

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ EKOLOGIJE IN BIODIVERZITETE

Mateja GRAŠIČ

**KALJIVOST SMRDLJIVE IN LEPLJIVE
DITRIHOVKE (*DITTRICHIA GRAVEOLENS* IN *D.*
VISCOsa) V ODVISNOSTI OD SLANOSTI TER VPLIV
NJUNIH IZVLEČKOV NA KALITEV IZBRANIH VRST
RASTLIN**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ EKOLOGIJE IN BIODIVERZITETE

Mateja GRAŠIČ

**KALJIVOST SMRDLJIVE IN LEPLJIVE DITRIHOVKE (*DITTRICHIA GRAVEOLENS* IN *D. VISCOSA*) V ODVISNOSTI OD SLANOSTI TER
VPLIV NJUNIH IZVLEČKOV NA KALITEV IZBRANIH VRST
RASTLIN**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**GERMINATION RATE OF STINKWORT AND FALSE YELLOWHEAD
(*DITTRICHIA GRAVEOLENS* AND *D. VISCOSA*) IN RELATION TO
SALINITY AND THE IMPACT OF THEIR EXTRACTS ON
GERMINATION OF SELECTED PLANT SPECIES**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa druge stopnje Ekologija in biodiverziteta na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin Oddelka za biologijo.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je dne 21. 2. 2014 odobrila temo magistrskega dela. Za mentorico magistrskega dela je imenovala doc. dr. Simono Strgulc Krajšek, za somentorico asist. dr. Sabino Anžlovar, za recenzenta pa doc. dr. Matevža Likarja.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Marjana REGVAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Simona STRGULC KRAJŠEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: asist. dr. Sabina ANŽLOVAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Matevž LIKAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, 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.

Mateja Grašič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 581(043.2)=163.6
KG	smrdljiva ditrihovka/lepljiva ditrihovka/slanost/toleranca/kaljivost/alelopatija/vodni izvlečki/pelinolistna žvrklja
AV	GRAŠIČ, Mateja, diplomirana biologinja (UN)
SA	STRGULC KRAJŠEK, Simona (mentor)/ANŽLOVAR, Sabina (somentor)/LIKAR, Matevž (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij ekologije in biodiverzitete
LI	2015
IN	KALJIVOST SMRDLJIVE IN LEPLJIVE DITRIHOVKE (<i>DITTRICHIA GRAVEOLENS</i> IN <i>D. VISCOsa</i>) V ODVISNOSTI OD SLANOSTI TER VPLIV NJUNIH IZVLEČKOV NA KALITEV IZBRANIH VRST RASTLIN
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	XIII, 92 str., 23 pregl., 36 sl., 233 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Smrdljiva (<i>Dittrichia graveolens</i>) in lepljiva ditrihovka (<i>D. viscosa</i>) sta vrsti, ki ju najbolj zaznamujeta močan vonj ter gosta poraslost z žleznimi dlakami. Obe omenjeni lastnosti nakazujeta na visoko vsebnost sekundarnih metabolitov z morebitnim alelopatskim učinkom, ki bi jih lahko uporabljali pri proizvodnji naravnih herbicidov. Želeli smo oceniti alelopatski učinek vodnih izvlečkov smrdljive in lepljive ditrihovke na kalitev drugih vrst. Zanimal nas je predvsem učinek smrdljive ditrihovke na pelinolistno žvrkljo, saj se ti vrsti pogosto pojavljata na istih rastiščih. Zanimiv je tudi vzorec razširjenosti ditrihovk. Obe vrsti se pojavljata na rastiščih z domnevno povišano slanostjo. Lepljiva ditrihovka uspeva le v bližini morja, smrdljiva ditrihovka pa ima v Sloveniji nahajališča ob avtocestnem križu, kjer je slanost lahko povišana zaradi zimskega soljenja cest. Predvsem z vidika smrdljive ditrihovke smo skušali ugotoviti, ali bi bila lahko povišana slanost razlog za takšen vzorec razširjenosti v slovenskem prostoru. Za poskus z vodnimi izvlečki ditrihovk smo pripravili kalitvene teste v petrijevkah s filtrirnim papirjem. Poleg pelinolistne žvrklje smo kot testni vrsti uporabili tudi pšenico in solato. Testne vrste smo tretirali z različnimi koncentracijami vodnih izvlečkov ditrihovk. V drugem sklopu smo pripravili kalitvene teste na agarnih ploščah. Semena lepljive in smrdljive ditrihovke ter solate kot pozitivne kontrole smo posadili na plošče z različnimi koncentracijami NaCl. Ugotovili smo, da vodna izvlečka obeh vrst ditrihovk zavirata ali vsaj upočasnita kalitev ter nadaljnji razvoj kalic testnih vrst, predvsem pelinolistne žvrklje. Kot nekoliko učinkovitejši se je izkazal vodni izvleček smrdljive ditrihovke. Obe vrsti ditrihovk sta uspevali pri vseh koncentracijah soli, a najboljše pri najnižjih. Stopnja kaljivosti in razvitosti kalic je z višanjem koncentracije NaCl upadala. Vrsti za uspevanje očitno ne zahtevata slane podlage, sta pa zelo tolerantni glede količine soli v tleh. Najverjetnejši razlog za njun vzorec razširjenosti je njuna nezahtevnost ter zmožnost uspevanja na rastiščih z dokaj neugodnimi razmerami, kjer konkurence ni veliko.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 581(043.2)=163.6
CX stinkwort/false yellowhead/salinity/tolerance/germination rate/allelopathy/aqueous extracts/common ragweed
AU GRAŠIČ, Mateja
AA STRGULC KRAJŠEK, Simona (supervisor)/ANŽLOVAR, Sabina (co-advisor)/LIKAR, Matevž (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programme in Ecology and Biodiversity
PY 2015
TI GERMINATION RATE OF STINKWORT AND FALSE YELLOWHEAD (*DITTRICHIA GRAVEOLENS* AND *D. VISCOSA*) IN RELATION TO SALINITY AND THE IMPACT OF THEIR EXTRACTS ON GERMINATION OF SELECTED PLANT SPECIES
DT M. SC. THESIS (Master Study Programmes)
NO XIII, 92 p., 23 tab., 36 fig., 233 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The most distinctive characteristics of stinkwort (*Dittrichia graveolens*) and false yellowhead (*D. viscosa*) are their strong smell and abundant glandular hairs, which demonstrate high content of secondary metabolites with allelopathic activity and point out their potential in production of natural phytoherbicides. Our goal was to assess allelopathic effect of stinkwort and false yellowhead on germination of other plant species, especially the effect of stinkwort on common ragweed, as these two species often grow on the same sites. Both *Dittrichia* species have an intriguing distribution pattern in the Slovene area on sites with seemingly elevated salinity level, with false yellowhead growing only by the seaside and stinkwort spreading only along the motorway. We wanted to ascertain whether elevated salinity level is the reason for such distribution pattern in Slovenia, especially from the aspect of stinkwort. We performed germination tests in Petri dishes with filter paper to study the allelopathic effect of different concentrations of aqueous extracts of stinkwort and false yellowhead on common ragweed, wheat and salad. The second part of our research consisted of germination tests on agar plates with different concentrations of NaCl, where we planted seeds of both *Dittrichia* species and salad seeds as positive control. Our results revealed a strong inhibitory effect of both *Dittrichia* species on germination and further development of young plantlets of all tested species, especially on common ragweed. Nonetheless, aqueous extract of stinkwort has proven to be more effective. Stinkwort as well as false yellowhead germinated and further developed under all salinity conditions. However, they thrived best under control conditions. Their germination rate and further growth declined with increasing NaCl concentration. Apparently, stinkwort and false yellowhead do not require elevated salinity level, yet we can say they are very tolerant regarding salinity. The most plausible reason for their distribution pattern is that they are undemanding and able to grow on less favourable sites, where competition is low.

OKRAJŠAVE

ABA	abscizinska kislina
DG	<i>Dittrichia graveolens</i> (smrdljiva ditrihovka)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (DNK)
DV	<i>Dittrichia viscosa</i> (lepljiva ditrihovka)
MDA	malondialdehid
N	število ponovitev
PEG	polietilenglikol
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
rpm	obraci na minuto
spp.	species (vrste)
TCA	trikloroacetna kislina
TBA	tiobarbiturna kislina

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
OKRAJŠAVE	V
KAZALO SLIK	X
KAZALO PREGLEDNIC	XII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 ROD DITRIHOVK (<i>Dittrichia</i>)	2
2.1.1 Uvrstitev v sistem.....	2
2.1.2 Morfološka oznaka smrdljive in lepljive ditrihovke	2
2.1.3 Svetovna razširjenost	3
2.1.4 Razširjenost v Sloveniji.....	6
2.1.5 Opis rastišč ditrihovk.....	7
2.1.6 Fenologija in invazivnost	8
2.1.6.1 Fenologija in invazivnost smrdljive ditrihovke	8
2.1.6.2 Fenologija in invazivnost lepljive ditrihovke	9
2.1.7 Sekundarni metaboliti ditrihovk ter njihova uporabnost	10
2.2 ALELOPATIJA.....	12
2.2.1 Splošno o alelopatiji.....	12
2.2.2 Preučevanje alelopatije	13
2.2.3 Alelopatski potencial ditrihovk	14
2.3 VPLIV POVIŠANE SLANOSTI NA RASTLINE	16
2.4 PELINOLISTNA ŽVRKLJA KOT TESTNA VRSTA	18
2.5 KALITEV, STRES IN TESTI.....	19

2.5.1 Splošno o kalitvi	19
2.5.2 Kalitveni testi	20
2.5.3 Ugotavljanje prisotnosti stresa pri rastlinah	21
2.6 NAMEN IN HIPOTEZE	22
3 MATERIAL IN METODE	23
3.1 MATERIAL	23
3.1.1 Smrdljiva in lepljiva ditrihovka	23
3.1.2 Druge testne vrste	24
3.1.2.1 Solata	24
3.1.2.2 Pšenica	25
3.1.2.3 Pelinolistna žvrklja	25
3.2 METODE	26
3.2.1 Vodni izvlečki	26
3.2.1.1 Priprava vodnih izvlečkov	26
3.2.1.2 Sterilizacija plodov in filtrirnega papirja	27
3.2.1.3 Nastavitev kalitvenih testov v petrijevkah na filtrirnem papirju	27
3.2.1.4 Potek poskusa	28
3.2.1.5 Tehtanje svežih in suhih mas kalic	29
3.2.1.6 Merjenje količine malondialdehida (MDA) v poganjkih in koreninah pšenice	29
3.2.1.7 Analiza rezultatov	30
3.2.2 Slanost	31
3.2.2.1 Ugotavljanje svetlobnih in temperaturnih potreb za kalitev ditrihovk	32
3.2.2.2 Primerjava kalitve smrdljive in lepljive ditrihovke	32
3.2.2.3 Nastavitev kalitvenih testov na agarnih ploščah in potek poskusa	34
3.2.2.4 Merjenje elektroprevodnosti vzorcev tal z lokacij nabiranja ditrihovk	36
3.2.2.5 Analiza rezultatov	37

4 REZULTATI.....	38
4.1 VODNI IZVLEČKI.....	38
4.1.1 Kaljivost.....	38
4.1.1.1 Ontogenetski razvoj.....	39
4.1.1.2 Glivne okužbe.....	40
4.1.2 Razprtje kličnih listov ter izrast koleoptil.....	40
4.1.2.1 Ontogenetski razvoj.....	42
4.1.2.2 Glivne okužbe.....	44
4.1.3 Izrast nadomestnih korenin.....	44
4.1.3.1 Ontogenetski razvoj.....	45
4.1.4 Sveža in suha masa	46
4.1.5 Količina malondialdehida (MDA).....	48
4.1.6 Pregled pomembnejših rezultatov v sklopu vodnih izvlečkov ditrihovk.....	49
4.2 SLANOST	50
4.2.1 Spremljevalni poskusi s smrdljivo in lepljivo ditrihovko	50
4.2.1.1 Ugotavljanje svetlobnih in temperaturnih potreb za kalitev ditrihovk	50
4.2.1.2 Primerjava kalitve smrdljive in lepljive ditrihovke	50
4.2.2 Kaljivost.....	51
4.2.2.1 Ontogenetski razvoj.....	53
4.2.2.2 Glivne okužbe.....	54
4.2.3 Razprtje kličnih listov	55
4.2.3.1 Ontogenetski razvoj.....	57
4.2.3.2 Glivne okužbe.....	59
4.2.4 Pregled pomembnejših rezultatov v sklopu slanosti	59
4.2.5 Elektroprevodnost tal.....	60
5 RAZPRAVA.....	61

5.1	VODNI IZVLEČKI.....	61
5.1.1	Kalitev testnih vrst in nadaljnji razvoj.....	61
5.1.2	Delovanje vodnih izvlečkov.....	61
5.1.3	Glivne okužbe.....	62
5.1.4	Sveža in suha masa	63
5.1.5	Malondialdehid (MDA)	64
5.2	SLANOST	65
5.2.1	Ugotovitve pri spremljevalnih poskusih	65
5.2.2	Kalitev testnih vrst in nadaljnji razvoj.....	66
5.2.3	Učinek povišane slanosti	67
5.2.4	Glivne okužbe.....	69
6	SKLEPI	70
6.1	POTRDITEV HIPOTEZ	70
6.2	KAJ BI ŠE LAHKO RAZISKALI?	70
6.3	KAJ BI LAHKO IZVEDLI BOLJE?	71
7	POVZETEK	73
8	VIRI	75
ZAHVALA		

KAZALO SLIK

Sl. 1: Smrdljiva ditrihovka (<i>Dittrichia graveolens</i>) in lepljiva ditrihovka (<i>Dittrichia viscosa</i>)	3
Sl. 2: Svetovna razširjenost lepljive ditrihovke.....	4
Sl. 3: Razširjenost lepljive ditrihovke v Sredozemlju in širši Evropi	4
Sl. 4: Svetovna razširjenost smrdljive ditrihovke.....	5
Sl. 5: Razširjenost smrdljive ditrihovke v Sredozemlju in širši Evropi	5
Sl. 6: Območje uspevanja lepljive ditrihovke v Sloveniji	6
Sl. 7: Razširjenost smrdljive ditrihovke v Sloveniji.....	7
Sl. 8: Pelinolistna žvrklja (<i>Ambrosia artemisiifolia</i>).....	19
Sl. 9: Mesto vzorčenja smrdljive ditrihovke	23
Sl. 10: Mesti prvega in drugega vzorčenja lepljive ditrihovke.....	24
Sl. 11: Mesto vzorčenja pelinolistne žvrklje	26
Sl. 12: Shema poskusa z vodnimi izvlečki ditrihovk	28
Sl. 13: Način označevanja skaljenih semen ter kalic z razprtima kličnima listoma na petrijevki s plodovi pelinolistne žvrklje	29
Sl. 14: Načrt poskusa za ugotavljanje svetlobnih in temperaturnih potreb za kalitev ditrihovk	32
Sl. 15: Shema poskusa kalitve smrdljive in lepljive ditrihovke	33
Sl. 16: Polaganje oreškov za poskus kalitve smrdljive in lepljive ditrihovke.....	33
Sl. 17: Shema prvega poskusa v sklopu slanosti	35
Sl. 18: Odstotek skaljenih semen pelinolistne žvrklje pri različnih koncentracijah vodnih izvlečkov smrdljive in lepljive ditrihovke v odvisnosti od časa.....	38
Sl. 19: Odstotek skaljenih semen pšenice pri različnih koncentracijah vodnih izvlečkov smrdljive in lepljive ditrihovke v odvisnosti od časa	39

Sl. 20: Odstotek kalic pelinolistne žvrklje z razprtima kličnima listoma pri različnih koncentracijah vodnih izvlečkov smrdljive in lepljive ditrihovke v odvisnosti od časa	41
Sl. 21: Odstotek kalic pšenice z izrastlo koleoptilo pri različnih koncentracijah vodnih izvlečkov smrdljive in lepljive ditrihovke v odvisnosti od časa.....	41
Sl. 22: Pšenica na zadnji dan poskusa	43
Sl. 23: Pelinolistna žvrklja na zadnji dan poskusa	43
Sl. 24: Solata na zadnji dan poskusa	44
Sl. 25: Odstotek kalic pšenice z izrastlimi nadomestnimi koreninami pri različnih koncentracijah vodnih izvlečkov smrdljive in lepljive ditrihovke v odvisnosti od časa	45
Sl. 26: Intervali zaupanja za svežo maso poganjkov in korenin pšenice, tretirane z različnimi koncentracijami vodnih izvlečkov smrdljive in lepljive ditrihovke.....	46
Sl. 27: Intervali zaupanja za svežo maso poganjkov in korenin pelinolistne žvrklje, tretirane z različnimi koncentracijami vodnih izvlečkov smrdljive in lepljive ditrihovke..	47
Sl. 28: Intervali zaupanja za suho maso poganjkov in korenin pšenice, tretirane z različnimi koncentracijami vodnih izvlečkov smrdljive in lepljive ditrihovke.....	47
Sl. 29: Intervali zaupanja za suho maso poganjkov in korenin pelinolistne žvrklje, tretirane z različnimi koncentracijami vodnih izvlečkov smrdljive in lepljive ditrihovke	48
Sl. 30: Intervali zaupanja za količino MDA v poganjkih in koreninah pšenice, tretirane z različnimi koncentracijami vodnih izvlečkov smrdljive in lepljive ditrihovke.....	49
Sl. 31: Odstotek skaljenih semen smrdljive in lepljive ditrihovke ter solate pri različnih koncentracijah NaCl v odvisnosti od časa.....	52
Sl. 32: Primerjava kalitve smrdljive in lepljive ditrihovke pri vseh štirih tretmajih	54
Sl. 33: Odstotek kalic smrdljive in lepljive ditrihovke ter solate z razprtima kličnima listoma pri različnih koncentracijah NaCl v odvisnosti od časa.....	56
Sl. 34: Smrdljiva ditrihovka na zadnji dan poskusa pri različnih tretmajih z NaCl	58
Sl. 35: Lepljiva ditrihovka na zadnji dan poskusa pri različnih tretmajih z NaCl	58
Sl. 36: Solata na zadnji dan poskusa pri različnih tretmajih z NaCl	59

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Prikaz statistično značilnih razlik med posameznim tretmajem vodnih izvlečkov smrdljive in lepljive ditrihovke ter kontrolo za kaljivost semen pelinolistne žvrklje na podlagi Log-rank testa	38
Pregl. 2: Prikaz statistično značilnih razlik med posameznim tretmajem vodnih izvlečkov smrdljive in lepljive ditrihovke ter kontrolo za kaljivost semen pšenice na podlagi Log-rank testa.....	39
Pregl. 3: Prikaz statistično značilnih razlik med vsemi tretmaji vodnega izvlečka ene od obeh vrst ditrihovk skupaj na podlagi Log-rank testa za kaljivost semen pelinolistne žvrklje in pšenice	39
Pregl. 4: Prikaz statistično značilnih razlik med posameznim tretmajem vodnih izvlečkov smrdljive in lepljive ditrihovke ter kontrolo za razprte klične liste kalic pelinolistne žvrklje na podlagi Log-rank testa	41
Pregl. 5: Prikaz statistično značilnih razlik med posameznim tretmajem vodnih izvlečkov smrdljive in lepljive ditrihovke ter kontrolo za izrastle koleoptile kalic pšenice na podlagi Log-rank testa	42
Pregl. 6: Prikaz statistično značilnih razlik med vsemi tretmaji vodnega izvlečka ene od obeh vrst ditrihovk skupaj na podlagi Log-rank testa za razprte klične liste kalic pelinolistne žvrklje in koleoptile kalic pšenice.....	42
Pregl. 7: Prikaz statistično značilnih razlik med posameznim tretmajem vodnih izvlečkov smrdljive in lepljive ditrihovke ter kontrolo za izrastle nadomestne korenine kalic pšenice na podlagi Log-rank testa	45
Pregl. 8: Prikaz statistično značilnih razlik med vsemi tretmaji vodnega izvlečka ene od obeh vrst ditrihovk skupaj na podlagi Log-rank testa za izrastle nadomestne korenine kalic pšenice	45
Pregl. 9: Prikaz statistično značilnih razlik med vsemi tretmaji za svežo in suho maso kalic pšenice ter pelinolistne žvrklje na podlagi enosmerne analize variance	48
Pregl. 10: Prikaz statistično značilnih razlik za količino MDA med vsemi tretmaji za poganjke in korenine pšenice na podlagi enosmerne analize variance	49
Pregl. 11: Vpliv različnih koncentracij vodnih izvlečkov smrdljive in lepljive ditrihovke na različne spremljane znake pri pelinolistni žvrklji in pšenici, ponazorjen na podlagi izračunanih P vrednosti	49

Pregl. 12: Odstotek skaljenih semen smrdljive in lepljive ditrihovke pri različnih svetlobnih in temperaturnih razmerah	50
Pregl. 13: Odstotek skaljenih semen ter odstotek kalic smrdljive in lepljive ditrihovke z razprtima kličnima listoma na zadnji dan poskusa s posameznimi tretmaji.....	50
Pregl. 14: Prikaz statistično značilnih razlik med posameznim tretmajem NaCl in kontrolo za kaljivost semen smrdljive ditrihovke na podlagi Log-rank testa	52
Pregl. 15: Prikaz statistično značilnih razlik med posameznim tretmajem NaCl in kontrolo za kaljivost semen lepljive ditrihovke na podlagi Log-rank testa	52
Pregl. 16: Prikaz statistično značilnih razlik med posameznim tretmajem NaCl in kontrolo za kaljivost semen solate na podlagi Log-rank testa	53
Pregl. 17: Prikaz statistično značilnih razlik med vsemi tretmaji NaCl skupaj na podlagi Log-rank testa za kaljivost semen smrdljive in lepljive ditrihovke ter solate	53
Pregl. 18: Prikaz statistično značilnih razlik med kaljivostjo semen smrdljive in lepljive ditrihovke pri istem tretmaju na podlagi Log-rank testa	54
Pregl. 19: Prikaz statistično značilnih razlik med posameznim tretmajem NaCl in kontrolo za razprte klične liste kalic smrdljive ditrihovke na podlagi Log-rank testa.....	56
Pregl. 20: Prikaz statistično značilnih razlik med posameznim tretmajem NaCl in kontrolo za razprte klične liste kalic lepljive ditrihovke na podlagi Log-rank testa.....	56
Pregl. 21: Prikaz statistično značilnih razlik med posameznim tretmajem NaCl in kontrolo za razprte klične liste kalic solate na podlagi Log-rank testa	57
Pregl. 22: Prikaz statistično značilnih razlik med vsemi tretmaji NaCl skupaj na podlagi Log-rank testa za razprte klične liste kalic smrdljive in lepljive ditrihovke ter solate.....	57
Pregl. 23: Vpliv različnih koncentracij NaCl na kaljivost semen in razprtje kličnih listov pri smrdljivi in lepljivi ditrihovki ter solati, ponazorjen na podlagi izračunanih P vrednosti	60

1 UVOD

Dandanes smo priča porastu v uporabi umetnih herbicidov, kar je pripeljalo do odpornosti mnogih plevelov proti tem herbicidom (Vyvyan, 2002) in pojavljanja številnih pomislekov glede njihovega učinka na zdravje in okolje (Omezzine in sod., 2011a). To je bil povod za pričetek mnogih raziskav alternativnih naravnih herbicidov in agrokemikalij, katerih ključna tema so postale alelokemikalije rastlin. Njihova učinkovitost je v primerjavi z umetnimi herbicidi manjša, zaradi česar jih je za enako površino treba porabiti več, vendar pa ponujajo nove mehanizme delovanja in bolj specifične interakcije s pleveli. Najpomembneje je, da predstavljajo manjše breme za okolje kot umetni herbicidi; imajo namreč krajšo razpolovno dobo, saj vsebujejo manj težje razgradljivih komponent (Dayan in sod., 2009) in so manj toksične za netarčne organizme (Duke in Lydon, 1987).

Vir alelokemikalij, ki zavirajo predvsem kalitev ter do določene mere tudi nadaljnji razvoj rastlin, so med drugim mnoge vrste iz družine nebinovk (Asteraceae), v katero poleg številnih vrst sodijo tudi ditrihovke. Te s svojim močnim vonjem, gosto poraslostjo z žleznimi laski in lepljivostjo na otip (Werker in Fahn, 1981; Thong in sod., 2008; Frajman in Kaligarič, 2009) že na zunaj kažejo na visoko vsebnost različnih aktivnih učinkovin, zaradi česar so že bile predmet marsikaterih raziskav v povezavi z alelopatijo (Levizou in sod., 2002, 2004; Stavrianakou in sod., 2004; Aşkin Çelik in Aslantürk, 2010; Omezzine in sod., 2011a, 2011b, 2011c; Dor in Hershenhorn, 2012; Andolfi in sod., 2013). Pri vseh omenjenih raziskavah so preučevali le po eno od obeh vrst ditrihovk.

Naša naloga je bila opraviti prvo primerjalno analizo učinka izvlečkov smrdljive in lepljive ditrihovke. V ta namen smo spremljali kalitev semen pelinolistne žvrklje, pšenice in solate ob tretiranju z različnimi koncentracijami izvlečkov smrdljive in lepljive ditrihovke. Delali smo z vodnimi izvlečki; ti so namreč bližje dejanskemu stanju v naravi, kjer dež izločke z ditrihovk spira v tla (Levizou in sod., 2002; Parolin in sod., 2014) in jih s tem razredči. Za ta poskus smo kot testno vrsto v prvi vrsti izbrali invazivno pelinolistno žvrkljo, saj se s smrdljivo ditrihovko pogosto pojavljata na skupnih nahajališčih (Frajman in Kaligarič, 2009); s tega vidika bi slednja na pelinolistno žvrkljo lahko imela zaznaven zaviralen učinek. Testov s kombinacijo pelinolistne žvrklje in smrdljive ditrihovke do naše raziskave namreč še ni bilo.

