaat E., Ma L.J., Vaillancourt L.J. 2012. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature genetics*, 44, 9: 1060–1067
- Ohno K.M., Clausen C.A., Green F., Diehl S. V. 2015. Insights into the mechanism of copper-tolerance in *Fibroporia radiculosa*: the biosynthesis of oxalate. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 105: 90–96
- Orožen L., Vogel-Mikuš K., Likar M., Nečemer M., Kump P., Regvar M. 2012. Elemental composition of wheat, common buckwheat, and tartary buckwheat grains under conventional production. *Acta biologica Slovenica*, 55, 2: 13–24
- Ortega R., Deves G., Carmona A. 2009. Bio-metals imaging and speciation in cells using proton and synchrotron radiation X-ray microspectroscopy. *Journal of The Royal Society Interface*, 6: 649–658
- Ouda S.M. 2014. Antifungal activity of silver and copper nanoparticles on two plant pathogens, *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. *Research Journal of Microbiology*, 9, 1: 34–42
- Pandey P., Merwyn S., Agarwal G.S., Tripathi B.K., Pant S.C. 2012. Electrochemical synthesis of multi-armed CuO nanoparticles and their remarkable bactericidal potential against waterborne bacteria. *Journal of Nanoparticle Research*, 14: 709–721
- Parry K.E., Wood K.S. 1958. The adaptation of fungi to fungicides: adaptation to copper and mercury salts. *Annals of Applied Biology*, 46, 3: 446–456
- Parveen A., Rao S. 2015. Effect of nanosilver on seed germination and seedling growth in *Pennisetum glaucum*. *Journal of Cluster Science*, 26, 3: 693–701
- Pawlak-Sprada S., Arasimowicz-Jelonek M., Podgórska M., Deckert J. 2011. Activation of phenylpropanoid pathway in legume plants exposed to heavy metals. Part I. Effects of cadmium and lead on phenylalanine ammonia-lyase gene expression, enzyme activity and lignin content. *Acta Biochimica Polonica*, 58, 2: 211–216

- Perelshtein I., Applerot G., Perkas N., Wehrsuetz-Sigl E., Hasmann A., Guebitz G., Gedanken A. 2009. CuO-cotton nanocomposite: Formation, morphology, and antibacterial activity. *Surface & Coatings Technology*, 204, 1-2: 54–57
- Pérez-Miranda S., Cabirol N., George-Télléz R., Zamudio-Rivera L.S., Fernández F.J. 2007. O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection. *Journal of Microbiological Methods*, 70, 1: 127–131
- Perreault F., Samadani M., Dewez D. 2014. Effect of soluble copper released from copper oxide nanoparticles solubilisation on growth and photosynthetic processes of *Lemna gibba* L. *Nanotoxicology*, 8, 4: 347–382
- Pongrac P., Vogel-Mikuš K., Jeromel L., Vavpetič P., Pelicon P., Kaulich B., Gianoncelli A., Eichert D., Regvar M., Kreft I. 2013. Spatially resolved distributions of the mineral elements in the grain of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*). *Food Research International*, 54, 1: 125–131
- Pongrac P., Vogel-Mikuš K., Regvar M., Vavpetič P., Pelicon P., Kreft I. 2011. Improved lateral discrimination in screening the elemental composition of buckwheat grain by micro-PIXE. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 4: 1275–1280
- Pradhan A., Seena S., Dobritsch D., Helm S., Gerth K., Dobritsch M., Krauss G.J., Schlosser D., Pascoal C., Cássio F. 2014. Physiological responses to nanoCuO in fungi from non-polluted and metal-polluted streams. *Science of the Total Environment*, 466-467: 556–563
- Pradhan A., Seena S., Pascoal C., Cassio F. 2011. Can metal nanoparticles be a threat to microbial decomposers of plant litter in streams? *Microbial Ecology*, 62, 1: 58–68
- Preosti E., Daniele P.G., Toso S. 2002. Visible spectrophotometric determination of metal ions: the influence of structure on molar absorptivity value of copper (II) complexes in aqueous solution. *Analytica Chimica Acta*, 459, 2: 323–236
- Punshon T., Jackson B.P., Lanzirotti A., Hopkins W.A., Bertsch P.M., Burger J. 2005. Application of synchrotron X-ray microbeam spectroscopy to the determination of metal distribution and speciation in biological tissues. *Spectroscopy Letters*, 38, 3: 343–363
- Quilambo O.A. 2003. The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *African Journal of Biotechnology*, 2, 12: 539–546
- Quinet M., Cawoy V., Lefevre I., Van Miegroet F., Jacquemart A.L., Kinet J.M. 2004. Inflorescence structure and control of flowering time and duration by light in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Jornal of Experimental Botany*, 55, 402: 1509–1517
- Rao D.V., Shivannavar C.T., Gaddad S.M. 2002. Bioleaching of copper from chalcopyrite ore by fungi. *Indian Journal of Experimental Biology*, 40, 3: 319–324
- Ravel B., Newville M. 2005. ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *Jornal of Synchrotron Radiation*, 12, 4: 537–541
- Regvar M., Bukovnik U., Likar M., Kreft I. 2012. UV-B radiation affects flavonoids and fungal colonisation in *Fagopyrum esculentum* and *F. tataricum*. *Central European Journal of Biology*, 7, 2: 275–283
- Reis H., Pfiff S., Hahn M. 2005. Molecular and functional characterization of a secreted lipase from *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 6, 3: 257–267
- Remškar M. 2009. Nanodelci in nanovarnost. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje/Urad RS za kemikalije: 103 str.
- Rice P.J., Harman-Fetcho J.A., Heighton L.P., McConnell L.L., Sadeghi A.M., Hapeman C.J. 2006. Environmental fate and ecological impact of copper hydroxide: Use of management practices to reduce the transport of copper hydroxide in runoff from vegetable production. V: *Crop protection products for organic agriculture*, Felsot A., Racke K.D. (eds.). Washington DC, American Chemical Society; 230–244

- Rioux R.A., Shultz J., Garcia M., Willis D.K., Casler M., Bonos S., Smith D., Kerns J. 2014. *Sclerotinia homoeocarpa* overwinters in turfgrass and is present in commercial seed. PLoS ONE, 9, 10, e110897: 10 str.
- Rispoli F., Angelov A., Badia D., Kumar A., Seal S., Shah V. 2010. Understanding the toxicity of aggregated zero valent copper nanoparticles against *Escherichia coli*. Journal of Hazardous Materials, 180, 1-3: 212–216
- Rodriguez R.J., White J.F., Arnold a E., Redman R.S. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. The New phytologist, 182, 2: 314–330
- Rousk J., Ackermann K., Curling S.F., Jones D.L. 2012. Comparative toxicity of nanoparticulate CuO and ZnO to soil bacterial communities. PLoS ONE. 7, 3, e34197: 8 str.
- Ruan J.J., Chen H., Shao J.R., Wu Q., Han X.Y. 2011. An antifungal peptide from *Fagopyrum tataricum* seeds. Peptides, 32, 6: 1151–1158
- Ruan Y., Kotraiah V., Straney D.C. 1995. Flavonoids stimulate spore germination in *Fusarium solani* pathogenic on legumes in a manner sensitive to inhibitors of cAMP-dependent protein kinase. Molecular Plant-Microbe Interactions, 8, 6: 929–938
- Rubilar O., Rai M., Tortella G., Diez M.C., Seabra A.B., Durán N. 2013. Biogenic nanoparticles: copper, copper oxides, copper sulphides, complex copper nanostructures and their applications. Biotechnology Letters, 35, 9: 1365–1375
- Ruiz-Lozano J.M., Bonfante P. 2001. Intracellular Burkholderia strain has no negative effect on the symbiotic efficiency of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. Plant Growth Regulation, 34, 3: 347–352
- Salama H.M.H. 2012. Effects of silver nanoparticles in some crop plants, common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and corn (*Zea mays* L.). International Research Journal of Biotechnology, 3, 10: 190–197
- Sanchez-Pardo B., Fernandez-Pascual M., Zornoza P. 2014. Copper microlocalisation and changes in leaf morphology, chloroplast ultrastructure and antioxidative response in white lupin and soybean grown in copper excess. Journal of Plant Research, 127, 1: 119–129
- Savithramma N., Ankanna S., Bhumi G. 2012. Effect of nanoparticles on seed germination and seedling growth of *Boswellia ovalifoliolata*—an endemic and endangered medicinal tree taxon. Nano Vision, 2, 1-3: 61–68
- Scervino J.M., Ponce M.A., Erra-Bassells R., Vierheilig H., Ocampo J.A., Godeas A. 2005. Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth of *Gigaspora* and *Glomus*. Mycological Research, 109, 7: 789–794
- Schulz B., Boyle C. 2006. What are Endophytes? V: Microbial Root Endophytes, Schulz B.J.E., Boyle C.J.C., Sieber T.N.S. (eds). Berlin, Springer: 1–13
- Schwyn B., Neilands J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry, 160, 1: 47–56
- Seigle-Murandi F., Guiraud P., Croize J., Falsen E., Eriksson K.E.L. 1996. Bacteria are omnipresent on *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall. Applied and Environmental Microbiology, 62, 7: 2477–2481
- Shah P., Gutierrez-Sanchez G., Orlando R., Bergmann C. 2009. A proteomic study of pectin degrading enzymes secreted by *Botrytis cinerea* grown in liquid culture. Proteomics, 9, 11: 3126–3135
- Shah V., Dobiášova P., Baldrian P., Nerud F., Kumar A., Seal S. 2010. Influence of iron and copper nanoparticle powder on the production of lignocellulose degrading enzymes in the fungus *Trametes versicolor*. Journal of Hazardous Materials, 178, 1-3: 1141–1145
- Shahbaz M., Tseng H.M., Stuiver C.E.E., Koralewska A., Posthumus F.S., Venema H.J., Parmar S., Schat H., Hawkesford M.J., Kok L.J. De. 2010. Copper exposure interferes with the regulation of the uptake, distribution and metabolism of sulfate in Chinese cabbage. Journal of Plant Physiology, 167, 6: 438–446

- Sharma R.R., Singh D., Singh R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50, 3: 205–221
- Sheldon A.R., Menzies N.W. 2005. The effect of copper toxicity on the growth and root morphology of Rhodes grass (*Chloris gayana* Knuth.) in resin buffered solution culture. *Plant and Soil*, 278, 1: 341–349
- Shen R., Ma F.J., Kyo M., Iwashita T. 2002. Compartmentation of aluminium in leaves of an Al-accumulator, *Fagopyrum esculentum* Moench. *Planta*, 215, 3: 394–398
- Shi J., Abid A.D., Kennedy I.M., Hristova K.R., Silk W.K. 2011. To duckweeds (*Landoltia punctata*), nanoparticulate copper oxide is more inhibitory than the soluble copper in the bulk solution. *Environmental Pollution*, 159, 5: 1277–1282
- Shi J., Peng C., Yang J., Zhang H., Yuan X., Chen Y., Hu T. 2014. Phytotoxicity and accumulation of copper oxide nanoparticles to the Cu-tolerant plant *Elsholtzia splendens*. *Nanotoxicology*, 8, 2: 179–188
- Singh D., Nath K., Sharma Y.K. 2007. Response of wheat seed germination and seedling growth under copper stress. *Journal of Environmental Biology*, 28, 2: 409–414
- Singh P.N., Sindhu I.R., Singhal G. 1984. Fungi recorded from seeds and seedlings of *Fagopyrum esculentum*. *Journal of Indian Botanical Society*, 63, 3: 236–243
- Singh S.P., Vogel-Mikuš K., Vavpetič P., Jeromel L., Pelicon P., Kumar J., Tuli R. 2014. Spatial X-ray fluorescence micro-imaging of minerals in grain tissues of wheat and related genotypes. *Planta*, 240, 2: 277–289
- Smirnov O.E., Kosyan A.M., Kosyk O.I., Taran N.Y. 2015. Response of phenolic metabolism induced by aluminium toxicity in *Fagopyrum esculentum* Moench. plants. *Ukrainian Biochemical Journal*, 87, 6: 129–135
- Soltani Nezhad S., Rabbani Khorasgani M., Emtiazi G., Yaghoobi M.M., Shakeri S. 2014. Isolation of copper oxide (CuO) nanoparticles resistant *Pseudomonas* strains from soil and investigation on possible mechanism for resistance. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 30, 3: 809–817
- Soriano J.M., Dragacci S. 2004. Occurrence of fumonisins in foods. *Food Research International*, 37, 10: 985–1000
- Sperandio E.M., Martins do Vale H.M., Moreira G.A.M. 2015. Yeasts from native Brazilian Cerrado plants: occurrence, diversity and use in the biocontrol of citrus green mould. *Fungal Biology*, 119, 11: 984–993
- Sradans J., Penuelas J., Rivas-Ubach A. 2011. Ecological metabolomics: overview of current developments and future challenges. *Chemoecology*, 21, 4: 191–225
- Srinivasan C., Saraswathi R. 2010. Nano-agriculture - carbon nanotubes enhance tomato seed germination and plant growth. *Current Science*, 99, 3: 274–275
- Stampoulis D., Sinha, S K., White J.C. 2009. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environmental Science & Technology*, 43, 24: 9473–9479
- Steinkellner S., Lenzemo V., Langer I., Schweiger P., Khaosaad T., Toussaint J.P., Vierheilig H. 2007. Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant-fungus interactions. *Molecules*, 12, 7: 1290–1306
- Sunitha V.H., Devi D.N., Srinivas C. 2013. Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. *World Journal of Agricultural Sciences*, 9, 1: 1–9
- Sytar O., Borankulova A., Hemmerich I., Rauh C., Smetanska I. 2014. Effect of chlorocholine chlorid on phenolic acids accumulation and polyphenols formation of buckwheat plants, *Biological Research*. 47: 19–25
- Tamura H., Honda M., Sato T., Kamachi H. 2005. Pb hyperaccumulation and tolerance in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Journal of Plant Research*, 118, 5: 355–359

- Tani H., Koshino H., Sakuno E., Cutler H.G., Nakajima H. 2006. Botcinins E and F and botcinolide from *Botrytis cinerea* and structural revision of botcinolides. *Journal of Natural Products*, 69, 4: 722–725
- Tao Y.P., Shf Q.L., Zhangl X.X., Zhou Y.N. 2004. Inoculation effect on growth and flavonoid content of Tartary buckwheat in a field experiment. *Fagopyrum*, 21: 45–50
- Thill A., Zeyons O., Spalla O., Chauvat F., Rose J., Auffan M., Flank A.M. 2006. Cytotoxicity of CeO<sub>2</sub> nanoparticles physico-chemical insight of the cytotoxicity mechanism. *Environmental Science & Technology*, 40, 19: 6151–6156
- Thul S.T., Sarangi B.K., Pandey R.A. 2013. Nanotechnology in agroecosystem: implications on plant productivity and its soil environment. *Expert Opinion on Environmental Biology*, 2, 1: 1–7
- Trigiano R.N., Fergus C.L. 1979. Extracellular enzymes of some fungi associated with mushroom culture. *Mycological Society of America*, 71, 5: 908–917
- Trigiano R.N., Ament M.H. 2007. Detecting and measuring extracellular enzymes of fungi and bacteria. V: *Plant Pathology: Concepts & Laboratory Exercises*, Trigiano R.N., Windham M.T., Windham A.S. (eds.). 2nd ed. Boca Raton, CRC Press: 243–255
- Trujillo-Reyes J., Majumdar S., Botez C.E., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. 2014. Exposure studies of core-shell Fe/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and Cu/NPs CuO to lettuce (*Lactuca sativa*) plants: Are they a potential physiological and nutritional hazard? *Journal of Hazardous Materials*, 267: 255–263
- Tsuda T., Shiga K., Ohshima K., Kuwakishi S., Osawu T. 1996. Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of anthocyanin pigments isolated from *Phaseoks vulgaris* L. *Biochemical Pharmacology*, 52, 7: 1033–1039
- Usha R., Prabu E., Palaniswamy M., Venil C.K., Rajendran R. 2010. Synthesis of metal oxide nano particles by *Streptomyces* sp. for development of antimicrobial textiles. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 5, 3: 153–160
- van Kan J.A.L., Shaw M.W., Grant-Downton R.T. 2014. Botrytis species: relentless necrotrophic thugs or endophytes gone rogue? *Molecular Plant Pathology*, 15, 9: 957–961
- van Kan J.A.L. 2005. Infection strategies of *Botrytis cinerea*. *Acta Horticulturae: VIII International Symposium on Postharvest Physiology of Ornamental Plants*, 669: 77–90
- Van-Zwieten L., Merrington G., Van-Zwieten M. 2004. Review of impacts on soil biota caused by copper residues from fungicide application. *SuperSoil 2004: 3rd Australian New Zealand Soils Conference*: 1–8
- Verhoeff K., Leeman M., van Peer R., Posthuma L., Schot N., van Ejik G.W. 1988. Changes in pH and the production of organic acids during colonization of tomato petioles by *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology*, 122, 4: 327–336
- Virant I., Kajfež-Bogataj L. 1988. Vesicular-arbuscular mycorrhiza in buckwheat. *Fagopyrum*, 8: 10–14
- Vogel-Mikuš K. 2006. Privzem Zn, Cd in Pb ter arbuskularna mikoriza pri ranem mošnjaku *Thlaspi praecox* Wulfen (Brassicaceae). Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 124 str.
- Vogel-Mikuš K., Arčon I., Kump P., Pelicon P., Nečemer M., Vavpetič P., Koren Š., Regvar M. 2012. Analytical tools for exploring metal accumulation and tolerance in plants. V: *Phytotechnologies: Remediation of environmental contaminants*, Anjum N.A., Pereira M.E., Ahmad I., Duarte A.C., Umar S., Khan N.A., (eds.). 1st ed. Boca Raton, CRC Press: 443–496
- Vogel-Mikuš K., Kump P., Nečemer M., Pelicon P., Arčon I., Pongrac P., Povh B., Regvar M. 2010. Quantitative analyses of trace elements in environmental samples: Options and (im)possibilities. V: *Soil heavy metals*, Sherameti I. Varma A. (eds.). Springer Berlin Heidelberg: 113–138
- Vogel-Mikuš K., Pongrac P., Pelicon P., Vavpetič P., Povh B., Bothe H., Regvar M. 2009. Micro-PIXE analysis for localization and quantification of elements in roots of mycorrhizal metal-tolerant plants. V: *Symbiotic fungus: principles and practice*, Varma A., Kharkwal A.C. (eds.). Springer Berlin Heidelberg: 227–242

- Wang L., Li X., Niu M., Wang R., Chen Z. 2013. Effect of additives on flavonoids, D-chiro-Inositol and trypsin inhibitor during the germination of tartary buckwheat seeds. *Journal of Cereal Science*, 58, 2: 348–354
- Wang Q.-Y., Zhou D.-M., Cang L. 2009. Microbial and enzyme properties of apple orchard soil as affected by long-term application of copper fungicide. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 7: 1504–1509
- Wang Z., Xie X., Zhao J., Liu X., Feng W., White J.C., Xing B. 2012. Xylem- and phloem-based transport of CuO nanoparticles in maize (*Zea mays* L.). *Environmental Science & Technology*, 46, 8: 4434–4441
- Wanjiru W.M., Zhensheng K., Buchenauer H. 2002. Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infection of wheat heads. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 8: 803–810
- Waters B.M., Sankaran R.P. 2011. Moving micronutrients from the soil to the seeds: genes and physiological processes from a biofortification perspective. *Plant Science*, 180, 4: 562–574
- Wei C., Wei-Jun C., Zhi-Rong S., Ya-Ping Y. 2008. Protective effects of ethanolic extracts of buckwheat groats on DNA damage caused by hydroxyl radicals. *Food Research International*, 41, 9: 924–929
- Wheatley R.E. 2002. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 1-4: 357–364
- Wong J., Lytle F.W., Messmer R.P., Maylotte D.H. 1984. A study of the K-edge absorption spectra of selected vanadium compounds. *Physical Review B, Condensed Matter*, 30: 5596–5610
- Woodward B., De Groot R. 1999. Tolerance of *Wolfiporia cocos* isolates to copper in agar media. *Forest Products Journal*, 49, 4: 87–94
- Wu S.G., Huang L., Head J., Chen D., Kong I., Tang Y.J. 2012. Phytotoxicity of metal oxide nanoparticles is related to both dissolved metals ions and adsorption of particles on seed surfaces. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology*, 3, 4: 126–130
- Xia Y. 2004. Proteases in pathogenesis and plant defence. *Cellular Microbiology*, 6, 10: 905–913
- Xue T., Li X., Zhu W., Wu C., Yang G., Zheng C. 2009. Cotton metallothionein GhMT3a, a reactive oxygen species scavenger, increased tolerance against abiotic stress in transgenic tobacco and yeast. *Journal of Experimental Botany*, 60, 1: 339–349
- Yang Z., Chen J., Dou R., Gao X., Mao C., Wang L. 2015. Assessment of the phytotoxicity of metal oxide nanoparticles on two crop plants, maize (*Zea mays* L.) and rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12, 12: 15100–15109
- Yasur J., Rani P.U. 2013. Environmental effects of nanosilver: impact on castor seed germination, seedling growth, and plant physiology. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 12: 8636–8648
- Yeole R.D., Dave B.P., Dube H.C. 2001. Siderophore production by fluorescent pseudomonads colonizing roots of certain crop plants. *Indian Journal of Experimental Biology*, 39, 5: 464–468
- Yin L., Colman B.P., McGill B.M., Wright J.P., Bernhardt E.S. 2012. Effects of silver nanoparticles exposure on germination and early growth of eleven wetland plants. *PLoS ONE*, 7, 10, e47674: 7 str.
- Yoon K.Y., Hoon Byeon J., Park J.H., Hwang J. 2007. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 373, 2-3: 572–275
- Yruela I. 2005. Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 17, 1: 145–156
- Zafar S., Aqil F., Ahmad I. 2007. Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresource Technology*, 98, 13: 2557–2561
- Zaferanloo B., Virkar A., Mahon P.J., Palombo E.A. 2013. Endophytes from an Australian native plant are a promising source of industrially useful enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 2: 335–345

- Zepp G., Harwood J., Hammond C., Somwaru A. 1996. Buckwheat: An economic assessment of the feasibility of providing multiple-peril crop insurance. Economic Research Service, U.S. Department of Agriculture: 43 str.
- Zhang Q., Zhang J., Yang L., Zhang L., Jiang D., Chen W., Li G. 2014. Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. *Biological Control*, 72: 98–108
- Zhao J., Wang Z., Liu X., Xie X., Zhang K., Xing B. 2011. Distribution of CuO nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) and their potential toxicity. *Journal of Hazardous Materials*, 197: 304–310
- Zhao Y., Li L., Zhang P., Shen W., Liu J., Yang F. 2015. Differential regulation of gene and protein expression by zinc oxide nanoparticles in Hen's ovarian granulosa cells: specific roles of nanoparticles. *PLoS ONE*, 10, 10, e0140499: 21 str.
- Zhou X., Cheng S., Yang Y., Zhou Y., Tang W., Zhang X., Wang Q., Li Z. 2011. Toward a novel understanding of buckwheat self-defensive strategies during seed germination and preliminary investigation on the potential pharmacological application of its malting products. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 32: 6946–6954
- Zimmer R.C. 1974. Chlorotic leafspot and stipple spot, newly described diseases of buckwheat in Manitoba. *Canadian Journal of Plant Disease Survey*, 54, 2: 55–56
- Žitnik M., Šmit Ž., Muhleisen A., Pelicon P., Kavčič M., Zorko B., Čadež I., Ravnikar M., Gasser F., Rupnik Z., Simčič J., Budnar M. 1999. Tandetron - pomembno orodje za študij materialov. *Kovine, zlitine, tehnologije*, 33: 61–65



## ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem mentorici prof. dr. Marjani Regvar za usmerjanje pri raziskovalnem delu, svetovanje, pomoč pri pisanju članka in ponujeno mesto mladega raziskovalca.

Hvala somentorju doc. dr. Matevžu Likarju za nasvete pri pisanju članka.

Posebna zahvala gre prof. dr. Katarini Vogel-Mikuš za vse posredovano znanje, nasvete pri izvedbi poskusov, pisanju doktorske disertacije in pomoč pri dostopu do različnih raziskovalnih inštitucij.

Zahvaljujem se članoma komisije, prof. dr. Alenki Gaberščik za prijazne usmeritve in prof. dr. Primožu Peliconu, za vse meritve in analize, ki so bile opravljene v okviru njegove raziskovalne skupine.

Prof. dr. Iztoku Arčonu z Univerze v Novi Gorici se zahvaljujem za analize sinhrotronskih spektrov in dr. Petru Kumpu in dr. Marijanu Nečemru z Inštituta Jožef Stefan za možnost meritev z rentgensko fluorescenco.

Za uporabo rastlinjakov se zahvaljujem Nacionalnemu inštitutu za biologijo, dr. Johannesu T. van Elternu iz Kemijskega inštituta za analize LA-ICP-MS in sodelavcem Oddelka za mikrobiologijo Univerze v Szegedu, posebej doc. dr. Tamásu Pappu, za prijazen sprejem in pomoč pri izvedbi poskusov z glivami. Za pomoč pri spektrofotometričnih meritvah se zahvaljujem doc. dr. Tjaši Danevčič in Simoni Leskovec s Katedre za mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo BF ter prof. dr. Darku Makovcu z Inštituta Jožef Stefan za karakterizacijo uporabljenih spojin v poskusih.

Hvala za pomoč prof. dr. Ivanu Kreftu in mlinarju Antonu Rangusu za odlična semena ajde, na katerih temelji to delo.

Za večletno strokovno, kot tudi neformalno druženje, se zahvaljujem vsem sodelavcem Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin, še posebej Mileni, Špeli in Tanji.

Pisarniškim "sotrpinom" Špeli, Janji, Sašotu in Cenetu se zahvaljujem za vse uporabne nasvete in namige.

Največja zahvala gre mami in očiju, ker sta me naučila ljubiti naravo in me v vseh pogledih življenja podpirala z ljubeznijo in neskončnim razumevanjem ter sestri Žani, da mi je stala ob strani in mi svetovala.

Najbolj srčna zahvala gre mojemu Saši za ljubečo spodbudo, potrpljenje in vso pozitivno energijo.

Vsem drugim, ki jih tukaj poimensko nisem naštela in ste mi tekom študija in pri nastajanju doktorske disertacije pomagali na kakršenkoli način, bi se rada iskreno zahvalila in obenem opravičila, da vas nisem poimensko navedla.

*... po Koroškem po Kranjskem že ajda zori,*

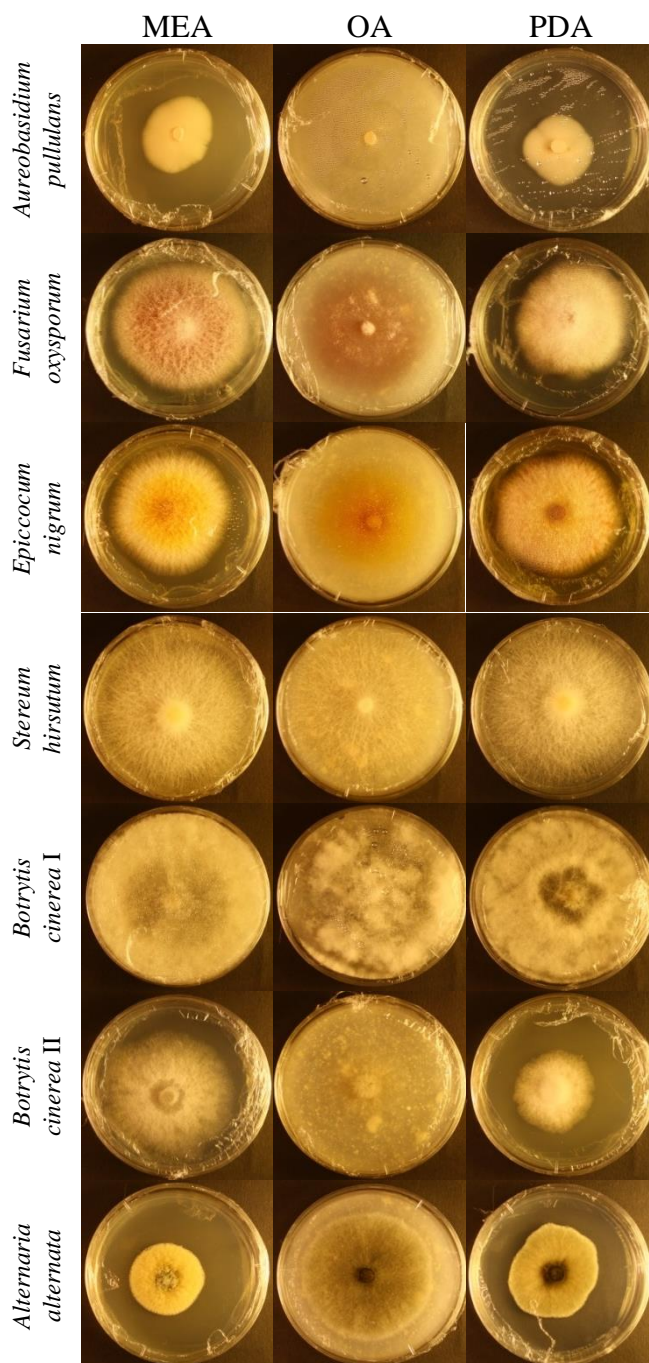
*že ajda zori, že ajda zori...*

## PRILOGE

### PRILOGA A

Rast izoliranih gliv na različnih gojiščih (MEA-agarno gojišče sladnega ekstrakta, OA-ovseno agarno gojišče, PDA-agarno gojišče krompirjeve dekstroze).

Growth of isolated fungi on different growing media (MEA-malt extract agar, OA-oat agar, PDA-potato dextrose agar).



## PRILOGA B

Rezultati faktorске ANOVE za pogostost izolacije gliv vseh rodov, gliv rodu *Epicoccum* sp., *Botrytis* sp. in *Alternaria* sp. iz semen navadne in tatarske ajde po 0, 6 in 12 mesecih skladiščenja. v letih pridelka 2012 in 2013. Statistično značilne vplive prikazujejo odebeljene črke.

Results of factorial ANOVA for isolation frequencies of fungi from all genera, fungi from genera *Epicoccum* sp., fungi from genera *Botrytis* sp. and fungi from genera *Alternaria* sp. from seeds of common and Tartary buckwheat after 0, 6 and 12 months of storage in years of crop production 2012 and 2013. Statistically significant influence is marked as bold text.

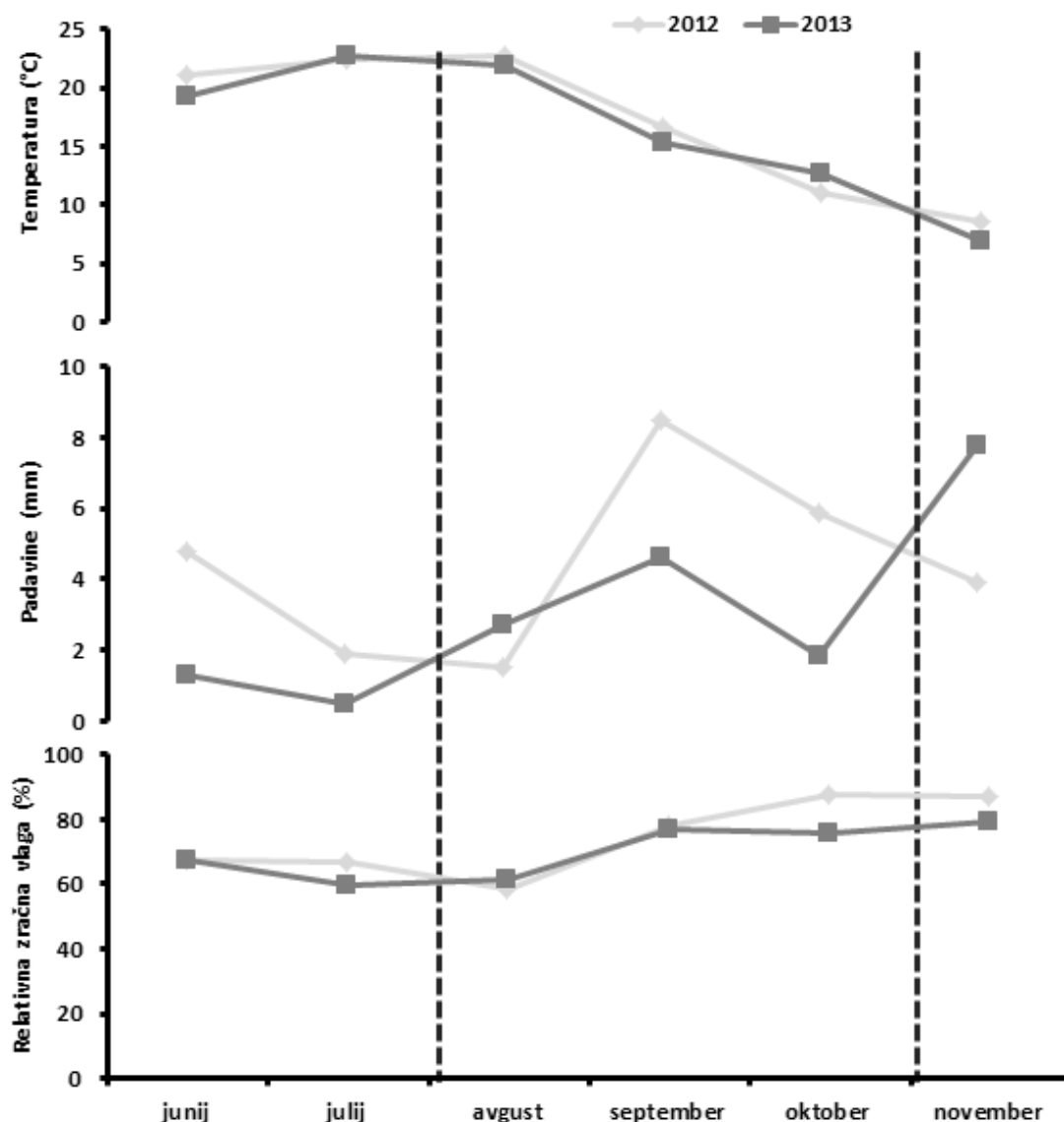
Izbran parameter	Dejavnik vpliva	SS	Prostostne stopinje	MS	F	p
Vsi glivni rodovi	vrsta ajde	<b>4,507</b>	<b>1</b>	<b>4,507</b>	<b>4,565</b>	<b>0,034</b>
	čas izolacije	<b>89,453</b>	<b>2</b>	<b>44,727</b>	<b>45,306</b>	<b>0,000</b>
	vrsta ajde * čas izolacije	1,213	2	0,607	0,615	0,542
<i>Epicoccum</i> sp.	vrsta ajde	<b>0,667</b>	<b>1</b>	<b>0,667</b>	<b>4,396</b>	<b>0,038</b>
	čas izolacije	<b>8,013</b>	<b>2</b>	<b>4,007</b>	<b>26,418</b>	<b>0,000</b>
	vrsta ajde * čas izolacije	<b>0,973</b>	<b>2</b>	<b>0,487</b>	<b>3,209</b>	<b>0,043</b>
<i>Botrytis</i> sp.	vrsta ajde	0,240	1	0,240	0,839	0,361
	čas izolacije	<b>12,093</b>	<b>2</b>	<b>6,047</b>	<b>21,134</b>	<b>0,000</b>
	vrsta ajde * čas izolacije	0,360	2	0,180	0,629	0,535
<i>Alternaria</i> sp.	vrsta ajde	0,960	1	0,960	2,031	0,156
	čas izolacije	<b>11,160</b>	<b>2</b>	<b>5,580</b>	<b>11,803</b>	<b>0,000</b>
	vrsta ajde * čas izolacije	0,760	2	0,380	0,804	0,450

Izbran parameter	Dejavnik vpliva	SS	Prostostne stopinje	MS	F	p
Vsi glivni rodovi	leto pridelka	0,007	1	0,007	0,007	0,932
	čas izolacije	<b>60,493</b>	<b>2</b>	<b>30,247</b>	<b>33,077</b>	<b>0,000</b>
	leto pridelka * čas izolacije	0,653	2	0,327	0,357	0,700
<i>Epicoccum</i> sp.	leto pridelka	0,167	1	0,167	2,381	0,125
	čas izolacije	<b>1,613</b>	<b>2</b>	<b>0,807</b>	<b>11,524</b>	<b>0,000</b>
	leto pridelka * čas izolacije	0,333	2	0,167	2,381	0,096
<i>Botrytis</i> sp.	leto pridelka	<b>3,227</b>	<b>1</b>	<b>3,227</b>	<b>8,669</b>	<b>0,004</b>
	čas izolacije	<b>19,573</b>	<b>2</b>	<b>9,787</b>	<b>26,293</b>	<b>0,000</b>
	leto pridelka * čas izolacije	1,973	2	0,987	2,651	0,074
<i>Alternaria</i> sp.	leto pridelka	<b>1,307</b>	<b>1</b>	<b>1,307</b>	<b>4,200</b>	<b>0,042</b>
	čas izolacije	<b>4,013</b>	<b>2</b>	<b>2,007</b>	<b>6,450</b>	<b>0,002</b>
	leto pridelka * čas izolacije	1,213	2	0,607	1,950	0,146

## PRILOGA C

Vremenski pogoji v preučevanih sezonah pridelka. Povprečne mesečne temperature, padavine in relativna zračna vlaga za leti 2012 in 2013, kjer črne pikčaste črte nakazujejo rastno sezono ajde na polju (vir: Arhiv - opazovani in merjeni meteorološki podatki po Sloveniji, 2015).

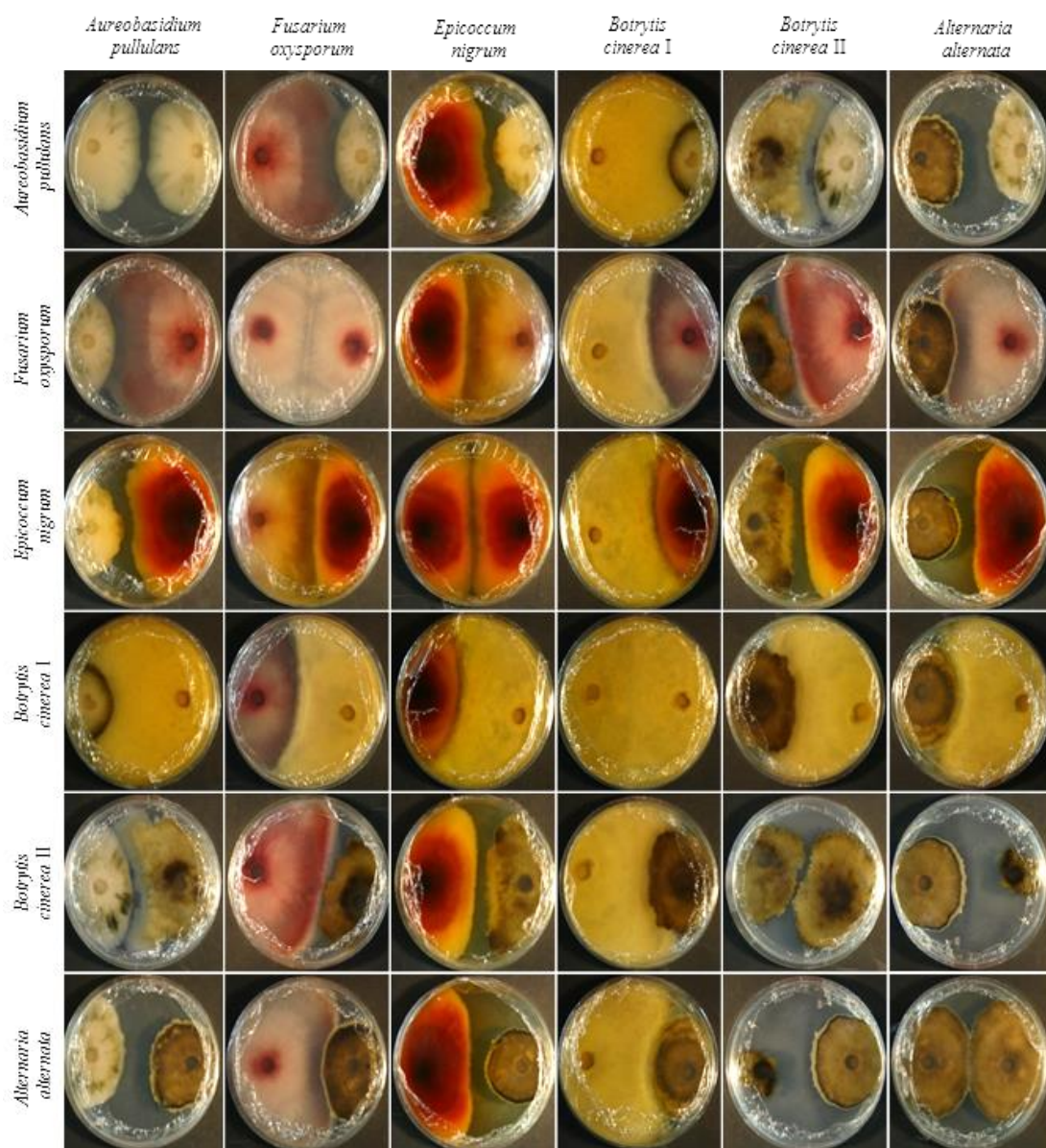
Weather conditions for the studied crop seasons. Mean monthly temperatures, precipitation and relative air humidity for 2012 and 2013, where black dotted lines delimit the growing season for the buckwheat crops in the field (source: Arhiv - opazovani in merjeni meteorološki podatki po Sloveniji, 2015).



## PRILOGA D

Glivne interakcije (pogled od spodaj) pri testih neposrednih dvojnih kultur. Fotografije smo posneli 14 dni po inokulaciji plošč PDA.

Fungal interactions (bottom view) in the direct dual-culture tests. Photographs were taken 14 days after inoculation of PDA plates.



## PRILOGA E

### PRILOGA E1

Površine glivnega micelija ( $\text{mm}^2$ ) v neposrednih testih dvojnih kultur kot odziv na izpostavljenost miceliju drugega izolata (povprečje  $\pm$  SN; n=5). Različne črke (a-d) označujejo statistično značilne razlike med vplivi različnih gliv (Duncanov test,  $p < 0,05$ ). Fungal growth areas ( $\text{mm}^2$ ) in the direct dual-culture tests as response to presence of other isolate (mean  $\pm$  SE; n=5). Different letters (a-d) present statistically significant differences between fungal influences (Duncan test,  $p < 0,05$ ).

	<i>A. pullulans</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>E. nigrum</i>	<i>B. cinerea</i> I	<i>B. cinerea</i> II	<i>A. alternata</i>
<i>A. pullulans</i>	2296 $\pm$ 124 <b>d</b>	3518 $\pm$ 96 <b>a</b>	3114 $\pm$ 47 <b>a</b>	3646 $\pm$ 109 <b>a</b>	2018 $\pm$ 135 <b>b</b>	1977 $\pm$ 704 <b>de</b>
<i>F. oxysporum</i>	1191 $\pm$ 48 <b>a</b>	4370 $\pm$ 227 <b>bc</b>	3128 $\pm$ 26 <b>a</b>	4772 $\pm$ 50 <b>b</b>	3187 $\pm$ 141 <b>c</b>	1410 $\pm$ 60 <b>a</b>
<i>E. nigrum</i>	1565 $\pm$ 42 <b>b</b>	4010 $\pm$ 51 <b>ab</b>	3143 $\pm$ 25 <b>a</b>	3988 $\pm$ 280 <b>a</b>	2146 $\pm$ 62 <b>b</b>	1681 $\pm$ 64 <b>bc</b>
<i>B. cinerea</i> I	1089 $\pm$ 26 <b>a</b>	3484 $\pm$ 269 <b>a</b>	2272 $\pm$ 65 <b>b</b>	5025 $\pm$ 84 <b>b</b>	2787 $\pm$ 25 <b>c</b>	1620 $\pm$ 87 <b>ab</b>
<i>B. cinerea</i> II	1986,2 $\pm$ 50 <b>c</b>	4098 $\pm$ 94 <b>ab</b>	3132 $\pm$ 91 <b>a</b>	4908 $\pm$ 82 <b>b</b>	1819 $\pm$ 122 <b>b</b>	1896 $\pm$ 77 <b>cd</b>
<i>A. alternata</i>	1580,4 $\pm$ 49 <b>b</b>	4861 $\pm$ 65 <b>c</b>	3127 $\pm$ 80 <b>a</b>	4921 $\pm$ 59 <b>b</b>	565 $\pm$ 90 <b>a</b>	2209 $\pm$ 141 <b>e</b>

### PRILOGA E2

Površine glivnega micelija ( $\text{mm}^2$ ) v testih posrednih dvojnih kultur kot odziv na izpostavljenost hlapnim organskim spojinam (povprečje  $\pm$  SN; n=6). Kontrolo predstavlja spodnja plošča brez glive. Različne črke (a-d) označujejo statistično značilne razlike med vplivi različnih gliv (Duncanov test,  $p < 0,05$ ).

Fungal growth areas ( $\text{mm}^2$ ) in the indirect dual-culture tests as response to production of volatile organic compounds (mean  $\pm$  SE; n=6). Control represents bottom agar plate without fungi. Different letters (a-d) present statistically significant differences between fungal influences (Duncan test,  $p < 0,05$ ).