Zanimalo nas je tudi uspevanje smrdljive in lepljive ditrihovke pri različnih koncentracijah soli, saj se obe vrsti pojavljata večinoma na tleh, kjer bi bila koncentracija soli lahko povečana. Lepljivo ditrihovko v Sloveniji najdemo le v primorski regiji (Jogan in sod., 2001; Wraber, 2010), ki jo zaznamuje vpliv morja, smrdljivo ditrihovko pa le ob avtocestah, ki so pozimi izpostavljene intenzivnemu soljenju. V naši raziskavi smo testirali učinek soli (NaCl) na njuno kaljivost in tako skušali ugotoviti, ali je povišana slanost vzrok za obstoječi vzorec razširjenosti smrdljive in lepljive ditrihovke.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ROD DITRIHOVK (*Dittrichia*)

2.1.1 Uvrstitev v sistem

Rod ditrihovk (*Dittrichia*) spada v družino nebinovk (Asteraceae) znotraj redu Asterales. Širše spada v podrazred Asteridae, razred dvokaličnic (Dicotyledoneae), poddeblo kritosemenk (Angiospermae) in deblo semenk (Spermatophyta) (Martinčič in sod., 2010).

Ditrihovke je prvi opisal že Linné v 18. stoletju, vendar jih je uvrstil v rod *Erigeron* (Brullo in de Marco, 2000). Vse do sedemdesetih let prejšnjega stoletja so pripadale mnogim drugim rodovom, ki jih še vedno najdemo med sinonimi. Najbolj pogost sinonim za rod *Dittrichia*, na katerega v literaturi naletimo še danes, je rod *Inula*. Greuter (1973) je ditrihovke uvrstil v svoj rod, *Dittrichia*. Poimenoval ga je po nemškem botaniku Manfredu Dittrichu, velikem poznavalcu nebinovk, rojenim leta 1934 (Quattrocchi, 2012). Rod ditrihovk v osnovi tvorita dve vrsti, to sta *Dittrichia graveolens* (L.) Greuter ali smrdljiva ditrihovka in *D. viscosa* (L.) Greuter ali lepljiva ditrihovka. Znotraj vrste *D. viscosa* so trenutno priznane štiri podvrste. To so subsp. *viscosa*, subsp. *revoluta*, subsp. *angustifolia* ter subsp. *maritima* (Greuter, 2003; Flann, 2009+). Brullo in de Marco (2000) sta med podvrstami vrste *D. viscosa* zaznala pomembne razlike tako na morfološkem nivoju kot tudi v povezavi z njihovim vzorcem razširjenosti. Predlagata, da bi vse štiri podvrste priznavali kot samostojne vrste. Tako zagovarjata obstoj petih vrst znotraj rodu *Dittrichia*. To so *D. graveolens*, *D. viscosa*, *D. revoluta*, *D. orientalis* (sinonim za *D. viscosa* subsp. *angustifolia*) in *D. maritima*.

2.1.2 Morfološka oznaka smrdljive in lepljive ditrihovke

Smrdljiva ditrihovka (slika 1) je med 10 in 50 cm visoka gosto razvejana pokončna enoletnica s številnimi značilno kvišku štrlečimi stranskimi poganjki. Na otip je lepljiva, saj je porasla z žleznimi lasmi. Ime je dobila po svojem močnem vonju (Frajman in Kaligarič, 2009), ki spominja na kafro (Thong in sod., 2008), in je za večino ljudi neprijeten. Njeni listi so večinoma ožji od 10 mm, črtalaste ali suličaste oblike ter razmaknjeno nazobčani. Koški so drobni in valjasti, široki približno 5 mm, in bogato poraščajo poganjke. Ovojkove liste obdaja sklerenhimska obroba. Zunanji so na vrhu značilno zakrivljeni. V košku so ženski jezičasti cvetovi z 1–1,5 mm široko ploskvijo, ki zelo malo presega ovojek, ter dvospolni cevasti cvetovi. Plodovi so oreški, dolgi približno 2 mm in narobe jajčasto-valjaste oblike. Na vrhu je kodeljica, ki rahlo presega ovojek (Frajman in Kaligarič, 2009).

Lepljiva ditrihovka (slika 1) je trajnica. Prav tako je pokončna, a je višja od smrdljive ditrihovke, saj zraste do 125 cm. Njeno steblo je pri dnu olesenelo (Wraber, 2010). Ima

podolgasto suličaste liste, ki so običajno širši od 10 mm (Frajman in Kaligarič, 2009). Koški so stožčaste oblike in nekoliko daljši od koškov smrdljive ditrihovke (Brullo in de Marco, 2000). Ovojkovi listi nimajo sklerenhimske obrobe in zunanji niso zakrivljeni. Ženski jezičasti cvetovi so široki 2,5–3 mm in presegajo ovojek za več mm (Frajman in Kaligarič, 2009). Prav tako kot smrdljiva ditrihovka ima tudi lepljiva ditrihovka dvospolne cevaste cvetove. Tudi ta vrsta ima močan vonj in je gosto porasla z žleznimi lasi ter lepljiva (Werker in Fahn, 1981), po čemer je dobila svoje slovensko ime. Plodovi (oreški) so nepravilno valjaste oblike in nekoliko daljši kot pri smrdljivi ditrihovki. Kodeljica je krajša od ovojka (Brullo in de Marco, 2000).

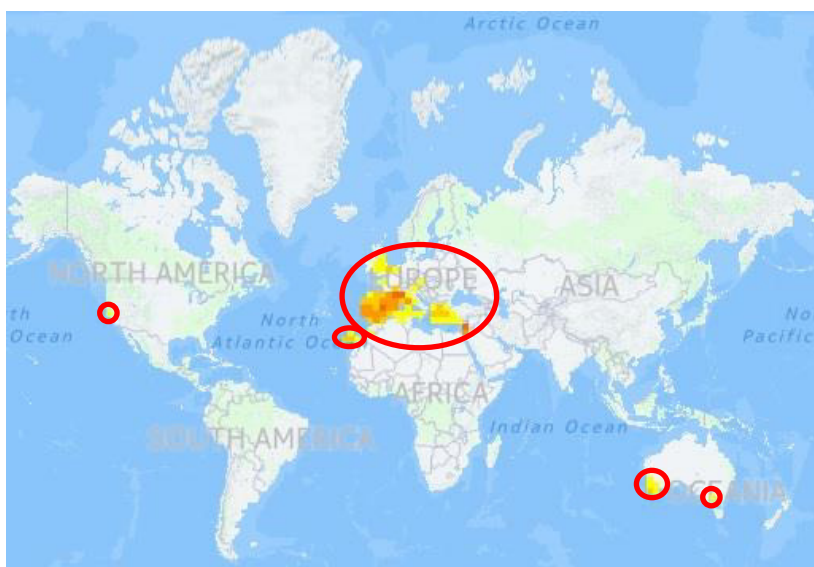


Slika 1: Smrdljiva ditrihovka (*Dittrichia graveolens*) na levi in lepljiva ditrihovka (*Dittrichia viscosa*) na desni strani slike. Foto: Simona Strgulc Krajšek in Mateja Grašič

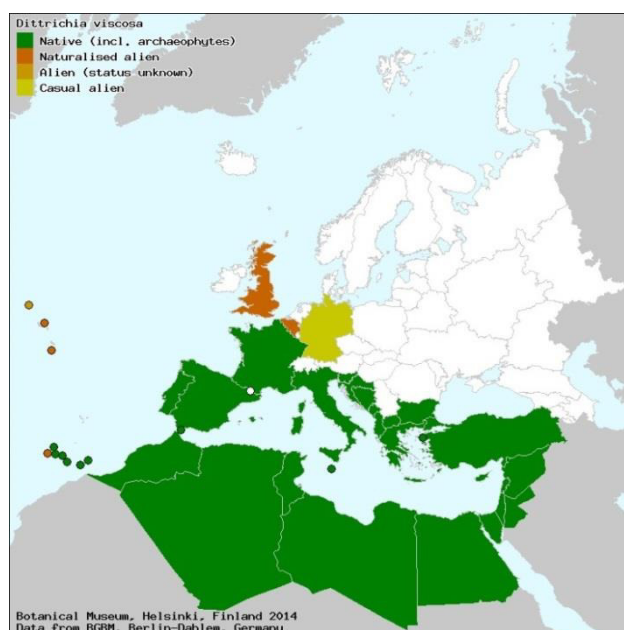
Rod ditrihovk je podoben omanom (rod *Inula*). Ločimo ju po obliki plodov in kodeljice (Brullo in de Marco, 2000).

2.1.3 Svetovna razširjenost

Lepljiva ditrihovka je mediteranska vrsta. Razširjena je v državah na severu Afrike vključno z nekaterimi otoki na severozahodu Afrike, ter v sredozemskih državah Bližnjega vzhoda in Evrope (USDA, ARS,...). Kot tujerodna vrsta se je do sedaj le mestoma naturalizirala ponekod v severnejših delih Evrope (Meyer, 2005-; Groom, 2011; Parolin in sod., 2014), sicer pa se pojavlja tudi v vzhodnih delih Združenih držav Amerike (USDA, NRCS ..., 2015a) ter na jugozahodu Avstralije (False yellowhead ..., 2003; Parolin in sod., 2014). Kljub širjenju svojega areala v druge predele sveta lepljive ditrihovke večinoma ne obravnavajo kot invazivno vrsto, saj zaenkrat še ne ogroža avtohtone flore. Kot invazivna vrsta je trenutno zaznamovana le v Avstraliji, kjer povzroča več težav (False yellowhead ..., 2003). Slika 2 prikazuje svetovno razširjenost lepljive ditrihovke, slika 3 pa vse mediteranske in preostale bližnje države, v katerih je bila do sedaj že zabeležena prisotnost lepljive ditrihovke.



Slika 2: Svetovna razširjenost lepljive ditrihovke. Zaradi boljše opaznosti smo širša območja pojavljanja obkrožili z rdečo barvo. Z različnimi odtenki rumene barve je označena pogostost pojavljanja te vrste; temnejša barva pomeni večjo pogostost pojavljanja (vir slike: The Global Biodiversity ..., 2013a)



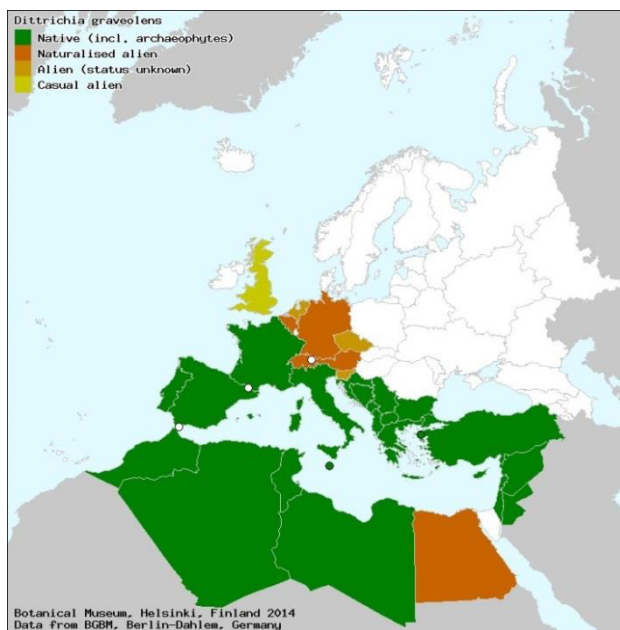
Slika 3: Razširjenost lepljive ditrihovke v Sredozemlju in širši Evropi. Zelena barva – naravno območje razširjenosti; druge barve – države, kjer se lepljiva ditrihovka pojavlja kot tujerodna vrsta (vir slike: Euro+Med PlantBase, 2006a)

Tudi smrdljiva ditrihovka izvira iz Sredozemlja. Njen prvotni areal prav tako obsega večino držav severa Afrike, sredozemske države Bližnjega vzhoda ter države na jugu in jugovzhodu Evrope. V zadnjem času se je kot tujerodna in tudi invazivna vrsta pričela širiti vse bolj proti severu Evrope (Euro+Med PlantBase, 2006b; Bister, 2013), med drugim tudi v Slovenijo (Frajman in Kaligarič, 2009). Na nova območja se širi tudi na severu Afrike (Euro+Med PlantBase, 2006b) in na Bližnjem vzhodu (Meyer, 2005-). Uspeva že v večjem

delu Avstralije in ponekod v njeni okolici (Esler, 1988; Meyer, 2005-), na jugu Afrike (SANBI ..., 2009), nemalo težav pa danes povzroča tudi na vzhodni in zahodni obali Združenih držav Amerike (Brullo in de Marco, 2000; USDA, NRCS, 2015b). Na sliki 4 je upodobljena svetovna razširjenost smrdljive ditrihovke, na sliki 5 pa vse sredozemske in preostale bližnje države, v katerih je do sedaj že bila zabeležena prisotnost smrdljive ditrihovke.



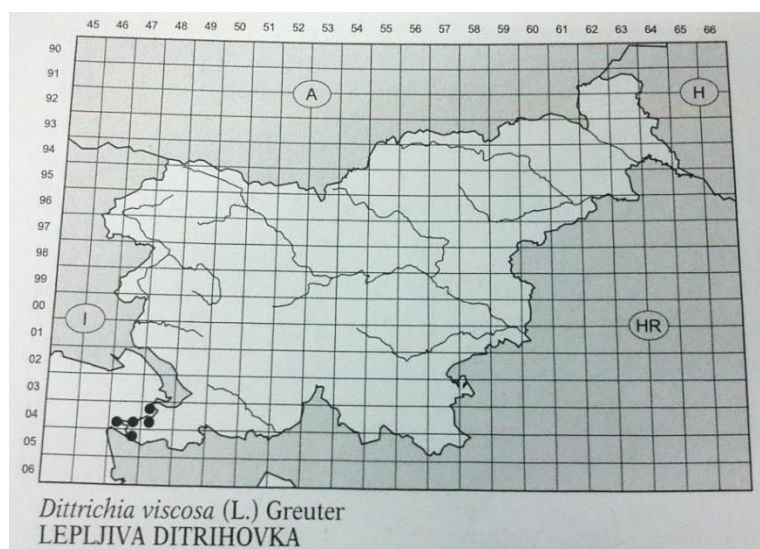
Slika 4: Svetovna razširjenost smrdljive ditrihovke. Zaradi boljše opaznosti smo širša območja pojavljanja obkrožili z rdečo barvo. Z različnimi odtenki rumene barve je označena pogostost pojavljanja te vrste; temnejša barva pomeni večjo pogostost pojavljanja (vir slike: The Global Biodiversity ..., 2013b)



Slika 5: Razširjenost smrdljive ditrihovke v Sredozemlju in širši Evropi. Zelena barva – naravno območje razširjenosti; druge barve – države, kjer se smrdljiva ditrihovka pojavlja kot tujerodna vrsta (vir slike: Euro+Med PlantBase, 2006b)

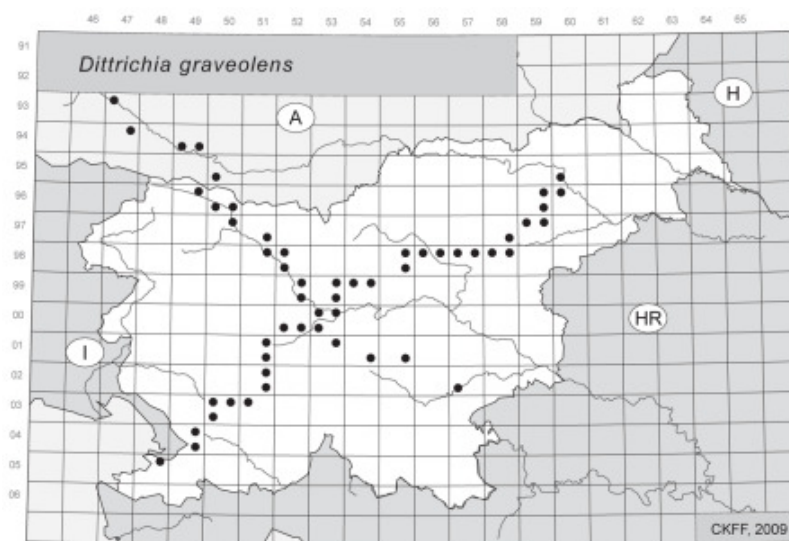
2.1.4 Razširjenost v Sloveniji

Lepljiva ditrihovka je v Sloveniji priznana kot avtohtona vrsta, vendar uspeva le v Slovenski Istri (Jogan in sod., 2001; Wraber, 2010). Območje njenega uspevanja v Sloveniji do leta 2001 natančneje prikazuje slika 6. V oktobru 2014 smo med vožnjo po primorski avtocesti v smeri Ljubljane lepljivo ditrihovko opazili tudi nekoliko dlje stran od morja ob avtocesti, in sicer med predorom Dekani in viaduktom Črni Kal v bližini nadvoza nad avtocesto ter kamnoloma Črni Kal pred predodom Kastelec. Glede na fitogeografsko delitev Slovenije po M. Wrabru (1969), kot je navedena v Mali flori Slovenije (Martinčič in sod., 2010), celotno do sedaj poznano območje pojavljanja lepljive ditrihovke v Sloveniji vključno z zgoraj omenjenima novima lokacijama spada v submediteransko fitogeografsko območje, katerega glavna značilnost je znaten vpliv morja.



Slika 6: Območje uspevanja lepljive ditrihovke v Sloveniji (vir slike: Jogan in sod., 2001)

V nasprotju z lepljivo ditrihovko je smrdljiva ditrihovka za slovenski prostor adventivna vrsta. V slovenskem merilu gre za dokaj novo vrsto, saj sta Frajman in Kaligarič njeno pojavljanje v Sloveniji prvič zabeležila poleti leta 2008. Možno je, da se je raztreseno pojavljala že prej, vendar je postala opazna šele, ko se je dovolj razširila. Zaenkrat uspeva le vzdolž avtocestnega križa (Frajman in Kaligarič, 2009). Na sliki 7 je natančneje upodobljena razširjenost smrdljive ditrihovke v Sloveniji do leta 2009. Na primorskem in štajerskem kraku avtocestnega križa večinoma tvori dolge sklenjene sestoje, medtem ko je na gorenjskem in predvsem dolenjskem odseku avtoceste redkejša. Natančne poti njenega prihoda v Slovenijo zaradi zelo splošnega vzorca razširjenosti ni bilo možno določiti (Frajman in Kaligarič, 2009), a najverjetneje se je k nam razširila iz Avstrije (Jogan, 2012).



Slika 7: Razširjenost smrdljive ditrihovke v Sloveniji (vir slike: Frajman in Kaligarič, 2009)

2.1.5 Opis rastišč ditrihovk

Smrdljiva ditrihovka je nitrofilna vrsta (Brullo in de Marco, 2000), ki najbolje raste na območjih s suhimi in vročimi poletji (Brownsey in sod., 2013b). Največkrat se pojavlja na ruderalnih rastiščih, in sicer na odprtih peščenih (Brownsey in sod., 2013b) ali gruščnatih tleh, ki so suha in topla ter revna z minerali (Frajman in Kaligarič, 2009). Zelo ji ustrezajo antropogena rastišča, saj nekoliko spominjajo na njena naravna rastišča v Sredozemlju. Poleg tega ji nudijo tudi močno kompeticijsko prednost pred drugimi vrstami, ki so nanje slabše prilagojene; smrdljiva ditrihovka se na tovrstnih rastiščih zato pogosto pojavlja v gostih sestojih. Uspeva predvsem med avtocestnima pasovoma, kjer kosijo zelo redko, medtem ko na zunanjih robovih avtocest njeno uspevanje najverjetneje nekoliko omejuje vse bolj strnjena rastlinska odeja iz drugih vrst (Frajman in Kaligarič, 2009). Njeno pojavljanje ni omejeno le na ceste; najdemo jo tudi na različnih obdelovalnih površinah ter opuščeni poljih (Brullo in de Marco, 2000), ob železnicah (Frajman in Kaligarič, 2009), na kamnolomih, na intenzivnih pašnikih, na obrobjih mokrišč, na poplavnih ravninah (Brownsey in sod., 2013a), v obrežnih gozdovih (Brownsey in sod., 2013b), na protipoplavnih grebenih, ob izsušenih strugah potokov, v sadovnjakih (Plant Protection ..., 2013), na odpadkih (Kaiser in Abid, 2005), ob robu vinogradov (Brownsey in sod., 2013b), na območjih rudnikov (Higueras in sod., 2003), in ob mokrih zadrževalnikih vode (Brownsey in sod., 2014). V nemotenih ekosistemih se zaenkrat sekundarno pojavlja le ponekod na slabo poraslih tleh (Brownsey in sod., 2014). Če je v tleh na voljo dovolj vlage, uspeva tudi na ultramafičnih kamninah, ki jih zaznamujejo nizko razmerje Ca/Mg, nizka koncentracija makronutrientov ter visoka vsebnost določenih težkih kovin (Shallari in sod., 1998), in na zasoljenih tleh (Brownsey in sod., 2013b).

Tudi lepljiva ditrihovka ima izredno pionirski značaj in naseljuje mesta, kjer je kompeticije zelo malo ali nič. Običajno se pojavlja na odprtih območjih z dolgimi, suhimi in vročimi

poletji (Parolin in sod., 2014). Prav tako ji ustrezajo območja z večjo količino padavin. Lepljiva ditrihovka je nekoliko bolj odvisna od zadostne količine vlage kot smrdljiva ditrihovka (False yellowhead ..., 2003). Primarno se pojavlja na izsušenih gručnatih strugah rek, na meliščih, na vulkanski žlindri (volcanic scoria) (Brullo in de Marco, 2000), na klifih, v borovih gozdovih (Doussi in Thanos, 1997), na peščenih ali glinenih tleh ter na kamnitih obalah in mokriščih (Parolin in sod., 2014). Tako kot smrdljivo ditrihovko lahko tudi lepljivo ditrihovko obravnavamo kot ruderalno vrsto, saj se pogosto pojavlja na rastiščih, izpostavljenim požarom (Doussi in Thanos, 1997) ter na območjih, ki jih je človek močno spremenil (Murciego Murciego in sod., 2007). Prav tako jo torej najdemo ob cestah, ob ograjah, na opuščenih poljih (Brullo in de Marco, 2000), v jarkih, na odpadkih (Doussi in Thanos, 1997), ob železnicah in poteh, na protipožarnih presekah (False yellowhead ..., 2003) ter v urbanih okoljih (Parolin in sod., 2014) in solinah (Wraber, 2010). Tudi lepljiva ditrihovka se lahko pojavlja na ultramafičnih kamninah (Shallari in sod., 1998). Zelo dobro se odziva na visoko vsebnost dušika v tleh, ki izboljša njeno uspevanje (Dias in sod., 2011).

2.1.6 Fenologija in invazivnost

2.1.6.1 Fenologija in invazivnost smrdljive ditrihovke

Smrdljiva ditrihovka kali v temperaturnem razponu od 12 in vse do 34 °C, če ima na voljo zadostno količino vlage. Optimalna temperatura za njeno kalitev je 22 °C (Brownsey in sod., 2013a). Podoben rezultat glede optimalne temperature so dobili tudi Ghorbanali in sod. (2013). Brownsey in sod. (2013a) so v svoji raziskavi ugotovili, da je primarna dormanca pri tej vrsti najverjetneje odsotna. Stopnja kaljivosti brez prekinitve dormance je bila namreč primerljiva z visoko viabilnostjo teh semen v optimalnih temperaturnih razmerah. Kaljivost te vrste ni odvisna od svetlobe, saj njena semena enako dobro kalijo v zelo različnih svetlobnih razmerah (Brownsey in sod., 2013a). Najbolj je odvisna od zadostne vlažnosti tal (Brownsey, 2012). Brownsey in sod. (2013a) so v Kaliforniji spremljali potek razvoja smrdljive ditrihovke skozi sezono. Po kalitvi pozimi vse do maja ostane v fazi majhnih rozet (Brownsey in sod., 2013b). Naprej se razvija od maja do septembra, cveti šele jeseni in vse do decembra, senescenca pa nastopi v decembru in januarju. Faza cvetenja je odvisna od dolžine dneva, saj vse rastline pričnejo cveteti hkrati ne glede na to, kdaj so vzkile (Brownsey, 2012). Smrdljiva ditrihovka proizvede obilo drobnih oreškov, ki se pozno jeseni s pomočjo kodeljice z vetrom ali z vodo učinkovito razširjajo na zelo dolge razdalje (Parsons in Cuthbertson, 2001; Brownsey in sod., 2013a). Širijo se tudi s transportom in živalmi v njihovi dlaki, perju ali koži, kamor se zapletejo s kodeljico (Parsons in Cuthbertson, 2001; Brownsey in sod., 2013b). Kalitev poteče že v isti sezoni, in sicer pozimi in zgodaj spomladi po večjih nalivih. Zelo malo semen vzklije šele leto po razširjanju. To nakazuje, da so semena najverjetneje viabilna le dve do tri leta. Odvisnost od sezonskih padavin skupaj s širokim temperaturnim razponom kažeta na oportunističen značaj njene kalitve (Brownsey in sod., 2013a).

K vse hitrejšemu širjenju smrdljive ditrihovke izven njenega naravnega območja pojavljanja najbolj prispevata vedno večja pogostost antropogenih motenj ter učinkovit sistem razširjanja semen. Nezanemarljiva je tudi njena sposobnost kalitve v široki paleti temperatur ter tako v sončnih kot tudi senčnih okoljih. Vseeno pa smrdljiva ditrihovka ni tako konkurenčna drugim vrstam v gozdnih ekosistemih, saj pomanjkanje svetlobe zavira njeno rast v kasnejših fazah razvoja (Brownsey in sod., 2013b). Njeno širjenje ni tako uspešno tudi na naravnih pašnih površinah. Tam je ključno čim hitrejša poglobljanje koreninskega sistema, s čimer si tamkajšnje vrste zagotovijo dovolj talne vlage za razvoj. Naravno prisotne vrste travišč imajo v teh ekosistemih prednost, saj globok koreninski sistem razvijejo že nekaj tednov pred smrdljivo ditrihovko. V tovrstnih ekosistemih bi torej smrdljiva ditrihovka lahko postala invazivna le, če zaradi zadostne količine padavin pozno v sezoni voda ne bi bila več omejujoč faktor za njen razvoj (Brownsey in sod., 2013b). Veliko raziskav na temo invazivnosti smrdljive ditrihovke so opravili v Kaliforniji, kjer naj bi se ta vrsta prvič pojavila v sedemdesetih ali v začetku osemdesetih let prejšnjega stoletja (Brownsey in sod., 2013a). Brownsey in sod. (2013a) so ugotovili, da velik problem v Kaliforniji predstavlja košnja ob cestah pozno v aprilu in v začetku maja, saj smrdljiva ditrihovka v tem času šele začneja poganjati socvetja, medtem ko so druge vrste večinoma že bolj razvite. Košnja v tem času torej onemogoči razvoj drugih vrst, smrdljivi ditrihovki pa tako omogoči bolj ugodno okolje za nadaljnjo rast in razvoj.