		Zgornja plošča					
		<i>A. pullulans</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>E. nigrum</i>	<i>B. cinerea</i> I	<i>B. cinerea</i> II	<i>A. alternata</i>
Spodnja plošča	kontrola	2130 $\pm$ 82 <b>b</b>	4838 $\pm$ 196 <b>bc</b>	5885 $\pm$ 51 <b>d</b>	5816 $\pm$ 162 <b>c</b>	4173 $\pm$ 190 <b>c</b>	2238 $\pm$ 161 <b>bc</b>
	<i>A. pullulans</i>	1492 $\pm$ 61 <b>a</b>	3743 $\pm$ 130 <b>a</b>	4658 $\pm$ 251 <b>bcd</b>	4295 $\pm$ 289 <b>b</b>	3224 $\pm$ 184 <b>b</b>	1502 $\pm$ 71 <b>a</b>
	<i>F. oxysporum</i>	1358 $\pm$ 135 <b>a</b>	4948 $\pm$ 120 <b>bc</b>	3524 $\pm$ 97 <b>b</b>	4143 $\pm$ 668 <b>b</b>	3300 $\pm$ 99 <b>b</b>	1952 $\pm$ 145 <b>b</b>
	<i>E. nigrum</i>	2112 $\pm$ 196 <b>b</b>	4951 $\pm$ 137 <b>bc</b>	5501 $\pm$ 129 <b>cd</b>	4227 $\pm$ 239 <b>b</b>	2256 $\pm$ 161 <b>a</b>	2544 $\pm$ 130 <b>c</b>
	<i>B. cinerea</i> I	1408 $\pm$ 103 <b>a</b>	5239 $\pm$ 122 <b>c</b>	2980 $\pm$ 341 <b>a</b>	3463 $\pm$ 689 <b>ab</b>	2532 $\pm$ 145 <b>a</b>	1880 $\pm$ 151 <b>ab</b>
	<i>B. cinerea</i> II	1733 $\pm$ 167 <b>ab</b>	5037 $\pm$ 104 <b>bc</b>	4436 $\pm$ 829 <b>bc</b>	3265 $\pm$ 343 <b>ab</b>	3170 $\pm$ 214 <b>b</b>	2163 $\pm$ 110 <b>bc</b>
	<i>A. alternata</i>	1786 $\pm$ 155 <b>ab</b>	4748 $\pm$ 120 <b>b</b>	4268 $\pm$ 649 <b>bc</b>	2551 $\pm$ 471 <b>a</b>	2692 $\pm$ 310 <b>ab</b>	2303 $\pm$ 168 <b>bc</b>

## PRILOGA F

Rezultati multivariatne regresijske analize vpliva aktivnosti sinteze encimov amilaze, polifenol oksidaze, celulaze in lipaze ter hitrosti rasti gliv na vsebnost fenolov in taninov v kalicah, ki so rasle ob prisotnosti različnih gliv. Statistično značilne vplive prikazujejo odebeljene črke.

Results of multivariate regression analyses of impact of fungal amylase, polyphenol oxidase, cellulase and lipase synthesis as well as fungal growth rate on content of phenols and tannins in seedlings, which were grown in contact with different fungi. Statistically significant influence is marked as bold text.

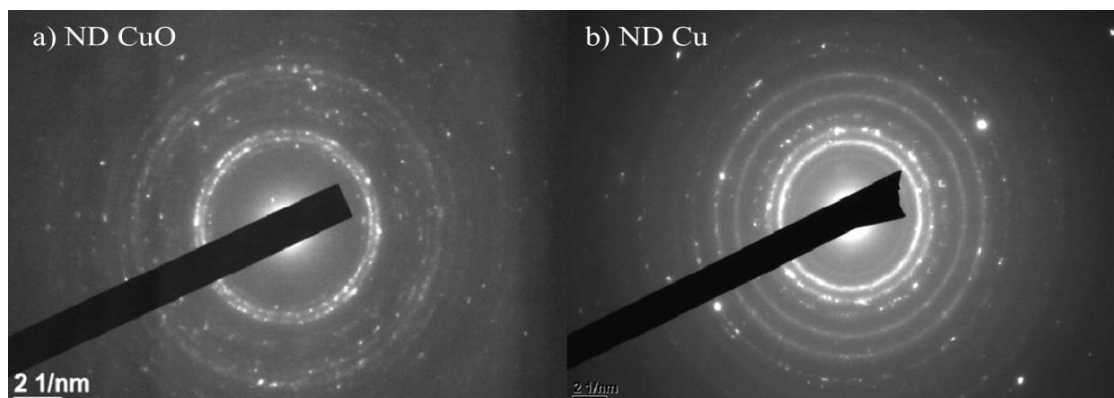
Izbran parameter	Dejavnik vpliva	Ocena	Standardna napaka	t	p
Fenoli	celulaza	0,0017	0,0012	1,41	0,1691
	amilaza	-0,0241	0,0124	-1,94	0,0610
	polifenol oksidaza	-0,0008	0,0005	-1,68	0,1032
	<b>hitrost rasti gliv</b>	<b>-0,0170</b>	<b>0,0059</b>	<b>-2,90</b>	<b>0,0069</b>
	$\beta$ koeficient	0,1754			
	$R^2$	0,3752			
	Prilagojen $R^2$	0,2946			
Tanini	<b>celulaza</b>	<b>0,0004</b>	<b>0,0001</b>	<b>5,13</b>	<b>0,0000</b>
	$\beta$ koeficient	0,0633			
	$R^2$	0,4364			
	Prilagojen $R^2$	0,4198			

## PRILOGA G

### PRILOGA G1

Koncentrični krog ED, ki so rezultat sipanja elektronov na praškovnih vzorcih a) ND CuO in b) ND Cu.

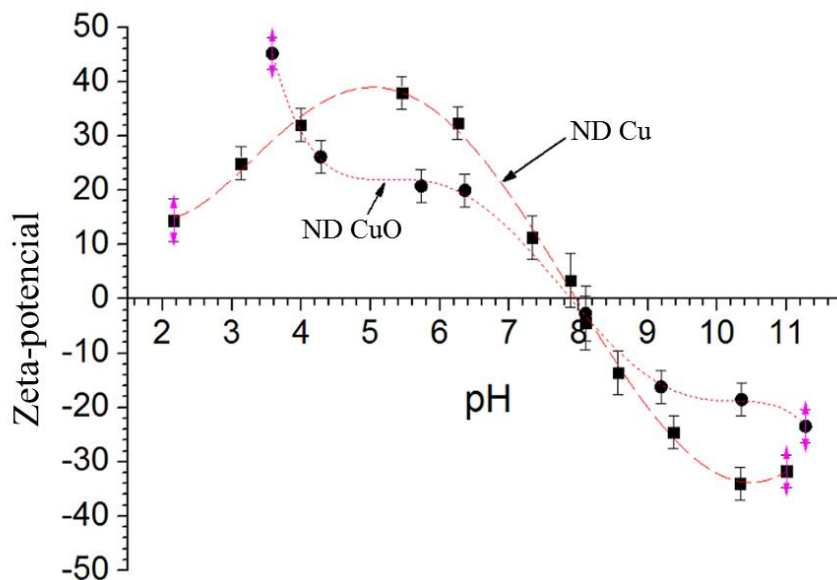
The concentric rings of ED, which are the results of electrons diffraction on samples of a) NPs CuO and b) NPs Cu powder.



### PRILOGA G2

Primerjava meritev zeta-potenciala ND CuO in ND Cu.

Comparison of zeta-potential measurements of NPs CuO and NPs Cu.





## PRILOGA H

Rezultati faktorске ANOVE vpliva vrste glive, oblike Cu in njune interakcije na luženje bakrovega iona, biomaso, vsebnost vode v miceliju, MDA koncentracije, sinteze oksalne kisline in pH gojišč v gojiščih z različnima glivama (*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*) in dodanimi različnimi bakrovimi spojinami (Cu sol, MD CuO, ND CuO in ND Cu). Statistično značilne vplive prikazujejo odebeljene črke.

Results of factorial ANOVA impacts of fungal species, Cu form and their interaction on copper ion leaching, biomass production, water content in mycelia, MDA concentrations, oxalic acid synthesis and pH of media, in media with different fungi (*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*) and supplemented with different copper compounds (Cu salt, MPs CuO, NPs CuO in NPs Cu). Statistically significant influence is marked as bold text.

Izbran parameter	Dejavnik vpliva	SS	Prostostne stopinje	MS	F	p
Luženje bakrovega iona	<b>vrsta glive</b>	<b>129,34</b>	<b>1</b>	<b>129,34</b>	<b>53,86</b>	<b>0,000000</b>
	<b>oblika Cu</b>	<b>290,18</b>	<b>4</b>	<b>72,54</b>	<b>30,21</b>	<b>0,000000</b>
	<b>vrsta glive * oblika Cu</b>	<b>120,77</b>	<b>4</b>	<b>30,19</b>	<b>12,57</b>	<b>0,000028</b>
Biomasa	<b>vrsta glive</b>	<b>0,117</b>	<b>1</b>	<b>0,117</b>	<b>66,706</b>	<b>0,000000</b>
	<b>oblika Cu</b>	<b>0,614</b>	<b>3</b>	<b>0,204</b>	<b>116,528</b>	<b>0,000000</b>
	<b>vrsta glive * oblika Cu</b>	<b>0,085</b>	<b>3</b>	<b>0,028</b>	<b>16,261</b>	<b>0,000041</b>
Vsebnost vode v miceliju	<b>vrsta glive</b>	<b>499,5</b>	<b>1</b>	<b>499,5</b>	<b>71,4</b>	<b>0,000000</b>
	<b>oblika Cu</b>	<b>2053,6</b>	<b>3</b>	<b>684,5</b>	<b>97,8</b>	<b>0,000000</b>
	<b>vrsta glive * oblika Cu</b>	<b>1233,8</b>	<b>3</b>	<b>411,3</b>	<b>58,8</b>	<b>0,000000</b>
MDA koncentracija	<b>vrsta glive</b>	<b>6630847</b>	<b>1</b>	<b>6630847</b>	<b>27,8</b>	<b>0,000021</b>
	<b>oblika Cu</b>	<b>14811301</b>	<b>3</b>	<b>4937100</b>	<b>20,7</b>	<b>0,000001</b>
	<b>vrsta glive * oblika Cu</b>	<b>11538589</b>	<b>3</b>	<b>3846196</b>	<b>16,1</b>	<b>0,000006</b>
Sinteza oksalne kisline	<b>vrsta glive</b>	<b>3581606</b>	<b>1</b>	<b>3581606</b>	<b>79,9</b>	<b>0,000000</b>
	<b>oblika Cu</b>	<b>2281237</b>	<b>4</b>	<b>570309</b>	<b>12,7</b>	<b>0,000001</b>
	<b>vrsta glive * oblika Cu</b>	<b>2789239</b>	<b>4</b>	<b>697309</b>	<b>15,5</b>	<b>0,000000</b>
pH gojišča	vrsta glive	0,197	1	0,197	2,46	0,125773
	<b>oblika Cu</b>	<b>42,361</b>	<b>4</b>	<b>10,590</b>	<b>131,90</b>	<b>0,000000</b>
	vrsta glive * oblika Cu	0,427	4	0,106	1,33	0,277515



PRILOGA J

Rezultati meritev organskih kislin v vzorcih gojišč(mg ml<sup>-1</sup>), kjer so rastle glive pod različnimi pogoji. Z odebeljeno so označene vrednosti nad mejo detekcije in mejo kvantifikacije. Legenda: A-A. *alternata*; B-B. *cinerea*; microCuO-MD CuO; nanoCuO-ND CuO; nanoCu-ND Cu; sol1-Cu sol (1 %); sol10-Cu sol (10 %).

Results of organic acid measurements in samples of growing media, where fungi were growing under different conditions. Values are presented as raw data (mg ml<sup>-1</sup>) of different organic acids. Values up the detection and quantification limit are in bold. The legend: A-A. *alternata*, B-B. *cinerea*, microCuO-MPs Cu, nanoCuO-NPs CuO, nanoCu-NPs Cu, sol1-Cu salt (1 %), sol10-Cu salt (10 %).

Meja detekcije (mg ml <sup>-1</sup> )	Oksalna kislina	Maleinska kislina	Citronska kislina	Glukonska kislina	Jabolčna kislina	Askorbinska kislina	Sukcinska kislina	Itakonska kislina	Fumarična kislina	Ocetna kislina	Levulinična kislina
	5,68	0,71	14,2	28,4	28,4	227,2	227,2	1,42	1,42	14,2	28,4
A-kontrola-1		0		20,335	0	148,473	0				
A-kontrola-2		0		<b>42,915</b>	0	146,708	21,278		1,062		
A-kontrola-3	0	0		<b>39,802</b>	0	132,031	0		0		
A-kontrola-4	0			<b>56,091</b>	4,222		0		0		
A-kontrola-5				27,562	0		0		0		
A-microCuO-1	0		0						0		
A-microCuO-2	3,369	0	0		0				0		
A-microCuO-3	0	0	0						0		
A-microCuO-4	0	0	0	0					0		
A-microCuO-5	<b>9,272</b>	0	0	0					0		
A-nanoCuO-1	<b>8,163</b>	0		0					0		
A-nanoCuO-2	<b>11,608</b>	0		0	0				0,064		
A-nanoCuO-3	4,215	0,311	0	20,317					0,311		
A-nanoCuO-4	1,792	0,126	0	22,09	0				0,071		
A-nanoCuO-5	<b>8,729</b>	0	0	6,378	0				0		
A-nanoCu-1	<b>8,353</b>	0,123	0	0	0				0,03		
A-nanoCu-2	0,454	0	0	0					0		
A-nanoCu-3	0	0	0	0					0		
A-nanoCu-4	<b>6,167</b>	0,545	0	5,172					0,367		
A-nanoCu-5	3,455	0	0	0					0		
A-sol-1-1	0	0,25	0	27,369	0		21,004		0	<b>133,929</b>	
A-sol-1-2		0	0	3,981	0				0	4,131	
A-sol-1-3		0		0	0	143,604			0		
A-sol-1-4	0	0	0	0			0		0	<b>17,518</b>	
A-sol-1-5		0	0	0	0				0	<b>49,438</b>	<b>29,949</b>
A-sol-10-1	0	0,462	0	<b>29,237</b>					0		
A-sol-10-2	0	0,107	0	8,922					0		
A-sol-10-3	0	0,075	0	0					0		
B-kontrola-1	<b>106,046</b>	0,056	0	19,684	0				1,015	<b>24,702</b>	
B-kontrola-2	<b>51,029</b>	0,009		<b>34,979</b>	0				0,695		
B-kontrola-3	<b>93,039</b>	0	0	18,098	0				1,221		
B-kontrola-4	<b>84,754</b>	0,022	0	<b>31,698</b>	0				0,493	<b>24,651</b>	
B-kontrola-5	<b>99,578</b>	0,052	0	<b>34,455</b>	0				1,355	13,255	
B-microCuO-1	<b>40,009</b>	0	0	0	0				<b>1,876</b>	4,701	
B-microCuO-2	<b>94,7</b>	0,067	0	0	0				1,173		
B-microCuO-3	<b>72,899</b>	0,208	0	0	0				0,363	<b>77,651</b>	
B-microCuO-4	<b>50,939</b>	0,048	0	0	0				0		
B-microCuO-5	<b>73,905</b>	0	0	0	0				<b>5,338</b>		
B-nanoCuO-1	<b>94,897</b>	0,206						0	0	<b>16,677</b>	
B-nanoCuO-2	<b>44,029</b>	0		0	0			0	0		
B-nanoCuO-3	<b>66,025</b>	0		0	0			0	0	8,867	
B-nanoCuO-4	<b>62,212</b>	0,056						0	0		
B-nanoCuO-5	<b>32,448</b>	0		0	0			0	0	0	
B-nanoCu-1	<b>95,985</b>	0	0		0				0,805		
B-nanoCu-2	<b>39,915</b>	0,122	0		0			0	0,402		
B-nanoCu-3	4,012	0	0		0				0		
B-nanoCu-4	<b>29,47</b>	0,159	0		0				0,37		
B-nanoCu-5	<b>25,21</b>	0,29	0		0				0,47		
B-sol-1-1	<b>124,645</b>	0,088	0		0			0	0,956	4,337	
B-sol-1-2	<b>156,424</b>	0	0		0			0	0,657		
B-sol-1-3	<b>19,763</b>	0	0		0				0,583	<b>26,104</b>	
B-sol-1-4	<b>207,777</b>	0,058	0		0			0	<b>1,603</b>		
B-sol-1-5	<b>219,705</b>	0,035	0		0				<b>4,465</b>		
B-sol-10-1	<b>55,589</b>	0,286	0	5,499	0				0,766		
B-sol-10-2	<b>25,794</b>	0		0					0,061		
B-sol-10-3	<b>25,585</b>	0,092	0	0					0,089		

## PRILOGA K

Najboljši parametri fita Cu K-roba EXAFS modela najbližjih koordinacijskih lupin okoli Cu atoma v standardu Cu-oksalat in neznani modri bakrovi spojini, ki jo naredi gliva *Botrytis cinerea* ko je izpostavljena ND CuO. Legenda: N–število Cu najbližjih sosednjih atomov, R–razdalja,  $\sigma^2$ –Debye-Waller faktor. Negotovost zadnje številke je podana v oklepajih. Najboljši fit K-roba Cu EXAFS smo pridobili z zmanjšanjem amplitude za redukcijski faktor So2 1,0 (1) v primeru Cu-oksalat in 0,98 v primeru neznane bakrove spojine. Kvaliteta fita K-roba Cu EXAFS, R-faktor, je v obeh primerih 0,0094.

Copper K-edge EXAFS model best fit parameters of the nearest coordination shells around the Cu atoms in Cu-oxalate standard and unknown blue compound, produced by fungus *Botrytis cinerea* growing on NPs CuO. The legend: N-number of nearest Cu neighbour atoms, R-distance,  $\sigma^2$ -Debye-Waller factor. The uncertainty of the last digit is given in parentheses. A best fit is obtained with the amplitude reduction factor So2 of 1.0 (1) in case of Cu-oxalate, and 0.98 in case of unknown Cu compound K-edge EXAFS. The goodness-of-fit parameter, R-factor, is in case of both compounds EXAFS models 0.0094.

Cu-oksalat	Cu sosed	N	R (Å)	$\sigma^2$ (Å <sup>2</sup> )
	O	4,0	1,94 (1)	0,005 (3)
	O	2,0	2,65 (1)	0,006 (3)
	C	1,0 (8)	2,74 (2)	0,005 (3)
	C	1,6 (8)	3,13 (2)	0,005 (3)
neznana Cu-spojina	Cu sosed	N	R (Å)	$\sigma^2$ (Å <sup>2</sup> )
	O	4,0	1,97 (1)	0,005 (3)
	O	2,0	2,65 (1)	0,006 (3)
	C	0,2 (8)	2,53 (2)	0,005 (3)
	C	2,0 (8)	2,43 (2)	0,005 (3)

# PRILOGA L

## PRILOGA L1

Izmerjenih podatki izbranih parametrov odziva semen in kalic navadne ajde v kalitvenem testu (povprečje ± SN). Podatki za kalitev 1. dan, kalitev 8. dan, SvM kalic, SM kalic, dolžino korenčic (n=15) in fenole, flavonoide, tanine (n=5). Različne črke (a-h) označujejo statistično značilne razlike med vplivi različnih tretmajev kontrole, MD CuO, ND CuO in Cu soli v različnih koncentracijah (Duncanov test,  $p < 0,05$ ).

Measured data for selected parameters of common buckwheat seeds and seedlings response in germination test (mean ± SN). Data for germination on 1. day, germination on 8. day, seedlings FW, seedlings DW, root length (n=15) and phenols, flavonoids and tannins (n=5). Different letters (a-h) present statistically significant differences between treatments of control, MPs CuO, NPs CuO and Cu salt in different concentrations (Duncan test,  $p < 0,05$ ).

Oblika spojine	Koncentracija spojine (mg l <sup>-1</sup> )	Kalitev 1. dan (št.semen)	Kalitev 8. dan (št.semen)	SvM (g)	SM (g)	Dolžina korenčic (mm)	Fenoli (% SM)	Flavonoidi (% SM)	Tanini (% SM)
kontrola	0	6,80 ± 0,48 bcde	9,27 ± 0,25 abc	0,16 ± 0,003 fg	0,02 ± 0,0013 a	111,58 ± 9,67 cd	1,33 ± 0,05 a	0,52 ± 0,03 a	0,36 ± 0,02 fgh
Cu sol	0,01	5,60 ± 0,50 abcde	8,87 ± 0,35 abc	0,14 ± 0,003 efg	0,02 ± 0,0004 abc	118,17 ± 8,02 d	1,60 ± 0,07 bcd	0,65 ± 0,04 bc	0,33 ± 0,02 bcdefgh
Cu sol	0,05	5,07 ± 0,38 abcd	9,27 ± 0,18 abc	0,15 ± 0,004 efg	0,02 ± 0,0007 abc	148,58 ± 7,5 d	1,71 ± 0,04 bcd	0,65 ± 0,03 bc	0,34 ± 0,03 cdefgh
Cu sol	0,1	4,13 ± 0,52 a	8,67 ± 0,30 abc	0,14 ± 0,00 de	0,02 ± 0,0004 abc	111,25 ± 8,60 cd	1,75 ± 0,07 bcde	0,69 ± 0,01 bcdefg	0,38 ± 0,02 h
Cu sol	0,5	4,38 ± 0,55 abcde	7,61 ± 0,76 abc	0,13 ± 0,01 efg	0,01 ± 0,0015 abc	99,82 ± 10,10 bc	1,12 ± 0,41 def	0,42 ± 0,17 bcdef	0,22 ± 0,08 abcdefg
Cu sol	1	3,60 ± 0,35 abc	7,75 ± 0,66 abc	0,1 ± 0,01 efg	0,01 ± 0,0012 bc	105,98 ± 10,39 d	1,19 ± 0,26 bcd	0,46 ± 0,09 bcdefg	0,22 ± 0,05 abcdefg
Cu sol	10	4,16 ± 0,49 abcde	7,80 ± 0,73 abc	0,14 ± 0,01 g	0,02 ± 0,0014 abc	93,11 ± 12,33 cd	1,13 ± 0,32 def	0,41 ± 0,11 b	0,19 ± 0,05 abcde
Cu sol	100	5,10 ± 0,60 abcde	8,16 ± 0,70 abc	0,12 ± 0,01 cd	0,02 ± 0,0013 abc	31,74 ± 5,39 a	0,97 ± 0,20 a	0,40 ± 0,10 b	0,18 ± 0,04 abc
MD CuO	0,1	5,94 ± 0,61 bcde	8,30 ± 0,73 abc	0,14 ± 0,01 efg	0,02 ± 0,0014 abc	102,07 ± 14,83 cd	1,07 ± 0,35 bcde	0,41 ± 0,11 bcde	0,19 ± 0,06 abcdefg
MD CuO	1	6,66 ± 0,65 e	8,52 ± 0,74 c	0,15 ± 0,01 fg	0,02 ± 0,0016 abc	117,36 ± 11,62 d	1,06 ± 0,23 bcd	0,46 ± 0,13 bcdefg	0,21 ± 0,06 bcdefgh
MD CuO	5	6,86 ± 0,68 cde	8,21 ± 0,74 bc	0,14 ± 0,01 efg	0,02 ± 0,0023 abc	116,91 ± 10,65 d	1,19 ± 0,38 efg	0,47 ± 0,12 bcdefg	0,23 ± 0,07 gh
MD CuO	10	6,28 ± 0,57 de	8,05 ± 0,69 abc	0,14 ± 0,01 efg	0,02 ± 0,001 abc	110,93 ± 10,65 d	1,37 ± 0,37 g	0,46 ± 0,12 cdefgh	0,22 ± 0,05 efg
MD CuO	50	5,94 ± 0,59 cde	8,16 ± 0,71 abc	0,13 ± 0,01 fg	0,01 ± 0,0013 abc	111,32 ± 10,06 d	1,39 ± 0,37 fg	0,47 ± 0,13 bcdefg	0,23 ± 0,07 fgh
MD CuO	100	5,99 ± 0,60 cde	8,04 ± 0,72 abc	0,14 ± 0,01 fg	0,02 ± 0,0013 abc	107,17 ± 11,34 d	1,26 ± 0,30 bcd	0,46 ± 0,12 bcdefg	0,22 ± 0,05 abcdefg
MD CuO	150	4,73 ± 0,48 bcde	8,17 ± 0,71 abc	0,13 ± 0,01 def	0,02 ± 0,0072 abc	96,12 ± 9,52 d	1,20 ± 0,32 efg	0,45 ± 0,11 bcdefg	0,21 ± 0,06 defgh
MD CuO	1000	6,14 ± 0,69 bcde	8,37 ± 0,73 abc	0,11 ± 0,01 cd	0,02 ± 0,0011 abc	37,30 ± 5,2 ab	1,16 ± 0,30 bcd	0,44 ± 0,1 bcd	0,20 ± 0,05 abcdefg
ND CuO	0,1	5,50 ± 0,57 bcde	7,80 ± 0,74 abc	0,13 ± 0,01 de	0,02 ± 0,0023 ab	77,75 ± 9,33 cd	1,00 ± 0,23 ab	0,48 ± 0,14 cdefgh	0,20 ± 0,06 bcdefgh
ND CuO	1	4,02 ± 0,37 abcd	7,83 ± 0,68 abc	0,13 ± 0,01 ef	0,02 ± 0,0011 abc	64,70 ± 9,70 cd	1,07 ± 0,32 cde	0,47 ± 0,11 cdefgh	0,19 ± 0,04 ab
ND CuO	5	5,52 ± 0,62 abcd	8,28 ± 0,74 ab	0,14 ± 0,01 fg	0,01 ± 0,0013 abc	94,04 ± 11,88 cd	1,18 ± 0,32 efg	0,51 ± 0,15 fgh	0,21 ± 0,06 abcdef
ND CuO	10	6,37 ± 0,65 de	8,13 ± 0,71 abc	0,13 ± 0,01 efg	0,01 ± 0,0012 abc	91,17 ± 9,51 cd	1,25 ± 0,35 efg	0,49 ± 0,11 defgh	0,20 ± 0,04 abcde
ND CuO	50	4,17 ± 0,39 ab	7,84 ± 0,66 bc	0,11 ± 0,01 bc	0,02 ± 0,0013 abc	27,26 ± 5,44 ab	1,23 ± 0,31 def	0,50 ± 0,14 h	0,20 ± 0,06 abcdefg
ND CuO	100	4,00 ± 0,52 abcd	7,67 ± 0,68 a	0,10 ± 0,01 bc	0,02 ± 0,0013 abc	21,64 ± 2,13 a	1,11 ± 0,28 abc	0,51 ± 0,13 gh	0,19 ± 0,04 a
ND CuO	150	4,84 ± 0,51 abcde	8,13 ± 0,72 abc	0,1 ± 0,01 ab	0,02 ± 0,0014 abc	16,11 ± 3,40 a	1,07 ± 0,28 abc	0,52 ± 0,15 cdefgh	0,19 ± 0,06 abcd
ND CuO	1000	4,82 ± 0,52 abcd	8,04 ± 0,70 abc	0,09 ± 0,01 a	0,02 ± 0,0013 c	10,80 ± 1,04 a	1,03 ± 0,26 bcd	0,52 ± 0,13 efg	0,20 ± 0,05 bcdefgh

## PRILOGA L2

Izmerjenih podatki izbranih parametrov odziva semen in kalic tatarske ajde v kalitvenem testu (povprečje  $\pm$  SN). Podatki za kalitev 1. dan, kalitev 8. dan, SvM kalic, SM kalic, dolžino korenčic (n=15) in fenole, flavonoide, tanine (n=5). Različne črke (a-i) označujejo statistično značilne razlike med vplivi različnih tretmajev kontrole, MD CuO, ND CuO in Cu soli v različnih koncentracijah (Duncanov test,  $p < 0,05$ ).

Measured data for selected parameters of Tartary buckwheat seeds and seedlings response in germination test (mean  $\pm$  SN). Data for germination on 1. day, germination on 8. day, seedlings FW, seedlings DW, root length (n=15) and phenols, flavonoids and tannins (n=5). Different letters (a-h) present statistically significant differences between treatments of control, MPs CuO, NPs CuO and Cu salt in different concentrations (Duncan test,  $p < 0,05$ ).

Oblika spojine	Koncentracija spojine (mg l <sup>-1</sup> )	Kalitev 1. dan (št.semen)	Kalitev 8. dan (št.semen)	SvM (g)	SM (g)	Dolžina korenčic (mm)	Fenoli (% SM)	Flavonoidi (% SM)	Tanini (% SM)
kontrola	0	2,73 $\pm$ 0,37 a	9,07 $\pm$ 0,18 ab	0,11 $\pm$ 0,002 efg	0,02 $\pm$ 0,0003 ab	94,55 $\pm$ 5,19 g	2,6 $\pm$ 0,04 bcde	2,73 $\pm$ 0,09 bc	0,28 $\pm$ 0,02 a
Cu sol	0,01	3,8 $\pm$ 0,33 bcde	9,27 $\pm$ 0,23 ab	0,09 $\pm$ 0,005 bc	0,02 $\pm$ 0,0003 ab	83,24 $\pm$ 4,25 efg	2,63 $\pm$ 0,06 bcde	2,79 $\pm$ 0,02 c	0,28 $\pm$ 0,01 a
Cu sol	0,05	3,73 $\pm$ 0,36 bcde	9,07 $\pm$ 0,25 ab	0,12 $\pm$ 0,002 g	0,02 $\pm$ 0,0002 ab	93,68 $\pm$ 3,55 fg	2,57 $\pm$ 0,1 bcd	2,65 $\pm$ 0,03 abc	0,33 $\pm$ 0,02 abcd
Cu sol	0,1	4,27 $\pm$ 0,36 bcd	8,67 $\pm$ 0,23 a	0,11 $\pm$ 0,003 cdefg	0,02 $\pm$ 0,0003 a	86,39 $\pm$ 4,87 efg	2,86 $\pm$ 0,04 f	2,67 $\pm$ 0,03 abc	0,35 $\pm$ 0,01 abcde
Cu sol	0,5	3,8 $\pm$ 0,38 cde	8,8 $\pm$ 0,24 a	0,12 $\pm$ 0,002 efg	0,02 $\pm$ 0,0003 a	84,85 $\pm$ 4,12 fg	2,87 $\pm$ 0,08 f	2,8 $\pm$ 0,13 c	0,37 $\pm$ 0,01 bcdef
Cu sol	1	4,67 $\pm$ 0,33 abc	9,13 $\pm$ 0,22 ab	0,1 $\pm$ 0,004 bcd	0,02 $\pm$ 0,0003 ab	56,31 $\pm$ 4,07 cd	2,57 $\pm$ 0,07 bcd	2,73 $\pm$ 0,07 bc	0,33 $\pm$ 0 abcd
Cu sol	10	5,53 $\pm$ 0,4 cdefg	9,2 $\pm$ 0,17 ab	0,12 $\pm$ 0,003 fg	0,01 $\pm$ 0,0004 a	94,72 $\pm$ 4,61 g	2,58 $\pm$ 0,05 bcd	2,67 $\pm$ 0,03 abc	0,3 $\pm$ 0,02 abc
Cu sol	100	4,07 $\pm$ 0,38 ab	9,2 $\pm$ 0,2 ab	0,09 $\pm$ 0,002 ab	0,02 $\pm$ 0,0004 ab	10,97 $\pm$ 1,53 a	2,51 $\pm$ 0,09 bc	2,63 $\pm$ 0,06 abc	0,29 $\pm$ 0,02 ab
MD CuO	0,1	6,47 $\pm$ 0,34 cdefg	9,07 $\pm$ 0,23 ab	0,11 $\pm$ 0,004 g	0,02 $\pm$ 0,0002 ab	90,8 $\pm$ 4,57 efg	2,51 $\pm$ 0,09 bc	2,54 $\pm$ 0,05 ab	0,33 $\pm$ 0,03 abcd
MD CuO	1	6,93 $\pm$ 0,42 cdefgh	9,27 $\pm$ 0,25 a	0,12 $\pm$ 0,001 g	0,02 $\pm$ 0,0002 ab	71,16 $\pm$ 7 fg	2,62 $\pm$ 0,03 bcde	2,62 $\pm$ 0,04 abc	0,32 $\pm$ 0,02 abcd
MD CuO	5	6,53 $\pm$ 0,4 cdefg	9,27 $\pm$ 0,18 ab	0,11 $\pm$ 0,004 cdef	0,02 $\pm$ 0,0003 ab	84,78 $\pm$ 6,04 efg	2,69 $\pm$ 0,07 cdef	2,72 $\pm$ 0,06 abc	0,36 $\pm$ 0,05 bcdef
MD CuO	10	5,8 $\pm$ 0,42 cdef	9,13 $\pm$ 0,31 ab	0,12 $\pm$ 0,003 defg	0,02 $\pm$ 0,0003 ab	77,49 $\pm$ 5,32 ef	2,76 $\pm$ 0,09 def	2,8 $\pm$ 0,08 c	0,36 $\pm$ 0,01 bcde
MD CuO	50	5,87 $\pm$ 0,38 cdefg	9,27 $\pm$ 0,18 ab	0,12 $\pm$ 0,002 fg	0,01 $\pm$ 0,0004 a	83,5 $\pm$ 3,5 ef	2,67 $\pm$ 0,03 cdef	2,69 $\pm$ 0,05 abc	0,36 $\pm$ 0,02 bcde
MD CuO	100	5,33 $\pm$ 0,33 abc	9,27 $\pm$ 0,27 b	0,12 $\pm$ 0,003 fg	0,02 $\pm$ 0,0004 ab	78,81 $\pm$ 4,19 def	2,76 $\pm$ 0,04 def	2,59 $\pm$ 0,05 ab	0,37 $\pm$ 0,02 cdef
MD CuO	150	6,47 $\pm$ 0,32 defghi	9,07 $\pm$ 0,27 ab	0,12 $\pm$ 0,002 fg	0,02 $\pm$ 0,0002 a	79,03 $\pm$ 4,85 fg	2,64 $\pm$ 0,06 bcde	2,54 $\pm$ 0,02 ab	0,36 $\pm$ 0,02 abcde
MD CuO	1000	6,6 $\pm$ 0,49 cdefg	9,6 $\pm$ 0,16 ab	0,1 $\pm$ 0,003 bc	0,02 $\pm$ 0,0002 ab	24,29 $\pm$ 1,03 ab	2,58 $\pm$ 0,08 bcd	2,61 $\pm$ 0,05 abc	0,33 $\pm$ 0,01 abcd
ND CuO	0,1	6,67 $\pm$ 0,35 cdefgh	9,27 $\pm$ 0,18 ab	0,12 $\pm$ 0,003 efg	0,02 $\pm$ 0,0003 a	77,78 $\pm$ 5,89 fg	2,7 $\pm$ 0,07 cdef	2,53 $\pm$ 0,04 a	0,37 $\pm$ 0,04 cdef
ND CuO	1	8,13 $\pm$ 0,36 i	9,33 $\pm$ 0,16 ab	0,12 $\pm$ 0,003 g	0,01 $\pm$ 0,0002 a	105,52 $\pm$ 4,74 g	2,64 $\pm$ 0,09 bcde	2,57 $\pm$ 0,06 abc	0,33 $\pm$ 0,04 abcd
ND CuO	5	7,73 $\pm$ 0,43 ghi	9,4 $\pm$ 0,19 ab	0,12 $\pm$ 0,002 g	0,01 $\pm$ 0,0003 a	98,2 $\pm$ 6,51 fg	2,81 $\pm$ 0,08 ef	2,63 $\pm$ 0,06 abc	0,37 $\pm$ 0,02 cdef
ND CuO	10	5,67 $\pm$ 0,23 cdef	8,87 $\pm$ 0,17 ab	0,12 $\pm$ 0,003 efg	0,02 $\pm$ 0,0003 ab	72,23 $\pm$ 4,53 de	2,62 $\pm$ 0,08 bcde	2,55 $\pm$ 0,06 ab	0,41 $\pm$ 0,02 def
ND CuO	50	7,27 $\pm$ 0,4 hi	9,2 $\pm$ 0,2 ab	0,1 $\pm$ 0,001 cde	0,02 $\pm$ 0,0003 ab	33,68 $\pm$ 4,87 bc	2,66 $\pm$ 0,05 bcdef	2,56 $\pm$ 0,04 ab	0,44 $\pm$ 0,04 f
ND CuO	100	7,13 $\pm$ 0,41 efghi	8,93 $\pm$ 0,27 ab	0,09 $\pm$ 0,003 ab	0,02 $\pm$ 0,0006 ab	19,29 $\pm$ 3,79 ab	2,56 $\pm$ 0,04 bcd	2,57 $\pm$ 0,04 ab	0,4 $\pm$ 0,01 def
ND CuO	150	7,6 $\pm$ 0,38 fghi	9,47 $\pm$ 0,22 ab	0,09 $\pm$ 0,005 cdefg	0,02 $\pm$ 0,0009 b	11,72 $\pm$ 0,91 a	2,44 $\pm$ 0,03 b	2,54 $\pm$ 0,04 ab	0,37 $\pm$ 0,01 cdef
ND CuO	1000	6,53 $\pm$ 0,52 bcd	9,13 $\pm$ 0,22 a	0,08 $\pm$ 0,003 a	0,02 $\pm$ 0,0006 ab	12,93 $\pm$ 2,64 a	2,13 $\pm$ 0,07 a	2,62 $\pm$ 0,05 abc	0,42 $\pm$ 0,03 ef

PRILOGA M

PRILOGA M1

Diskriminantne spremenljivke odziva semen in kalic navadne ajde s postopno linearno diskriminantno analizo (9 spremenljivk, 24 skupin). Odebeljene črke in številke predstavljajo statistično značilen vpliv spremenljivk ( $p < 0,05$ ).

Discriminant variables of common buckwheat seeds and seedlings response with stepwise discriminant analysis (9 variables, 24 groups). Letters and numbers in bold represent statistically significant variables ( $p < 0.05$ ).

	Wilks' Lambda	Delna Wilks' Lambda	F-odstranjena (23,88)	p	Toleranca	1-Toler. (R-Sqr.)
<b>SvM</b>	<b>0,013238</b>	<b>0,411309</b>	<b>5,476137</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,725740</b>	<b>0,274260</b>
<b>Fenoli</b>	<b>0,011664</b>	<b>0,466820</b>	<b>4,369982</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,914296</b>	<b>0,085704</b>
<b>Dolžina koreničic</b>	<b>0,009830</b>	<b>0,553885</b>	<b>3,081644</b>	<b>0,000080</b>	<b>0,951038</b>	<b>0,048962</b>
<b>Flavonoidi</b>	<b>0,010217</b>	<b>0,532908</b>	<b>3,353548</b>	<b>0,000023</b>	<b>0,863140</b>	<b>0,136860</b>
<b>Tanini</b>	<b>0,009194</b>	<b>0,592184</b>	<b>2,634895</b>	<b>0,000630</b>	<b>0,837268</b>	<b>0,162732</b>
<b>Kalitev 1.dan</b>	<b>0,008601</b>	<b>0,633013</b>	<b>2,218165</b>	<b>0,004257</b>	<b>0,673125</b>	<b>0,326875</b>
Kalitev 8. dan	0,007470	0,728930	1,422822	0,123145	0,690116	0,309884
SM	0,007004	0,777428	1,095383	0,366606	0,829547	0,170454

PRILOGA M2

Diskriminantne spremenljivke odziva semen in kalic tatarske ajde s postopno linearno diskriminantno analizo (9 spremenljivk, 24 skupin). Odebeljene črke in številke predstavljajo statistično značilen vpliv spremenljivk ( $p < 0,05$ ).

Discriminant variables of Tartary buckwheat seeds and seedlings response with stepwise discriminant analysis (9 variables, 24 groups). Letters and numbers in bold represent statistically significant variables ( $p < 0.05$ ).

	Wilks' Lambda	Delna Wilks' Lambda	F-odstranjena (23,88)	p	Toleranca	1-Toler. (R-Sqr.)
<b>Dolžina koreničic</b>	<b>0,008412</b>	<b>0,406842</b>	<b>5,578265</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,954041</b>	<b>0,045959</b>
<b>Kalitev 1.dan</b>	<b>0,008193</b>	<b>0,417720</b>	<b>5,333378</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,772290</b>	<b>0,227710</b>
<b>Fenoli</b>	<b>0,006099</b>	<b>0,561175</b>	<b>2,991909</b>	<b>0,000121</b>	<b>0,951010</b>	<b>0,048991</b>
<b>SvM</b>	<b>0,008866</b>	<b>0,386012</b>	<b>6,085751</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,497924</b>	<b>0,502076</b>
<b>Tanini</b>	<b>0,005737</b>	<b>0,596503</b>	<b>2,588111</b>	<b>0,000781</b>	<b>0,929693</b>	<b>0,070307</b>
<b>Suha masa</b>	<b>0,005434</b>	<b>0,629789</b>	<b>2,249098</b>	<b>0,003699</b>	<b>0,536867</b>	<b>0,463133</b>
<b>Flavonoidi</b>	<b>0,005216</b>	<b>0,656084</b>	<b>2,005615</b>	<b>0,011041</b>	<b>0,912336</b>	<b>0,087664</b>
Kalitev 8. dan	0,004349	0,786962	1,035758	0,432218	0,739694	0,260306

## PRILOGA N

Ocenjene efektivne koncentracije posameznih bakrovih spojin na dolžino korenčic tretiranih kalic a) navadne ajde in b) tatarske ajde. Predstavljene so vrednosti efektivnih koncentracij na 10, 50 in 90 % poskusnih organizmov.

Estimated effective concentrations for different Cu compounds on root length of treated seedlings of a) common buckwheat and b) Tartary buckwheat. Only values affecting 10, 50 and 90 % tested organisms are presented.

### a) Navadna ajda

Oblika bakrove spojine	EK	Ocenjena vrednost	SN	Sp. EK	Zg. EK
Cu sol	EK <sub>10</sub>	11,91	6,85	-1,65	25,47
	EK <sub>50</sub>	44,68	12,28	20,34	69,01
	EK <sub>90</sub>	167,59	57,49	53,73	281,46
MD CuO	EK <sub>10</sub>	189,89	87,99	15,83	363,95
	EK <sub>50</sub>	634,73	119,56	398,22	871,24
	EK <sub>90</sub>	2121,62	629,10	877,19	3366,06
ND CuO	EK <sub>10</sub>	12,14	4,07	4,09	20,19
	EK <sub>50</sub>	40,05	6,31	27,56	52,54
	EK <sub>90</sub>	132,08	39,59	53,76	210,40

### b) Tatarska ajda

Oblika bakrove spojine	EK	Ocenjena vrednost	SN	Sp. EK	Zg. EK
Cu sol	EK <sub>10</sub>	32,53	19,01	-5,11	70,18
	EK <sub>50</sub>	59,64	17,21	25,55	93,74
	EK <sub>90</sub>	109,35	16,93	75,81	142,89
MD CuO	EK <sub>10</sub>	184,53	85,01	16,36	352,70
	EK <sub>50</sub>	614,30	113,05	390,66	837,94
	EK <sub>90</sub>	2045,00	585,06	887,68	3202,32
ND CuO	EK <sub>10</sub>	6,50	1,90	2,74	10,27
	EK <sub>50</sub>	33,67	4,76	24,24	43,11
	EK <sub>90</sub>	174,33	37,59	99,96	248,70



## PRILOGA O

Rezultati faktorске ANOVE vpliva vrste ajde, oblike Cu, koncentracije Cu in njihovih interakcij na kalitev semen 1. in 8. dan poskusa, svežo maso, suho maso, dolžino korenčice, fenole, flavonoide in tanine v kalicah navadne in tatarske ajde. Statistično značilne vplive prikazujejo odebeljene črke.

Results of factorial ANOVA impacts of buckwheatl species, Cu form, Cu concentration and their interaction on seed germination on 1. and 8. day, fresh biomass, dry biomass, root length, phenols, flavonoids and tannins in common and Tartary buckwheat seedlings. Statistically significant influence is marked as bold text.

Izbran parameter	Dejavnik vpliva	SS	Prostostne stopinje	MS	F	p
Kalitev 1. dan	vrsta ajde	5,400	1	5,400	2,7574	0,103322
	oblika Cu	<b>20,833</b>	2	<b>10,417</b>	<b>5,3191</b>	<b>0,008193</b>
	konc. Cu	5,400	1	5,400	2,7574	0,103322
	vrsta ajde*oblika Cu	<b>63,300</b>	2	<b>31,650</b>	<b>16,1617</b>	<b>0,000004</b>
	vrsta ajde*konc. Cu	1,067	1	1,067	0,5447	0,464092
	oblika Cu * konc. Cu	5,700	2	2,850	1,4553	0,243436
	vrsta ajde*oblika Cu*konc. Cu	11,233	2	5,617	2,8681	0,066587
Kalitev 8. dan	vrsta ajde	<b>4,267</b>	1	<b>4,267</b>	<b>6,095</b>	<b>0,017166</b>
	oblika Cu	0,033	2	0,017	0,024	0,976483
	konc. Cu	0,267	1	0,267	0,381	0,540011
	vrsta ajde*oblika Cu	0,633	2	0,317	0,452	0,638796
	vrsta ajde*konc. Cu	0,267	1	0,267	0,381	0,540011
	oblika Cu * konc. Cu	3,433	2	1,717	2,452	0,096809
	vrsta ajde*oblika Cu*konc. Cu	4,433	2	2,217	3,167	0,051074
Sveža masa	vrsta ajde	<b>0,019209</b>	1	<b>0,019209</b>	<b>119,937</b>	<b>0,000000</b>
	oblika Cu	<b>0,001480</b>	2	<b>0,000740</b>	<b>4,621</b>	<b>0,014611</b>
	konc. Cu	<b>0,006060</b>	1	<b>0,006060</b>	<b>37,840</b>	<b>0,000000</b>
	vrsta ajde*oblika Cu	<b>0,001589</b>	2	<b>0,000794</b>	<b>4,960</b>	<b>0,011017</b>
	vrsta ajde*konc. Cu	<b>0,000917</b>	1	<b>0,000917</b>	<b>5,723</b>	<b>0,020706</b>
	oblika Cu * konc. Cu	<b>0,006059</b>	2	<b>0,003030</b>	<b>18,917</b>	<b>0,000001</b>
	vrsta ajde*oblika Cu*konc. Cu	0,000111	2	0,000056	0,348	0,708147
Suha masa	vrsta ajde	<b>0,000055</b>	1	<b>0,000055</b>	<b>20,033</b>	<b>0,000047</b>
	oblika Cu	0,000001	2	0,000000	0,098	0,906691
	konc. Cu	0,000005	1	0,000005	1,882	0,176461
	vrsta ajde*oblika Cu	0,000002	2	0,000001	0,304	0,739597
	vrsta ajde*konc. Cu	0,000000	1	0,000000	0,058	0,811447
	oblika Cu * konc. Cu	0,000003	2	0,000001	0,463	0,631897
	vrsta ajde*oblika Cu*konc. Cu	<b>0,000018</b>	2	<b>0,000009</b>	<b>3,241</b>	<b>0,047819</b>

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge O

Izbran parameter	Dejavnik vpliva	SS	Prostostne stopinje	MS	F	p
Dolžina korenčice	vrsta ajde	<b>14992,9</b>	1	<b>14992,9</b>	<b>16,3500</b>	<b>0,000190</b>
	oblika Cu	<b>23242,4</b>	2	<b>11621,2</b>	<b>12,6731</b>	<b>0,000038</b>
	konc. Cu	<b>42389,8</b>	1	<b>42389,8</b>	<b>46,2266</b>	<b>0,000000</b>
	vrsta ajde*oblika Cu	<b>8499,2</b>	2	<b>4249,6</b>	<b>4,6342</b>	<b>0,014448</b>
	vrsta ajde*konc. Cu	4,1	1	4,1	0,0045	0,946981
	oblika Cu * konc. Cu	<b>20287,7</b>	2	<b>10143,8</b>	<b>11,0620</b>	<b>0,000112</b>
	vrsta ajde*oblika Cu*konc. Cu	342,3	2	171,2	0,1866	0,830336
Fenoli	vrsta ajde	<b>10,4596</b>	1	<b>10,4596</b>	<b>543,83</b>	<b>0,000000</b>
	oblika Cu	<b>0,8918</b>	2	<b>0,4459</b>	<b>23,18</b>	<b>0,000000</b>
	konc. Cu	<b>0,2339</b>	1	<b>0,2339</b>	<b>12,16</b>	<b>0,001053</b>
	vrsta ajde*oblika Cu	<b>0,1952</b>	2	<b>0,0976</b>	<b>5,07</b>	<b>0,010014</b>
	vrsta ajde*konc. Cu	0,0297	1	0,0297	1,54	0,220032
	oblika Cu * konc. Cu	<b>0,1680</b>	2	<b>0,0840</b>	<b>4,37</b>	<b>0,018069</b>
	vrsta ajde*oblika Cu*konc. Cu	0,1217	2	0,0608	3,16	0,051242
Flavonoidi	vrsta ajde	<b>55,9568</b>	1	<b>55,9568</b>	<b>5819,22</b>	<b>0,000000</b>
	oblika Cu	0,0567	2	0,0284	2,95	0,061878
	konc. Cu	0,0036	1	0,0036	0,38	0,541493
	vrsta ajde*oblika Cu	<b>0,1611</b>	2	<b>0,0806</b>	<b>8,38</b>	<b>0,000756</b>
	vrsta ajde*konc. Cu	0,0147	1	0,0147	1,53	0,222447
	oblika Cu * konc. Cu	0,0008	2	0,0004	0,04	0,960426
	vrsta ajde*oblika Cu*konc. Cu	0,0077	2	0,0039	0,40	0,671791
Tanini	vrsta ajde	0,008245	1	0,008245	2,560	0,116192
	oblika Cu	<b>0,061943</b>	2	<b>0,030972</b>	<b>9,615</b>	<b>0,000308</b>
	konc. Cu	0,000703	1	0,000703	0,218	0,642404
	vrsta ajde*oblika Cu	<b>0,026175</b>	2	<b>0,013087</b>	<b>4,063</b>	<b>0,023435</b>
	vrsta ajde*konc. Cu	0,002208	1	0,002208	0,686	0,411760
	oblika Cu * konc. Cu	0,010089	2	0,005045	1,566	0,219345
	vrsta ajde*oblika Cu*konc. Cu	0,002685	2	0,001342	0,417	0,661579

## PRILOGA P

Rezultati linearne diskriminantne analize izmerjenih podatkov odziva (kalitev 1. dan, kalitev 8. dan, SvM, SM, dolžina koreničic, fenoli, flavonoidi, tanini) semen in kalic navadne in tatarske ajde v kalitvenem poskusu z dodajanjem različnih bakrovih spojin (MD CuO, ND CuO, Cu sol) v različnih koncentracijah.