Glede na kratko življenjsko dobo semen smrdljive ditrihovke bi lahko že z nekajletnim preprečevanjem proizvodnje in širjenja semen dosegli znatno zmanjšanje njenih populacij (Brownsey in sod., 2013a). Najbolj učinkoviti bi bili t. i. biološki ukrepi. Sem štejemo omejevanje spreminjanja tal v naravnih območjih ter vzdrževanje dovolj goste vegetacijske odeje, ki bi spomladi omejevala razvoj kalic smrdljive ditrihovke (Brownsey in sod., 2013b). Možna je tudi kontrola populacij z mehanskimi ukrepi (fizično odstranjevanje rastlin z okopavanjem, pogostejšo košnjo ali puljenjem) ter za okolje bolj obremenjujoča uporaba različnih herbicidov (kemijski ukrepi) za zatiranje njene kalitve ali kasnejših razvojnih faz (Brownsey in sod., 2013a). Ključno je, da ukrepe izvedemo temeljito in še pred semenenjem rastlin, saj v nasprotnem primeru lahko celo pospešimo njeno širjenje. Z odnašanjem rastlinskega materiala in uporabljene opreme namreč seme lahko zanesemo tudi na druga mesta (Brownsey in sod., 2013b).

2.1.6.2 Fenologija in invazivnost lepljive ditrihovke

Semena lepljive ditrihovke so globoko dormantna. Kalijo pri temperaturah od 15 do 30 °C, najbolje pri 25 °C (Doussi in Thanos, 1997). Idealni razpon temperatur za nadaljnji razvoj kalic je med 10 in 24 °C (Scott in sod., 2008). Pri tej vrsti je ključna za sprožitev kalitve svetloba. Kaljivost je namreč v temi zelo slaba, saj doseže manj kot 10 % (Doussi in Thanos, 1997). Izredno spodbujevalen učinek na kalitev semen lepljive ditrihovke ima kratkovalovna rdeča svetloba. Ta je v naravi bolj dostopna na manj poraščenih območjih. Prav to je en od ključnih razlogov, da odprta rastišča lepljivi ditrihovki ustrezajo bolj kot

poraščena območja. S predhodno inkubacijo na hladnem se stopnja kaljivosti semen v temi ne razlikuje bistveno od stopnje kaljivosti semen, inkubiranih na sobni temperaturi. To dejstvo še dodatno kaže, da je za kalitev pri lepljivi ditrihovki bistvena svetloba (Doussi in Thanos, 1997). Tako kot smrdljiva ditrihovka je tudi lepljiva ditrihovka množična proizvajalka oreškov s kodeljico, ki se učinkovito razširjajo na podobne načine kot pri smrdljivi ditrihovki (False yellowhead ..., 2003). Pravkar omenjeni lastnosti ter izreden pomen svetlobe za sprožitev njene kalitve so ključ za dobro in dokaj agresivno uspevanje na pogosto motenih območjih (Doussi in Thanos, 1997).

V njenem naravnem območju razširjenosti v Sredozemlju glavno obdobje rasti lepljive ditrihovke poteka od konca marca do maja ali junija (Parolin in sod., 2013a). Konec julija se razvijejo socvetni koški (Parolin in sod., 2014). Cveti septembra in oktobra, na južni polobli v Avstraliji pa od decembra do aprila (False yellowhead ..., 2003). Plodovi dosežejo zrelost v oktobru in novembru (Parolin in sod., 2013a). Semena večinoma kalijo po jesenskih nalivih (Parolin in sod., 2014). Če jo poleti porežemo, ne požene koškov, njeni listi pa ostanejo zeleni skozi vso zimo. Če je ne porežemo, bujno cveti, a jeseni njeni listi porjavijo in nekateri pozimi celo odpadejo (Parolin in sod., 2013a).

Hitrost širjenja te vrste ni tako zaskrbljujoča kot pri smrdljivi ditrihovki. Kljub temu jo v Avstraliji obravnavajo kot eno tistih tujerodnih vrst, ki bi potencialno lahko povzročile ogromno škodo biodiverziteti, in so označene za izkoreninjenje. Tam so njeno prisotnost prvič zabeležili že leta 1955. Tako kot pri smrdljivi ditrihovki je tudi pri lepljivi ditrihovki bistveno, da ukrepe za zmanjševanje njenih populacij pričnemo izvajati dovolj zgodaj, in sicer pred fazo cvetenja in semenenja (False yellowhead ..., 2003).

2.1.7 Sekundarni metaboliti ditrihovk ter njihova uporabnost

Tako lepljiva kot smrdljiva ditrihovka že s svojim močnim vonjem in lepljivimi žleznimi laski nakazujeta na visoko vsebnost sekundarnih metabolitov. Gre za spojine, ki nimajo neposredne vloge v osnovnih življenjskih procesih (Namdeo, 2007) kot so rast, razvoj in razmnoževanje (Croteau in sod., 2000), temveč so pomembne pri interakcijah rastlin z okoljem (Namdeo, 2007). Te spojine pripomorejo k izboljšanju njihovega uspevanja (Williams in sod., 1989), saj jih ščitijo pred različnimi negativnimi vplivi (Bourgau in sod., 2001). Nekoliko bolje raziskana na področju sekundarnih metabolitov je lepljiva ditrihovka, pri kateri so raziskovalci identificirali že številne seskviterpene (Shtacher in Kashman, 1970; Bohlmann in Gupta, 1982; Ceccherelli in sod., 1985; Rustaiyan in sod., 1987; Ulubelen in sod., 1987; Sanz in sod., 1991; Grande in Bellido, 1992; Abu Zarga in sod., 1998; Máñez in sod., 1999; Maoz in sod., 1999; Maoz in Neeman, 2000; De Laurentis in sod., 2002; Abu Zarga in sod., 2003; Fontana in sod., 2007; Andolfi in sod., 2013), flavonoide (Bohlmann in sod., 1977; Chiappini in sod., 1982; Grande in sod., 1985; Wollenweber in sod., 1991; Grande in Bellido, 1992; Máñez in sod., 1999; Hernández in sod., 2005), monoterpene (Shtacher in Kashman, 1971), triterpenoide (Grande in sod.,

1992) in polifenole (Danino in sod., 2009). Dor in Hershenhorn (2012) v svojem delu poročata o prisotnosti alkaloidov in taninov pri tej vrsti. Vse našete substance tvorijo eterično olje lepljive ditrihovke. Eterično olje nadzemnih delov te vrste se po sestavi nekoliko razlikuje od eteričnega olja, pridobljenega iz njenih podzemnih delov (Pérez-Alonso in sod., 1996). Seskviterpeni in flavonoidi so prav tako med glavnimi sestavinami eteričnega olja manj raziskane smrdljive ditrihovke (Rustaiyan in sod., 1987; Lanzetta in sod., 1991; Öksüz in Topçu, 1992; Topçu in sod., 1993; Abou-Douh, 2003).

Poleg alelopatske vloge, ki se je bomo nekoliko podrobneje dotaknili v naslednjem poglavju, imajo našete substance obeh vrst ditrihovk tudi druge, za človeka uporabne lastnosti. Prav zaradi tega so jih ljudje že od nekdaj uporabljali v tradicionalni medicini (Ali-Shtayeh in sod., 1998; Ali-Shtayeh in sod., 2000; Lentini, 2000; Al-Qura'n, 2009; Mazandarani in sod., 2014). Te učinkovine med drugim delujejo protivnetno (Máñez in sod., 1999; Hernández in sod., 2005; Hernández in sod., 2007; Máñez in sod., 2007; Abraham in sod., 2010; Marín in sod., 2011; Mazandarani in sod., 2014), pospešujejo celjenje ran (Lentini, 2000; Khalil in sod., 2007; Mazandarani in sod., 2014), preprečujejo nastanek čira na želodcu (Alkofahi in Atta, 1999; Mazandarani in sod., 2014), delujejo antioksidativno (Schinella in sod., 2002; Danino in sod., 2009; Al-Fartosy, 2011; Marín in sod., 2011; Mazandarani in sod., 2014), zavirajo rast rakavih celic (Abu-Dahab in Afifi, 2007; Rozenblat in sod., 2008; Merghoub in sod., 2009; Talib in Mahasneh, 2010b), sproščajo mišice (Hudaib in sod., 2008), pomagajo pri odpravljanju pljučnih bolezni in hemoroidov, delujejo uspavalno in antiseptično (Ali-Shtayeh in sod., 1998; Mazandarani in sod., 2014), pomagajo pri zdravljenju diabetesa (Yaniv in sod., 1987; Zeggwagh in sod., 2006) ter zavirajo delovanje pomembnega sinaptičnega encima acetilholin-esteraze, zaradi česar bi jih lahko uporabljali tudi pri zdravljenju Alzheimerjeve bolezni (Dohi in sod., 2009). Že od nekdaj velja, da povzročajo neplodnost pri ženskah (Ali-Shtayeh in sod., 1998), kar so s svojo raziskavo potrdili tudi Al-Dissi in sod. (2001). Veliko raziskovalcev je že dokazalo njihovo protibakterijsko (Ali-Shtayeh in sod., 1998; Stamatidis in sod., 2003; Silva in sod., 2005; Blanc in sod., 2006; Ben Sassi in sod., 2007; Oskay in Sari, 2007; Bamuamba in sod., 2008; Miguel in sod., 2008; Oskay in sod., 2009; Talib in Mahasneh, 2010a; Djenane in sod., 2011; Talib in sod., 2012; Mazandarani in sod., 2014), protivirusno (Abad in sod., 2000; Bedoya in sod., 2002; Ben Sassi in sod., 2008) ter protiglivično delovanje, saj zavirajo razvoj številnih okužb na rastlinah in pri ljudeh (Shtacher in Kashman, 1970; Ali-Shtayeh in sod., 1998; Maoz in Neeman, 1998; Ali-Shtayeh in Abu Ghdeib, 1999; Maoz in Neeman, 2000; Abou-Jawdah in sod., 2002; Abou-Jawdah in sod., 2004; Wang in sod., 2004; Cohen in sod., 2006; Guinoiseau in sod., 2010; Talib in Mahasneh, 2010a; Aghel in sod., 2011; Mamoci in sod., 2011; Askarne in sod., 2012; Talib in sod., 2012; Talibi in sod., 2012; Askarne in sod., 2013). Debat in sod. (1981) ter Cohen (1996) so že uspešno patentirali postopke izdelave baktericidnih in fungicidnih pripravkov iz ditrihovk; danes je v veljavi le še prvi od obeh navedenih patentov. Ditrihovke so uporabne tudi v biokontrolnih postopkih za uravnavanje populacij

nekaterih živalskih skupin, saj zavirajo razvoj glist (Oka in sod., 2001; Oka in sod., 2006), insektov (Alexenizer in Dorn, 2007; Mamoci in sod., 2012; Mazandarani in sod., 2014) in pršic (Mansour in sod., 2004). V sklopu biološke kontrole imajo poleg neposredne vloge tudi veliko posredno vlogo, saj lahko služijo kot substrat za naselitev nekaterih predatorskih vrst žuželk, ki se hranijo s t. i. škodljivci nekaterih pomembnih kulturnih rastlinskih vrst (Constant in sod., 1996; Kavallieratos in sod., 2002; Tommasini, 2004; Perdakis in sod., 2007; Franco-Micán in sod., 2010). Parolin in sod. (2013b) so poročali o ravno nasprotnem primeru, pri katerem se je zaradi prisotnosti ditrihovk populacija škodljivcev celo močno povečala. Gre za edini do sedaj zabeležen tovrsten primer, zato lahko še vedno trdimo, da imajo ditrihovke velik potencial tudi v biološki kontroli. Pires in sod. (2012) so dokazali, da jih uporabljajo tudi ptice plavčki (*Cyanistes caeruleus*). Ti jih dodajajo v svoja gnezda, saj ditrihovke s svojim aromatičnim značajem odganjajo ektoparazite.

Vedno več je raziskav, ki kažejo na možnost uporabe ditrihovk na področju fitoremediacije ter njihov pomen za bioindikacijo. Ditrihovke so namreč sposobne akumulacije različnih kovin (Shallari in sod., 1998; Ater in sod., 2000; Melendo in sod., 2002; Higuera in sod., 2003; Swaileh in sod., 2004; Nogales in Benítez, 2006; Murciego Murciego in sod., 2007; Gisbert in sod., 2008; Barbaferri in sod., 2011; Conesa in sod., 2011; Jiménez in sod., 2011). S to sposobnostjo lahko prispevajo k izboljšanju stanja tal, onesnaženih s kovinami.

Pri uporabi ditrihovk v biološki kontroli in fitoremediaciji ne smemo spregledati dejstva, da jim določene lastnosti omogočajo dokaj velik potencial za invazivnost. S tega vidika je zelo pomembno, da ju v te namene uporabljamo le znotraj njunega naravnega območja razširjenosti (Parolin in sod., 2014).

Kljub številnim pozitivnim učinkom sekundarnih metabolitov ditrihovk pa ti lahko povzročajo tudi različne bolezni, kot so kožna vnetja pri človeku (Gonçalo M. in Gonçalo S., 1991; Thong in sod., 2008) in vnetja prebavnega trakta ter driska pri živalih (Philbey in Morton, 2000).

2.2 ALELOPATIJA

2.2.1 Splošno o alelopatiji

Pojem alelopatija se nanaša na biokemijske interakcije med rastlinami (Rice, 1979) in v splošnem zajema vse negativne ali pozitivne učinke kemijskih substanc oz. alelopatijskih snovi neke rastline, ki jih ta sprošča v okolico, na druge rastline v njeni neposredni bližini (Willis, 2007). V to definicijo so lahko vključeni tudi mikroorganizmi (Rice, 1979). Gre za proces, ki je v rastlinskem svetu vsesplošno prisoten (John in sod., 2010). Alelokemikalije so prisotne v večini rastlinskih tkiv (Peng in sod., 2004) in se iz rastlin sproščajo na več načinov: lahko iz njih izparevajo, se spirajo v tla s padavinami, se izločajo skozi korenine

ali pa se sproščajo v tla z razgradnjo odmrlih rastlinskih delov (Anaya, 1999). Alelopatske interakcije vplivajo na številne ekološke in fiziološke procese: od pojavljanja, rasti in produktivnosti rastlin do dominantnosti, sukcesije, raznolikosti ter strukture rastlinskih združb (Ferguson in sod., 2013).

Alelopatija bi bila lahko eden od ključnih mehanizmov za izredno uspešno širjenje nekaterih invazivnih tujerodnih vrst (Hierro in Callaway, 2003), med njimi tudi smrdljive in lepljive ditrihovke (Omezzine in sod., 2011c). Invazivne tujerodne vrste se namreč niso razvijale v koevoluciji z vrstami svojega drugotnega območja razširjenosti, ki so zato bolj občutljive na njihove učinkovine kot vrste iz njenega prvotnega območja razširjenosti, ki so bile v stiku z njimi občutno več časa (Hierro in Callaway, 2003).

2.2.2 Preučevanje alelopatije

Klasična metoda za preučevanje alelopatije je primerjava uspevanja testne vrste ob dodatku listnega izvlečka druge vrste ter ob dodatku kontrolnega tretmaja, ki vsebuje le destilirano vodo. Zaželeno je uporaba več različnih koncentracij izvlečka, s čimer dobimo širši vpogled v njegovo delovanje (Rúa in sod., 2008). Težava te metode je, da težko ocenimo, ali so dobljeni rezultati posledica alelopatije, ali pa so v resnici posledica kompeticije za vire (Lau in sod., 2008).

Poskus lahko izboljšamo z dodatkom aktivnega oglja, ki adsorbira različne tipe alelokemikalij in izniči njihov učinek, ob tem pa skoraj ne vpliva na dostopnost mineralov. Kadar se ob uporabi aktivnega oglja skupaj z listnim izvlečkom neke vrste uspevanje testne vrste izboljša, lahko z večjo gotovostjo govorimo o alelopatskem učinku prve vrste (Rúa in sod., 2008). Obstaja tudi različica metode z aktivnim ogljem, pri kateri testne rastline izpostavimo izvlečku neke vrste ob prisotnosti ali odsotnosti kompeticije za vire skupaj z aktivnim ogljem ali brez njega (Nilsson, 1994). Njena prednost je, da z njo lahko ocenimo tako stopnjo kompeticije kot tudi alelopatski učinek na testne rastline. Te tehnike se lahko poslužujemo zgolj v primeru, ko je iz izvlečka možno izolirati posamezne učinkovine (Lau in sod., 2008). Weißhuhn in Prati (2009) sta ugotovila, da uporaba aktivnega oglja ni najboljša rešitev, saj z njim med drugim vplivamo na dostopnost mineralov in s tem tudi na rast rastlin. Do najbolj zanesljivih sklepov torej lahko pridemo s primerjavo rezultatov več različnih izvedb te metode (Lau in sod., 2008).

Realno stanje v ekosistemu najboljše odražajo eksperimenti, ki jih izvedemo v naravi (in situ). Pri tem se je treba ves čas zavedati, da so ekosistemi preplet številnih kompleksnih dejavnikov, zaradi česar tudi pri tovrstnih eksperimentih ne moremo z gotovostjo trditi, da je opaženo stanje dejansko posledica alelopatskega učinka določene vrste (Inderjit in Nilsen, 2003).

Alelopatski učinek izvlečka neke vrste običajno ocenjujemo na podlagi števila skaljenih semen testne vrste, preko merjenja dolžine korenin, poganjkov ali biomase testnih rastlin (Nilsson, 1994; Macías in sod., 2000; Levizou in sod., 2002, 2004; Stavrianakou in sod., 2004; Abdelgaleil in Hashinaga, 2007; Rúa in sod., 2008; Cândido in sod., 2010; Omezzine in sod., 2011a, 2011b, 2011c; Dor in Hershenhorn, 2012; Andolfi in sod., 2013; El Ayeb in sod., 2013; Grisi in sod., 2013). Dragoeva in sod. (2014) so poleg merjenja dolžine korenin izvedli tudi *Allium* test, pri čemer so korenine čebule najprej tretirali z izvlečkom, jih fiksirali in pobarvali, nato pa pod mikroskopom pregledali celice koreninskega meristema in izračunali mitotski indeks (število celic v procesu mitoze glede na število vseh pregledanih celic) ter prešteli neobičajne celice. Svojo raziskavo sta na podoben način izpeljala tudi Aşkin Çelik in Aslantürk (2010).

2.2.3 Alelopatski potencial ditrihovk

V primeru ditrihovk gre večinoma za negativne učinke njihovih izločkov na kalitev in razvoj korenin ter poganjkov drugih vrst (Levizou in sod., 2002, 2004; Stavrianakou in sod., 2004; Aşkin Çelik in Aslantürk, 2010; Omezzine in sod., 2011a, 2011b, 2011c; Dor in Hershenhorn, 2012; Andolfi in sod., 2013). Koncentracija izločkov iz listov ditrihovk se močno poveča ob suhih, vročih in sončnih poletjih (Stephanou in Manetas, 1997a). Jesenska deževja te snovi spirajo v tla ravno v času kalitve večine mediteranskih vrst in tako ditrihovkam omogočijo kompeticijsko prednost pred drugimi vrstami (Stephanou in Manetas, 1997a; Levizou in sod., 2002). Sekundarni metaboliti ditrihovk imajo poleg alelopatskih sposobnosti tudi vlogo zaščite listov matične rastline pred UV-B sevanjem in izgubo vode (Stephanou in Manetas, 1995, 1997a, 1997b).

Karageorgou in sod. (2002) trdijo, da je povečanje koncentracije sekundarnih metabolitov na nivoju posameznih listov zaradi suše pomembno za obrambo samih listov. Vendar pa moramo upoštevati nivo celotne rastline, če pri tem želimo oceniti alelopatski učinek teh substanc na druge rastline. Karageorgou in sod. (2002) so ugotovili, da se z vidika celotne rastline ob suši v resnici koncentracije teh učinkovin zmanjša. Pomanjkanje vode namreč zavira rast in razvoj, zaradi česar se zmanjša tudi aktivna listna površina za izločanje teh učinkovin (Karageorgou in sod., 2002).

Predhodne raziskave v povezavi z alelokemikalijami ditrihovk se večinoma nanašajo le na lepljivo ditrihovko (Stamatakis in Konstantopoulou, 2001; Levizou in sod., 2002, 2004; Stavrianakou in sod., 2004; Aşkin Çelik in Aslantürk, 2010; Omezzine in sod., 2011a; Dor in Hershenhorn, 2012; Andolfi in sod., 2013). Stamatakis in Konstantopoulou (2001) sta raziskala učinek listnega izvlečka lepljive ditrihovke na N₂-fiksirajoče cianobakterije. Ugotovila sta, da stopnja delitve njihovih celic upada z višanjem koncentracije izvlečka (Stamatakis in Konstantopoulou, 2001). Ob dodatku izvlečka se močno zmanjša stopnja fiksacije CO₂ v procesu fotosinteze. Nekoliko se zmanjša tudi stopnja dihanja, poveča pa se število heterocist in s tem najverjetneje tudi stopnja asimilacije N₂ (Stamatakis in

Konstantopoulou, 2001). Izvleček listov lepljive ditrihovke preprečuje ali vsaj zakasni kalitev drugih rastlinskih vrst (Levizou in sod., 2002; Stavrianakou in sod., 2004; Omezzine in sod., 2011a; Dor in Hershenhorn, 2012; Andolfi in sod., 2013). Poleg tega zavira rast poganjkov in rast korenin (Levizou in sod., 2002, 2004; Stavrianakou in sod., 2004; Omezzine in sod., 2011a; Dor in Hershenhorn, 2012), proces celičnih delitev v meristematski coni korenin ter razvoj koreninskih laskov, a spodbuja razvoj stranskih korenin (Levizou in sod., 2002). Tudi Aşkin Çelik in Aslantürk (2010) sta poročala o zaviralnem učinku izvlečka lepljive ditrihovke na rast korenin. Ta fenomen sta raziskala podrobneje in ugotovila, da dodajanje izvlečka lepljive ditrihovke zavira proces mitoze in povzroči spremembo obarvanosti korenin, kromosomske aberacije, poškodbe na membranah, nastanek dvojedrnih celic ter mikronukleusov in celično smrt. Levizou in sod. (2002, 2004) so v svojih raziskavah opazili mnogo navzgor orientiranih korenin s potemnelimi vršički in ugotovili, da ima izvleček lepljive ditrihovke vpliv tudi na zaznavanje sile težnosti pri koreninah. Tretirane rastline so imele manj statocit od kontrolnih rastlin, močno spremenjena pa je bila tudi razporeditev organelov v njih (Levizou in sod., 2002). Pri novejši od obeh raziskav so Levizou in sod. (2004) uporabili le določene izolate iz izvlečka in odkrili, da te učinkovine posamično ne povzročajo vseh prej omenjenih sprememb na drugih vrstah, ki so jih opazili ob uporabi celotnega izvlečka. Omezzine in sod. (2011a) so dokazali, da poleg listov alelopatski potencial izkazujejo tudi drugi organi lepljive ditrihovke. Listni izvleček je sicer res najučinkovitejši, vendar imajo močan zaviralen učinek na kalitev ter rast poganjkov in korenin drugih vrst tudi koški lepljive ditrihovke. Znatno manjši učinek kaže stebelni izvleček, najšibkejši učinek pa imajo korenine. Stopnja zaviranja je v splošnem naraščala sorazmerno s koncentracijo izvlečka (Omezzine in sod., 2011a). O zelo podobnem zaporedju učinkovitosti izvlečkov različnih delov lepljive ditrihovke sta poročala tudi Dor in Hershenhorn (2012), le da je bil od stebelnega izvlečka nekoliko močnejši še izvleček semen, izvleček korenin pa ni izkazal alelopatskega učinka na testne vrste. Plevelne vrste so na izvleček lepljive ditrihovke bolj občutljive od kulturnih vrst. Njen izvleček je v dveh raziskavah zaviral vse testne plevelne vrste in večino kulturnih vrst, medtem ko na določene kulturne vrste ni imel učinka ali pa je celo nekoliko izboljšal njihovo uspevanje (Stavrianakou in sod., 2004; Dor in Hershenhorn, 2012). Ključno vlogo pri tem selektivnem učinku ima najverjetneje velikost semen, saj je imel izvleček na večja semena manjši učinek (Stavrianakou in sod., 2004; Dor in Hershenhorn, 2012). Andolfi in sod. (2013) so iz desetih izbranih mediteranskih vrst skušali pridobiti izvleček, ki bi najbolj učinkovito zaviral kalitev pojalnikov (*Orobancha* spp.) in predenic (*Cuscuta* spp.). Gre za parazitske plevelce, ki so velikokrat med glavnimi krivci za manjši pridelek nekaterih pomembnih kulturnih vrst (Parker, 2009). Največji herbicidni učinek je izkazal prav organski izvleček nadzemnih delov lepljive ditrihovke Andolfi in sod. (2013). Nekatere izolirane učinkovine iz omenjenega izvlečka so namreč kalitev testnih vrst zavrle v celoti glede na kontrolo (Andolfi in sod., 2013). Predvsem listni izvleček lepljive ditrihovke bi torej lahko uporabljali kot selektivni

herbicide za bolj trajnostno upravljanje s pleveli (Stavrianakou in sod., 2004; Omezzine in sod., 2011a; Dor in Hershenhorn, 2012).

Alelopatski potencial smrdljive ditrihovke so do sedaj raziskovali le Omezzine in sod. (2011b). Ugotovili so, da tudi izvleček smrdljive ditrihovke onemogoči ali vsaj zakasni kalitev drugih vrst ter zavira rast njihovih poganjkov in korenin (Omezzine in sod., 2011b). Izvlečki različnih delov smrdljive ditrihovke so različno učinkoviti. Najučinkovitejši je izvleček koškov, sledi mu izvleček poganjkov (stebela in listi skupaj), zelo šibak oz. brez učinka pa je njen koreninski izvleček. Stopnja zaviranja tudi v primeru smrdljive ditrihovke narašča s koncentracijo njenega izvlečka. Na ta izvleček so prav tako bolj občutljive od kulturnih plevelne vrste. Učinek je bil bolj zaznaven na koreninah kot na poganjkih (Omezzine in sod., 2011b). Organski izvleček smrdljive ditrihovke se je izkazal celo za močnejšega od izvlečka lepljive ditrihovke (Omezzine in sod., 2011c). Tudi izvlečke smrdljive ditrihovke bi torej lahko uporabljali za proizvodnjo okolju prijaznejših herbicidov (Omezzine in sod., 2011b).