Linear discrimination analysis results for measured data of common and Tartary buckwheat seeds and seedlings response (germination 1. day, germination 8. day, FW, DW, root length, phenols, flavonoids, tannins) in germination experiment with addition of different Cu compounds (MPs CuO, NPs CuO, Cu salt) in different concentrations.

	Navadna ajda			Tatarska ajda		
	Lastne vrednosti			Lastne vrednosti		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3
Eigen-vrednost	1,66	0,47	0,13	1,58	0,06	0,04
Relativna pomembnost (%)	73,12	20,83	6,03	93,24	3,91	2,83
Kumulativa (%)	73,12	93,96	100	93,24	97,16	100
Bartlettov test značilnosti lastnih vrednosti						
	F1	F2	F3	F1	F2	F3
Eigen-vrednost	1,66	0,47	0,13	1,58	0,06	0,04
Bartlett-ova statistika	168,80	58,26	14,51	120,07	12,63	5,31
p	0,00	0,00	0,02	0,00	0,55	0,50
Korelacije dejavnik-funkcija LDA						
	F1	F2	F3	F1	F2	F3
Kalitev 1. dan	-0,115	0,664	-0,482	-0,708	0,127	0,292
Kalitev 8. dan	-0,085	0,156	0,130	-0,075	0,274	0,501
SvM	-0,546	0,354	0,200	0,115	0,924	0,256
SM	0,164	-0,002	0,532	-0,104	0,369	-0,220
Dolžina koreničic	-0,476	0,503	0,373	0,413	0,500	-0,096
Fenoli	0,251	0,687	0,456	0,185	0,057	0,625
Flavonoidi	0,834	0,152	-0,098	0,494	-0,309	0,260
Tanini	-0,356	0,319	-0,123	-0,623	0,094	-0,050

# PRILOGA R

## PRILOGA R1

Surovi podatki izmerjenih parametrov v hidropsonskem poskusu za navadno ajdo (povprečje ± SN). Podatki za SM korenin, SM poganjkov, MDA, kl<sub>a</sub>, kl<sub>b</sub>, kl<sub>ab</sub>, karotenoide, fenole, flavonoide, tanine ter vsebnosti P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn v koreninah in poganjkih tretiranih rastlin (n=5), kjer različne črke (a-h) označujejo statistično značilne razlike med vplivi tretmajev kontrole in MD CuO, ND CuO ter Cu soli v različnih koncentracijah (Duncanov test,  $p < 0,05$ ).

Raw data for measured parameters in germination test for common buckwheat (mean ± SE). Data for root DW, shoot DW, MDA, chl<sub>a</sub>, chl<sub>b</sub>, chl<sub>ab</sub>, carotenoids, phenols, flavonoids, tannins and P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn content in roots and shoots of treated plants (n=5), where different letters (a-h) present statistically significant differences between treatments of control, MPs CuO, NPs CuO and Cu salt in different concentrations (Duncan test,  $p < 0.05$ ).

Obilka splojne	Koncentracija Cu (mg l <sup>-1</sup> )	SM kor (g)	SM pog (g)	MDA (mmol g <sup>-1</sup> SM)	Kl <sub>a</sub> (mg g <sup>-1</sup> SM)	Kl <sub>b</sub> (mg g <sup>-1</sup> SM)	Kl <sub>ab</sub> (mg g <sup>-1</sup> SM)	Karotenoidi (mg g <sup>-1</sup> SM)	Flavonoidi (% SM)	Fenoli (% SM)	Tanini (% SM)
kontrola	0	0,14 ± 0,05 b	1,28 ± 0,30 c	569997 ± 44300 ab	2,62 ± 0,27 c	0,90 ± 0,2 d	3,50 ± 0,45 c	1,64 ± 0,28 b	0,74 ± 0,03 ab	2,57 ± 0,15 a	1,42 ± 0,09 de
MD CuO	1	0,11 ± 0,04 ab	1,16 ± 0,35 bc	1129997 ± 152971 bc	2,42 ± 0,25 c	0,77 ± 0,06 cd	3,18 ± 0,30 c	2,40 ± 0,25 c	0,90 ± 0,05, d	2,72 ± 0,10 a	1,13 ± 0,11 bed
MD CuO	10	0,08 ± 0,06 ab	0,88 ± 0,59 abc	1464991 ± 194229 cd	1,56 ± 0,16 b	0,59 ± 0,03 bc	2,14 ± 0,14 b	1,52 ± 0,03 b	0,85 ± 0,02 cd	2,60 ± 0,14 a	0,94 ± 0,05 bc
MD CuO	100	0,06 ± 0,02 ab	0,73 ± 0,22 abc	3084991 ± 322258 e	1,36 ± 0,07 b	0,50 ± 0,01 ab	1,85 ± 0,08 b	1,58 ± 0,08 b	0,82 ± 0,02 bed	2,63 ± 0,11 a	1,09 ± 0,08 bc
ND CuO	1	0,10 ± 0,05 ab	1,38 ± 0,36 c	1224993 ± 171574 bc	1,39 ± 0,09 b	0,53 ± 0,05 ab	1,91 ± 0,12 b	1,61 ± 0,18 b	0,78 ± 0,01 abc	2,58 ± 0,17 a	1,2 ± 0,11 cd
ND CuO	10	0,03 ± 0,01 ab	0,22 ± 0,07 ab	1854996 ± 281003 cd	0,67 ± 0,03 a	0,26 ± 0,01 a	0,93 ± 0,03 a	1,86 ± 0,10 b	0,87 ± 0,02 cd	2,91 ± 0,11 a	1,57 ± 0,08 e
ND CuO	100	0,01 ± 0,00 a	0,10 ± 0,04 a	5854996 ± 364040 f	0,46 ± 0,07 a	0,35 ± 0,06 ab	0,82 ± 0,13 a	1,00 ± 0,06 a	0,73 ± 0,07 ab	2,72 ± 0,07 a	0,93 ± 0,12 b
Cu sol	0,1	0,11 ± 0,04 ab	0,95 ± 0,21 abc	419998 ± 195000 a	1,48 ± 0,14 b	0,49 ± 0,05 ab	1,96 ± 0,19 b	1,84 ± 0,10 b	0,71 ± 0,02a	2,79 ± 0,12 a	1,01 ± 0,16 bc
Cu sol	1	0,04 ± 0,01 ab	0,44 ± 0,13 abc	2164990 ± 220596 d	1,25 ± 0,19 b	0,45 ± 0,07 ab	1,69 ± 0,25 b	1,43 ± 0,12 ab	0,73 ± 0,02 ab	2,67 ± 0,15 a	0,53 ± 0,01 a
Obilka splojne	Koncentracija Cu (mg l <sup>-1</sup> )	P kor (ppm)	S kor (ppm)	K kor (ppm)	Cu kor (ppm)	Mn kor (ppm)	Fe kor (ppm)	Cu kor (ppm)	Zn kor (ppm)		
kontrola	0	873 ± 87 a	2286 ± 247 d	13860 ± 1260 f	1396 ± 162 a	54 ± 5 abc	715 ± 122 a	36,40 ± 5,29 a	96,86 ± 11,28 ab		
MD CuO	1	1131 ± 132 a	1862 ± 281 bed	10528 ± 561 e	2104 ± 533 a	70 ± 10 cd	2563 ± 865 a	84 ± 129,15 a	166,04 ± 36,92 cd		
MD CuO	10	1446 ± 115 ab	1794 ± 166 bed	4930 ± 266 bc	2259 ± 420 a	50 ± 1 ab	2904 ± 241 ab	2408 ± 125,55 a	84,70 ± 8,75 ab		
MD CuO	100	2638 ± 387 cd	1519 ± 200 bc	6024 ± 1083 cd	2300 ± 367 a	43 ± 3 a	8318 ± 1287 c	44280 ± 11223,30 b	191,00 ± 25,12 d		
ND CuO	1	1890 ± 215 bc	2146 ± 125 nd	7690 ± 881 d	1180 ± 173 a	63 ± 3 bed	2774 ± 296 ab	317 ± 56,78 a	62,84 ± 11,07 ab		
ND CuO	10	3220 ± 286 de	1464 ± 91 b	2782 ± 268 ab	2370 ± 242 a	75 ± 8 d	13140 ± 929 d	5726 ± 738,64 a	65,38 ± 12,09 ab		
ND CuO	100	3915 ± 208 e	730 ± 85 a	806 ± 3 a	3750 ± 644 b	96 ± 6 e	15250 ± 783 e	38200 ± 6395,15 b	123,55 ± 27,03 bc		
Cu sol	0,1	2088 ± 238 bc	2098 ± 101 d	15460 ± 1341 f	1696 ± 188 a	66 ± 4 bed	1846 ± 171 a	75,44 ± 15,48 a	60,52 ± 5,93 a		
Cu sol	1	1984 ± 370 bc	2008 ± 114 cd	5832 ± 1088 cd	2182 ± 271 a	71 ± 6 cd	4962 ± 846 b	541,40 ± 89,63 a	78,62 ± 2,98 ab		
Obilka splojne	Koncentracija Cu (mg l <sup>-1</sup> )	P pog (ppm)	S pog (ppm)	K pog (ppm)	Cu pog (ppm)	Mn pog (ppm)	Fe pog (ppm)	Cu pog (ppm)	Zn pog (ppm)		
kontrola	0	1990 ± 159 d	2014 ± 251 abc	19200 ± 1739 e	2418 ± 428 a	190 ± 8 b	136 ± 5 a	23,42 ± 2,55 a	41,50 ± 4,37 a		
MD CuO	1	2622 ± 431 d	2076 ± 313 bc	18620 ± 1510 bc	3110 ± 334 ab	200 ± 24 b	158 ± 2 ab	77,84 ± 12,57 ab	38,82 ± 3,42 a		
MD CuO	10	1846 ± 225 bc	1829 ± 311 abc	16320 ± 1563 abc	2208 ± 173 a	125 ± 10 ab	103 ± 6 a	121,62 ± 18,19 ab	37,40 ± 2,06 a		
MD CuO	100	962 ± 254 a	1464 ± 245 abc	13640 ± 770 ab	2806 ± 645 a	122 ± 14 ab	106 ± 11 a	177,20 ± 20,48 b	39,02 ± 6,67 a		
ND CuO	1	1116 ± 229 ab	1540 ± 189 abc	14980 ± 1779 abc	2672 ± 276 a	196 ± 54 b	167 ± 27 ab	179,30 ± 26,93 b	58,02 ± 28,66 a		
ND CuO	10	1443 ± 224 abc	2410 ± 271 c	14080 ± 757 abc	1712 ± 233 a	104 ± 10 a	158 ± 10 ab	201,60 ± 25,23 b	42,18 ± 4,43 a		
ND CuO	100	1390 ± 256 abc	4010 ± 855 d	13220 ± 1156 a	4160 ± 822 b	189 ± 30 b	216 ± 49 b	523,80 ± 127,75 c	51,60 ± 5,94 a		
Cu sol	0,1	985 ± 213 a	865 ± 156 a	17140 ± 2384 abc	2282 ± 182 a	162 ± 26 ab	134 ± 18 a	28,78 ± 2,26 a	47,84 ± 3,23 a		
Cu sol	1	850 ± 32 a	969 ± 152 ab	16118 ± 1984 abc	2688 ± 240 a	121 ± 15 ab	128 ± 26 a	107,58 ± 12,27 ab	38,10 ± 4,76 a		

PRILOGA R2

Surovi podatki izmerjenih parametrov v hidroponskem poskusu za tatarsko ajdo (povprečje ± SN). Podatki za SM korenin, SM poganjkov, MDA, kl<sub>a</sub>, kl<sub>b</sub>, kl<sub>ab</sub>, karotenoide, fenole, flavonoide, tanine ter vsebnosti P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn v koreninah in poganjkih tretiranih rastlin (n=5), kjer različne črke (a-h) označujejo statistično značilne razlike med vplivi tretmajev kontrole in MD CuO, ND CuO ter Cu soli v različnih koncentracijah (Duncanov test,  $p < 0,05$ ).

Raw data for measured parameters in germination test for Tartary buckwheat (mean ± SE). Data for root DW, shoot DW, MDA, chl<sub>a</sub>, chl<sub>b</sub>, chl<sub>ab</sub>, carotenoids, phenols, flavonoids, tannins and P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn content in roots and shoots of treated plants (n=5), where different letters (a-h) present statistically significant differences between treatments of control, MPs CuO, NPs CuO and Cu salt in different concentrations (Duncan test,  $p < 0,05$ ).

Oblika spojine	Koncentracija Cu (mg l <sup>-1</sup> )	SM korenin (g)	SM poganjkov (g)	MDA (nmol g <sup>-1</sup> SM)	Kl <sub>a</sub> (mg g <sup>-1</sup> SM)	Kl <sub>b</sub> (mg g <sup>-1</sup> SM)	Kl <sub>ab</sub> (mg g <sup>-1</sup> SM)	Karotenoidi (mg g <sup>-1</sup> SM)	Flavonoidi (% SM)	Fenoli (% SM)	Tanini (% SM)
kontrola	0	0,16 ± 0,04 c	1,47 ± 0,62 b	469998 ± 150499 a	3,58 ± 0,21 d	1,11 ± 0,10 e	4,67 ± 0,31 d	3,58 ± 0,06 e	0,93 ± 0,02 c	3,06 ± 0,15 b	0,75 ± 0,08 a
MD CuO	1	0,11 ± 0,03 c	1,50 ± 0,52 b	884998 ± 141995 ab	2,66 ± 0,25 c	0,82 ± 0,0 cde	3,47 ± 0,33 c	1,98 ± 0,24 bc	0,87 ± 0,03 c	3,00 ± 0,13 b	0,81 ± 0,19 ab
MD CuO	10	0,10 ± 0,04 c	1,15 ± 0,52 ab	1749996 ± 173745 bc	2,51 ± 0,28 c	0,89 ± 0,23 de	3,38 ± 0,51 c	1,9 ± 0,13 bc	0,77 ± 0,02 ab	2,88 ± 0,16 b	1,32 ± 0,0 c
MD CuO	100	0,02 ± 0,00 ab	0,35 ± 0,07 a	3004996 ± 257560 d	2,43 ± 0,30 c	0,85 ± 0,05 cde	3,27 ± 0,35 c	2,86 ± 0,33 d	0,88 ± 0,03 c	2,44 ± 0,10 a	1,19 ± 0,10 abc
ND CuO	1	0,10 ± 0,03 bc	0,90 ± 0,38 ab	1579997 ± 377525 bc	2,66 ± 0,12 c	0,75 ± 0,04 bcd	3,40 ± 0,16 c	2,66 ± 0,17 d	0,87 ± 0,02 c	2,95 ± 0,06 b	1,23 ± 0,17 bc
ND CuO	10	0,01 ± 0,01 a	0,17 ± 0,06 a	1979998 ± 549170 c	1,52 ± 0,15 b	0,57 ± 0,01 abc	2,08 ± 0,15 ab	2,47 ± 0,20 cd	0,94 ± 0,01 c	3,18 ± 0,07 b	1,93 ± 0,23 d
ND CuO	100	0,01 ± 0,00 a	0,05 ± 0,02 a	7029995 ± 143483 e	0,89 ± 0,10 a	0,47 ± 0,04 ab	1,35 ± 0,0 a	1,54 ± 0,19 ab	0,69 ± 0,01 a	2,19 ± 0,01 a	1,15 ± 0,12 abc
Cu sol	0,1	0,08 ± 0,03 abc	0,59 ± 0,20 ab	479998 ± 167779 a	1,61 ± 0,03 b	0,44 ± 0,01 a	2,03 ± 0,04m ab	1,43 ± 0,08 ab	0,78 ± 0,03 b	2,96 ± 0,19 b	1,50 ± 0,07 c
Cu sol	1	0,02 ± 0,00 ab	0,17 ± 0,05 a	1109999 ± 485451 abc	1,48 ± 0,06 b	0,1 ± 0,00 abc	2,21 ± 0,14 b	1,19 ± 0,0 a	0,88 ± 0,07 c	2,87 ± 0,08 b	1,08 ± 0,16 abc
Oblika spojine	Koncentracija Cu (mg l <sup>-1</sup> )	P kor (ppm)	S kor (ppm)	K kor	Ca kor (ppm)	Mn kor (ppm)	Fe kor (ppm)	Cu kor (ppm)	Zn kor (ppm)		
kontrola	0	1242 ± 207 a	2650 ± 284 e	15200 ± 1963 c	1366 ± 209 a	70 ± 4 a	645 ± 71 a	44 ± 6,3 a	87,0 ± 16,9 a		
MD CuO	1	1371 ± 170 ab	2552 ± 184 de	15560 ± 1370 c	1681 ± 305 ab	69 ± 8 a	1195 ± 137m a	597 ± 109,2 a	65,7 ± 8,6 a		
MD CuO	10	1601 ± 314 ab	2378 ± 232 cde	11332 ± 453 b	1520 ± 164 ab	62 ± 5 a	3242 ± 1075 ab	2634 ± 967,5 a	50,9 ± 6,8 a		
MD CuO	100	2483 ± 309 bcd	1885 ± 148 abc	5867 ± 336 a	1937 ± 105 ab	55 ± 9 a	9520 ± 1877 cd	37176 ± 5648,4 b	150,3 ± 17,0 b		
ND CuO	1	1980 ± 258 abc	2008 ± 179 abcd	10580 ± 1890 b	1908 ± 338 ab	72 ± 1 ab	3666 ± 815 ab	567 ± 160,7 a	57,3 ± 4,2 a		
ND CuO	10	4731 ± 428 e	2116 ± 261 bcde	3783 ± 329 a	3947 ± 294 d	80 ± 6 ab	18431 ± 3127 e	7232 ± 2057,0 a	89,2 ± 26,0 a		
ND CuO	100	3350 ± 742 d	1420 ± 85 a	3885 ± 110 a	5075 ± 123 c	99 ± 2 b	12225 ± 2851 d	73800 ± 10375,4 c	303,5 ± 27,5 c		
Cu sol	0,1	2940 ± 316 cd	2426 ± 106 cde	12444 ± 1124 bc	2258 ± 268 b	77 ± 16 ab	4082 ± 952 ab	96 ± 6,0 a	85,0 ± 4,4 a		
Cu sol	1	1427 ± 279 ab	1615 ± 208 ab	5590 ± 9 a	2140 ± 170 c	83 ± 8 ab	7020 ± 1100 bc	638 ± 37,8 a	53,9 ± 3,3 a		
Oblika spojine	Koncentracija Cu (mg l <sup>-1</sup> )	P pog (ppm)	S pog (ppm)	K pog	Ca pog (ppm)	Mn pog (ppm)	Fe pog (ppm)	Cu pog (ppm)	Zn pog (ppm)		
kontrola	0	2200 ± 466 b	1748 ± 188 ab	19560 ± 2973 a	2116 ± 355 ab	280 ± 71 d	248 ± 26 d	46,54 ± 11,5 a	35,98 ± 4,23 a		
MD CuO	1	1868 ± 243 ab	899 ± 171 a	21040 ± 1587 a	2036 ± 268 ab	225 ± 21 abc	203 ± abc	82,96 ± 7,34 ab	38,46 ± 1,95 a		
MD CuO	10	1488 ± 210 ab	1310 ± 163 a	20860 ± 254 a	2086 ± 58 ab	193 ± 10 abc	217 ± 24 bcd	207,60 ± 42,39 bc	33,88 ± 3,78 a		
MD CuO	100	1117 ± 312 a	1914 ± 484 ab	17800 ± 2720 a	3352 ± 623 cd	159 ± 20 ab	184 ± 25 abc	303,00 ± 61,85 cd	38,30 ± 5,84 a		
ND CuO	1	1748 ± 220 ab	1154 ± 231 a	16560 ± 1842 a	1636 ± 150 a	134 ± 25 a	169 ± 16 ab	147,12 ± 29,10 ab	29,30 ± 1,40 a		
ND CuO	10	1251 ± 327 ab	2678 ± 526 bc	20320 ± 1937 a	2632 ± 139 abc	154 ± 14 ab	208 ± 9 bcd	352,80 ± 90,72 d	35,60 ± 1,95 a		
ND CuO	100	1828 ± 309 ab	4561 ± 615 d	20980 ± 950 a	4771 ± 649 e	207 ± 10 abc	230 ± 13 cd	753,73 ± 65,54 e	59,13 ± 12,49 b		
Cu sol	0,1	1747 ± 245 ab	829 ± 93 a	29140 ± 3753 b	2908 ± 472 bc	231 ± 30 cd	150 ± 1 a	37,16 ± 3,94 a	40,78 ± 3,81 a		
Cu sol	1	2051 ± 393 ab	3344 ± 522 c	18360 ± 1784 a	4182 ± 233 de	138 ± 6 ab	197 ± 9 abcd	165,40 ± 6,39 abc	36,14 ± 2,15 a		

PRILOGA R3

Korelacije med vsemi merjenimi parametri v hidroponskem poskusu. Levo so vrednosti za navadno ajdo, desno pa za tatarsko ajdo (k-korenine, p-poganjki).

Correlations between all measured parameters in hydroponics experiment. Left are values for common buckwheat and right for Tartary buckwheat (k-roots, p-shoots).

	SM-k	SM-p	MDA	KL <sub>a</sub>	KL <sub>b</sub>	KL <sub>lab</sub>	Karote Flavono- noidi	Fenoli	Tanini	P-k	S-k	K-k	Ca-k	Mn-k	Fe-k	Cu-k	Zn-k	P-p	S-p	K-p	Ca-p	Mn-p	Fe-p	Cu-p	Zn-p	
SM-k	1	0.874	-0.389	0.424	0.347	0.417	0.122	-0.077	0.240	0.018	-0.398	0.204	0.320	-0.139	-0.109	-0.353	-0.218	0.065	-0.257	0.114	-0.092	-0.009	-0.125	-0.356	-0.141	
SM-p	0.794	1	-0.443	0.496	0.407	0.488	0.036	0.002	0.014	0.019	-0.443	0.329	0.368	-0.218	-0.161	-0.436	-0.236	0.051	-0.327	0.230	-0.116	0.192	-0.083	-0.355	0.041	
MDA	-0.377	-0.303	1	-0.563	-0.352	-0.525	-0.523	-0.038	0.021	-0.245	0.672	-0.685	-0.662	0.551	0.431	0.762	0.727	0.310	0.488	-0.397	0.348	-0.054	0.262	0.694	0.046	
KL <sub>a</sub>	0.401	0.328	-0.507	1	0.844	0.990	0.394	0.133	-0.204	0.097	-0.737	0.461	0.655	-0.325	-0.380	-0.690	-0.346	0.247	-0.334	0.429	-0.170	0.131	-0.277	-0.611	-0.128	
KL <sub>b</sub>	0.161	0.076	-0.336	0.810	1	0.911	0.182	0.198	-0.138	0.037	-0.619	0.441	0.534	-0.289	-0.299	-0.541	-0.221	0.155	-0.250	0.454	-0.128	0.123	-0.252	-0.445	-0.193	
KL <sub>lab</sub>	0.354	0.276	-0.482	0.989	0.889	1	0.351	0.154	-0.193	0.084	-0.729	0.470	0.643	-0.326	-0.370	-0.672	-0.324	0.231	-0.322	0.449	-0.165	0.133	-0.279	-0.587	-0.149	
Karotenoidi	0.258	0.146	-0.161	0.753	0.516	0.720	1	0.372	0.033	0.276	-0.408	0.253	0.331	-0.324	-0.353	-0.369	-0.372	0.007	-0.249	0.120	-0.288	-0.156	-0.242	-0.467	-0.264	
Flavono- noidi	0.013	0.093	-0.561	0.391	0.394	0.407	0.367	1	0.011	0.289	-0.090	-0.003	-0.138	0.017	0.171	0.085	0.008	0.207	-0.176	0.060	-0.334	-0.208	-0.226	-0.219	-0.041	
Fenoli	0.294	0.248	-0.640	0.307	0.120	0.271	0.134	0.400	1	0.060	0.184	-0.232	-0.093	0.148	0.200	0.206	-0.034	-0.064	0.070	-0.147	0.088	-0.211	-0.012	0.052	-0.171	
Tanini	-0.340	-0.326	0.051	-0.292	-0.295	-0.304	-0.097	-0.003	0.180	1	-0.008	0.056	0.121	-0.158	-0.141	0.068	-0.072	0.020	0.189	0.161	-0.107	0.077	0.030	-0.075	0.070	
P-k	-0.416	-0.430	0.349	-0.449	-0.349	-0.440	-0.040	-0.105	-0.116	0.565	1	-0.565	-0.614	0.535	0.396	0.871	0.649	0.161	-0.271	0.405	-0.418	0.139	-0.076	0.458	0.660	
S-k	0.384	0.297	-0.485	0.429	0.198	0.386	0.283	0.099	0.404	-0.075	-0.245	1	0.619	-0.651	-0.326	-0.677	-0.451	-0.278	0.056	-0.460	0.468	-0.429	0.124	-0.193	-0.570	
K-k	0.611	0.481	-0.534	0.569	0.296	0.520	0.233	0.044	0.384	-0.433	-0.516	0.723	1	-0.491	-0.259	-0.763	-0.474	-0.095	0.140	-0.409	0.455	-0.111	0.330	-0.175	-0.612	
Ca-k	-0.433	-0.409	0.732	-0.678	-0.466	-0.649	-0.273	-0.280	-0.298	0.278	0.605	-0.458	-0.623	1	0.540	0.662	0.448	0.477	0.086	0.333	-0.195	0.368	-0.083	0.334	0.501	
Mn-k	-0.141	-0.132	0.304	-0.385	-0.262	-0.367	-0.272	-0.041	0.006	-0.050	0.200	-0.405	-0.222	0.586	1	0.507	0.106	0.059	-0.008	0.400	-0.046	0.319	0.209	0.556	0.479	
Fe-k	-0.536	-0.446	0.472	-0.499	-0.272	-0.460	-0.088	0.006	-0.132	0.492	0.874	-0.498	-0.732	0.691	0.337	1	0.654	0.253	-0.120	0.509	-0.386	0.166	-0.191	0.365	0.694	
Cu-k	-0.382	-0.315	0.894	-0.447	-0.249	-0.413	-0.138	-0.417	-0.695	-0.039	0.234	-0.467	-0.504	0.674	0.265	0.357	1	0.629	-0.178	0.348	-0.355	0.167	-0.107	0.207	0.570	
Zn-k	-0.288	-0.263	0.859	-0.440	-0.274	-0.414	-0.110	-0.407	-0.631	-0.083	0.282	-0.471	-0.447	0.748	0.364	0.375	0.949	1	0.314	0.149	-0.017	0.231	0.028	0.137	0.155	
P-p	0.236	0.138	-0.066	0.084	0.180	0.112	-0.037	0.066	0.009	-0.182	-0.262	0.146	0.289	-0.079	0.194	-0.261	0.010	0.053	1	0.136	0.530	0.136	0.273	0.041	-0.171	
S-p	-0.393	-0.361	0.608	-0.524	-0.209	-0.463	-0.263	-0.089	-0.382	0.196	0.256	-0.553	-0.596	0.613	0.364	0.476	0.611	0.603	0.304	1	-0.057	0.532	0.286	0.625	0.816	
K-p	0.099	0.167	-0.092	-0.239	-0.264	-0.254	-0.340	-0.007	0.221	0.064	0.057	0.184	0.207	0.160	0.440	-0.017	0.007	0.076	0.363	0.014	1	0.077	0.390	0.059	-0.292	
Ca-p	-0.399	-0.382	0.513	-0.616	-0.282	-0.554	-0.492	-0.188	-0.382	0.054	0.146	-0.465	-0.450	0.524	0.453	0.339	0.626	0.581	0.342	0.759	0.334	1	0.546	0.458	0.580	
Mn-p	0.349	0.309	-0.070	0.117	-0.008	0.089	0.091	-0.043	0.143	-0.248	-0.142	0.462	0.550	-0.086	0.150	-0.257	0.002	0.062	0.543	-0.036	0.608	0.194	1	0.565	0.237	
Fe-p	0.097	0.066	0.213	0.015	0.095	0.036	0.124	0.004	-0.161	-0.161	-0.027	0.177	0.065	0.035	0.019	-0.024	0.220	0.181	0.528	0.399	0.000	0.260	0.435	1	0.678	
Cu-p	-0.430	-0.330	0.887	-0.563	-0.352	-0.530	-0.206	-0.352	-0.561	0.226	0.380	-0.420	-0.633	0.751	0.277	0.505	0.834	0.788	0.079	0.755	0.015	0.609	-0.039	0.380	1	
Zn-p	-0.114	-0.104	0.494	-0.418	-0.167	-0.369	-0.350	-0.285	-0.385	-0.033	0.059	-0.117	-0.117	0.445	0.312	0.103	0.610	0.596	0.439	0.494	0.361	0.729	0.356	0.398	0.594	1

## PRILOGA S

### PRILOGA S1

Diskriminantne spremenljivke odziva rastlin navadne ajde s postopno diskriminantno analizo (26 spremenljivk, 9 skupin). Odebeljene črke in številke predstavljajo statistično značilen vpliv spremenljivk ( $p < 0,05$ ).

Discriminant variables of common buckwheat plants response with stepwise discriminant analysis (26 variables, 9 groups). Letters and numbers in bold represent statistically significant variables ( $p < 0.05$ ).

	Wilks' Lambda	Delna Wilks' Lambda	F-odstranjena (23,88)	P	Toleranca	1-Toler. (R-Sqr.)
<b>Fe v koreninah</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,242827</b>	<b>7,015867</b>	<b>0,000309</b>	<b>0,182446</b>	<b>0,817554</b>
MDA	<b>0,000000</b>	<b>0,245731</b>	<b>6,906354</b>	<b>0,000340</b>	<b>0,428193</b>	<b>0,571807</b>
<b>Zn v koreninah</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,315080</b>	<b>4,891035</b>	<b>0,002488</b>	<b>0,104545</b>	<b>0,895455</b>
<b>K v koreninah</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,279179</b>	<b>5,809352</b>	<b>0,000955</b>	<b>0,426516</b>	<b>0,573484</b>
<b>Cu v koreninah</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,344873</b>	<b>4,274144</b>	<b>0,005011</b>	<b>0,132539</b>	<b>0,867461</b>
<b>S v koreninah</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,451199</b>	<b>2,736719</b>	<b>0,036244</b>	<b>0,287180</b>	<b>0,712820</b>
Tanini	<b>0,000000</b>	<b>0,406544</b>	<b>3,284461</b>	<b>0,017194</b>	<b>0,560040</b>	<b>0,439960</b>
<b>Cu v poganjkih</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,469474</b>	<b>2,542598</b>	<b>0,047727</b>	<b>0,088039</b>	<b>0,911961</b>
<b>S v poganjkih</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,386730</b>	<b>3,568017</b>	<b>0,011900</b>	<b>0,152148</b>	<b>0,847852</b>
Flavonoidi	<b>0,000000</b>	<b>0,440944</b>	<b>2,852686</b>	<b>0,030832</b>	<b>0,414668</b>	<b>0,585333</b>
Ca v koreninah	0,000000	0,496119	2,285204	0,069318	0,232858	0,767142
<b>P v poganjkih</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,329732</b>	<b>4,573733</b>	<b>0,003545</b>	<b>0,240438</b>	<b>0,759562</b>
Ca v poganjkih	0,000000	0,490497	2,337182	0,064240	0,181087	0,818913
<b>Mn v koreninah</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,389242</b>	<b>3,530461</b>	<b>0,012486</b>	<b>0,273221</b>	<b>0,726779</b>
Karotenoidi	<b>0,000000</b>	<b>0,442259</b>	<b>2,837516</b>	<b>0,031487</b>	<b>0,468726</b>	<b>0,531274</b>
Klorofil a	0,000000	0,643198	1,248146	0,328491	0,563072	0,436928
P v koreninah	0,000000	0,564122	1,738499	0,157004	0,241162	0,758838
K v poganjkih	0,000000	0,576368	1,653756	0,178524	0,313982	0,686018
Fe v poganjkih	0,000000	0,610889	1,433154	0,249247	0,187239	0,812761

### PRILOGA S2

Diskriminantne spremenljivke odziva rastlin tatarske ajde s postopno diskriminantno analizo (26 spremenljivk, 9 skupin). Odebeljene črke in številke predstavljajo statistično značilen vpliv spremenljivk ( $p < 0,05$ ).

Discriminant variables of Tartary buckwheat plants response with stepwise discriminant analysis (26 variables, 9 groups). Letters and numbers in bold represent statistically significant variables ( $p < 0.05$ ).

	Wilks' Lambda	Delna Wilks' Lambda	F-odstranjena (23,88)	P	Toleranca	1-Toler. (R-Sqr.)
MDA	0,000000	0,649544	1,14653	0,383573	0,244123	0,755876
<b>Karotenoidi</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,119737</b>	<b>15,62220</b>	<b>0,000002</b>	<b>0,076530</b>	<b>0,923470</b>
K v koreninah	0,000000	0,508644	2,05278	0,101254	0,222091	0,777910
<b>Ca v koreninah</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,214251</b>	<b>7,79326</b>	<b>0,000208</b>	<b>0,158219</b>	<b>0,841781</b>
<b>Zn v koreninah</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,225372</b>	<b>7,30388</b>	<b>0,000308</b>	<b>0,062946</b>	<b>0,937054</b>
Klorofil a	<b>0,000000</b>	<b>0,200245</b>	<b>8,48701</b>	<b>0,000123</b>	<b>0,035243</b>	<b>0,964758</b>
Flavonoidi	<b>0,000000</b>	<b>0,425308</b>	<b>2,87138</b>	<b>0,032146</b>	<b>0,293743</b>	<b>0,706257</b>
Klorofil b	<b>0,000000</b>	<b>0,203779</b>	<b>8,30297</b>	<b>0,000141</b>	<b>0,048044</b>	<b>0,951956</b>
<b>P v koreninah</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,071906</b>	<b>27,42730</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,018527</b>	<b>0,981473</b>
Fe v koreninah	<b>0,000000</b>	<b>0,105094</b>	<b>18,09490</b>	<b>0,000001</b>	<b>0,020893</b>	<b>0,979106</b>
<b>Fe v poganjkih</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,163617</b>	<b>10,86266</b>	<b>0,000025</b>	<b>0,090390</b>	<b>0,909610</b>
<b>P v poganjkih</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,223638</b>	<b>7,37696</b>	<b>0,000290</b>	<b>0,098630</b>	<b>0,901370</b>
<b>Cu v koreninah</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,253558</b>	<b>6,25574</b>	<b>0,000762</b>	<b>0,087258</b>	<b>0,912742</b>
<b>K v poganjkih</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,344116</b>	<b>4,05025</b>	<b>0,007361</b>	<b>0,205961</b>	<b>0,794039</b>
<b>Cu v poganjkih</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,380149</b>	<b>3,46491</b>	<b>0,014907</b>	<b>0,123612</b>	<b>0,876388</b>
<b>Zn v poganjkih</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,348221</b>	<b>3,97745</b>	<b>0,008014</b>	<b>0,120777</b>	<b>0,879223</b>
<b>Ca v poganjkih</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,254394</b>	<b>6,22818</b>	<b>0,000782</b>	<b>0,108879</b>	<b>0,891122</b>
<b>S v koreninah</b>	<b>0,000000</b>	<b>0,367395</b>	<b>3,65897</b>	<b>0,011732</b>	<b>0,159736</b>	<b>0,840264</b>
Fenoli	0,000000	0,588340	1,48686	0,233433	0,380180	0,619820
Tanini	0,000000	0,605704	1,38331	0,272003	0,428474	0,571526

PRILOGA T

PRILOGA T1

Vrednosti parametrov linearne diskriminantne analize vseh izmerjenih podatkov odziva rastlin navadne in tatarske ajde v hidroponskem poskusu z dodajanjem različnih bakrovih spojin (MD CuO, ND CuO, Cu sol) v različnih koncentracijah.

Values of linear discrimination analysis parameters of all measured data of common and Tartary buckwheat plants response in hydroponics experiment with supplementation of different Cu compounds (MPs CuO, NPs CuO, Cu salt) in different concentrations.

Navadna ajda				Tatarska ajda			
	Lastne vrednosti				Lastne vrednosti		
	F1	F2	F3		F1	F2	F3
Eigen-vrednost	12,09	8,82	3,10	Eigen-vrednost	18,44	11,26	2,58
Relativna pomembnost (%)	50,33	36,73	12,92	Relativna pomembnost (%)	57,12	34,87	8,01
Kumulativa (%)	50,33	87,07	100	Kumulativa (%)	57,12	91,99	100
Bartlettov test značilnosti lastnih vrednosti				Bartlettov test značilnosti lastnih vrednosti			
	F1	F2	F3		F1	F2	F3
Eigen-vrednost	12,09	8,82	3,10	Eigen-vrednost	18,44	11,26	2,58
Bartlett-ova statistika	184,95	109,07	41,66	Bartlett-ova statistika	199,16	111,62	37,68
p	0,00	0,00	0,01	p	0,00	0,00	0,02
Korelacije dejavnik-funkcija LDA				Korelacije dejavnik-funkcija LDA			
	F1	F2	F3		F1	F2	F3
SM korenin	-0,207	-0,223	-0,170	SM korenin	0,501	-0,049	0,067
SM poganjkov	-0,268	-0,134	-0,121	SM poganjkov	0,443	0,003	-0,115
MDA	0,177	0,466	0,168	MDA	-0,307	0,517	-0,028
Kl <sub>a</sub>	-0,620	-0,433	-0,260	Kl <sub>a</sub>	0,765	0,069	-0,086
Kl <sub>b</sub>	-0,562	-0,286	-0,284	Kl <sub>b</sub>	0,642	0,024	-0,108
Kl <sub>ab</sub>	-0,624	-0,408	-0,274	Kl <sub>ab</sub>	0,762	0,060	-0,095
Karotenoidi	-0,228	-0,132	0,178	Karotenoidi	0,642	0,420	0,194
Flavonoidi	-0,370	0,312	0,375	Flavonoidi	0,282	0,019	0,160
Fenoli	0,192	0,059	0,072	Fenoli	0,138	-0,148	0,188
Tanini	-0,233	0,439	-0,426	Tanini	-0,485	0,124	0,043
P-k	0,484	0,477	0,151	Kl <sub>a</sub>	-0,462	0,329	0,188
S-k	-0,106	-0,483	-0,232	S-k	0,450	-0,113	-0,072
K-k	-0,172	-0,635	-0,320	K-k	0,551	-0,222	-0,074
Ca-k	0,093	0,245	0,219	Ca-k	-0,530	0,422	0,310
Mn-k	0,511	0,269	-0,077	Mn-k	-0,300	0,054	0,386
Fe-k	0,317	0,612	0,111	Fe-k	-0,462	0,343	0,112
Cu-k	-0,115	0,321	0,227	Cu-k	-0,194	0,405	-0,050
Zn-k	-0,492	0,060	0,309	Zn-k	-0,157	0,369	0,127
P-p	-0,520	0,110	-0,072	P-p	0,129	-0,167	0,301
S-p	-0,051	0,563	-0,177	S-p	-0,273	0,179	0,323
K-p	-0,217	-0,335	-0,188	K-p	-0,105	-0,307	0,040
Ca-p	0,015	0,147	0,061	Ca-p	-0,328	-0,166	0,119
Mn-p	-0,071	0,089	-0,235	Mn-p	0,427	-0,106	0,150
Fe-p	0,259	0,374	-0,179	Fe-p	0,378	0,240	0,145
Cu-p	0,247	0,603	0,067	Cu-p	-0,352	0,523	0,023
Zn-p	0,168	0,153	-0,089	Zn-p	-0,126	0,080	0,071



## PRILOGA T2

Vrednosti parametrov linearne diskriminantne analize fiziološkega in rastnega odziva rastlin navadne in tatarske ajde v hidroponskem poskusu z dodajanjem različnih bakrovih spojin (MD CuO, ND CuO, Cu sol) v različnih koncentracijah.

Values of linear discrimination analysis parameters of physiological and growth response of common and Tartary buckwheat plants response in hydroponics experiment with supplementation of different Cu compounds (MPs CuO, NPs CuO, Cu salt) in different concentrations.

	Navadna ajda			Tatarska ajda			
	Lastne vrednosti			Lastne vrednosti			
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	
Eigen-vrednost	2,19	1,39	0,62	3,39	1,20	0,29	
Relativna pomembnost (%)	52,22	33,03	14,73	69,35	24,68	5,95	
Kumulativa (%)	52,22	85,26	100	69,35	94,04	100	
Bartlettov test značilnosti lastnih vrednosti							
	F1	F2	F3		F1	F2	F3
Eigen-vrednost	2,19	1,39	0,62	Eigen-vrednost	3,39	1,20	0,29
Bartlett-ova statistika	94,34	50,76	18,08	Bartlett-ova statistika	94,83	39,31	9,59
p	0,00	0,00	0,01	p	0,00	0,00	0,21
Korelacije dejavnik-funkcija LDA							
	F1	F2	F3		F1	F2	F3
SM korenin	-0,379	0,102	0,052	SM korenin	0,421	-0,421	0,207
SM poganjkov	-0,306	0,175	0,172	SM poganjkov	0,386	-0,373	-0,142
MDA	0,591	0,096	-0,010	MDA	0,055	0,748	-0,341
Kl <sub>a</sub>	-0,815	0,303	0,412	Kl <sub>a</sub>	0,718	-0,550	-0,081
Kl <sub>b</sub>	-0,659	0,384	0,330	Kl <sub>b</sub>	0,578	-0,505	-0,114
Kl <sub>ab</sub>	-0,799	0,334	0,403	Kl <sub>ab</sub>	0,709	-0,559	-0,092
Karotenoidi	-0,161	-0,055	0,422	Karotenoidi	0,859	-0,028	0,216
Flavonoidi	0,266	0,230	0,793	Flavonoidi	0,278	-0,158	0,305
Fenoli	0,179	-0,141	-0,139	Fenoli	0,045	-0,205	0,415
Tanini	0,119	0,769	-0,141	Tanini	-0,348	0,513	-0,051

### PRILOGA T3

Vrednosti parametrov linearne diskriminantne analize privzema elementov P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu in Zn v korenine rastlin navadne in tatarske ajde tretiranih v hidroponskem poskusu z dodajanjem različnih bakrovih spojin (MD CuO, ND CuO, Cu sol) v različnih koncentracijah.

Values of linear discrimination analysis parameters of minerals P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu and Zn uptake in roots of common and Tartary buckwheat plants in hydroponics experiment with supplementation of different Cu compounds (MPs CuO, NPs CuO, Cu salt) in different concentrations.

Navadna ajda				Tatarska ajda			
Lastne vrednosti				Lastne vrednosti			
	F1	F2	F3		F1	F2	F3
Eigen-vrednost	3,67	0,90	0,18	Eigen-vrednost	2,91	0,58	0,18
Relativna pomembnost (%)	77,05	19,02	3,92	Relativna pomembnost (%)	79,15	15,85	4,99
Kumulativa (%)	77,05	96,07	100	Kumulativa (%)	79,15	95,00	100
Bartlettov test značilnosti lastnih vrednosti				Bartlettov test značilnosti lastnih vrednosti			
	F1	F2	F3		F1	F2	F3
Eigen-vrednost	3,67	0,90	0,18	Eigen-vrednost	2,91	0,58	0,18
Bartlett-ova statistika	89,69	31,06	6,52	Bartlett-ova statistika	75,73	23,88	6,41
p	0,00	0,00	0,36	p	0,00	0,04	0,37
Korelacije dejavnik-funkcija LDA				Korelacije dejavnik-funkcija LDA			
	F1	F2	F3		F1	F2	F3
P	0,676	-0,397	0,167	P	-0,647	-0,036	0,315
S	-0,304	0,628	-0,016	S	0,521	-0,019	0,191
K	-0,430	0,821	-0,073	K	0,670	0,067	0,098
Ca	0,181	-0,368	0,226	Ca	-0,780	0,030	0,547
Mn	0,629	-0,009	-0,022	Mn	-0,406	0,424	0,213
Fe	0,582	-0,593	-0,176	Fe	-0,638	-0,136	0,256
Cu	0,016	-0,549	0,001	Cu	-0,358	-0,398	0,467
Zn	-0,480	-0,491	0,129	Zn	-0,341	-0,166	0,641

## PRILOGA T4

Vrednosti parametrov linearne diskriminantne analize prizrva elementov P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu in Zn v korenine rastlin navadne in tatarske ajde tretiranih v hidroponskem poskusu z dodajanjem različnih bakrovih spojin (MD CuO, ND CuO, Cu sol) v različnih koncentracijah.