2.3 VPLIV POVIŠANE SLANOSTI NA RASTLINE

Vsaka tla so slana, vendar jih zaznamujejo različni ioni v različnih razmerjih. Številne soli so esencialne za uspevanje rastlin, a kljub temu so v čezmernih količinah lahko zanje celo usodne. Ob presežku NaCl se denimo osmotski potencial tal poveča do takšne mere, da rastlina ni več zmožna sprejemati vode skozi korenine. Izrazito povečanje koncentracije NaCl torej ustvari fiziološko sušo in s tem primankljaj vode v rastlini (Carillo in sod., 2011).

Tla so lahko zasoljena zaradi različnih naravnih procesov, ali pa je vzrok za povišano koncentracijo soli v tleh človekova dejavnost, npr. namakanje poljščin, gnojenje kmetijskih površin, soljenje cest ipd. (Kotuby-Amacher in sod., 2000; Jouyban, 2012).

Večina rastlin ne prenese visokih koncentracij soli. Povišana slanost ima nanje lahko zelo negativen vpliv, saj povzroča vodni stres, ionsko neravnovesje in moteno oskrbo z minerali, toksičnost ionov v presežku, oksidativni stres, spremembe številnih metabolnih procesov, razpad membran, mutacije genskega materiala ter ustavlja proces delitve in širjenja celic (Hasegawa in sod., 2000; Munns, 2002; Zhu, 2007; Carillo in sod., 2011). Vse naštetu v končni fazi zmanjšuje stopnjo kaljivosti semen ter stopnjo rasti in preživetja kasnejših razvojnih faz (Carillo in sod., 2011; Jouyban, 2012), hkrati pa nastopita prezgodnja senescenca ter odmiranje izpostavljenih rastlin (Zhu, 2007). Zaradi povišane slanosti se med drugim poveča tudi vsebnost določenih sekundarnih metabolitov v rastlinah (Jouyban, 2012).

Nekatere vrste so razvile sposobnost tolerance do visokih koncentracij soli, različne mehanizme za izločanje presežka soli iz celic (Carillo in sod., 2011) ali pa uravnavajo

osmotski tlak s proizvodanjem in kopičenjem različnih nevtralnih topljencev (McNeil in sod., 1999). Faza kalitve je najbolj kritična faza življenjskega cikla rastlin. Vrste, katerih semena lahko normalno kalijo pri povišanih koncentracijah soli, imajo zato najverjetneje veliko kompetitivno prednost pred vrstami, ki zaradi povišane slanosti kalijo kasneje ali pa sploh ne kalijo (DiTommaso, 2004).

Do naše raziskave sta obstajali le dve raziskavi o vplivu povišane slanosti na ditrihovke (Curadi in sod., 2005; Ghorbanali in sod., 2013), dve drugi pa obravnavata uspevanje ditrihovk v sušnih razmerah (Öztürk in Mert, 1983; Pérez-Fernández in sod., 2006).

Lepljiva ditrihovka je v splošnem priznana kot vrsta, tolerantna do soli (Aronson, 1989) in pomanjkanja vode (Curadi in sod., 2005). Zmožna je preživeti vse do 52 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$, kar ustreza 30 g NaCl/l, oz. skoraj doseže slanost morske vode (približno 60 000 $\mu\text{S}/\text{cm}$) (Curadi in sod., 2005). Pri tako visokih koncentracijah liste pesti ožig, posamezne rastline so občutno manjše in bolj razvejane, imajo več cvetov in zrelost dosežejo prej kot pri nižjih koncentracijah soli. Večina spodnjih listov je v takšnih razmerah popolnoma posušenih (Curadi in sod., 2005). Kljub zaviranju rasti biomasa lepljive ditrihovke pri visokih koncentracijah soli doseže dokaj visoke vrednosti. Njena biomasa najbolj upada do 18 700 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (9 g NaCl/l), od tam naprej pa so spremembe manjše (Curadi in sod., 2005). Curadi in sod. (2005) so dokazali, da lepljiva ditrihovka akumulira Na^+ ione predvsem v spodnjem delu stebel in v starejših spodnjih listih. Na ta način mladim fotosintetsko aktivnim listom in poganjkom omogoča nemoten razvoj tudi pri visokih koncentracijah soli (Curadi in sod., 2005). Zaradi vseh naštetih lastnosti lahko lepljivo ditrihovko označimo kot izredno tolerantno do soli, vseeno pa je ne moremo obravnavati kot halofitne vrste (Curadi in sod., 2005). Pérez-Fernández in sod. (2006) so s pomočjo polietilen glikola (PEG) skušali ustvariti sušne razmere in ugotoviti, kako uspešno se z njimi spopadajo različne mediteranske vrste. PEG je inertna spojina, ki veže vodo in tako zniža osmotski potencial medija (Lawlor, 1970). S tem ustvari razmere, ki ustrezajo suši. Izkazalo se je, da je lepljiva ditrihovka izredno tolerantna do sušnih razmer. Njena semena vzklijejo tudi pri zelo nizkih osmotskih potencialih, pri čemer stopnja kaljivosti njenih semen narašča z nižanjem osmotskega potenciala. Veliko zaslugo za visoko stopnjo kaljivosti lepljive ditrihovke pri nizkih osmotskih potencialih pripisujejo priveskom na oreških. Ti imajo poleg vloge raznašanja semen tudi vlogo zadrževanja vode na površini, s čimer semenom omogočijo takojšen dostop do vode. Kljub temu se tudi ob odstranitvi priveskov stopnja kaljivosti lepljive ditrihovke povečuje z nižanjem osmotskega potenciala. Pérez-Fernández in sod. (2006) so opazili, da so priveski lepljive ditrihovke obdani z lepljivo hidrofobno prevleko, zaradi česar ob njihovi odstranitvi seme lahko doseže še večja količina vode, ki sproži kalitev tudi ob izredno nizkih vrednostih vodnega potenciala (Pérez-Fernández in sod., 2006).

Öztürk in Mert (1983) sta preučevala potrebe smrdljive ditrihovke po vodi. Ugotovila sta, da je stopnja kaljivosti njenih semen višja pri nižjih vrednostih osmotskega tlaka ter višjem deležu talne vlažnosti (Öztürk in Mert, 1983). Ghorbanali in sod. (2013) so izmed različnih koncentracij soli najvišjo stopnjo kaljivosti semen smrdljive ditrihovke ter rasti njenih poganjkov in korenin zaznali pri kontrolnem tretmaju, kjer so uporabili le destilirano vodo. Obe dosedanji raziskavi nakazujeta na to, da smrdljiva ditrihovka ni tako uspešna v boju proti suši in visoki slanosti kot lepljiva ditrihovka.

2.4 PELINOLISTNA ŽVRKLJA KOT TESTNA VRSTA

Pelinolistna žvrklja (slika 8) ali ambrozija (*Ambrosia artemisiifolia*) je vrsta, ki je širši množici v slovenskem prostoru že dokaj dobro poznana pod geslom invazivna tujerodna vrsta. Gre za enoletnico, ki zraste od nekaj dm do 2 m. Ima spiralasto nameščene in dvakrat pernato deljene liste z ozkimi suličastimi ali črtalastimi roglji. Dolgo klasasto socvetje s kimastimi moškimi koški z zraslimi ovojkovimi listi se razvije na vrhu poganjkov, ženski koški pa se v manjšem številu razvijejo nižje na poganjkih in so obdani z nekaj podpornimi listi. Iz preobraženega celotnega ženskega koška se razvije en otrdel bodičast orešek, ki vsebuje le eno seme (Jogan, 2009). Ena rastlina pelinolistne žvrklje lahko proizvede ogromno število zelo dolgoživih semen, ki ostanejo kaljiva tudi več desetletij (Rich, 1994). Za sprožitev kalitve njenih semen je potrebna vsaj ena vlažna in mrzla sezona. Je vetrocvetna vrsta, ki kali spomladi in cveti pozno poleti ter jeseni. V času cvetenja sprošča ogromne količine peloda, ki je za mnoge ljudi alergogen (Jogan, 2009). Iz svojega prvotnega območja razširjenosti v Severni Ameriki se je v Evropo razširila nenamerno kot plevel med kmetijskimi pridelki ter semeni žit in sončnic (Butterschøn in sod., 2008–2009; Essl in sod., 2009). V Sloveniji se je od konca druge svetovne vojne do konca osemdesetih let 20. stoletja pojavljala le prehodno. Od devetdesetih let prejšnjega stoletja do danes se je naturalizirala že po večini nižinskih predelov Slovenije. Širi se predvsem z mehanizacijo vzdolž prometnih koridorjev, v zadnjem času pa tudi s prenosom kontaminirane prsti na večje razdalje. Večinoma se pojavlja na suhih ruderalnih rastiščih. Najbolj množično raste na stalno mehansko motenih mestih, saj v strnjeni vegetaciji njena konkurenčnost ni tako velika. Pogosto jo opazimo ob cestišču, na manj rabljenih delih železniških nasipov, na okopavinskih njivah in na suhih delih naravnih prodišč (Jogan, 2009). V zadnjem času vedno pogosteje vdira tudi na čezmerno popašene travnike (Butterschøn in sod., 2008–2009). Dobro uspeva na gnojenih tleh, prenaša pa tudi nekoliko povišano slanost tal zaradi zimskega soljenja cest (DiTommaso, 2004). Naravovarstveno je najbolj težavna z vidika izpodrivanja avtohtone vegetacije suhih ruderalnih rastišč (Jogan, 2009).



Slika 8: Pelinolistna žvrklja (*Ambrosia artemisiifolia*). Foto: Simona Strgule Krajšek

Pelinolistno žvrkljo smo kot testno vrsto pri poskusu z vodnimi izvlečki ditrihovk izbrali namenoma, saj se s smrdljivo ditrihovko pogosto pojavljata na istih nahajališčih (Frajman in Kaligarič, 2009). Poleg tega obe spadata v družino nebinovk (Asteraceae). Pelinolistno žvrkljo je na mestih, kjer je naturalizirana, izredno težko nadzorovati in odstranjevati (Jogan, 2009). Učinkovine smrdljive ditrihovke imajo na nekatere vrste že dokazano herbicidni učinek (Omezzine in sod., 2011; Dor in Hershenhorn, 2012), medtem ko testov s pelinolistno žvrkljo do naše raziskave še ni bilo. S tega vidika nas je zanimalo, kakšen učinek ima na pelinolistno žvrkljo predvsem vodni izvleček smrdljive ditrihovke. V primeru zaviralnega učinka na uspevanje pelinolistne žvrklje bi smrdljivo ditrihovko potencialno lahko uporabljali pri proizvodnji naravnih herbicidov za zatiranje pelinolistne žvrklje.

Dosedanjih raziskav o vplivu alelokemikalij drugih vrst na pelinolistno žvrkljo je malo. Kazinczi in sod. (2008) so poročali o spodbujevalnem učinku alelokemikalij nekaterih vrst na pelinolistno žvrkljo, kar bi potencialno tudi lahko bil eden od razlogov za njeno uspešnost. Po drugi strani pa so Dmitrović in sod. (2015) objavili raziskavo, v kateri so poročali o zaviralnem učinku nekaterih alelokemikalij na pelinolistno žvrkljo in njihovo uporabo v proizvodnji bioherbicidov proti njej.

2.5 KALITEV, STRES IN TESTI

2.5.1 Splošno o kalitvi

Kalitev je eden izmed temeljnih procesov v naravi, saj omogoča razvoj nove rastline iz zarodka v semenu. Seme služi kot enota za razširjanje, ki rastlinam omogoča preživetje

skozi daljša obdobja neugodnih razmer (Koornneef in sod., 2002) v izsušenem ter metabolno relativno inaktivnem stanju (McDonald, 2008). Opremljeno je z zalogami, ki mlado kalečo rastlinico oskrbujejo s potrebno energijo vse dokler se ta ne razvije v samozadosten avtotrofen organizem (Bewley, 1997). Med ključnimi dejavniki za sprožitev kalitve so voda, kisik, temperatura in pogosto tudi svetloba ter vsebnost nitratov (Finch-Savage in Leubner-Metzger, 2006).

Za preživetje začetnih razvojnih faz rastlin je zelo pomembno, da njihova semena ne kalijo kadarkoli. Značilnost, ki številnim rastlinskim vrstam omogoča pričetek procesa kalitve v dovolj ugodnih razmerah, je dormanca semen. Gre za mehanizem, ki onemogoči kalitev popolnoma viabilnih nepoškodovanih semen (Bewley, 1997). Obstajata dve vrsti dormance, in sicer primarna ter sekundarna dormanca. Primarna dormanca se sproži že med razvojem semen, ki se iz starševske rastline razširjajo v dormantnem stanju (Bewley, 1997). Tako si rastline izborijo več časa za razširjanje svojih semen na daljše razdalje in preprečijo kalitev v morebitnih neugodnih razmerah (Taiz in Zeiger, 2010). Zrela nedormantna semena lahko kasneje vstopijo v obdobje sekundarne dormance zaradi neugodnih razmer za kalitev. Gre torej za lastnost, ki omogoča optimizacijo kalitve semen neke vrste skozi čas (Bewley, 1997). Dražljaji za prekinitev dormance so pri različnih vrstah različni. Najpogostejše je potrebno izsuševanje semen do določene mere, izpostavitve semen mrazu ali izpostavitve svetlobi (Taiz in Zeiger, 2010). Ključno vlogo pri vzdrževanju dormance ima ABA (abscizinska kislina), medtem ko je za prekinitev dormance in začetek kalitve potrebno zmanjšanje koncentracije ABA ter porast koncentracije giberelinov (Koornneef in sod., 2002).

Proces kalitve se prične s privzemom vode, ki je bistvenega pomena za ves nadaljnji potek. Sledi aktivacija encimov in različnih metabolnih procesov, začetek rasti zarodka in raztrganje semenske lupine. S prodrtnjem radikule skozi semensko lupino je kalitev končana (McDonald, 2008). Privzem vode poteka v treh fazah. V prvi fazi, ki ji pravimo tudi imbibicija, zaradi zelo hitrega privzema vode semena nabreknejo (Bewley, 1997). Ta proces ni odvisen od metabolne energije, saj lahko poteče tako pri živih kot pri mrtvih semenih (McDonald, 2008). Sledi faza stagnacije, nazadnje pa se ponovi proces privzemanja vode, ki nastopi po končani kalitvi s podaljševanjem radikule s pomočjo turgorja (Bewley, 1997).

Na uspešnost kalitve vplivajo številni okoljski dejavniki. Eden izmed njih je tudi slanost, ki negativno vpliva na kaljivost semen. Zaradi povišane slanosti se spremeni vsebnost dušika v semenu, s tem pa tudi rast zarodka (Miransari in Smith, 2014).

2.5.2 Kalitveni testi

S kalitvenimi testi ugotavljamo, kolikšno število semen bo vzkliklo v določenih razmerah ter kako bodo te vplivale na njihov nadaljnji razvoj. Načrtujemo jih tako, da je ponovljivost

čim večja. Običajno semena posadimo v pesek, prst, ali na filtrirni papir (Aswathaiah in sod., 1993). Vzgojimo jih lahko tudi na agarju ali hidroponsko (Zhang in sod., 2011). Izbor medija je odvisen od vrste semen, ki jih bomo uporabili. Pri samem izboru moramo biti pozorni tudi na to, da imajo različni tipi medijev različno kapaciteto za zadrževanje vode. Ta določa, v kakšnih količinah ter kako pogosto je med poskusom treba dodajati vodo (Karrfalt, 2008). Kalitvene teste običajno pripravimo v petrijevkah, lahko pa tudi v koritih ali drugih posodah.

Tako ISTA (International Seed Testing Association) kot AOSA (Association of Official Seed Analysts) predpisujeta uporabo štirih ponovitev s 100 semeni. Štiri ponovitve pripravimo tudi, če imamo na voljo manj kot 400 semen; v tem primeru vsaka ponovitev vsebuje manjše število semen, ki so številčno enakomerno porazdeljena med vse štiri ponovitve. To se sicer ne ujema s predpisi, a je s statističnega vidika bolj ustrezno kot priprava testa z manjšim številom ponovitev s 100 semeni (Karrfalt, 2008).

Nastavljene kalitvene teste hranimo oz. inkubiramo v prostorih z ustreznimi svetlobnimi, temperaturnimi in vlažnostnimi razmerami za kalitev izbrane testne vrste. Pri nekaterih vrstah je pred izvedbo kalitvenega testa potrebna še prekinitev primarne dormance, ki smo jo nekoliko natančneje opisali že v prejšnjem poglavju (Karrfalt, 2008). Ob zaključku testa izrazimo odstotek kaljivosti kot število skaljenih semen glede na število vseh testiranih semen.

Za našo raziskavo smo izbrali kalitvene teste na filtrirnem papirju ter kalitvene teste na agarnih ploščah. Prednosti kalitvenih testov na filtrirnem papirju so predvsem preprostejša in hitrejša priprava (Rao in sod., 2006) ter manjša verjetnost pojavljanja okužb. Primerni so za semena različnih velikosti (Rao in sod., 2006). Poleg vsega naštetega je filtrirni papir zelo vsestranski in cenovno ugoden (Aswathaiah in sod., 1993). Agarne plošče so alternativa filtrirnemu papirju, primerna za majhna ali srednje velika semena (Rao in sod., 2006). Sama priprava kalitvenih testov na agarnih ploščah je bolj zamudna in kompleksnejša od kalitvenih testov na filtrirnem papirju. Potrebna je tudi večja pazljivost med poskusom zaradi večje verjetnosti razvoja okužb. Ključna prednost agarja je njegova sposobnost zadrževanja vlage. Agar se običajno izsuši šele po enem mesecu od vlivanja v plošče (Rao in sod., 2006), zaradi česar dodajanje vode in s tem odpiranje plošč med kalitvenim poskusom ni potrebno. Poleg tega agar s svojo strukturo kalečim semenom nudi boljšo oporo in služi kot pufer za uravnavanje morebitnih nenadnih sprememb razmer v okolici, zaradi česar se nekoliko bolj približa vlogi prsti kot filtrirni papir (Zhang in sod., 2011).

2.5.3 Ugotavljanje prisotnosti stresa pri rastlinah

Kisik je molekula, ki je nujno potrebna za preživetje aerobnih organizmov. Njen značaj je zelo dvoličen; po eni strani omogoča učinkovit način pridobivanja energije z encimatskim

izgorevanjem organskih spojin (Bartosz, 1997), hkrati pa se kot stranski produkt običajnega aerobnega metabolizma tvorijo toksične reaktivne kisikove zvrsti (ROS) (Davey in sod., 2005; Razinger in sod., 2008), ki ob povišanih koncentracijah lahko povzročajo poškodbe na membranah, proteinih, DNA, ali celo celično smrt (Mittler, 2002). Med ROS prištevamo vodikov peroksid, superoksidni anion, singletni kisik in hidroksilni radikal (Davey in sod., 2005).

Aerobni organizmi so se skozi evolucijo na stalno nastajanje ROS prilagodili z različnimi antioksidativnimi mehanizmi, s katerimi uravnavajo njihove koncentracije (Bartosz, 1997). ROS pa niso le stranski produkt običajnega metabolizma; znano je, da prisotnost stresa pospeši njihovo nastajanje (Mittler, 2002). So dobri biokemijski pokazatelji toksičnosti različnih stresnih faktorjev (Tkalec, 2007) oz. oksidativnega stresa, pri čemer gre za porušeno razmerje med oksidanti in antioksidanti v prid oksidantov (Sies, 1991). Zaznamo jih lahko že pred vidnimi posledicami stresa (Tkalec, 2007). Morebitno prisotnost stresa pri rastlinah torej najlažje ugotavljamo s pomočjo različnih biokemijskih testov, ki se nanašajo na ROS. Koncentracije ROS so tudi v primeru oksidativnega stresa premajhne, da bi stres lahko opredelili neposredno preko merjenja njihove koncentracije, zato ga določamo na podlagi produktov reakcij različnih biomolekul z njimi (Bartosz, 1997). Večinoma določamo količino malondialdehida (MDA), lahko pa tudi količino stresnih proteinov, aktivnost določenih encimov, ipd. (Tkalec, 2007; Podboj, 2014).

Polinenasičene maščobne kisline v membranah so med najbolj dovzetnimi celičnimi komponentami za reakcije z ROS (Razinger in sod., 2008; Labudda, 2013). Ob stiku maščob z ROS pride do lipidne peroksidacije (Bartosz, 1997), pri čemer nastajajo lipidni peroksidi (Tkalec, 2007). Eden izmed končnih produktov njihove razgradnje je MDA, ki je zelo pogosto v uporabi kot biokemijski marker za ugotavljanje oksidativnega stresa pri rastlinah (Davey in sod., 2005; Razinger in sod., 2008); sorazmerno z večanjem stopnje stresa se namreč večja tudi količina MDA v rastlinah (Razinger in sod., 2008). Količino MDA običajno določamo spektrofotometrično po reakciji s TBA (tiobarbiturno kislino), katere rezultat je rdečkasto obarvanje (Tkalec, 2007).

2.6 NAMEN IN HIPOTEZE

Namen te magistrske naloge je bil ugotoviti, kako dobro smrdljiva in lepljiva ditrihovka uspevata pri različnih koncentracijah soli ter kakšen je učinek njunega vodnega izvlečka na kalitev drugih vrst. Zanimal nas je predvsem učinek vodnega izvlečka smrdljive ditrihovke na kalitev pelinolistne žvrklje.

Hipotezi:

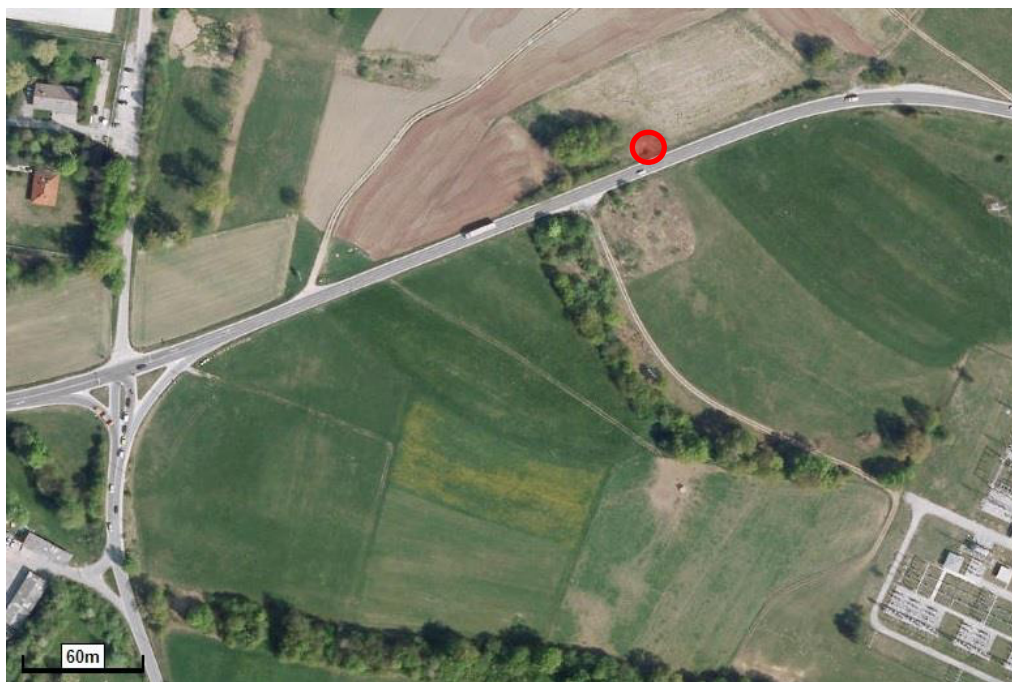
1. Obe vrsti ditrihovk sta tolerantni do povišane slanosti.
2. Vodni izvleček smrdljive ditrihovke učinkovito omejuje uspevanje drugih rastlin, predvsem pelinolistne žvrklje, ki se pogosto pojavlja na skupnih nahajališčih ob cestah.

3 MATERIAL IN METODE

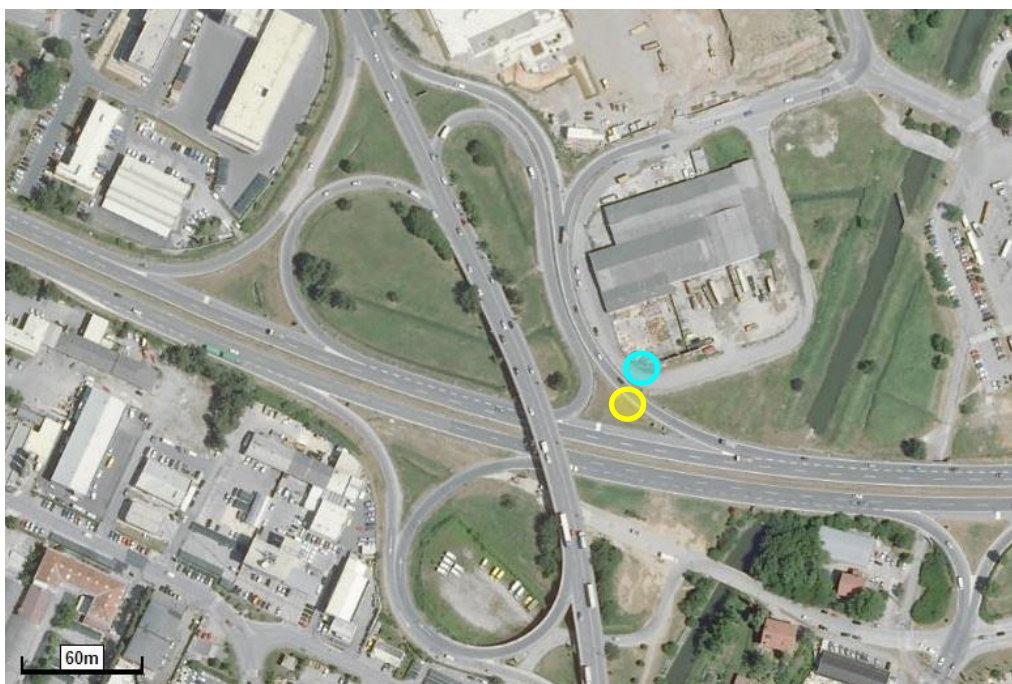
3.1 MATERIAL

3.1.1 Smrdljiva in lepljiva ditrihovka

Smrdljivo ditrihovko (*Dittrichia graveolens*) smo nabrali v fazi cvetenja 24. 9. 2013 na obrobju Ljubljane v Rojah pri Šentvidu, natančneje na gramoznem robu ceste ob Obvozni cesti (slika 9). Koordinate lokacije nabiranja so 46° 6' 17,17" N, 14° 28' 54,36" E, nadmorska višina je 295 m n. m. Tudi lepljivo ditrihovko (*D. viscosa*) smo nabrali v cvetoči fazi. Vzorčenje lepljive ditrihovke je potekalo dvakrat na dveh bližnjih lokacijah. Vzorec za poskus z vodnimi izvlečki ter prvi in drugi glavni poskus v sklopu slanosti smo nabrali 16. 9. 2013 v Kopru blizu potoka Badaševica, na ruderalnem mestu ob avtocestnem izvozu med Istrsko in Ljubljansko cesto (slika 10). Koordinate lokacije nabiranja so 45° 32' 16" N, 13° 44' 7,75" E, nadmorska višina je 1 m n. m. Material za tretji glavni poskus v sklopu slanosti smo nabrali 10. 10. 2014, prav tako v Kopru na ruderalnem mestu ob ograji okoli skladišča poleg kompleksa Planet Tuš, v bližini prej omenjenega izvoza z avtoceste (slika 10). Koordinate lokacije nabiranja so 45° 32' 16,51" N, 13° 44' 7,38" E, nadmorska višina je 1 m n. m. Koordinate in nadmorsko višino vseh mest vzorčenja smo odčitali naknadno s pomočjo spletne strani Google Maps GPS Coordinates.