Values of linear discrimination analysis parameters of minerals P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu and Zn uptake in roots of common and Tartary buckwheat plants in hydroponics experiment with supplementation of different Cu compounds (MPs CuO, NPs CuO, Cu salt) in different concentrations.

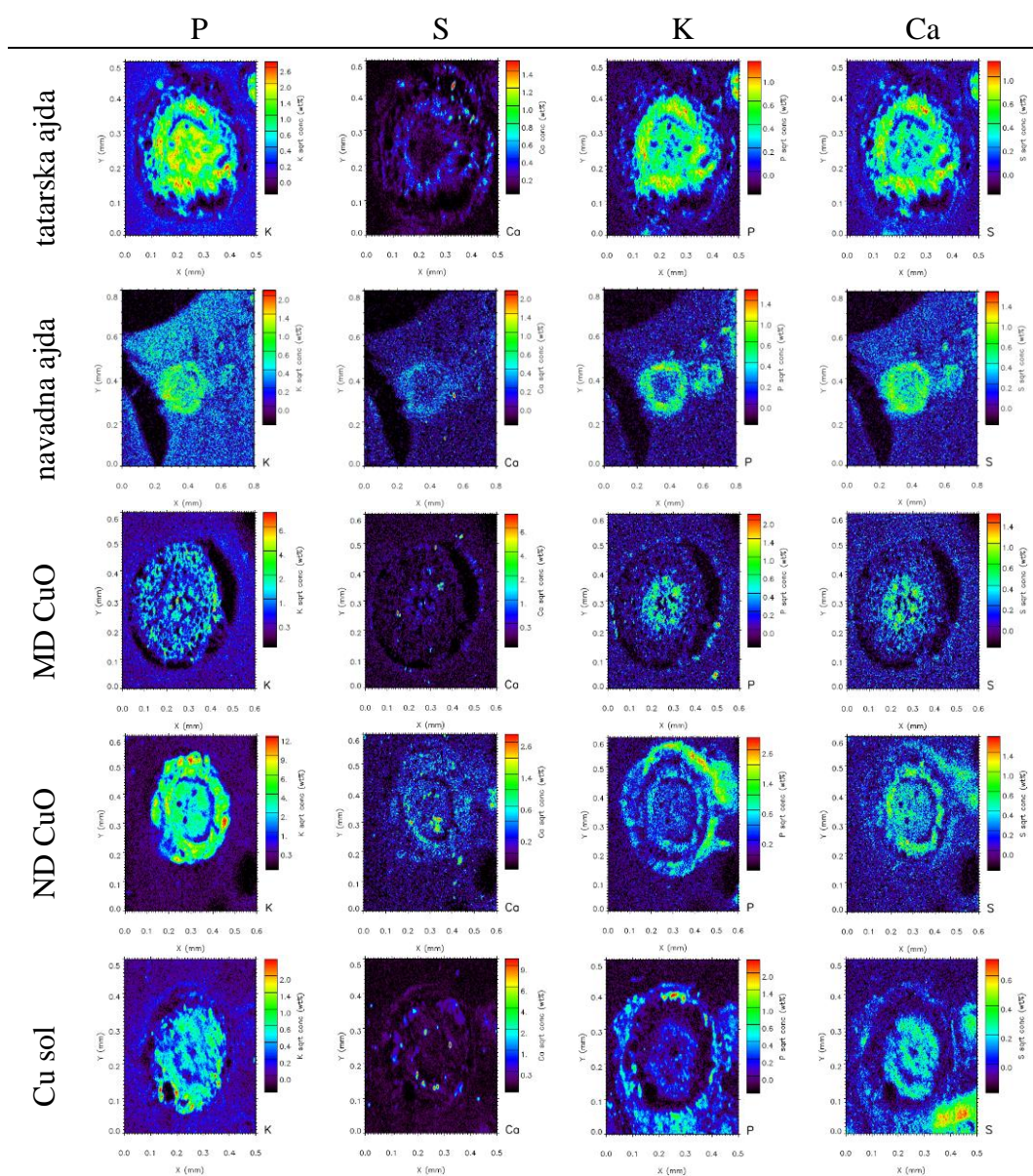
Navadna ajda				Tatarska ajda			
Lastne vrednosti				Lastne vrednosti			
	F1	F2	F3		F1	F2	F3
Eigen-vrednost	1,27	0,83	0,23	Eigen-vrednost	1,71	1,46	0,27
Relativna pomembnost (%)	54,37	35,47	10,15	Relativna pomembnost (%)	49,62	42,38	7,99
Kumulativa (%)	54,37	89,84	100	Kumulativa (%)	49,62	92,00	100
Bartlettov test značilnosti lastnih vrednosti				Bartlettov test značilnosti lastnih vrednosti			
	F1	F2	F3		F1	F2	F3
Eigen-vrednost	1,27	0,83	0,23	Eigen-vrednost	1,71	1,46	0,27
Bartlett-ova statistika	62,25	31,06	8,09	Bartlett-ova statistika	81,59	43,60	9,28
p	0,00	0,00	0,23	p	0,00	0,00	0,15
Korelacije dejavnik-funkcija LDA				Korelacije dejavnik-funkcija LDA			
	F1	F2	F3		F1	F2	F3
P	-0,118	0,734	-0,255	P	0,213	0,234	-0,458
S	-0,697	0,184	0,354	S	-0,190	-0,262	-0,718
K	0,445	0,353	0,141	K	0,375	-0,115	-0,085
Ca	-0,191	-0,037	-0,085	Ca	0,216	-0,372	-0,342
Mn	-0,092	0,207	0,392	Mn	0,123	0,565	-0,062
Fe	-0,467	-0,240	0,576	Fe	-0,293	0,496	-0,112
Cu	-0,775	-0,321	0,136	Cu	-0,618	-0,437	-0,258
Zn	-0,192	-0,175	0,313	Zn	-0,089	-0,139	-0,192

PRILOGA U

PRILOGA U1

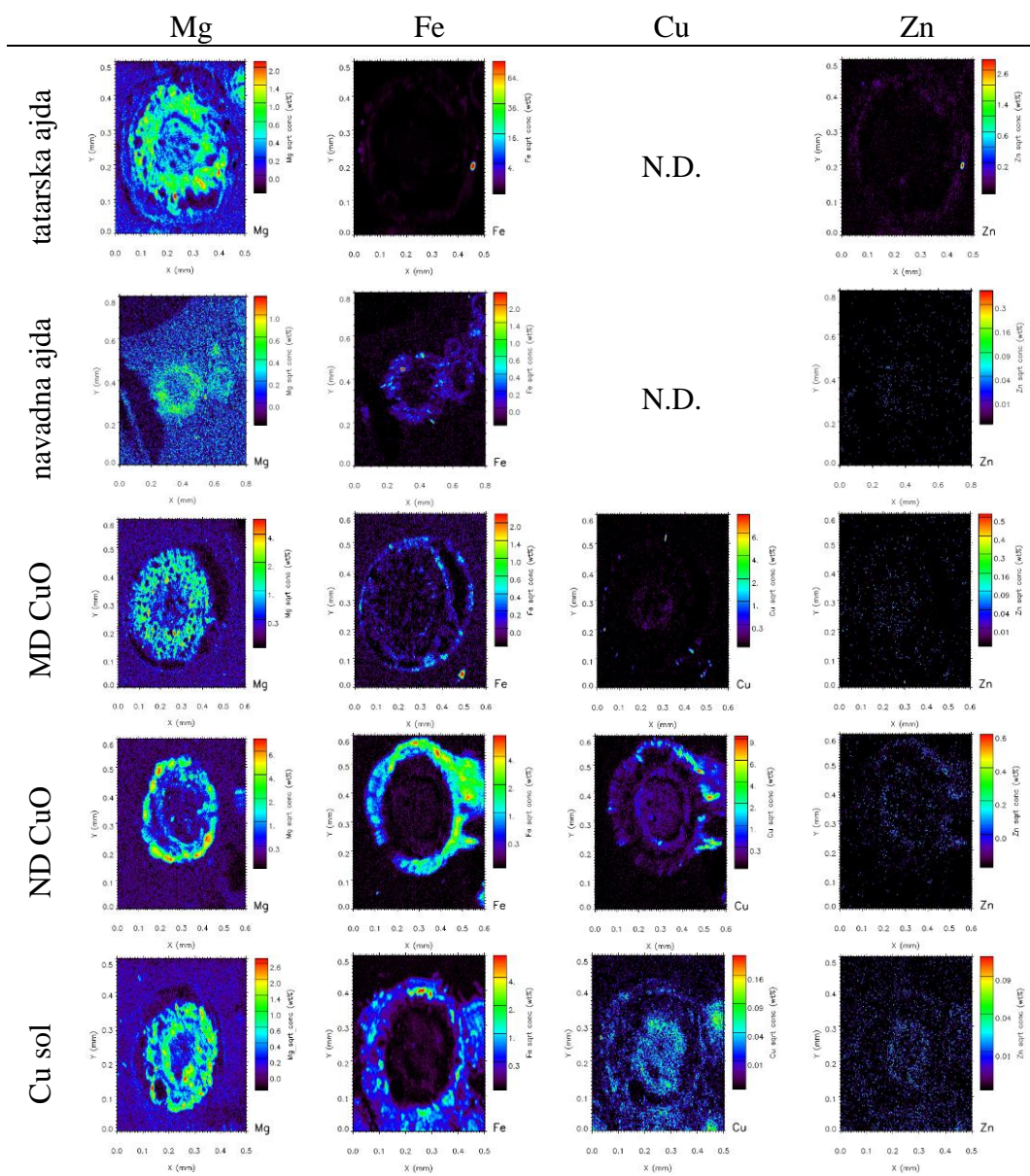
Koncentracijske mape porazdelitve elementov P, S, K, Ca in Mg, Fe, Cu ter Zn pomerenih na liofiliziranih prečnih rezinah korenin netretirane tatarske ajde in navadne ajde ter navadne ajde tretirane z MD CuO10 mg l<sup>-1</sup>, ND CuO 10 mg l<sup>-1</sup> in Cu soljo 1 mg l<sup>-1</sup> z metodo  $\mu$ -PIXE.

Concentration maps for P, S, K, Ca, and Mg, Fe, Cu, and Zn measured in freeze-dried cross sections of untreated Tartary and common buckwheat, and common buckwheat roots treated with MPs CuO 10 mg l<sup>-1</sup>, NPs CuO 10 mg l<sup>-1</sup> and Cu salt 1 mg l<sup>-1</sup> with  $\mu$ -PIXE.



se nadaljuje

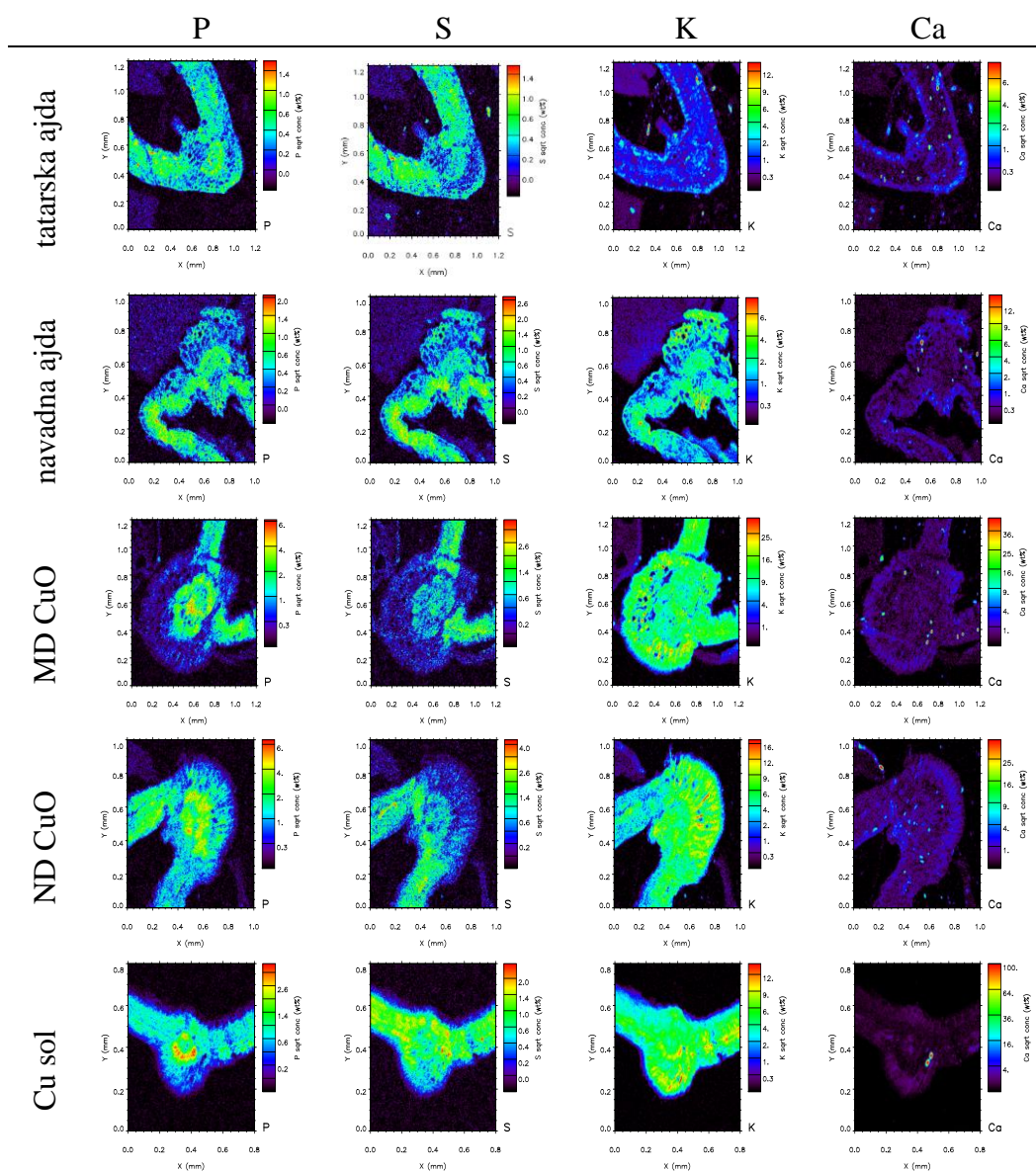
nadaljevanje Priloge U1



## PRILOGA U2

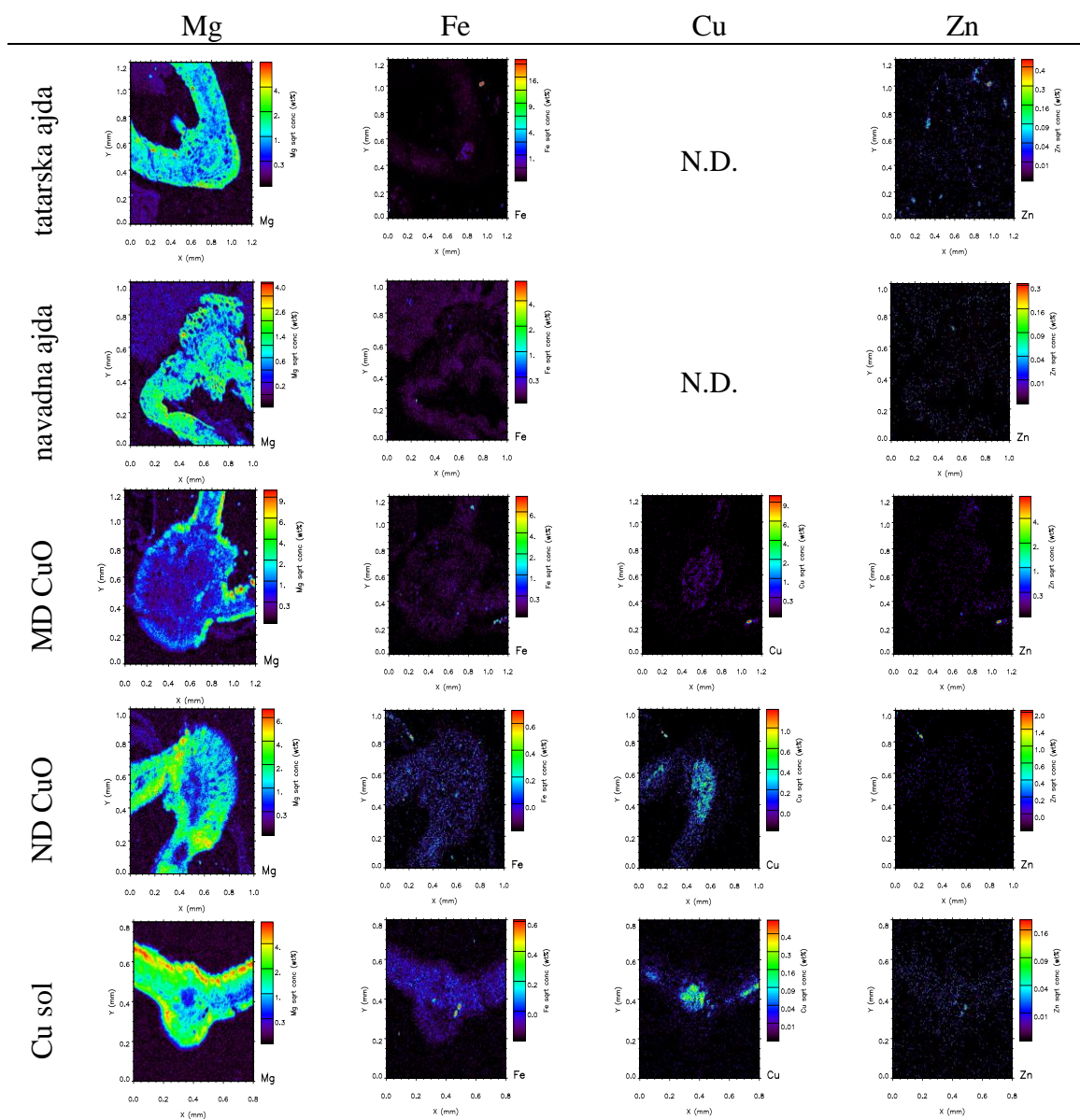
Koncentracijske mape porazdelitve elementov P, S K, Ca in Mg, Fe, Cu ter Zn pomerjenih na liofiliziranih prečnih rezinah listov netretirane tatarske ajde in navadne ajde ter navadne ajde tretirane z MD CuO10 mg l<sup>-1</sup>, ND CuO 10 mg l<sup>-1</sup> in Cu soljo 1 mg l<sup>-1</sup> z metodo  $\mu$ -PIXE.

Concentration maps for P, S, K, Ca and Mg, Fe, Cu and Zn measured in freeze-dried cross sections of untreated Tartary and untreated, treated with MPs CuO 10 mg l<sup>-1</sup>, NPs CuO 10 mg l<sup>-1</sup> and Cu salt 1 mg l<sup>-1</sup> common buckwheat leaves with  $\mu$ -PIXE.



se nadaljuje

nadaljevanje Priloge U2



PRILOGA V

PRILOGA VI

Rezultati analize porazdelitvenih map  $\mu$ -PIXE koncentracij elementov Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu in Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) v posameznih tkivih prečnih rezin korenin rastlin navadne in tatarske ajde ter korenin rastlin navadne ajde tretiranih z različnimi bakrovimi spojinami (mikro-MD CuO 10 mg l<sup>-1</sup>, nano-ND CuO 10 mg l<sup>-1</sup> in sol-Cu sol 1 mg l<sup>-1</sup>). Prikazane vrednosti so n=1, kjer velja SN=10 % pri lahkkih elementih in SN=5-10 % pri težkih elementih.

Elements concentrations analysis of  $\mu$ -PIXE distribution maps for Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu and Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) in different tissues on cross-sections of common and Tartary buckwheat roots and roots of common buckwheat treated with different Cu compounds (mikro-MPs CuO 10 mg l<sup>-1</sup>, nano-NPs CuO 10 mg l<sup>-1</sup> and sol-Cu salt 1 mg l<sup>-1</sup>). Values are n=1, where SE=10 % for light elements and SE=5-10 % for heavy elements.

Vrsta ajde	Tretma	Tkivo	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn
tatarska	kontrola	rizodermis	345	1005	1557	3561	840	20,7	140	N.D.	29,0
navadna	kontrola	rizodermis	2652	2330	3013	3879	1989	58,2	879	N.D.	25,7
navadna	mikro	rizodermis	6572	679	868	8194	920	50,1	408	44,2	19,5
navadna	nano	rizodermis	22077	2922	1456	36413	2528	93,6	5303	851,5	59,7
navadna	sol	rizodermis	1039	2438	618	982	637	35,3	5352	121,7	25,9
tatarska	kontrola	skorja	457	4068	4004	9311	1904	35,0	130	N.D.	31,1
navadna	kontrola	skorja	3511	4791	5748	6752	2531	70,6	887	N.D.	50,4
navadna	mikro	skorja	7785	1183	1456	7009	1184	46,8	261	93,6	27,0
navadna	nano	skorja	14052	3134	2728	32282	2404	91,0	3111	1229,5	79,3
navadna	sol	skorja	6016	760	891	4553	1817	27,7	454	175,9	31,7
tatarska	kontrola	endodermis	464	5108	4071	10483	2329	39,0	149	N.D.	36,2
navadna	kontrola	endodermis	3296	4967	6238	7273	2325	72,6	259	N.D.	50,9
navadna	mikro	endodermis	8010	1757	2072	5381	1683	67,9	235	164,6	58,9
navadna	nano	endodermis	7882	3726	4618	38252	2981	107,7	285	2021,9	137,9
navadna	sol	endodermis	7190	1327	1483	4253	4104	40,5	181	306,9	62,3
tatarska	kontrola	žila	543	3342	2774	13709	1269	55,3	225	N.D.	26,5
navadna	kontrola	žila	2173	1986	4294	6124	1509	63,6	142	N.D.	37,8
navadna	mikro	žila	3207	3144	3329	7491	1592	56,4	158	274,2	69,2
navadna	nano	žila	2746	2601	3391	28203	3142	131,0	287	1525,2	73,8
navadna	sol	žila	2456	880	1353	3578	509	37,4	165	211,3	41,8



## PRILOGA V2

Rezultati analize porazdelitvenih map  $\mu$ -PIXE koncentracij elementov Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu in Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) v posameznih tkivih prečnih rezin listov rastlin navadne in tatarske ajde ter listov rastlin navadne ajde tretiranih z različnimi bakrovimi spojinami (mikro-MD CuO 10 mg l<sup>-1</sup>, nano-ND CuO 10 mg l<sup>-1</sup> in sol-Cu sol 1 mg l<sup>-1</sup>). Prikazane vrednosti so n=1, kjer velja SN=10 % pri lahkkih elementih in SN=5-10 % pri težkih elementih.

Elements concentrations analysis of  $\mu$ -PIXE distribution maps for Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu and Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) in different tissues on cross-sections of common and Tartary buckwheat leaves and leaves of common buckwheat treated with different Cu compounds (mikro-MPs CuO 10 mg l<sup>-1</sup>, nano-NPs CuO 10 mg l<sup>-1</sup> and sol-Cu salt 1 mg l<sup>-1</sup>). Values are n=1, where SE=10 % for light elements and SE=5-10 % for heavy elements.

Vrsta ajde	Tretma	Tkivo	Mg	P	S	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn
tatarska	kontrola	zgornji kolenhim	11563	2567	2247	4484	2619	74	121	N.D.	40,4
navadna	kontrola	zgornji kolenhim	11498	5319	8176	28664	5134	204	304	N.D.	36,0
navadna	mikro	zgornji kolenhim	13395	6637	2421	105820	12210	728	419	116,9	363,3
navadna	nano	zgornji kolenhim	20039	10658	7696	59212	14266	412	281	264,0	72,6
navadna	sol	zgornji kolenhim	32086	3142	5068	48204	7698	299	159	34,2	26,2
tatarska	kontrola	zgornji epidermis	17546	4156	4598	2460	3349	171	176	N.D.	43,9
navadna	kontrola	zgornji epidermis	8749	3201	4695	16806	4146	132	179	N.D.	22,5
navadna	mikro	zgornji epidermis	50908	5113	4260	86608	13174	1015	449	140,6	199,1
navadna	nano	zgornji epidermis	12184	10405	5540	30318	13534	442	279	90,5	80,5
navadna	sol	zgornji epidermis	31586	1520	2286	25812	2447	139	94	27,0	22,0
tatarska	kontrola	stebričasto tkivo	11763	4664	5291	2457	1371	110	395	N.D.	43,3
navadna	kontrola	stebričasto tkivo	9806	7138	10883	20077	2775	182	461	N.D.	42,9
navadna	mikro	stebričasto tkivo	10059	24633	15123	124151	10270	544	840	394,7	426,9
navadna	nano	stebričasto tkivo	20452	18469	12485	43519	8014	314	416	493,8	131,4
navadna	sol	stebričasto tkivo	14632	7347	9306	56878	2598	174	257	121,1	47,2
tatarska	kontrola	glavna žila	11343	5549	3474	3081	1816	104	1088	N.D.	38,1
navadna	kontrola	glavna žila	8216	5675	5855	19466	1827	123	306	N.D.	19,2
navadna	mikro	glavna žila	3986	22852	6947	90895	5906	365	576	1004,1	130,2
navadna	nano	glavna žila	7437	28833	8506	56648	9578	279	291	2478,9	159,2
navadna	sol	glavna žila	8465	19522	7640	60040	4638	195	277	1012,8	64,0
tatarska	kontrola	gobasto tkivo	10742	3931	4810	7367	4359	105	398	N.D.	55,1
navadna	kontrola	gobasto tkivo	6347	3215	4291	9621	1494	84	178	N.D.	17,4
navadna	mikro	gobasto tkivo	11959	14326	10551	131943	6770	489	638	593,6	540,4
navadna	nano	gobasto tkivo	20166	18725	10694	31965	5868	227	347	880,0	172,6
navadna	sol	gobasto tkivo	6838	8472	8875	69451	3849	198	263	503,2	59,6
tatarska	kontrola	spodnji epidermis	12870	3227	3368	1543	3153	119	138	N.D.	26,5
navadna	kontrola	spodnji epidermis	9957	2740	3491	15300	2812	119	129	N.D.	17,6
navadna	mikro	spodnji epidermis	20700	8448	4365	72426	6052	413	373	158,0	204,7
navadna	nano	spodnji epidermis	17674	5618	3215	35586	6224	135	139	61,9	49,7
navadna	sol	spodnji epidermis	18153	4933	4264	32858	5344	171	140	50,5	27,0
tatarska	kontrola	spodnji kolenhim	13432	3287	2181	2892	3269	100	103	N.D.	34,6
navadna	kontrola	spodnji kolenhim	8072	3087	4491	20231	5394	129	260	N.D.	30,8
navadna	mikro	spodnji kolenhim	7575	3071	2361	109096	9269	530	445	96,1	120,5
navadna	nano	spodnji kolenhim	16066	12888	3611	66132	8175	262	230	146,0	46,8
navadna	sol	spodnji kolenhim	19642	4853	5464	57328	19397	229	227	55,7	34,6

## PRILOGA Z

Vrednosti parametrov linearne diskriminantne analize razporeditve elementov P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu in Zn v koreninah in listih rastlin navadne in tatarske ajde ter navadne ajde tretirane z različnimi bakrovimi spojinami (MD CuO, ND CuO, Cu sol).

Values of linear discrimination analysis parameters of minerals P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu and Zn distribution in roots and leaves of common and Tartary buckwheat plants as well as common buckwheat plants treated with different Cu compounds (MPs CuO, NPs CuO, Cu salt).

Korenine					Listi				
Lastne vrednosti					Lastne vrednosti				
	F1	F2	F3	F4		F1	F2	F3	F4
Eigen-vrednost	127,6	12,22	6,77	1,84	Eigen-vrednost	14,18	2,58	1,01	0,31
Relativna pomembnost (%)	85,96	8,23	4,56	1,24	Relativna pomembnost (%)	78,34	14,27	5,62	1,76
Kumulativa (%)	85,96	94,19	98,76	1000	Kumulativa (%)	78,34	92,61	98,24	100
Bartlettov test značilnosti lastnih vrednosti					Bartlettov test značilnosti lastnih vrednosti				
	F1	F2	F3	F4		F1	F2	F3	F4
Eigen-vrednost	127,6	12,22	6,77	1,84	Eigen-vrednost	14,18	2,58	1,01	0,31
Bartlett-ova statistika	179,06	96,5	52,6	17,75	Bartlett-ova statistika	134,35	60,89	26,43	7,47
p	0,00	0,00	0,00	0,00	p	0,00	0,00	0,02	0,28
Korelacije dejavnik-funkcija LDA					Korelacije dejavnik-funkcija LDA				
	F1	F2	F3	F4		F1	F2	F3	F4
K	0,914	-0,098	-0,343	0,160	K	0,960	0,093	-0,122	-0,119
Ca	0,520	0,221	-0,165	-0,187	Ca	0,563	0,305	0,351	-0,142
P	0,112	0,470	-0,537	0,088	P	0,461	0,228	0,537	-0,242
S	0,086	0,765	-0,364	0,161	S	0,228	0,242	0,111	-0,469
Cu	0,930	-0,158	-0,123	-0,043	Mn	0,863	-0,150	0,094	-0,144
Mn	0,883	0,289	-0,051	0,224	Fe	0,407	-0,445	0,073	0,117
Fe	0,402	-0,130	0,083	-0,409	Zn	0,786	-0,299	0,110	-0,036
Zn	0,769	-0,008	-0,030	0,049	Mg	0,263	0,270	0,050	0,394
Mg	0,719	-0,132	0,230	0,142	Cu	0,295	0,286	0,425	-0,124



#### PRILOGA AB4

Korelacije med izmerjenimi vsebnostmi elementov z  $\mu$ -PIXE v posameznih tkivih prečnih prerezov korenin in listov navadne ajde tretiranih s Cu soljo 1 mg l<sup>-1</sup>.

Correlations between measured elements with  $\mu$ -PIXE in each tissue on cross section of treated common buckwheat roots and leaves with Cu salt 1 mg l<sup>-1</sup>.

	Korenine							Listi							
	Cu	Fe	Zn	Ca	K	Mg	P	Fe	Zn	Ca	K	Mg	P	S	
Fe	0,059							Cu	-0,108	-0,325	0,028	0,203	-0,006	0,351	0,174
Zn	-0,266	-0,01						Fe		-0,062	0,554	0,156	0,102	0,108	0,203
Ca	-0,001	-0,039	-0,034					Zn			0,104	-0,013	0,001	0,007	0,009
K	0,11	-0,112	0,017	0,071				Ca				0,118	0,004	-0,021	0,057
Mg	0,083	-0,174	0,042	0,053	0,632			K					0,508	0,626	0,672
P	0,108	0,82	0,016	-0,016	-0,028	-0,081		Mg						0,295	0,464
S	0,121	0,032	0,004	0,018	0,101	0,002	0,105	P							0,642

#### PRILOGA AB5

Korelacije med izmerjenimi vsebnostmi elementov z  $\mu$ -PIXE v posameznih tkivih prečnih prerezov kontrolnih korenin in listov tatarske ajde.

Correlations between measured elements with  $\mu$ -PIXE in each tissue on cross section of Tartary buckwheat control roots and leaves.

	Korenine							Listi						
	Fe	Zn	Ca	K	Mg	P	Zn	Ca	K	Mg	P	S		
Zn	0,89						Fe	0,459	0,059	0,196	-0,027	-0,026	-0,025	
Ca	-0,01	-0,015					Zn		0,04	0,194	-0,052	-0,079	-0,046	
K	-0,031	-0,041	0,271				Ca			0,194	0,238	0,105	0,113	
Mg	-0,035	-0,04	0,262	0,571			K				0,45	0,373	0,396	
P	-0,037	-0,057	0,307	0,775	0,563		Mg					0,662	0,615	
S	-0,036	-0,049	0,281	0,773	0,627	0,77	P						0,63	

## PRILOGA AC

## PRILOGA AC1

Rezultati faktorске ANOVE vpliva vrste ajde, tkiva in njune interakcije na razporeditev Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu in Zn na prečnih prerezi korenin in listov navadne in tatarske ajde. Statistično značilne vplive prikazujejo odebeljene črke ( $p > 0,05$ ).

Results of factorial ANOVA impact of buckwheat species, tissue and their interaction on interaction on distribution of Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu and Zn in roots and leaves cross section of common and Tartary buckwheat leaves. Statistically significant influence is marked as bold text ( $p > 0.05$ ).

Izbran parameter	Dejavnik vpliva	SS	Prostostne stopinje	MS	F	p
Mg korenine	ajda	<b>8,881718E+07</b>	<b>1</b>	<b>8,881718E+07</b>	<b>28,015</b>	<b>0,000000</b>
	tkivo	<b>1,213945E+08</b>	<b>6</b>	<b>2,023242E+07</b>	<b>6,382</b>	<b>0,000000</b>
	ajda*tkivo	<b>4,162050E+07</b>	<b>6</b>	<b>6,936749E+06</b>	<b>2,188</b>	<b>0,000000</b>
S korenine	ajda	<b>52540806</b>	<b>3</b>	<b>17513602</b>	<b>7005441</b>	<b>0,000000</b>
	tkivo	<b>29648449</b>	<b>1</b>	<b>29648449</b>	<b>11859380</b>	<b>0,000000</b>
	ajda*tkivo	<b>774106</b>	<b>3</b>	<b>258035</b>	<b>103214</b>	<b>0,000000</b>
P korenine	ajda	<b>72738719</b>	<b>3</b>	<b>24246240</b>	<b>9698496</b>	<b>0,000010</b>
	tkivo	<b>189764</b>	<b>1</b>	<b>189764</b>	<b>75906</b>	<b>0,000000</b>
	ajda*tkivo	<b>10154436</b>	<b>3</b>	<b>3384812</b>	<b>1353925</b>	<b>0,000000</b>
K korenine	ajda	<b>2,223132E+08</b>	<b>3</b>	<b>7,410442E+07</b>	<b>29641767</b>	<b>0,000000</b>
	tkivo	<b>1,062253E+08</b>	<b>1</b>	<b>1,062253E+08</b>	<b>42490125</b>	<b>0,000000</b>
	ajda*tkivo	<b>7,999347E+07</b>	<b>3</b>	<b>2,666449E+07</b>	<b>10665796</b>	<b>0,000000</b>
Ca korenine	ajda	<b>7641022</b>	<b>3</b>	<b>2547007</b>	<b>1018803</b>	<b>0,000000</b>
	tkivo	<b>2531574</b>	<b>1</b>	<b>2531574</b>	<b>1012630</b>	<b>0,000000</b>
	ajda*tkivo	<b>1894335</b>	<b>3</b>	<b>631445</b>	<b>252578</b>	<b>0,000000</b>
Mn korenine	ajda	<b>2280,0</b>	<b>3</b>	<b>760,0</b>	<b>304,01</b>	<b>0,000000</b>
	tkivo	<b>8267,1</b>	<b>1</b>	<b>8267,1</b>	<b>3306,83</b>	<b>0,000000</b>
	ajda*tkivo	<b>1411,5</b>	<b>3</b>	<b>470,5</b>	<b>188,20</b>	<b>0,000000</b>
Fe korenine	ajda	<b>994568</b>	<b>3</b>	<b>331523</b>	<b>132609</b>	<b>0,000000</b>
	tkivo	<b>1450658</b>	<b>1</b>	<b>1450658</b>	<b>580263</b>	<b>0,000000</b>
	ajda*tkivo	<b>1392356</b>	<b>3</b>	<b>464119</b>	<b>185647</b>	<b>0,000000</b>
Zn korenine	ajda	<b>1691,25</b>	<b>3</b>	<b>563,75</b>	<b>225,50</b>	<b>0,000000</b>
	tkivo	<b>1105,65</b>	<b>1</b>	<b>1105,65</b>	<b>442,26</b>	<b>0,000000</b>
	ajda*tkivo	<b>712,85</b>	<b>3</b>	<b>237,62</b>	<b>95,05</b>	<b>0,000000</b>

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge AC1

Izbran parameter	Dejavnik vpliva	SS	Prostostne stopinje	MS	F	p
Mg listi	ajda	<b>8,881718E+07</b>	<b>1</b>	<b>8,881718E+07</b>	<b>28,015</b>	<b>0,000012</b>
	tkivo	<b>1,213945E+08</b>	<b>6</b>	<b>2,023242E+07</b>	<b>6,382</b>	<b>0,000254</b>
	ajda*tkivo	4,162050E+07	6	6,936749E+06	2,188	0,074283
P listi	ajda	<b>3829131</b>	<b>1</b>	<b>3829131</b>	<b>28,766</b>	<b>0,000010</b>
	tkivo	<b>47688555</b>	<b>6</b>	<b>7948092</b>	<b>59,709</b>	<b>0,000000</b>
	ajda*tkivo	<b>20751900</b>	<b>6</b>	<b>3458650</b>	<b>25,983</b>	<b>0,000000</b>
S listi	ajda	<b>64177051</b>	<b>1</b>	<b>64177051</b>	<b>405,993</b>	<b>0,000000</b>
	tkivo	<b>96329061</b>	<b>6</b>	<b>16054843</b>	<b>101,565</b>	<b>0,000000</b>
	ajda*tkivo	<b>53953565</b>	<b>6</b>	<b>8992261</b>	<b>56,886</b>	<b>0,000000</b>
K listi	ajda	<b>2,543792E+09</b>	<b>1</b>	<b>2,543792E+09</b>	<b>1038,401</b>	<b>0,000000</b>
	tkivo	<b>2,277925E+08</b>	<b>6</b>	<b>3,796542E+07</b>	<b>15,498</b>	<b>0,000000</b>
	ajda*tkivo	<b>2,815411E+08</b>	<b>6</b>	<b>4,692352E+07</b>	<b>19,155</b>	<b>0,000000</b>
Ca listi	ajda	<b>4766434</b>	<b>1</b>	<b>4766434</b>	<b>48,099</b>	<b>0,000000</b>
	tkivo	<b>39362602</b>	<b>6</b>	<b>6560434</b>	<b>66,203</b>	<b>0,000000</b>
	ajda*tkivo	<b>23299713</b>	<b>6</b>	<b>3883286</b>	<b>39,187</b>	<b>0,000000</b>
Mn listi	ajda	<b>14766,0</b>	<b>1</b>	<b>14766,0</b>	<b>37,208</b>	<b>0,000001</b>
	tkivo	<b>20187,0</b>	<b>6</b>	<b>3364,5</b>	<b>8,478</b>	<b>0,000027</b>
	ajda*tkivo	<b>22861,2</b>	<b>6</b>	<b>3810,2</b>	<b>9,601</b>	<b>0,000009</b>
Fe listi	ajda	<b>127059</b>	<b>1</b>	<b>127059</b>	<b>26,7594</b>	<b>0,000017</b>
	tkivo	<b>1524590</b>	<b>6</b>	<b>254098</b>	<b>53,5148</b>	<b>0,000000</b>
	ajda*tkivo	<b>1229012</b>	<b>6</b>	<b>204835</b>	<b>43,1397</b>	<b>0,000000</b>
Zn listi	ajda	<b>1275,01</b>	<b>1</b>	<b>1275,01</b>	<b>7,2329</b>	<b>0,011924</b>
	tkivo	504,75	6	84,12	0,4772	0,819435
	ajda*tkivo	1465,81	6	244,30	1,3859	0,254811

PRILOGA AC2

Rezultati faktorske ANOVE vpliva tretmaja, tkiva in njune interakcije na razporeditev Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu in Zn na prečnih prerezi korenin in listov navadne ajde tretiranih z MD CuO, ND CuO in Cu soljo. Statistično značilne vplive prikazujejo odebeljene črke ( $p>0,05$ ).

Results of factorial ANOVA impacts of treatment, tissue and their interaction on distribution of Mg, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu and Zn in roots and leaves cross section of treated common buckwheat leaves with MPs and NPs CuO, and Cu salt. Statistically significant influence is marked as bold text ( $p>0,05$ ).

Izbran parameter	Dejavnik pliva	SS	Prostostne stopinje	MS	F	p
Mg korenine	tretma	<b>3,800804E+08</b>	<b>3</b>	<b>1,266935E+08</b>	<b>5,067739E+07</b>	<b>0,000000</b>
	tkivo	<b>9,014460E+08</b>	<b>3</b>	<b>3,004820E+08</b>	<b>1,201928E+08</b>	<b>0,000000</b>
	tretma*tkivo	<b>8,653754E+08</b>	<b>9</b>	<b>9,615283E+07</b>	<b>3,846113E+07</b>	<b>0,000000</b>
P korenine	tretma	<b>9115670</b>	<b>3</b>	<b>3038557</b>	<b>1215423</b>	<b>0,000000</b>
	tkivo	<b>66738900</b>	<b>3</b>	<b>22246300</b>	<b>8898520</b>	<b>0,000000</b>
	tretma*tkivo	<b>57398481</b>	<b>9</b>	<b>6377609</b>	<b>2551044</b>	<b>0,000000</b>
S korenine	tretma	<b>48668809</b>	<b>3</b>	<b>16222936</b>	<b>6489175</b>	<b>0,000000</b>
	tkivo	<b>156471618</b>	<b>3</b>	<b>52157206</b>	<b>20862882</b>	<b>0,000000</b>
	tretma*tkivo	<b>28575274</b>	<b>9</b>	<b>3175030</b>	<b>1270012</b>	<b>0,000000</b>
K korenine	tretma	<b>6,043817E+07</b>	<b>3</b>	<b>2,014606E+07</b>	<b>8,058422E+06</b>	<b>0,000000</b>
	tkivo	<b>1,218447E+10</b>	<b>3</b>	<b>4,061491E+09</b>	<b>1,624596E+09</b>	<b>0,000000</b>
	tretma*tkivo	<b>3,355207E+08</b>	<b>9</b>	<b>3,728008E+07</b>	<b>1,491203E+07</b>	<b>0,000000</b>
Ca korenine	tretma	<b>18548409</b>	<b>3</b>	<b>6182803</b>	<b>2473121</b>	<b>0,000000</b>
	tkivo	<b>21499000</b>	<b>3</b>	<b>7166333</b>	<b>2866533</b>	<b>0,000000</b>
	tretma*tkivo	<b>29843923</b>	<b>9</b>	<b>3315991</b>	<b>1326397</b>	<b>0,000000</b>
Mn korenine	tretma	<b>3353,4</b>	<b>3</b>	<b>1117,8</b>	<b>447,1</b>	<b>0,000000</b>
	tkivo	<b>52912,2</b>	<b>3</b>	<b>17637,4</b>	<b>7055,0</b>	<b>0,000000</b>
	tretma*tkivo	<b>4079,7</b>	<b>9</b>	<b>453,3</b>	<b>181,3</b>	<b>0,000000</b>
Fe korenine	tretma	<b>102434296</b>	<b>3</b>	<b>34144765</b>	<b>13657906</b>	<b>0,000000</b>
	tkivo	<b>50109608</b>	<b>3</b>	<b>16703203</b>	<b>6681281</b>	<b>0,000000</b>
	tretma*tkivo	<b>86192204</b>	<b>9</b>	<b>9576912</b>	<b>3830765</b>	<b>0,000000</b>
Cu korenine	tretma	<b>1550531</b>	<b>3</b>	<b>516844</b>	<b>206737</b>	<b>0,000000</b>
	tkivo	<b>24601818</b>	<b>3</b>	<b>8200606</b>	<b>3280242</b>	<b>0,000000</b>
	tretma*tkivo	<b>2351502</b>	<b>9</b>	<b>261278</b>	<b>104511</b>	<b>0,000000</b>
Zn korenine	tretma	<b>21059,0</b>	<b>3</b>	<b>7019,7</b>	<b>2807,87</b>	<b>0,000000</b>
	tkivo	<b>31730,5</b>	<b>3</b>	<b>10576,8</b>	<b>4230,74</b>	<b>0,000000</b>
	tretma*tkivo	<b>11495,2</b>	<b>9</b>	<b>1277,2</b>	<b>510,90</b>	<b>0,000000</b>

se nadaljuje

nadaljevanje Priloge AC2

Izbran parameter	Dejavnik vpliva	SS	Prostostne stopinje	MS	F	p
Mg listi	tretma	1,121754E+09	3	3,739182E+08	35,163	0,000000
	tkivo	2,955992E+09	6	4,926653E+08	46,330	0,000000
	tretma*tkivo	2,941043E+09	18	1,633913E+08	15,365	0,000000
P listi	tretma	1,561629E+09	3	5,205431E+08	107,628	0,000000
	tkivo	1,750333E+09	6	2,917222E+08	60,317	0,000000
	tretma*tkivo	7,413358E+08	18	4,118532E+07	8,516	0,000000
S listi	tretma	3,270132E+07	3	1,090044E+07	14,980	0,000000
	tkivo	6,364779E+08	6	1,060797E+08	145,777	0,000000
	tretma*tkivo	1,941677E+08	18	1,078709E+07	14,824	0,000000
K listi	tretma	7,633580E+10	3	2,544527E+10	702,544	0,000000
	tkivo	6,719009E+09	6	1,119835E+09	30,919	0,000000
	tretma*tkivo	6,416243E+09	18	3,564579E+08	9,842	0,000000
Ca listi	tretma	5,384380E+08	3	1,794793E+08	42,1109	0,000000
	tkivo	2,357338E+08	6	3,928897E+07	9,2183	0,000001
	tretma*tkivo	3,667535E+08	18	2,037520E+07	4,7806	0,000003
Mn listi	tretma	2164946	3	721649	534,641	0,000000
	tkivo	381908	6	63651	47,157	0,000000
	tretma*tkivo	432290	18	24016	17,793	0,000000
Fe listi	tretma	2203796	3	734599	19,8492	0,000000
	tkivo	1300721	6	216787	5,8577	0,000086
	tretma*tkivo	1229526	18	68307	1,8457	0,041862
Cu listi	tretma	1445865	2	722932	59,5894	0,000000
	tkivo	13727697	6	2287950	188,5895	0,000000
	tretma*tkivo	2713770	12	226148	18,6407	0,000000
Zn listi	tretma	717078,4	3	239026,1	212,7815	0,000000
	tkivo	130365,9	6	21727,6	19,3420	0,000000
	tretma*tkivo	286165,3	18	15898,1	14,1525	0,000000