Slika 9: Mesto vzorčenja smrdljive ditrihovke (rdeč krožec) ob Obvozni cesti v Ljubljani (vir posnetka iz zraka: Atlas okolja)



Slika 10: Mesti prvega (rumen krožec) in drugega (moder krožec) vzorčenja lepljive ditrihovke v Kopru blizu izvoza s primorske avtoceste (vir posnetka iz zraka: Atlas okolja)

Nabrali smo cvetoče poganjke, ki smo jih nato posušili na sobni temperaturi v temni sušilnici in jih tam hranili do uporabe. Pri poskusu z vodnimi izvlečki smo uporabili liste in koške smrdljive in lepljive ditrihovke, pri poskusu s slanostjo pa oreške obeh omenjenih vrst.

3.1.2 Druge testne vrste

Kot testne vrste smo poleg smrdljive in lepljive ditrihovke uporabili še pelinolistno žvrkljo (*Ambrosia artemisiifolia* L.), solato (*Lactuca sativa* L.) ter pšenico (*Triticum aestivum* L. em. Fiori & Paol.). Slednji vrsti z ditrihovkami nimata takšne povezave kot jo ima pelinolistna žvrklja, zaradi česar sta nam služili zgolj kot primerjava s pelinolistno žvrkljo. Izbrali smo ju, ker se pogosto pojavljata kot testni vrsti v eksperimentih v povezavi z alelopatijo in kalitvijo (Macías in sod., 2000; Abdelgaleil in Hashinaga, 2007; Cândido in sod., 2010; El Ayebe in sod., 2013; Grisi in sod., 2013), in sicer pšenico kot enokaličniško ter solato kot dvokaličniško vrsto.

3.1.2.1 Solata

Solato smo uporabili tako v sklopu vodnih izvlečkov kot v sklopu slanosti. Pri poskusu z vodnimi izvlečki ditrihovk smo uporabili solato berivko blagovne znamke Semenarna Ljubljana, pri poskusu s slanostjo pa glavnato solato Unicum blagovne znamke Agrina. Glavnata solata Unicum je pozna sorta solate (Pomladne setve ...), ki dobro prenaša vročino (Pušenjak, 2010). Berivka je zgodnja sorta solate (Pomladne setve ...), ki ji najbolj ustrezajo temperature med 10 in 20 °C (Cortese, 2012). Pri temperaturah, višjih od 20 °C,

praviloma ne kali (Cortese, 2012). Oreške obeh sort solate smo do uporabe hranili v originalni embalaži v temnem prostoru na sobni temperaturi.

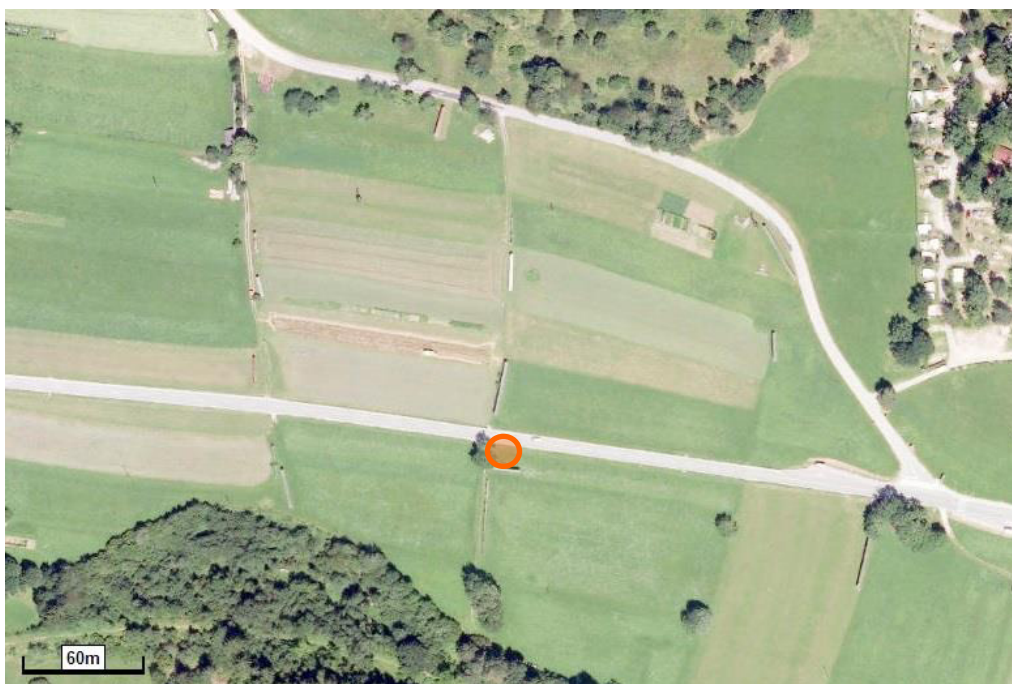
Poskus z vodnimi izvlečki smo izvajali pred poskusom s slanostjo. Pri prvem smo opazili, da so semena solate berivke znamke Semenarna Ljubljana kalila zelo slabo, zaradi česar smo pred poskusom s slanostjo kupili še tri druge sorte solate (glavnata solata Unicum blagovne znamke Agrina, berivka Bionda ricciolina o di Trieste blagovne znamke Agrina in berivka Valentin blagovne znamke Semenarna Ljubljana) ter preizkusili stopnjo kaljivosti semen teh treh sort in že prej uporabljene berivke znamke Semenarna Ljubljana. Na embalaži vseh štirih sort smo našli podatek o pričakovani stopnji kaljivosti. Ta je pri obeh sortah znamke Agrina zelo visoka, in sicer 99% (glavnata solata Unicum) ter 98% (berivka). Obe preostali sorti (znamka Semenarna Ljubljana) imata nekoliko nižjo pričakovano stopnjo kaljivosti, in sicer 85% (berivka) ter 77% (berivka Valentin). Pri našem poskusu se je izkazalo, da sta obe sorti blagovne znamke Agrina kalili dobro, preostali dve sorti (Semenarna Ljubljana) pa zelo slabo. Pri izvedbi poskusa s slanostjo smo se zato odločili za glavnato solato Unicum blagovne znamke Agrina.

3.1.2.2 Pšenica

Uporabili smo pšenična zrna blagovne znamke Natura iz ekološke pridelave, ki so sicer v prodaji za prehrano. Hranili smo jih v originalni embalaži na sobni temperaturi v svetlem prostoru. Potrebovali smo jih le pri poskusu z vodnimi izvlečki ditrihovk. Pšenica ima dokaj širok temperaturni razpon za kalitev, saj kali vse od 4 do 37 °C, optimalno pa pri temperaturah med 12 in 25 °C (Acevedo in sod., 2002).

3.1.2.3 Pelinolistna žvrklja

Plodove pelinolistne žvrklje je v okviru svojega magistrskega dela nabrala Lucija Batič 6. 5. 2012, in sicer v Mojstrani na prisojnem peščenem robu ob glavni cesti med Jesenicami in Kranjsko Goro (slika 11). Pelinolistna žvrklja se tam pojavlja v strnjenem sestoju, ki sega od roba ceste do travnika. Koordinate lokacije nabiranja so 46° 27' 50,30" N, 13° 57' 16,28" E, nadmorska višina je 660 m n. m (Batič, 2013).



Slika 11: Mesto vzorčenja pelinolistne žvrklje (oranžen krožec) ob glavni cesti v Mojstrani (vir posnetka iz zraka: Atlas okolja)

Plodove pelinolistne žvrklje smo do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C. Potrebovali smo jih le pri poskusu z vodnimi izvlečki ditrihovk.

3.2 METODE

3.2.1 Vodni izvlečki

3.2.1.1 Priprava vodnih izvlečkov

V sklopu vodnih izvlečkov smrdljive in lepljive ditrihovke smo izvedli en glavni poskus, iz katerega smo izpeljali še nekaj dodatnih manjših raziskav. V nadaljevanju bomo opisali celoten postopek izvedbe tega sklopa.

Za pripravo vodnih izvlečkov smo posušene liste in koške zmleli v električnem mlinčku (IKA Werke M 20). K 2,5 g zmetega rastlinskega materiala smo prilili 50 ml destilirane vode in nastalo suspenzijo približno 24 ur stresali na stresalniku (Gerhardt Laboshake RO 5) na 130 rpm. Po stresanju je sledilo nučiranje suspenzije skozi grob in fin filtrirni papir, s čimer smo na koncu dobili 5% vodni izvleček. Do uporabe smo ga shranili v zamrzovalniku pri -20 °C. 2,5% vodni izvleček smo pripravili z redčenjem 5% vodnega izvlečka.

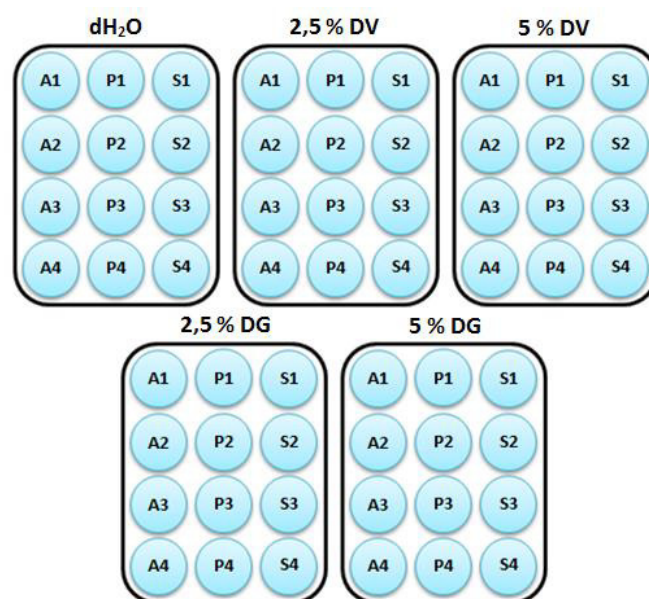
3.2.1.2 Sterilizacija plodov in filtrirnega papirja

Pred nastavitvijo poskusa smo avtoklavirali kose filtrirnega papirja. Poleg sterilizacije filtrirnega papirja smo ločeno izvedli tudi površinsko sterilizacijo plodov pelinolistne žvrklje, solate in pšenice. Izbrali smo več kot 500 najlepših plodov vsake vrste, ki smo jih stresli v filter vrečko za čaj. Filter vrečko s plodovi smo najprej 15 minut namakali v štirikrat redčeni varekini (40 ml varekine + 120 ml destilirane vode), nato pa jo trikrat po 5 minut spirali v destilirani vodi. Med namakanjem smo vsebino občasno rahlo premešali. S tem smo zmanjšali verjetnost nastanka zračnih mehurčkov med plodovi in omogočili, da je varekina prišla v stik s čim večjim delom površine plodov.

3.2.1.3 Nastavitev kalitvenih testov v petrijevkah na filtrirnem papirju

Sledila je nastavitev kalitvenih testov v petrijevkah s filtrirnim papirjem, s katerimi smo ugotavljali vpliv dveh različnih koncentracij vodnega izvlečka obeh uporabljenih vrst ditrihovk (2,5 in 5%) na kaljivost semen pelinolistne žvrklje, solate in pšenice. Za izbrani koncentraciji vodnih izvlečkov smo se odločili na podlagi nekaterih predhodnih raziskav s tega področja (Rúa in sod., 2008; Aşkin Çelik in Aslantürk, 2010; Dor in Hershenhorn, 2012; Grisi in sod., 2013). Kot kontrolo smo uporabili destilirano vodo.

Pripravili smo 60 petrijevk, od tega 20 za pelinolistno žvrkljo, 20 za pšenico ter 20 za solato. Za vsak tretma in vrsto plodov smo pripravili štiri ponovitve. V vsako petrijevko smo položili kos filtrirnega papirja in dodali 3,5 ml ustreznega vodnega izvlečka oz. destilirane vode (kontrola) in tako pripravili 12 petrijevk na tretma. V vsako petrijevko smo položili 25 plodov ene vrste v enakomernem razmaku 1 cm. Večina plodov pelinolistne žvrklje je bila gladkih, že oluščenih, nekaj pa grobih neoluščenih s še vedno prisotnimi otrdelimi ovojkovimi listi. Ker je bilo oluščenih plodov premalo, da bi samo z njimi zapolnili vseh 25 mest v posameznih petrijevkah, smo vanje postavili le 20 oluščenih plodov ter v zadnjo vrsto z rahlim zamikom od oluščenih še 5 neoluščenih plodov; verjetnost razvoja okužb je bila namreč večja pri neoluščenih plodovih, saj varekina najverjetneje ni dosegla vseh delov zelo razbrazdane površine otrdelih ovojkovih listov. Tako smo vsaj nekoliko odmaknili potencialen vir okužb od bolj natančno steriliziranih oluščenih plodov. Petrijevke smo naložili na pet pladnjev na način, prikazan na sliki 12.

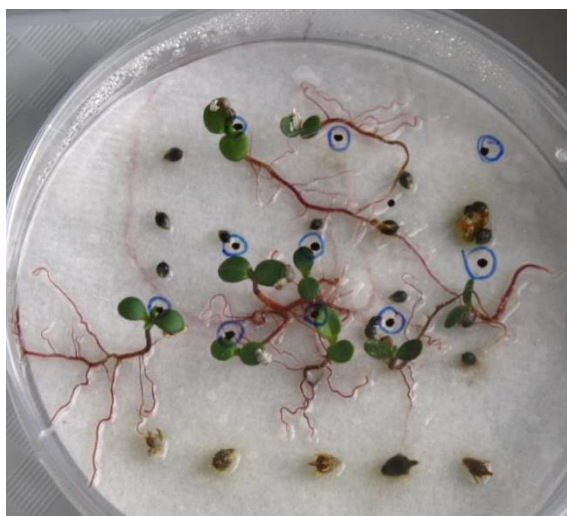


Slika 12: Shema poskusa z vodnimi izvlečki ditrihovk. Na vsakem pladnju je bilo 12 petrijevk (po štiri ponovitve za vsako od treh vrst), ki smo jim dodali isti tretma. A – ambrozija (pelinolistna žvrklja); P – pšenica; S – solata; 1, 2, 3 in 4 – ponovitve; DV – *D. viscosa* (lepljiva ditrihovka); DG – *D. graveolens* (smrdljiva ditrihovka); dH₂O – destilirana voda (kontrola)

Semena v petrijevkah smo kalili v rastni komori pri 60% vlažnosti, 22 °C ter 16 urah svetlobe na dan. Razvrstili smo jih v naključnem vrstnem redu na dodatne pladnje, s čimer smo vsaj nekoliko preprečili stik s pregretimi policami in tako omilili izhlapevanje vode iz petrijevk.

3.2.1.4 Potek poskusa

Poskus je potekal enajst dni v marcu 2014. V tem času smo vsak dan spremljali stanje v petrijevkah in si sproti beležili število vseh skaljenih semen, število vseh kalic z razprtima kličnima listoma oziroma razvito koleoptilo, število vseh kalic z razvitimi nadomestnimi koreninami ter morebitne opombe (razrast plesni in podobno). Nad vsako skaljeno seme smo z vodoodpornim flomastrom na zgornjo površino petrijevke označili piko (slika 13). Seme smo šteli kot skaljeno na dan, ko je skozi njegovo semensko lupino prodrla radikula. Pri pelinolistni žvrklji in solati smo spremljali število kalic z razprtima kličnima listoma, pri pšenici, ki je enokaličnica, pa število kalic z razvito koleoptilo. Ta dva znaka smo spremljali, ker potrjujeta viabilnost nadaljnjih razvojnih faz mladih kalic. Tako število kalic z razprtima kličnima listoma kot število kalic z razvito koleoptilo smo na petrijevkah označevali s krožcem okoli pike za vsako skaljeno seme (slika 13). Od drugega dneva poskusa dalje smo si beležili še število vseh kalic pšenice z razvitimi nadomestnimi koreninami. Na petrijevkah smo jih zaznamovali s črto čez piko, ki je označevala skaljeno seme.



Slika 13: Način označevanja skaljenih semen ter kalic z razprtima kličnima listoma na petrijevki s plodovi pelinolistne žvrklje. Skaljena semena so označena s piko, kalice z razprtima kličnima listoma pa s krožcem okoli pike. Foto: Mateja Grašič

Izsušenim petrijevkam smo po potrebi s kapalko dodali toliko kapljic destilirane vode, da je bilo celotno dno petrijevke ponovno omočeno. Stanje v petrijevkah s plodovi pšenice smo spremljali le do vključno sedmega dne poskusa, saj so v kontrolnih petrijevkah že v prvih štirih dneh od nastavitve poskusa vzkli vsa semena. Skoraj vsa so imela v tem času že razvite tudi vse druge znake, ki smo jih spremljali. Plodove solate in pelinolistne žvrklje smo opazovali vse do enajstega dne od nastavitve kalitvenih testov.

3.2.1.5 Tehtanje svežih in suhih mas kalic

Po zaključeni kalitvi pšeničnih semen smo ločeno tehtali sveže mase poganjkov in korenin kalic vsake ponovitve posebej. Poganjke in korenine kalic pšenice iz tretje in četrte ponovitve vsakega tretmaja smo zamrznili v tekočem dušiku in jih shranili v zamrzovalniku na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poganjke in korenine kalic pšenice iz prve in druge ponovitve vsakega tretmaja smo posušili v sušilniku (Heraeus instruments SUT 6120) pri $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sušenje je trajalo približno 24 ur.

3.2.1.6 Merjenje količine malondialdehida (MDA) v poganjkih in koreninah pšenice

Količino MDA smo izmerili na vzorcih tretje in četrte ponovitve s pšenico, ki smo jih do izvedbe tega testa hranili v zamrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zgledovali smo se po protokolu iz knjige z naslovom Metode u molekularnoj biologiji (Tkalec, 2007). Približno 100 mg vsakega vzorca posebej smo ob dodatku 1,5 ml reagenta 0,5% TBA + 20% TCA fino strli in inkubirali 30 minut pri $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ (WTC binder), da je potekla reakcija. Iz sušilnika smo jih takoj prestavili na led, da smo reakcijo ustavili. Po nekaj minutah smo vzorce nekoliko pretresli in jih tako premešali. Sledilo je 15-minutno centrifugiranje vzorcev v mikrocentrifugi (Eppendorf Refrigerated Centrifuge 5417R) na 10 000 rpm pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po centrifugiranju smo jih ponovno postavili na led. S spektrofotometrom (UV-1800

Shimadzu UV Spectrophotometer) smo vzorcem izmerili absorbanco pri 532 in 600 nm. Količino MDA smo nato izračunali s pomočjo naslednje formule (1):

$$MDA/FW = \frac{x}{155 \times 1000 \times m} \quad \dots (1)$$

MDA/FW = količina MDA [nmol/g sveže mase], x = razlika meritve absorbance posameznega vzorca pri 532 in 600 nm, m = sveža masa posameznega vzorca [g]. Ekstinkcijski koeficient MDA znaša 155 mM⁻¹cm⁻¹.

3.2.1.7 Analiza rezultatov

Rezultate smo analizirali s programom GraphPad Prism 5. Uporabili smo ga za izris različnih krivulj preživetja po metodi Kaplan-Meier ter njihovo primerjavo. Te krivulje se običajno nanašajo na raziskave, v katerih spremljamo čas smrti preučevanih subjektov kot enkratni dogodek. Vendar pa program Prism ni namenjen izključno izrisu krivulj preživetja, temveč v njem lahko grafično ponazorimo tudi rezultate raziskav, v katerih spremljamo kateri koli drug enkratni dogodek v času (Survival Analysis ,... 2007). V našem primeru smo kot enkratne dogodke obravnavali kalitev, razprtje kličnih listov oz. izrast koleoptile ter izrast nadomestnih korenin. Prism na podlagi vhodnih podatkov avtomatsko izriše krivulje, ki jih nato med seboj lahko primerja na dva različna načina (Survival Analysis ,... 2007), v našem primeru (kar je tudi bolj običajno) po metodi Mantel-Cox (Log-rank test). S tem testom nam program na podlagi izračunanih P vrednosti pove, ali so krivulje med seboj statistično značilno različne, ali ne.

Analiza preživetvenih testov je sicer zelo uporabna, a manj poznana metoda, zato jo bomo opisali natančneje. Podatke smo najprej v programu Microsoft Excel 2010 preuredili na tak način, da so ustrezali obliki, ki jo zahteva program GraphPad Prism 5. Vsak subjekt v razpredelnici (v našem primeru so bili subjekti posamezna semena) je predstavljal svojo vrstico. Za vsak tretma smo torej potrebovali 100 vrstic (saj smo imeli štiri ponovitve po 25 semen). V prvem stolpcu je za vsak subjekt posebej kot število dni izražen čas od začetka poskusa do opažene spremembe (vzklitje semena, razprtje kličnih listov oz. izrast koleoptile ter izrast nadomestnih korenin). Vsakemu subjektu smo nato morali pripisati vrednost 0 ali vrednost 1. Z vrednostjo 1 smo označili spremembo, vrednost 0 pa smo pripisali semenom, pri katerih do konca poskusa nismo opazili sprememb (torej semenom, ki do konca poskusa niso vzkli, so bila brez koleoptile ali kličnih listov oz. niso imela razprtih kličnih listov ter niso imela razvitih nadomestnih korenin). Če pri določenem subjektu nismo opazili sprememb (vrednost 0), smo v prvi stolpec zapisali zadnji dan poskusa. Dneve smo izpisovali kot števila, ne kot datume. Vsak naslednji stolpec je predstavljal svoj tretma, kamor smo vpisali vrednosti 0 ali 1. Stolpce smo razvrstili od najnižje (kontrola) do najvišje koncentracije uporabljenega vodnega izvlečka. Vsak subjekt (seme) je bil zastopan le v enem tretmaju, zato smo vrednost 0 ali 1 za vsak subjekt vpisali le v en stolpec, ki je predstavljal ustrezen tretma. Za vsako vrsto semen ter vrsto vodnega

izvlečka ditrihovk smo pripravili razpredelnice v ločenih zavihkih programa Microsoft Excel 2010. Podatke, ki smo jih pripravili v programu Microsoft Excel 2010, smo prenesli v program GraphPad Prism 5. V njem smo izbrali metodo Mantel-Cox, s katero je za vsako vrsto semen posebej na podlagi izračunanih P vrednosti v parih primerjal vse tretmaje s kontrolo. Med seboj je primerjal tudi podatke vseh treh tretmajev vodnega izvlečka vsake od obeh vrst ditrihovk posebej (kontrola, 2,5 ter 5% vodni izvleček) za vsako vrsto semen ločeno. Podatke o kaljivosti semen, o kalicah z razprtimi kličnimi listi oz. izrastlo koleoptilo ter o kalicah z izrastlimi nadomestnimi koreninami smo obravnavali ločeno. S pomočjo vseh teh primerjav smo lahko razbrali, ali med posameznim tretmajem in kontrolo obstajajo statistično značilne razlike, ali ne. Na podlagi vnesenih podatkov je Prism avtomatsko za vsako primerjavo izrisal tudi grafe. Prvi tip grafov je prikazoval stopnjo kaljivosti semen v odvisnosti od časa, drugi odstotek kalic z razprtima kličnima listoma oz. izrastlo koleoptilo v odvisnosti od časa, tretji pa odstotek kalic z izrastlimi nadomestnimi koreninami v odvisnosti od časa.

Suhe in sveže mase kalic pšenice in pelinolistne žvrklje smo analizirali s pomočjo enosmerne analize varince (One-way ANOVA) v programu Prism. Gre za splošno razširjeno metodo, zato je natančneje ne bomo opisovali. Zaradi zelo majhnih mas smo se med analizo odločili, da bomo izmerjene mase poganjkov in korenin posameznih tretmajev združili. V sklopu analize suhih in svežih mas smo prav tako v programu Prism izvedli tudi Tukey-jev test mnogoterih primerjav, s katerim smo ločeno med seboj primerjali sveže in suhe mase v parih, in sicer vsak tretma s kontrolo za vsako testno vrsto posebej. Prism je na podlagi vhodnih podatkov avtomatsko izrisal ločene grafe za svežo in suho maso vsake vrste posebej.

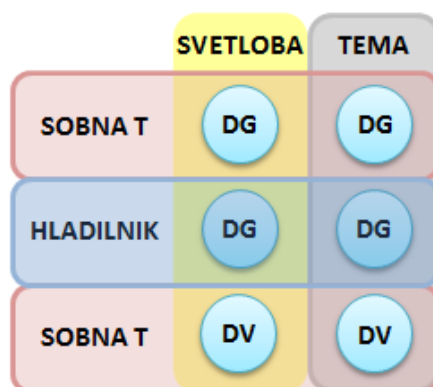
Tudi količino malondialdehida v poganjkih in koreninah kalic pšenice smo analizirali s pomočjo enosmerne analize variance (One-way ANOVA) v programu Prism. Pri tej analizi smo korenine in poganjke pšenice obravnavali ločeno, saj v primeru združevanja podatkov za korenine in poganjke pri istih tretmajih razlike niso bile očitne. Prism je na podlagi vhodnih podatkov avtomatsko izrisal tudi grafa.

3.2.2 Slanost

V sklopu slanosti smo izvedli nekaj manjših spremljevalnih poskusov, ki so nas vodili do glavnega eksperimenta. Določene ugotovitve iz spremljevalnih poskusov so pripomogle k temu, da smo nekatere metode do zadnjega poskusa nekoliko spremenili; v nadaljevanju bomo zato določene že uporabljene in obrazložene metode v primeru uvedb kakršnih koli sprememb pri kasnejših poskusih opisali ponovno.

3.2.2.1 Ugotavljanje svetlobnih in temperaturnih potreb za kalitev ditrihovk

Prvi spremljevalni poskus kalitve semen smrdljive in lepljive ditrihovke smo izvedli v januarju 2014. Zanimalo nas je, ali je za kalitev omenjenih vrst potrebna prekinitev primarne dormance z nizkimi temperaturami ter kakšne so njune svetlobne potrebe v času kalitve. Za vsako od obeh vrst ditrihovk smo pripravili različne kombinacije tretmajev (slika 14).



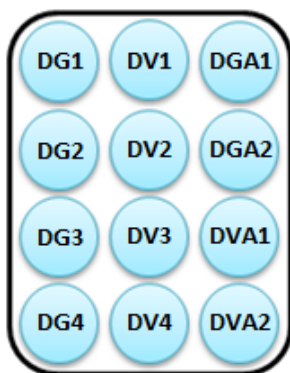
Slika 14: Načrt poskusa za ugotavljanje svetlobnih in temperaturnih potreb za kalitev ditrihovk. DG – *D. graveolens* (smrdljiva ditrihovka); DV – *D. viscosa* (lepljiva ditrihovka); sobna T – oreški, ki smo jih pred poskusom hranili na sobni temperaturi; hladilnik – oreški, ki smo jih pred poskusom hranili v hladilniku; svetloba – inkubacija na svetlobi; tema – inkubacija v temi

V šest petrijevkh smo položili po en filtrirni papir in ga omočili z destilirano vodo. V vsako petrijevko smo postavili 25 oreškov ene od obeh vrst ditrihovk, ki smo jim odstranili vse priveske (tudi kodeljico), saj so v raziskavi, ki so jo izvedli Pérez-Fernández in sod. (2006), semena lepljive ditrihovke brez priveskov kalila bolje kot semena iste vrste s priveski. Oreškov in filtrirnega papirja nismo sterilizirali. Pripravili smo vse možne kombinacije z izjemo dveh, ki bi vključevale na hladnem inkubirane oreške lepljive ditrihovke, saj do takrat oreškov lepljive ditrihovke še nismo imeli shranjenih v hladilniku. Oreški smrdljive ditrihovke, ki smo jih pred poskusom inkubirali na hladnem, so bili do začetka tega poskusa v hladilniku že približno tri mesece. Vseh šest petrijevkh smo inkubirali na sobni temperaturi. Petrijevke, ki smo jih inkubirali v temi, smo zavili v aluminijasto folijo, na svetlobi inkubirane petrijevke pa smo zavili le v prozorno plastično vrečko, da se njihova vsebina med poskusom ni preveč izsuševala. Stanje v petrijevkah smo petnajst dni pregledovali vsak z izjemo vikendov in si ob tem beležili spremembe. Kadar smo opazili, da se je vsebina preveč izsušila, smo dodali nekaj kapljic destilirane vode.

3.2.2.2 Primerjava kalitve smrdljive in lepljive ditrihovke

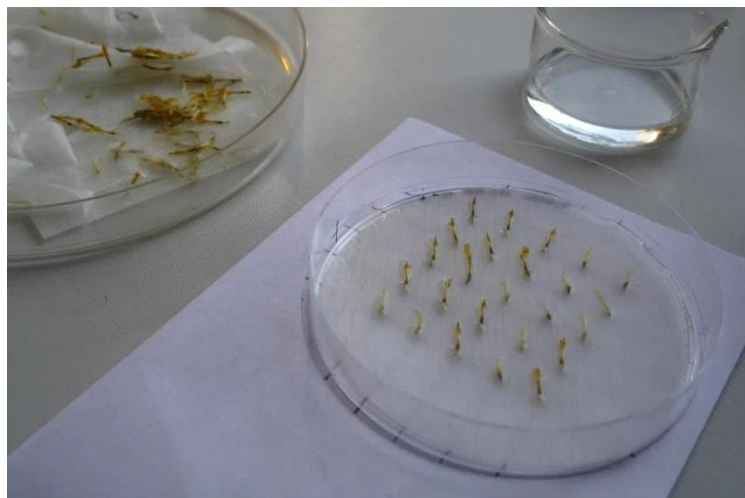
Z naslednjim spremljevalnim poskusom smo želeli dobiti vpogled v samo dinamiko kalitve obeh vrst ditrihovk, saj z njunim vzorcem kalitve še nismo imeli predhodnih izkušenj. Šlo je za poskus kalitve semen smrdljive in lepljive ditrihovke v petrijevkah s filtrirnim

papirjem ter na agarnih ploščah, pri čemer smo petrijevkam s filtrirnim papirjem dodali le še destilirano vodo. Najprej smo izbrali najlepše oreške obeh vrst, ki smo jih do nastavitve poskusa shranili v hladilniku pri 4 °C. Pri tem poskusu kodeljic, ostankov venčnih listov ter posušenih ostankov vratov pestičev nismo odstranili. Pred nastavitvijo poskusa smo sterilizirali kose filtrirnega papirja ter ločeno oreške obeh vrst ditrihovk po že opisanem postopku. Sledila je priprava petrijevk za poskus. Za vsako od obeh vrst ditrihovk smo pripravili štiri ponovitve na filtrirnem papirju ter dve ponovitvi na agarnih ploščah. Skupno smo torej potrebovali dvanajst petrijevk, in sicer osem petrijevk s filtrirnim papirjem ter štiri agarne plošče (slika 15).



Slika 15: Shema poskusa kalitve smrdljive in lepljive ditrihovke. DG – *D. graveolens* (smrdljiva ditrihovka) na filtrirnem papirju; DV – *D. viscosa* (lepljiva ditrihovka) na filtrirnem papirju; DGA – *D. graveolens* na agarnih ploščah; DVA – *D. viscosa* na agarnih ploščah; 1, 2, 3 in 4 – ponovitve

Uporabili smo štiri predhodno pripravljene agarne plošče, ki so bile shranjene v hladilniku pri 4 °C. V preostalih osem petrijevk smo položili kos filtrirnega papirja in jim dodali 3,5 ml destilirane vode. Nato smo v vsako od dvanajstih petrijevk enakomerno v razmaku 1 cm položili 25 oreškov ene od obeh vrst ditrihovk (slika 16).



Slika 16: Polaganje oreškov za poskus kalitve smrdljive in lepljive ditrihovke. Foto: Mateja Grašič

Vse štiri agarne plošče smo nazadnje zatesnili s parafilmom. Semena v petrijevkah smo kalili v rastni komori pri 60% vlažnosti, 22 °C ter 16 ur svetlobe na dan. Poskus je potekal v februarju in marcu 2014. Stanje v petrijevkah smo sedemnajst dni večinoma spremljali vsak dan. Petrijevkam s filtrirnim papirjem smo po potrebi dodali nekaj kapljic destilirane vode. Ob vsakem pregledu stanja smo si sproti beležili število vseh skaljenih semen ter število kalic z razprtima kličnima listoma, zapisali pa smo si tudi morebitne druge opažene znake. Kot skaljena semena smo šteli tista, pri katerih je skozi semensko lupino prodrla radikula. Skaljena semena ter kalice z razprtima kličnima listoma smo na petrijevkah označevali na že opisan način. Petrijevke, v katerih se je razrastla plesen, smo sproti odstranjevali iz poskusa.

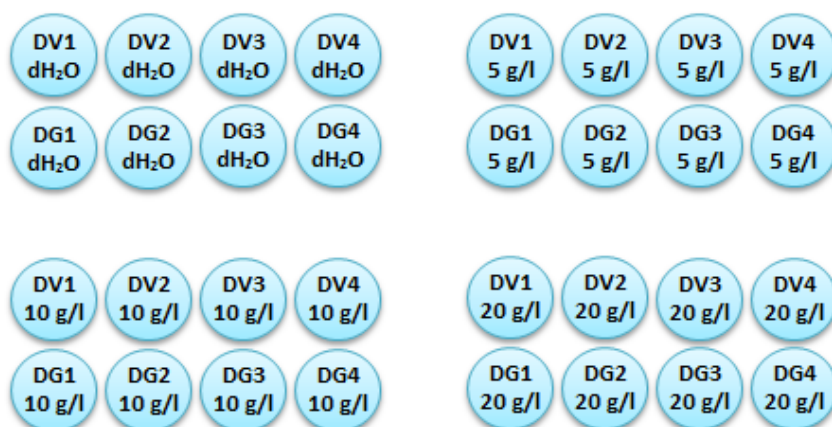
3.2.2.3 Nastavitev kalitvenih testov na agarnih ploščah in potek poskusa

Glavni poskus v sklopu slanosti je bil spremljanje kalitve ditrihovk pri različnih koncentracijah NaCl s kalitvenimi testi na agarnih ploščah. Prvič smo ga izvajali v maju 2014. Pri prvih dveh ponovitvah poskusa smo uporabili oreške lepljive ditrihovke, ki smo jih nabrali septembra 2013, pri tretji ponovitvi pa oreške lepljive ditrihovke, ki smo jih nabrali v oktobru 2014. Za poskus smo ločeno izbrali največje in najbolj polne oreške, ki smo jim odstranili posušene vratove pestičev ter morebitne ostanke venčnih listov, kodeljice pa smo pustili. Oreške obeh vrst ditrihovk, nabranih septembra 2013, smo do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C. Odločili smo se za štiri različne koncentracije NaCl:

- 0 g NaCl/l (kontrola – destilirana voda, 0 mM NaCl),
- 5 g NaCl/l (85 mM NaCl),
- 10 g NaCl/l (171 mM NaCl),
- 20 g NaCl/l (342 mM NaCl).

Izbrali smo jih na podlagi podobnih raziskav v povezavi z vplivom slanosti na kalitev nekaterih drugih vrst (Amini in sod., 2011; Ruiz-Carrasco in sod., 2011; Zhang in sod., 2012).

Za poskus smo 2% hranilnemu agarju PDA (potato dextrose agar) dodali ustrezno količino NaCl in ga sterilizirali v avtoklavu (121 °C, 60 minut). Steriliziran agar smo razlili v petrijevke kot je predstavljeno na shemi poskusa (slika 17).



Slika 17: Shema prvega poskusa v sklopu slanosti. DV – *D. viscosa*; DG – *D. graveolens*; 1, 2, 3 in 4 – ponovitve; dH₂O – destilirana voda (kontrola); 5 g/l, 10 g/l, 20 g/l – koncentracija NaCl

Oreške lepljive in smrdljive ditrihovke smo sterilizirali tako, da smo jih potopili neposredno v štirikrat redčeno varekino. Po 15 minutah namakanja smo oreške premestili v filter vrečko za čaj. Od tega koraka naprej je postopek sterilizacije potekal na že opisan način. Na vsako agarno ploščo smo položili 25 oreškov ene od obeh vrst. Plošče smo s prozorno folijo za živila zavili v pakete, da bi omejili izhlapevanje vode. Prozorno folijo za živila smo uporabili namesto parafilma. Plošč od nastavitve do konca poskusa nismo hranili v rastni komori kot pri obeh dotedanjih poskusih, saj je bilo pri obeh omenjenih poskusih izhlapevanje vode iz plošč dokaj veliko. Vse pakete s ploščami smo zato postavili na sobno temperaturo na ne preveč osončeno mesto, kjer smo jih hranili vse do konca poskusa. Ta način inkubacije se je z vidika manjšega izhlapevanja vode med poskusom izkazal kot bolj ustrezen od inkubacije v rastnih komorah. Stanje na ploščah smo sedemnajst dni pregledovali na nekaj dni in si pri tem beležili število skaljenih semen ter število kalic z razprtimi kličnima listoma. Zapisovali smo si tudi vse druge morebitne opazke (npr. razrast plesni). Kot skaljena semena smo šteli tista, pri katerih je skozi semensko lupino prodrla radikula. Skaljena semena ter kalice z razprtimi kličnima listoma smo na petrijevkah označevali na že opisan način. Plošč nismo odpirali vse do konca poskusa.

Drugo ponovitev tega poskusa smo izvedli v maju in juniju 2014, pri čemer smo namesto hranilnega agarja uporabili navadni granuliran agar; pri prvi ponovitvi poskusa smo najverjetneje imeli veliko težav z okužbami prav zaradi uporabe hranilnega agarja. Pri tem poskusu smo nekoliko spremenili tudi koncentracije NaCl, saj je bila najvišja koncentracija NaCl pri prejšnjem poskusu (20 g NaCl/l oz. 342 mM NaCl) ekstremno visoka; od stotih semen vsake od obeh vrst ditrihovk sta šele na zadnji dan poskusa vzklili le dve semeni lepljive ditrihovke. Koncentracije NaCl, ki smo jih pripravili za ta poskus, so bile:

- 0 g NaCl/l (kontrola – destilirana voda, 0 mM NaCl),
- 2,5 g NaCl/l (42 mM NaCl),

- 5 g NaCl/l (85 mM NaCl),
- 10 g NaCl/l (171 mM NaCl).

Za vsako koncentracijo NaCl smo pripravili po tri ponovitve za vsako od obeh vrst ditrihovk. Stanje na ploščah smo petindvajset dni pregledovali vsak dan in si vse novosti zapisovali na enak način, kot je opisano v prejšnjem odstavku.

Poskus smo še enkrat ponovili v novembru in decembru 2014. Postopek je bil enak kot prvič in drugič, uvedli pa smo še nekaj dodatnih sprememb. Poskus smo izvajali le z oreški lepljive ditrihovke, ki smo jih nabrali v oktobru 2014, ter z oreški solate, ki smo jo obravnavali kot pozitivno kontrolo. Oreške lepljive ditrihovke, ki smo jih uporabili pri tej ponovitvi poskusa, smo od nabiranja v oktobru 2014 do uporabe hranili v sušilnici. Ponovno smo pripravili 32 plošč, torej po štiri ponovitve za posamezno vrsto in koncentracijo NaCl. Plošče smo do konca poskusa hranili na istem mestu kot prejšnjič. Stanje na ploščah smo petindvajset dni pregledovali vsak dan in si beležili enake znake kot pri prejšnjih dveh poskusih.

3.2.2.4 Merjenje elektroprevodnosti vzorcev tal z lokacij nabiranja ditrihovk

V povezavi s slanostjo nas je zanimalo, kakšna je elektroprevodnost pripravljenih raztopin NaCl ter kakšna je elektroprevodnost tal na lokacijah, kjer dejansko uspevata smrdljiva in lepljiva ditrihovka. Izmerili smo elektroprevodnost treh različnih tipov vode in raztopin s koncentracijami NaCl, ki smo jih uporabili pri poskusu s slanostjo, ter vzorcev tal z lokacij, kjer smo nabrali obe vrsti ditrihovk. Pri delu z vzorci smo uporabljali vodo, prečiščeno s sistemom Milli-Q Plus 185 (Billerica, MA, ZDA).

Na lokaciji nabiranja smrdljive ditrihovke (gl. poglavje 3.1.1), smo 14. 5. 2014 nabrali tri površinske vzorce tal ob cesti ter tri površinske vzorce tal ob kolovozu. Izbrali smo mesta, ki so bila čim manj porasla s travo. Mesta vzorčenja so bila v razmiku približno 10 m. Prst ob cesti je bila bolj gruščnata, prst ob kolovozu pa nekoliko mehkejša. Ob kolovozu smrdljiva ditrihovka v času vzorčenja tal ni uspevala. V dneh pred vzorčenjem je bilo vreme večinoma oblačno; občasno je tudi deževalo (Meteo, 2015). Vseh šest vzorcev smo do izvedbe poskusa hranili pokrite in v temi, da so ostali čim bolj hladni. Pri nadaljnjem delu z vzorci smo se zgledovali po protokolu, ki so ga opisali Gavlak in sod. (1994). Vsak vzorec posebej smo presegali s sitom s porami velikosti 2 mm. Z vsakega vzorčnega mesta smo v hladilniku na 4 °C shranili 10 ml presejane prsti. Vzorce, nabrane ob cesti, smo sejali enega za drugim. Presejanim vzorcem tal smo dodali 40 ml vode, prečiščene s sistemom Milli-Q Plus 185. Talno suspenzijo smo dobro premešali na magnetnem mešalu. Po mešanju smo počakali dobrih 15 minut, da se je material usedel, nato pa vsem šestim vzorcem s konduktometrom (WTW Cond 330i) izmerili elektroprevodnost in temperaturo. Izvedli smo tri ponovitve za vsako meritev, ki smo jih izvajali v približno 10-minutnih intervalih. Kasneje smo iz njih izračunali povprečja. Pripravili smo še raztopine NaCl, kakršne smo uporabili v prvem poskusu s slanostjo (5 g NaCl/l, 10 g NaCl/l ter 20 g

NaCl/l). Zatehtali smo 1,25, 2,5 in 5 g NaCl ter dolili 250 ml destilirane vode. Raztopine smo približno 5 minut mešali na magnetnih mešalih. Po mešanju smo počakali 15 minut in nato izmerili elektroprevodnost. Nazadnje smo izmerili še elektroprevodnost vode iz pipe, destilirane vode ter prečiščene vode (Milli-Q). Elektroprevodnost smo merili zgolj z informativnega vidika, zato posebne analize teh meritev nismo izvedli.

19. 5. 2014 smo nabrali dva vzorca tal na lokaciji, kjer smo prvič nabirali lepljivo ditrihovko (gl. poglavje 3.1.1). Vzorca smo nabrali približno 5 m narazen. Prst na tej lokaciji je bila dokaj zbita in suha. Vreme v dneh pred vzorčenjem je bilo večinoma suho (Meteo, 2015). Vzorca smo dan kasneje pripravili za merjenje elektroprevodnosti na enak način, kot je opisano v prejšnjem odstavku. Sejali smo ju enega za drugim. Ponovno smo izvedli tri ponovitve za vsako meritev in kasneje iz njih izračunali povprečja.

3.2.2.5 Analiza rezultatov

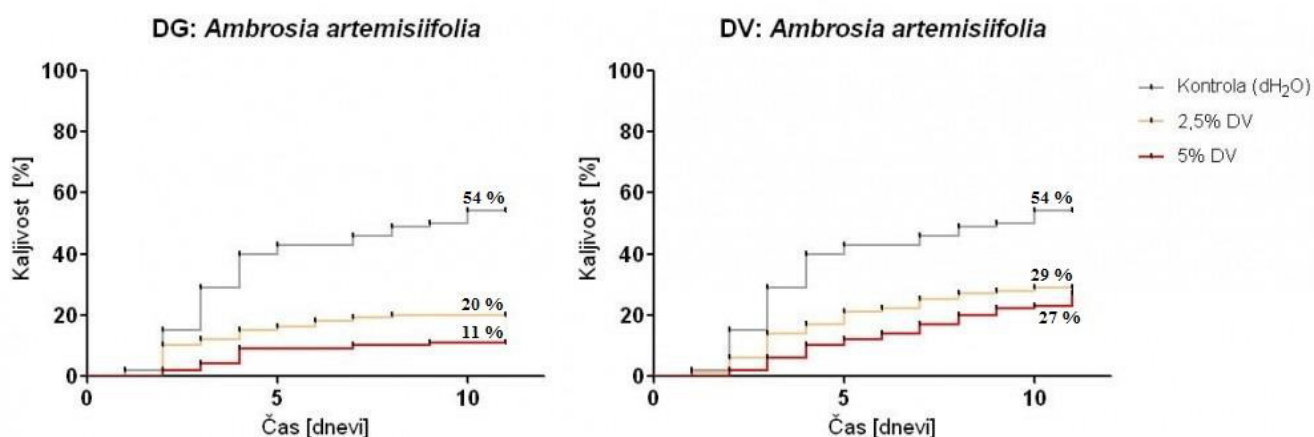
Rezultate smo ponovno analizirali s programom GraphPad Prism 5. Izvedli smo le analizo rezultatov drugega in tretjega poskusa kalitve smrdljive in lepljive ditrihovke ter solate pri različnih koncentracijah NaCl. Postopek je potekal na že opisan način za analizo preživetvenih testov. Razlika je bila le v tem, da smo pri pripravi podatkov drugega poskusa s slanostjo za program GraphPad Prism 5 za vsako koncentracijo NaCl potrebovali le 75 vrstic (pripravili smo le tri ponovitve po 25 semen), za tretji poskus s slanostjo pa enako kot pri poskusu z vodnimi izvlečki 100 vrstic (na voljo smo imeli štiri ponovitve po 25 semen). Program je na podlagi izračunanih P vrednosti z metodo Mantel-Cox med seboj za posamezno testno vrsto primerjal različne tretmaje s kontrolo ter rezultate za stopnjo kaljivosti obeh vrst ditrihovk pri istem tretmaju. Ponovno je primerjal tudi podatke vseh štirih tretmajev NaCl (vključno s kontrolo) za vsako testno vrsto ločeno. Podatke o kaljivosti semen smo obravnavali ločeno od podatkov o kalicah z razprtimi kličnimi listi. Iz teh primerjav smo lahko razbrali, ali med posameznim tretmajem in kontrolo obstajajo statistično značilne razlike, ali ne. Prism je na podlagi vnesenih podatkov za vsako primerjavo avtomatsko izrisal tudi grafe. Prvi tip grafov je prikazoval stopnjo kaljivosti semen v odvisnosti od časa, drugi pa odstotek kalic z razprtima kličnima listoma v odvisnosti od časa.

4 REZULTATI

4.1 VODNI IZVLEČKI

4.1.1 Kaljivost

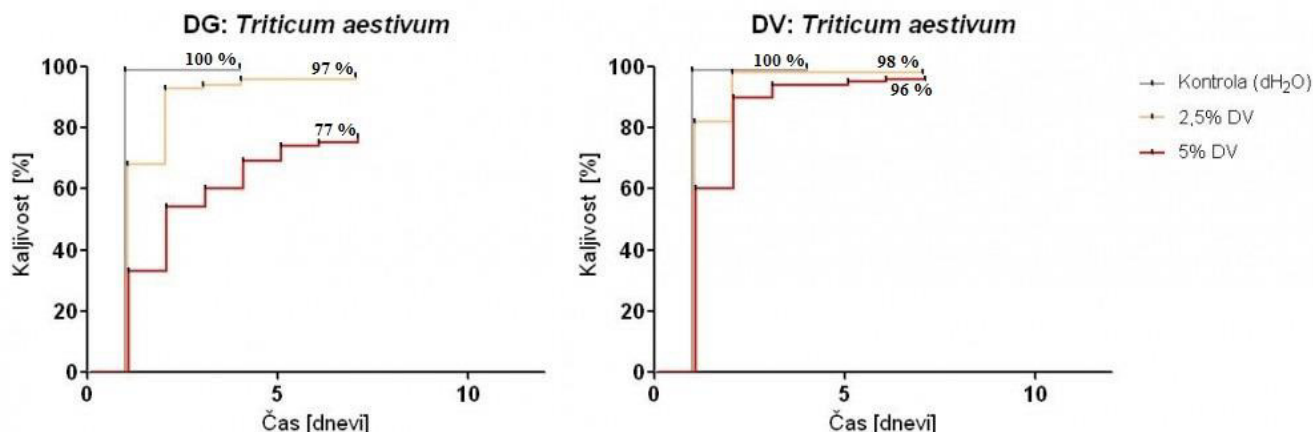
Semena obeh testnih vrst so pričela kaliti že dan po nastavitvi poskusa, pri čemer je pšenica kalila hitreje. Najvišjo stopnjo kaljivosti smo zabeležili pri pšenici, ki je v kontrolnem tretmaju do konca poskusa (sedmi dan) dosegla 100% stopnjo kaljivosti (slika 19). Pelinolistna žvrklja je do konca poskusa (enajsti dan) dosegla znatno nižjo končno stopnjo kaljivosti, ki je znašala 54 % (slika 18), najnižjo pa je dosegla solata. Semena solate so večinoma vzknila le v kontrolnih petrijevkah (52 %), le 6 % jih je vzknilo tudi ob dodatku 2,5% vodnega izvlečka lepljive ditrihovke. Zaradi izredno slabe kaljivosti semen solate (v številnih petrijevkah 0%) smo vse statistične analize opravili le za pšenico in pelinolistno žvrkljo. Pri pelinolistni žvrklji so večinoma kalila le semena iz oluščenih plodov.



Slika 18: Odstotek skaljenih semen pelinolistne žvrklje pri različnih koncentracijah vodnih izvlečkov smrdljive (DG) in lepljive ditrihovke (DV) v odvisnosti od časa. Ob koncu vsake krivulje je naveden končen odstotek kaljivosti. N = 4

Preglednica 1: Prikaz statistično značilnih razlik med posameznim tretmajem vodnih izvlečkov smrdljive (DG) in lepljive ditrihovke (DV) ter kontrolo za kaljivost semen pelinolistne žvrklje na podlagi Log-rank (Mantel-Cox) testa. P < 0,05; N = 4

Log-rank test za pelinolistno žvrkljo	P vrednost
Kontrola in 2,5% DG	< 0,0001
Kontrola in 5% DG	< 0,0001
Kontrola in 2,5% DV	0,0003
Kontrola in 5% DV	< 0,0001



Slika 19: Odstotek skaljenih semen pšenice pri različnih koncentracijah vodnih izvlečkov smrdljive (DG) in lepljive ditrihovke (DV) v odvisnosti od časa. Ob koncu vsake krivulje je naveden končen odstotek kaljivosti. N = 4

Preglednica 2: Prikaz statistično značilnih razlik med posameznim tretmajem vodnih izvlečkov smrdljive (DG) in lepljive ditrihovke (DV) ter kontrolo za kaljivost semen pšenice na podlagi Log-rank (Mantel-Cox) testa. $P < 0,05$; N = 4

Log-rank test za pšenico	P vrednost
Kontrola in 2,5% DG	< 0,0001
Kontrola in 5% DG	< 0,0001
Kontrola in 2,5% DV	0,0001
Kontrola in 5% DV	< 0,0001

Preglednica 3: Prikaz statistično značilnih razlik med vsemi tretmaji vodnega izvlečka ene od obeh vrst ditrihovk skupaj na podlagi Log-rank (Mantel-Cox) testa za kaljivost semen pelinolistne žvrklje in pšenice. DG – smrdljiva ditrihovka; DV – lepljiva ditrihovka. $P < 0,05$; N = 4

Log-rank test	Ambrozija + DG	Ambrozija + DV	Pšenica + DG	Pšenica + DV
P vrednost	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,0191

4.1.1.1 Ontogenetski razvoj

Izgled kalitvenih krivulj pšenice in pelinolistne žvrklje je nekoliko različen. Krivulje pelinolistne žvrklje so bolj položne, saj so njena semena dokaj enakomerno kalila skozi celoten poskus (slika 18), pri pšenici pa so krivulje bolj strme, saj je bila dinamika njene kalitve hitrejša (slika 19). Z višanjem koncentracije vodnih izvlečkov se je proces kalitve upočasnil in vzknilo je vedno manj semen, zaradi česar so krivulje obeh vrst postale položnejše. To je bilo bolj očitno pri pšenici ob tretiranju z različnimi koncentracijami vodnega izvlečka smrdljive ditrihovke (sliki 18 in 19). Učinek obeh vodnih izvlečkov na proces kalitve pelinolistne žvrklje in pšenice je bil sicer zaviralen pri obeh koncentracijah (preglednice 1, 2 in 3).

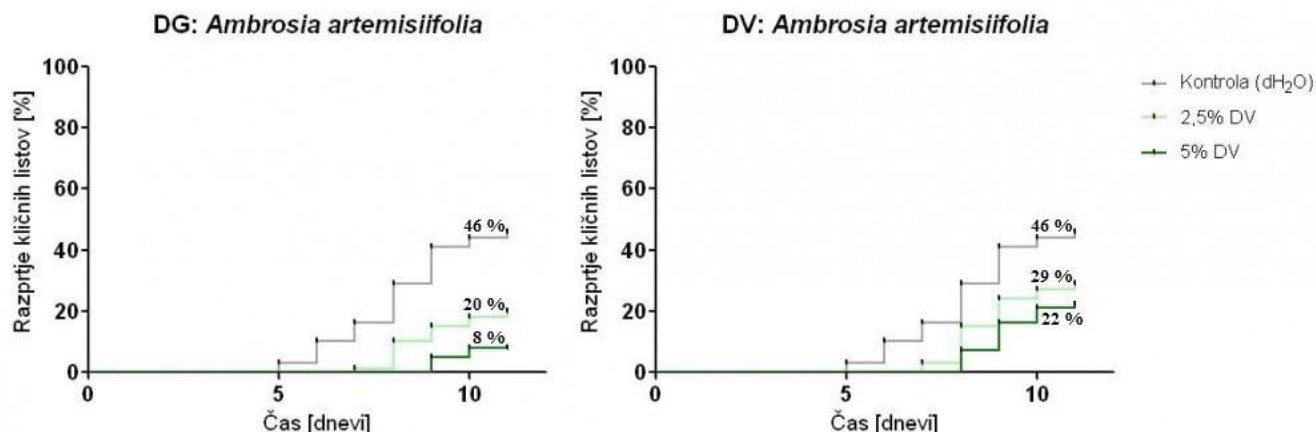
Skaljena semena solate so imela navidez pokrnele vršičke korenin brez laskov, pri čemer je bilo mnogo koreninic obrnjenih navzgor.

4.1.1.2 Glivne okužbe

Glivne okužbe smo zaznali v vseh petrijevkah s plodovi pelinolistne žvrklje ter v eni od kontrolnih petrijevkih z oreški solate. V preostalih petrijevkah se okužbe med poskusom niso razvile. Prvo okužbo smo opazili že dan po nastavitvi poskusa, in sicer v eni od petrijevkih s plodovi pelinolistne žvrklje, tretiranih z 2,5% vodnim izvlečkom lepljive ditrihovke. Izvor okužb so bili v primeru pelinolistne žvrklje največkrat neoluščeni plodovi. Tudi v petrijevki z oreški solate je bil izvor okužbe orešek. Okužbe so se večinoma pričele razraščati 2. in predvsem 3. dan po nastavitvi poskusa ter se v naslednjih dneh počasi širile. Pogosto so zavrle kalitev semen. Nekatera semena so vzknila kljub okužbam, vendar le v primeru, ko oreški s temi semeni niso bili popolnoma obrasli z njimi. V določenih primerih smo opazili, da so glive napadle tudi že skaljena semena. Koreninice teh semen so sčasoma propadle, s tem pa je bil onemogočen tudi njihov nadaljnji razvoj. Okužbe so se najbolj intenzivno razvijale v petrijevkah z dodanim vodnim izvlečkom lepljive ditrihovke (pri obeh koncentracijah približno enako), nato v kontrolnih petrijevkah, najpočasneje pa so se širile v petrijevkah z dodanim vodnim izvlečkom smrdljive ditrihovke (ponovno podobno pri obeh koncentracijah).

4.1.2 Razprtje kličnih listov ter izrast koleoptil

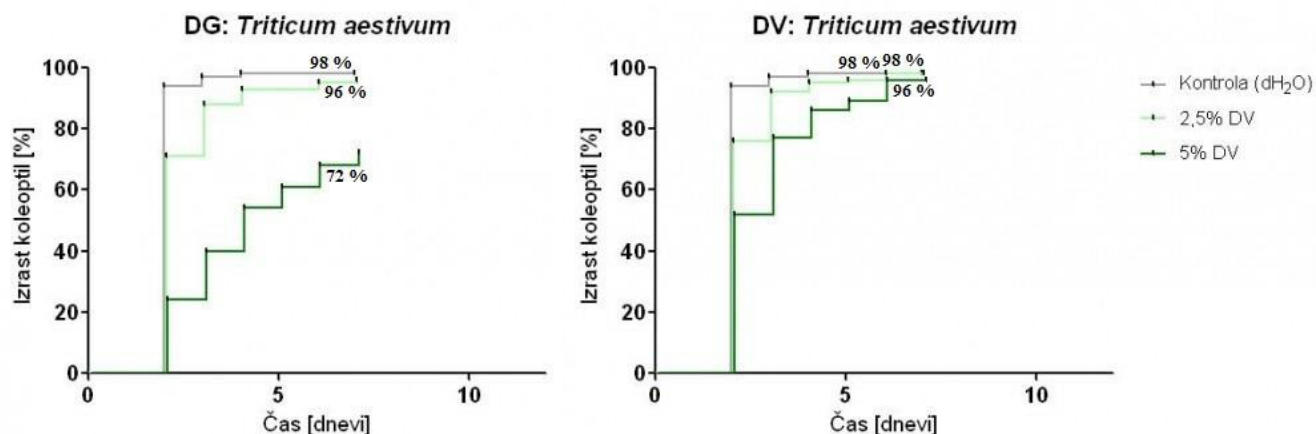
Prve koleoptile smo pri kalicah pšenice opazili že drugi dan, takoj ob začetku spremljanja tega znaka. Do razpiranja kličnih listov pri pelinolistni žvrklji je preteklo več časa. Prve kalice pelinolistne žvrklje z razprtima kličnima listoma smo opazili šele peti dan po nastavitvi poskusa. Do konca poskusa je bila pri pšenici v kontrolnem tretmaju koleoptila vidna pri 98 % kalic (slika 21), medtem ko sta se pri pelinolistni žvrklji v kontroli klična lista razprla le pri 46 % kalic (slika 20). Podobno kot v primeru kaljivosti je torej tudi glede na ta znak najvišji končen odstotek dosegla pšenica. Z višanjem koncentracije obeh vodnih izvlečkov se je znižal končen odstotek kalic z razprtima kličnima listoma oz. z izrastlo koleoptilo pri obeh vrstah, predvsem ob dodatku vodnega izvlečka smrdljive ditrihovke (sliki 20 in 21). Klični listi so se pri solati deloma razprli le v kontrolnih petrijevkah (25 %) ter ob dodatku 2,5% vodnega izvlečka lepljive ditrihovke (3 %).



Slika 20: Odstotek kalic pelinolistne žvrklje z razprtimi kličnimi listoma pri različnih koncentracijah vodnih izvlečkov smrdljive (DG) in lepljive ditrihovke (DV) v odvisnosti od časa. Ob koncu vsake krivulje je naveden končen odstotek kalic z razprtimi kličnimi listoma. N = 4

Preglednica 4: Prikaz statistično značilnih razlik med posameznim tretmajem vodnih izvlečkov smrdljive (DG) in lepljive ditrihovke (DV) ter kontrolo za razprte klične liste kalic pelinolistne žvrklje na podlagi Log-rank (Mantel-Cox) testa. P < 0,05; N = 4

Log-rank test za pelinolistno žvrkljo	P vrednost
Kontrola in 2,5% DG	< 0,0001
Kontrola in 5% DG	< 0,0001
Kontrola in 2,5% DV	0,0061
Kontrola in 5% DV	< 0,0001



Slika 21: Odstotek kalic pšenice z izrastlo koleoptilo pri različnih koncentracijah vodnih izvlečkov smrdljive (DG) in lepljive ditrihovke (DV) v odvisnosti od časa. Ob koncu vsake krivulje je naveden končen odstotek kalic z izrastlo koleoptilo. N = 4

Preglednica 5: Prikaz statistično značilnih razlik med posameznim tretmajem vodnih izvlečkov smrdljive (DG) in lepljive ditrihovke (DV) ter kontrolo za izrastle koleoptile kalic pšenice na podlagi Log-rank (Mantel-Cox) testa. $P < 0,05$; $N = 4$

Log-rank test za pšenico	P vrednost
Kontrola in 2,5% DG	0,0011
Kontrola in 5% DG	$< 0,0001$
Kontrola in 2,5% DV	0,0151
Kontrola in 5% DV	$< 0,0001$

Preglednica 6: Prikaz statistično značilnih razlik med vsemi tretmaji vodnega izvlečka ene od obeh vrst ditrihovk skupaj na podlagi Log-rank (Mantel-Cox) testa za razprte klične liste kalic pelinolistne žvrklje in koleoptile kalic pšenice. DG – smrdljiva ditrihovka; DV – lepljiva ditrihovka. $P < 0,05$; $N = 4$

Log-rank test	Ambrozija + DG	Ambrozija + DV	Pšenica + DG	Pšenica + DV
P vrednost	$< 0,0001$	0,0003	$< 0,0001$	0,0143

4.1.2.1 Ontogenetski razvoj

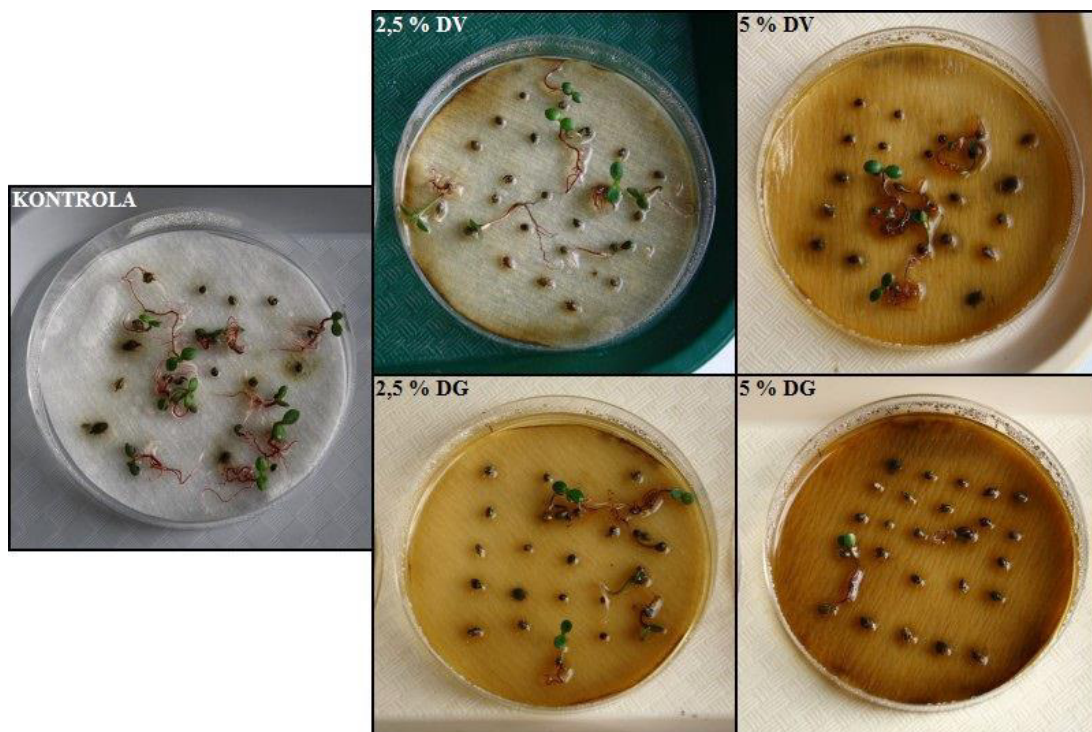
Za obliko krivulj pri pelinolistni žvrklji in pšenici velja enako kot v primeru kaljivosti; krivulje pšenice so bile bolj strme od krivulj pelinolistne žvrklje in njena dinamika izrasti koleoptil hitrejša od procesa razpiranja kličnih listov pri pelinolistni žvrklji (sliki 20 in 21). Temu ustrezno se je sam proces pri pšenici do konca poskusa že zaključil, medtem ko se pri pelinolistni žvrklji krivulja v tem času še ni ustalila, saj se je ta proces pri njej pričel kasneje (sliki 20 in 21). Učinek obeh vodnih izvlečkov na proces razpiranja kličnih listov oz. izrasti koleoptil pri pelinolistni žvrklji in pšenici je bil zaviralen pri obeh koncentracijah (preglednice 4, 5 in 6). Z višanjem koncentracije se je upočasnjeval. Krivulje pelinolistne žvrklje so večinoma ohranile svojo obliko (slika 20), krivulje pšenice pa so postale nekoliko položnejše (slika 21), saj je v primerjavi s kontrolnim tretmajem proces izrasti koleoptil v začetnih dnevih poskusa ob dodatku vodnih izvlečkov ditrihovk potekal počasneje. Z višanjem koncentracije vodnih izvlečkov se je pri pelinolistni žvrklji sam pričetek procesa razpiranja kličnih listov vedno bolj časovno zamaknil (slika 20).

Klični listi kalic solate so bili nekoliko degenerirani, saj so bili večinoma nagubani in pri nekaterih kalicah tudi nekoliko rjavkasti (slika 24).

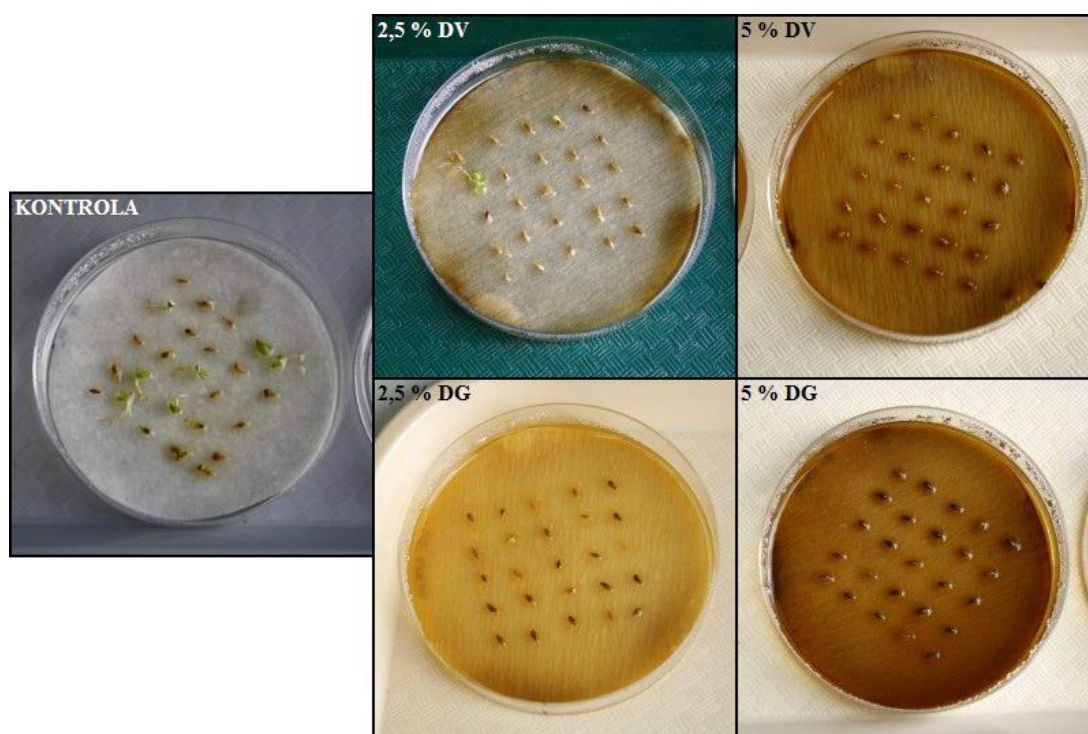
Ob koncu poskusa so bile polno razvite kalice pelinolistne žvrklje z razprtima kličnima listoma na videz enake pri vseh tretmajih (slika 23). Zaznali smo le razliko v stopnji razvitosti kalic pri različnih tretmajih v istem času; kalice v kontrolnem tretmaju so imele najdaljše korenine in najbolj razvit nadzemni del s kličnima listoma (slika 23). Z višanjem koncentracije vodnega izvlečka so bile kalice vseh testnih vrst v vedno večjem zaostanku za kalicami v kontrolnem tretmaju, predvsem v primeru vodnega izvlečka smrdljive ditrihovke (sliki 20 in 21). Razlika v razvitosti med kalicami pri različnih tretmajih se je kazala skozi celoten poskus. Najbolj očitna je bila pri pšenici (slika 22). Z izjemo razlike v razvitosti so kalice pšenice pri različnih tretmajih izgledale podobno.



Slika 22: Pšenica na zadnji dan poskusa. Prikazana je le po ena ponovitev za vsak tretma in testno vrsto. DV – vodni izvleček vrste *D. viscosa*; DG – vodni izvleček vrste *D. graveolens*; 2,5 % in 5 % – koncentracija vodnega izvlečka. Foto: Mateja Grašič



Slika 23: Pelinolistna žvrklja na zadnji dan poskusa. Prikazana je le po ena ponovitev za vsak tretma in testno vrsto. DV – vodni izvleček vrste *D. viscosa*; DG – vodni izvleček vrste *D. graveolens*; 2,5 % in 5 % – koncentracija vodnega izvlečka. Foto: Mateja Grašič



Slika 24: Solata na zadnji dan poskusa. Prikazana je le po ena ponovitev za vsak tretma in testno vrsto. DV – vodni izvleček vrste *D. viscosa*; DG – vodni izvleček vrste *D. graveolens*; 2,5 % in 5 % – koncentracija vodnega izvlečka. Foto: Mateja Grašič

Četrty dan poskusa so bile koleoptile nekaterih kalic pšenice v prvi ponovitvi kontrolnega tretmaja že tako velike, da so segale čez zgornji pokrov petrijevke in ga nekoliko dvignile. Po pregledu stanja smo vse večje koleoptile potlačili nazaj v petrijevko, vendar smo pri tem nehote rahlo pomečkali vrhnje dele petih večjih koleoptil. To ni bistveno vplivalo na rezultate, saj so se koleoptile v naslednjih dneh normalno razvijale naprej. V zadnjih dveh dneh poskusa s pšenico smo opazili, da so se nekatere kontrolne petrijevke s kalicami pšenice od zadnjega pregleda stanja močno izsušile.

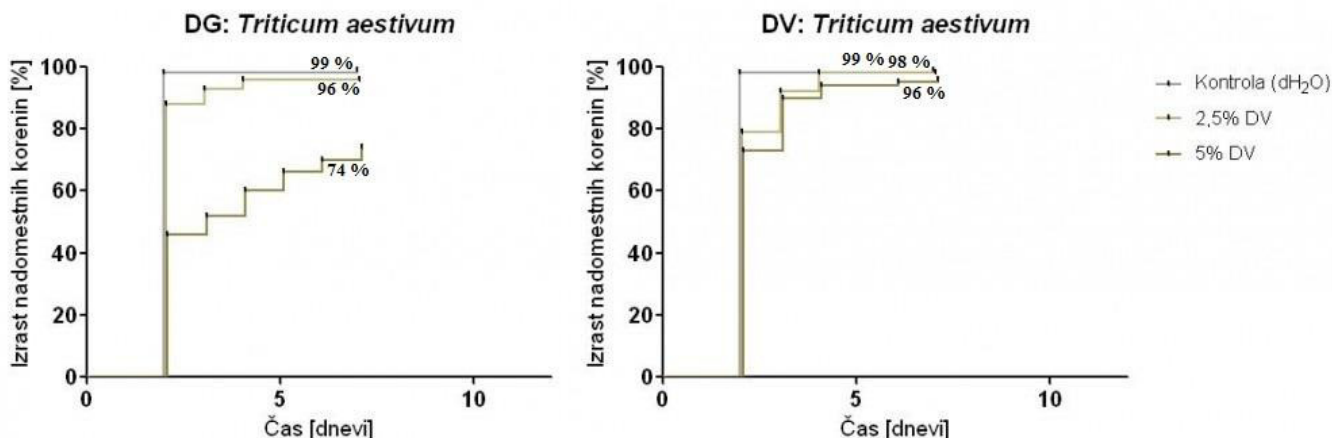
4.1.2.2 Glivne okužbe

Glivne okužbe na proces razpiranja kličnih listov pri pelinolistni žvrklji niso imele bistvenega vpliva, medtem ko so na skaljena semena solate verjetno vplivale zelo negativno, saj se klična lista nista razprla pri nobeni od številnih okuženih kalic v petrijevki z okužbami.

4.1.3 Izrast nadomestnih korenin

Prve nadomestne korenine smo opazili že drugi dan spremljanja procesa kalitve. Končen odstotek kalic pšenice z izrastlimi nadomestnimi koreninami je bil v kontrolnem tretmaju zelo visok, saj je znašal 99 % (slika 25). V primerjavi s kontrolo se skoraj ni spremenil pri nobeni od obeh koncentracij vodnega izvlečka lepljive ditrihovke ter ob dodatku najnižje

koncentracije vodnega izvlečka smrdljive ditrihovke. Znatno se je znižal le ob dodatku najvišje koncentracije vodnega izvlečka smrdljive ditrihovke (slika 25).



Slika 25: Odstotek kalic pšenice z izrastlimi nadomestnimi koreninami pri različnih koncentracijah vodnih izvlečkov smrdljive (DG) in lepljive ditrihovke (DV) v odvisnosti od časa. Ob koncu vsake krivulje je naveden končen odstotek kalic z izrastlimi nadomestnimi koreninami. N = 4

Preglednica 7: Prikaz statistično značilnih razlik med posameznim tretmajem vodnih izvlečkov smrdljive (DG) in lepljive ditrihovke (DV) ter kontrolo za izrastle nadomestne korenine kalic pšenice na podlagi Log-rank (Mantel-Cox) testa. $P < 0,05$; N = 4

Log-rank test	P vrednost
Kontrola in 2,5% DG	0,0389
Kontrola in 5% DG	< 0,0001
Kontrola in 2,5% DV	0,0022
Kontrola in 5% DV	< 0,0001

Preglednica 8: Prikaz statistično značilnih razlik med vsemi tretmaji vodnega izvlečka ene od obeh vrst ditrihovk skupaj na podlagi Log-rank (Mantel-Cox) testa za izrastle nadomestne korenine kalic pšenice. DG – smrdljiva ditrihovka; DV – lepljiva ditrihovka. $P < 0,05$; N = 4

Log-rank test	Pšenica + DG	Pšenica + DV
P vrednost	0,0001	0,2274

4.1.3.1 Ontogenetski razvoj

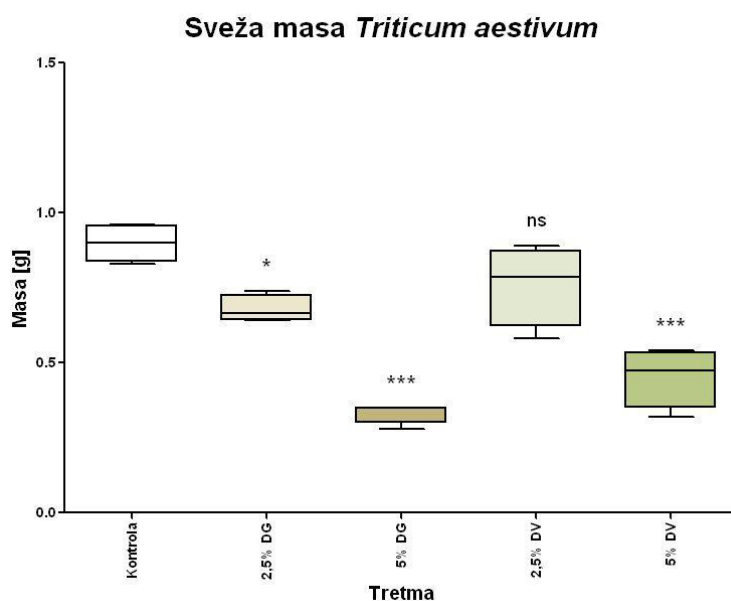
Proces izrasti nadomestnih korenin se je ob dodatku vodnega izvlečka lepljive ditrihovke v prvih dneh poskusa glede na kontrolo le malo upočasnil. Nekoliko bolj ga je upočasnil vodni izvleček smrdljive ditrihovke (slika 25). Oba vodna izvlečka sta sicer tudi na ta proces imela zaviralen učinek pri obeh koncentracijah (preglednica 7), vendar če gledamo delovanje obeh vodnih izvlečkov v celoti, je imel zaviralen učinek le vodni izvleček smrdljive ditrihovke (preglednica 8). Oblika krivulj je z višanjem koncentracije vodnih izvlečkov postala položnejša, saj je v primerjavi s kontrolnim tretmajem v začetnih dneh poskusa proces izrasti nadomestnih korenin potekal počasneje (slika 25).

Tudi glede na proces izrasti nadomestnih korenin je bilo razvidno, da so bile kalice z višanjem koncentracije vodnih izvlečkov glede na kontrolni tretma v vedno večjem zaostanku, predvsem v primeru vodnega izvlečka smrdljive ditrihovke (slika 22).

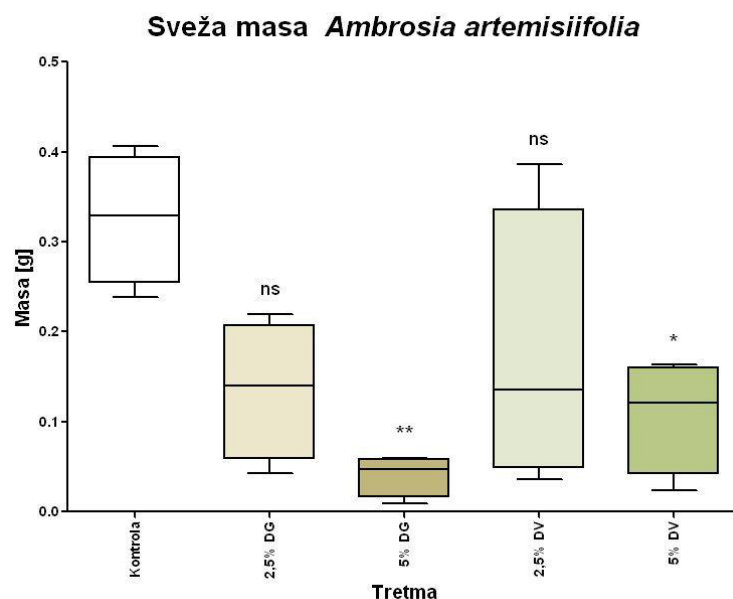
4.1.4 Sveža in suha masa

Izmerjene mase so bile izredno majhne, predvsem pri pelinolistni žvrklji, katere kalice so bile ob koncu poskusa vidno manj razvite od kalic pšenice. Tako sveža kot suha masa sta bili pri obeh testnih vrstah največji v kontrolnem tretmaju. Zaviralen učinek obeh vodnih izvlečkov pri obeh koncentracijah je bil zaznaven tako na pelinolistni žvrklji kot na pšenici (preglednica 9). Masa je pri obeh testnih vrstah z višanjem koncentracije vodnih izvlečkov ditrihovk upadala, pri čemer je trend upadanja bolj očiten pri pšenici. Nekoliko večje razlike med tretmaji smo zaznali pri vodnem izvlečku smrdljive ditrihovke (slike 26, 27, 28 in 29).

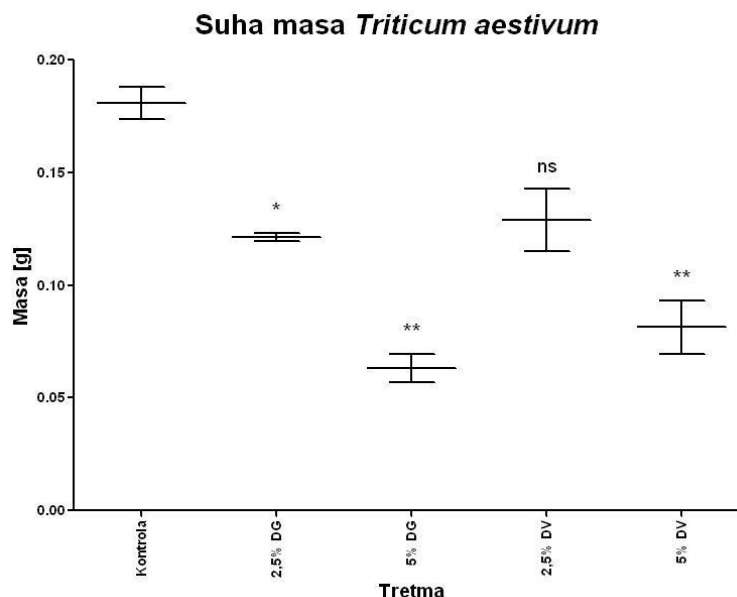
Natančnejše statistične analize za suho maso kalic pelinolistne žvrklje nismo izvedli, saj smo imeli na voljo premalo ponovitev.



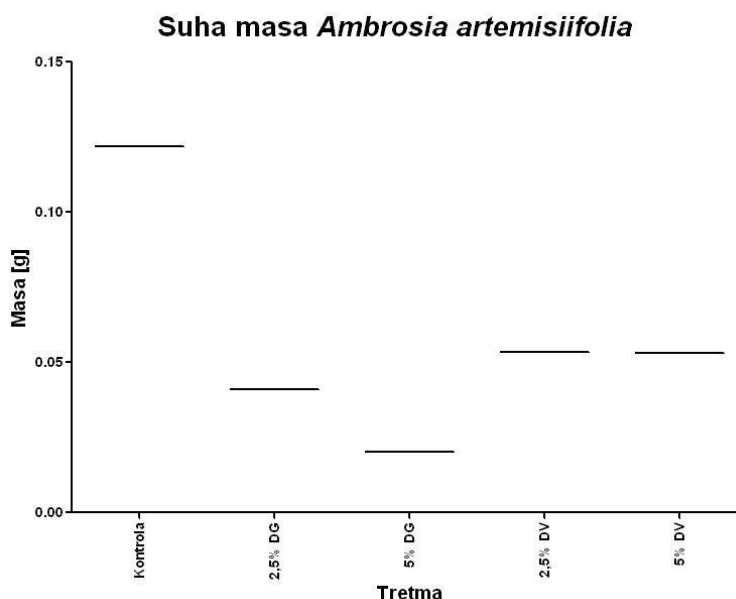
Slika 26: Intervali zaupanja za svežo maso poganjkov in korenin pšenice [g], tretirane z različnimi koncentracijami vodnih izvlečkov smrdljive (DG) in lepljive ditrihovke (DV), na zadnji (sedmi) dan poskusa. Zvezdice nad intervali zaupanja na podlagi Tukey-jevega testa mnogoterih primerjav ponazarjajo statistično različnost med posameznim tretmajem in kontrolo, oznaka ns pa pomeni, da razlik ni; večje število zvezdic pomeni večjo verjetnost, da je razlika statistično značilna. ***: $P < 0,001$; **: $0,001 < P < 0,01$; *: $0,01 < P < 0,05$; ns: $P > 0,05$; $N = 2$



Slika 27: Intervali zaupanja za svežo maso poganjkov in korenin pelinolistne žvrklje [g], tretirane z različnimi koncentracijami vodnih izvlečkov smrdljive (DG) in lepljive ditrihovke (DV), na zadnji (enajsti) dan poskusa. Zvezdice nad intervali zaupanja na podlagi Tukey-jevega testa mnogoterih primerjav ponazarjajo statistično različnost med posameznim tretmajem in kontrolo, oznaka ns pa pomeni, da razlik ni; večje število zvezdic pomeni večjo verjetnost, da je razlika statistično značilna. ***: $P < 0,001$; **: $0,001 < P < 0,01$; *: $0,01 < P < 0,05$; ns: $P > 0,05$; $N = 2$



Slika 28: Intervali zaupanja za suho maso poganjkov in korenin pšenice [g], tretirane z različnimi koncentracijami vodnih izvlečkov smrdljive (DG) in lepljive ditrihovke (DV). Zvezdice nad intervali zaupanja na podlagi Tukey-jevega testa mnogoterih primerjav ponazarjajo statistično različnost med posameznim tretmajem in kontrolo, oznaka ns pa pomeni, da razlik ni; večje število zvezdic pomeni večjo verjetnost, da je razlika statistično značilna. ***: $P < 0,001$; **: $0,001 < P < 0,01$; *: $0,01 < P < 0,05$; ns: $P > 0,05$; $N = 2$



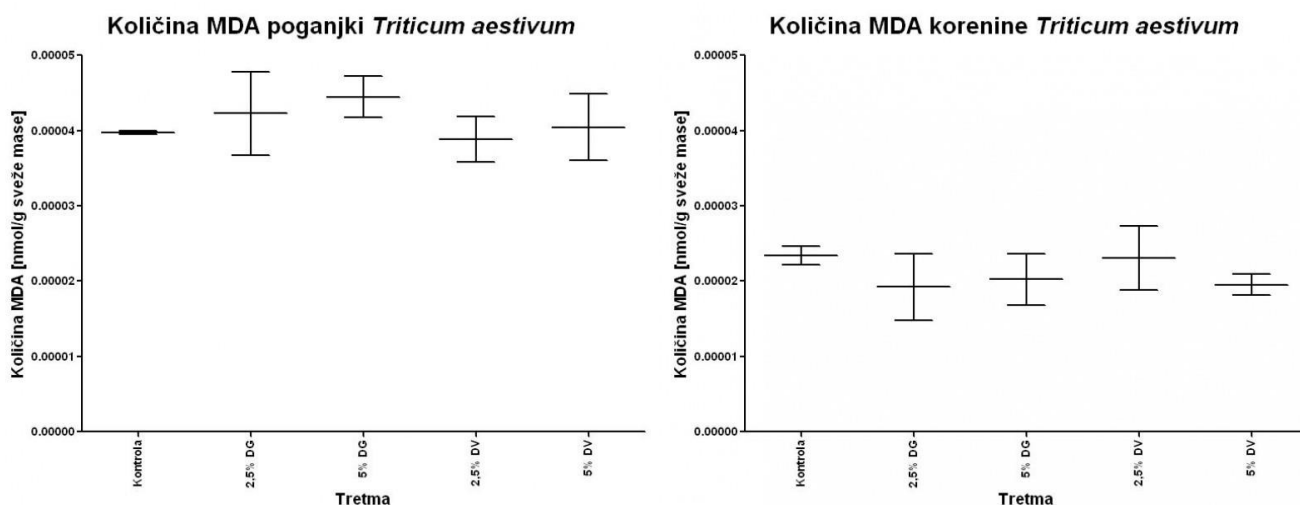
Slika 29: Intervali zaupanja za suho maso poganjkov in korenin pelinolistne žvrklje [g], tretirane z različnimi koncentracijami vodnih izvlečkov smrdljive (DG) in lepljive ditrihovke (DV). N = 2

Preglednica 9: Prikaz statistično značilnih razlik med vsemi tretmaji za svežo in suho maso kalic pšenice ter pelinolistne žvrklje na podlagi enosmerne analize variance (One-way ANOVA). $P < 0,05$; N = 2

Enosmerna analiza variance	Sveža masa pšenice	Suha masa pšenice	Sveža masa ambrozije
P vrednost	< 0,0001	0,0017	0,0054

4.1.5 Količina malondialdehida (MDA)

Med različnimi tretmaji za posamezen del pšenice (poganjki ali korenine) statistično značilnih razlik ni bilo. Izmerjene količine malondialdehida (MDA) v poganjkih in koreninah pšenice so bile zelo majhne; vrednosti so segale le od 0,0000148 do 0,0000478 nmol/g sveže mase. Kljub temu je s slike 30 razvidno, da je bilo MDA pri vseh tretmajih v poganjkih več kot v koreninah. Razlika med koreninami in poganjki je bila tudi statistično značilna (preglednica 10). Kljub sicer zelo majhnim razlikam je količina v poganjkih rahlo naraščala z višanjem koncentracije vodnih izvlečkov ditrihovk, pri čemer je bila v primeru vodnega izvlečka smrdljive ditrihovke nekoliko višja kot v primeru vodnega izvlečka lepljive ditrihovke (slika 30). V primeru korenin smo največjo količino MDA izmerili v kontrolnem tretmaju, med večino preostalih tretmajev pa so bile razlike neznatne.



Slika 30: Intervali zaupanja za količino MDA [nmol/g sveže mase] v poganjkih (levo) in koreninah pšenice (desno), tretirane z različnimi koncentracijami vodnih izvlečkov smrdljive (DG) in lepljive ditrihovke (DV).

N = 2

Preglednica 10: Prikaz statistično značilnih razlik za količino MDA med vsemi tretmaji za poganjke in korenine pšenice na podlagi enosmerne analize variance (One-way ANOVA). $P < 0,05$; N = 2

Enosmerna analiza variance	Količina MDA
P vrednost	0,0007

4.1.6 Pregled pomembnejših rezultatov v sklopu vodnih izvlečkov ditrihovk

Rezultati v preglednici 11 jasno kažejo na zaviralen učinek vodnih izvlečkov ditrihovk.

Preglednica 11: Vpliv različnih koncentracij vodnih izvlečkov smrdljive (DG) in lepljive ditrihovke (DV) na različne spremljane znake pri pelinolistni žvrklji (ambroziji) in pšenici, ponazorjen na podlagi izračunanih P vrednosti. Podatki za količino MDA pri pšenici v preglednico zaradi neinformativnosti niso vključeni. Večji krožci zaznamujejo P vrednosti, manjše od 0,001. Rdeča barva označuje zaviralen vpliv obravnavanega tretmaja na spremljan znak pri obravnavani testni vrsti glede na kontrolo; modra barva kaže nevtralen vpliv glede na kontrolo; označba / pomeni, da podatki iz različnih razlogov niso bili na voljo. $P < 0,05$; N = 4

Spremljani znaki	Kaljivost	Klični listi oz. koleoptile	Nadomestne korenine	Sveža masa	Suha masa
2,5% DG	Ambrozija	●	/	●	/
	Pšenica	●	●	●	●
5% DG	Ambrozija	●	/	●	/
	Pšenica	●	●	●	●
2,5% DV	Ambrozija	●	/	●	/
	Pšenica	●	●	●	●
5% DV	Ambrozija	●	/	●	/
	Pšenica	●	●	●	●

4.2 SLANOST

4.2.1 Spremljevalni poskusi s smrdljivo in lepljivo ditrihovko

Stopnja kaljivosti semen smrdljive in lepljive ditrihovke je bila v splošnem zelo nizka. Opazili smo številne okužbe (predvsem glivne), ki so verjetno zavirale kalitev semen. Večinoma je bilo okužb več v petrijevkah z oreški lepljive ditrihovke. Njena semena so kalila slabše od semen smrdljive ditrihovke.

4.2.1.1 Ugotavljanje svetlobnih in temperaturnih potreb za kalitev ditrihovk

Preglednica 12: Odstotek skaljenih semen smrdljive in lepljive ditrihovke pri različnih svetlobnih in temperaturnih razmerah na zadnji dan poskusa. Prisotnost glivnih okužb v posameznih petrijevkah je označena s simbolom •; oznaka / pomeni, da teh tretmajev nismo pripravili. N = 1

Tretma	Smrdljiva ditrihovka	Lepljiva ditrihovka
Svetloba + sobna temperatura	16 %	0 % •
Svetloba + hladilnik	36 %	/
Tema + sobna temperatura	8 % •	8 % •
Tema + hladilnik	12 %	/

Stopnja kaljivosti semen je bila v vseh tretmajih zelo nizka (preglednica 12). V določenih primerih jo je še dodatno znižala prisotnost glivnih okužb (pri vseh tretmajih z manj kot 10 % skaljenih semen). V petrijevkah z oreški lepljive ditrihovke so se glivne okužbe razrastle zelo izrazito, zato za to vrsto zanesljivih sklepov iz tega poskusa ne moremo podati. Iz rezultatov za smrdljivo ditrihovko lahko vidimo, da je kaljivost boljša na svetlobi, ter da semena kalijo nekoliko bolje, če jih predhodno hranimo v hladilniku.

4.2.1.2 Primerjava kalitve smrdljive in lepljive ditrihovke

Stopnja kaljivosti je bila nizka (preglednica 13). Na obeh substratih je bolje kalila smrdljiva ditrihovka, vendar je bila stopnja kaljivosti njenih semen na agarju občutno nižja kot na filtrirnem papirju. Stopnja kaljivosti lepljive ditrihovke je bila zelo nizka in na obeh tipih substrata podobna. Primerljiv rezultat je opazen tudi v povezavi z razprtjem kličnih listov pri obeh vrstah. Prvo seme je vzkilo četrty dan od nastavitve poskusa, in sicer je šlo za seme v orešku lepljive ditrihovke na filtrirnem papirju. Prva semena smrdljive ditrihovke so vzkila dan kasneje, prav tako na filtrirnem papirju. Prvi klični listi so se pri obeh vrstah na obeh tipih substrata razprli osmi dan od nastavitve poskusa. Razvoj je bil pri obeh vrstah ditrihovk dokaj počasen.

Preglednica 13: Odstotek skaljenih semen ter odstotek kalic smrdljive (DG) in lepljive ditrihovke (DV) z razprtima kličnima listoma na zadnji dan poskusa s posameznimi tretmaji. Podana so povprečja vseh ponovitev posameznega tretmaja. N = 1

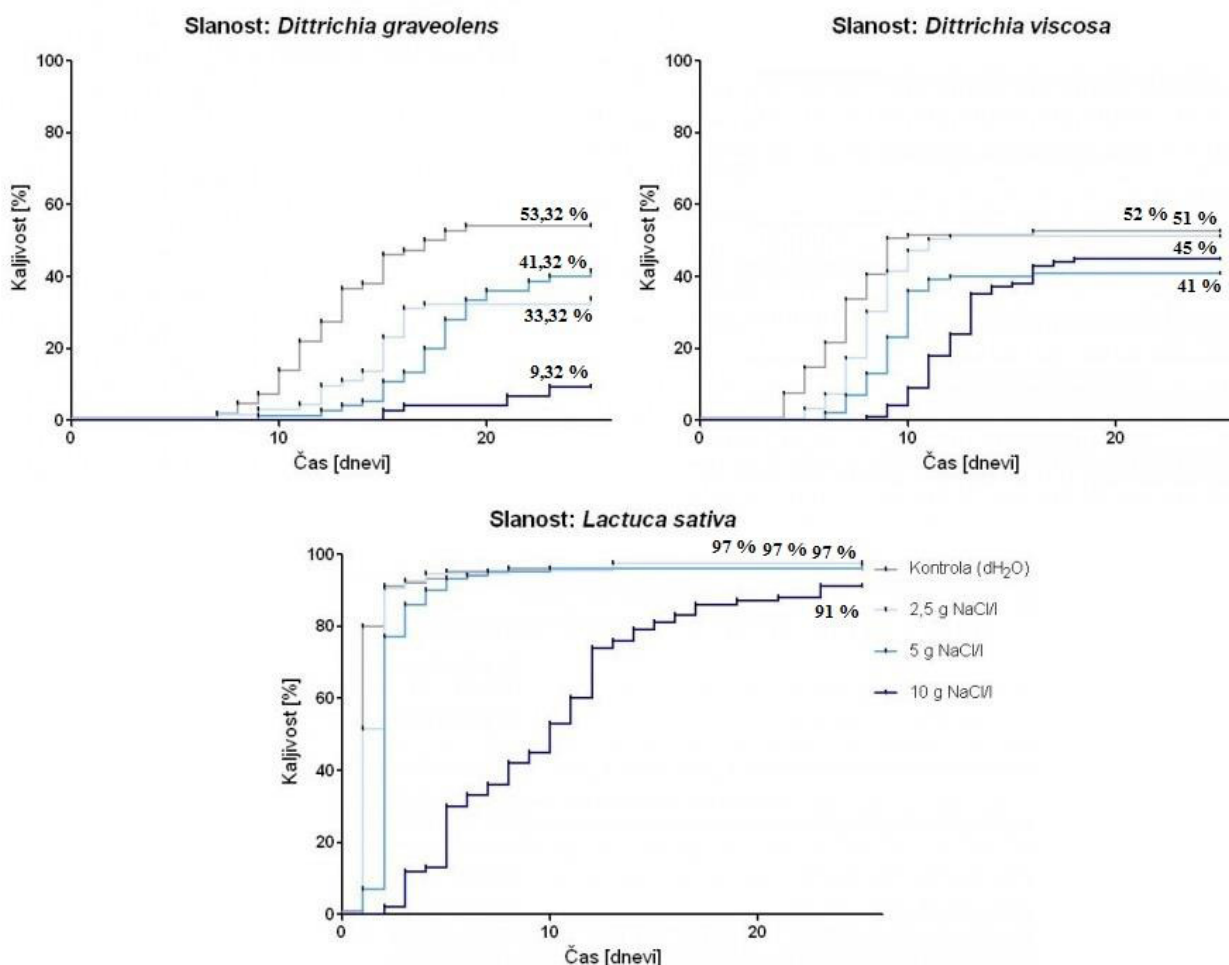
DG + filtrirni papir		DV + filtrirni papir		DG + agar		DV + agar	
kaljivost	klični listi	kaljivost	klični listi	kaljivost	klični listi	kaljivost	klični listi
52 %	39 %	5 %	2 %	18 %	8 %	8 %	4 %

Glivne okužbe smo zaznali v vseh razen dveh petrijevkah z oreški smrdljive ditrihovke na filtrirnem papirju. Največ okužb je bilo na agarnih ploščah, predvsem na ploščah z oreški lepljive ditrihovke. Glive so se na njih razrastle po skoraj celotni površini agarja in prekrile večino oreškov. Tudi v petrijevkah s filtrirnim papirjem so se glive bolj razrastle v petrijevkah z oreški lepljive ditrihovke. Pri nekaterih kalicah smo v zadnjih dneh poteka poskusa opazili navzgor obrnjene koreninice s potemnelimi vršički.

4.2.2 Kaljivost

Semena vseh treh testnih vrst so kalila pri vseh koncentracijah NaCl. Prva semena smrdljive ditrihovke so vzknila šele sedmi dan od nastavitve poskusa, prva semena lepljive ditrihovke četrty dan, prva semena solate pa že dan po nastavitvi poskusa. Večina skaljenih semen lepljive ditrihovke je ne glede na koncentracijo NaCl vzknila v prvih dneh po začetku kalitve te vrste pri različnih tretmajih, medtem ko je pri višjih koncentracijah NaCl več semen smrdljive ditrihovke vzknilo v kasnejših dneh od začetka kalitve te vrste pri različnih tretmajih. To se odraža na oblikah njunih kalitvenih krivulj, iz katerih lahko razberemo, da se je proces kalitve pri lepljivi ditrihovki do konca poskusa že zaključil, medtem ko je pri smrdljivi ditrihovki še potekal (slika 31). Najvišji končen odstotek kaljivosti je dosegla solata. Smrdljiva in lepljiva ditrihovka sta v kontrolnem tretmaju dosegli med seboj zelo podoben končen odstotek kaljivosti (53 in 52 %), ki pa je bil občutno nižji kot pri solati, pri kateri je znašal 97 % (slika 31). Razlika med končnim odstotkom kaljivosti smrdljive ditrihovke pri različnih tretmajih je bila dokaj velika. Končen odstotek kaljivosti je pri tej vrsti upadal, razen pri 5 g NaCl/l, kjer je bil ponovno nekoliko višji (slika 31). Na zaviraen učinek povišane slanosti na proces kalitve smrdljive ditrihovke pri vseh koncentracijah NaCl je pokazala tudi statistična analiza (preglednica 14). Med končnim odstotkom kaljivosti semen lepljive ditrihovke pri različnih tretmajih ni bilo večjih razlik. Statistična analiza je kljub temu pokazala, da je imela povišana slanost bistven negativen vpliv na dinamiko kalitve te vrste pri 5 in 10 g NaCl/l (preglednica 15). Pri solati podobno kot pri lepljivi ditrihovki glede končnega odstotka kaljivosti ni bilo bistvenih razlik med tretmaji. Ta je bil nekoliko nižji le pri najvišji koncentraciji NaCl (slika 31). Glede na statistiko je kljub pravkar navedenemu povišana slanost na proces kalitve solate imela zaznaven negativen vpliv glede na kontrolo pri vseh koncentracijah (preglednica 16).

Ob primerjavi končnega odstotka kaljivosti zgolj obeh vrst ditrihovk pri istem tretmaju lahko vidimo, da je bil pri kontrolnem tretmaju ter 5 g NaCl/l ta pri obeh vrstah zelo podoben (sliki 31 in 32). Pri 2,5 g NaCl/l je bil končen odstotek kaljivosti lepljive ditrihovke nekoliko višji, pri 10 g NaCl/l pa izrazito višji od končnega odstotka kaljivosti smrdljive ditrihovke (sliki 31 in 32). Razlika med smrdljivo in lepljivo ditrihovko je bila najbolj očitna prav pri najvišji koncentraciji NaCl (sliki 31 in 32).



Slika 31: Odstotek skaljenih semen smrdljive in lepljive ditrihovke ter solate pri različnih koncentracijah NaCl v odvisnosti od časa. Ob koncu vsake krivulje je naveden končen odstotek kaljivosti. N = 3 pri *D. graveolens*, N = 4 pri *D. viscosa* in *L. sativa*

Preglednica 14: Prikaz statistično značilnih razlik med posameznim tretmajem NaCl in kontrolo za kaljivost semen smrdljive ditrihovke na podlagi Log-rank (Mantel-Cox) testa. $P < 0,05$; N = 3

Log-rank test za smrdljivo ditrihovko	P vrednost
Kontrola in 2,5 g NaCl/l	0,0047
Kontrola in 5 g NaCl/l	0,0146
Kontrola in 10 g NaCl/l	< 0,0001

Preglednica 15: Prikaz statistično značilnih razlik med posameznim tretmajem NaCl in kontrolo za kaljivost semen lepljive ditrihovke na podlagi Log-rank (Mantel-Cox) testa. $P < 0,05$; N = 4

Log-rank test za lepljivo ditrihovko	P vrednost
Kontrola in 2,5 g NaCl/l	0,3892
Kontrola in 5 g NaCl/l	0,0111
Kontrola in 10 g NaCl/l	0,0118

Preglednica 16: Prikaz statistično značilnih razlik med posameznim tretmajem NaCl in kontrolo za kaljivost semen solate na podlagi Log-rank (Mantel-Cox) testa. $P < 0,05$; $N = 4$

Log-rank test za solato	P vrednost
Kontrola in 2,5 g NaCl/l	0,0342
Kontrola in 5 g NaCl/l	$< 0,0001$
Kontrola in 10 g NaCl/l	$< 0,0001$

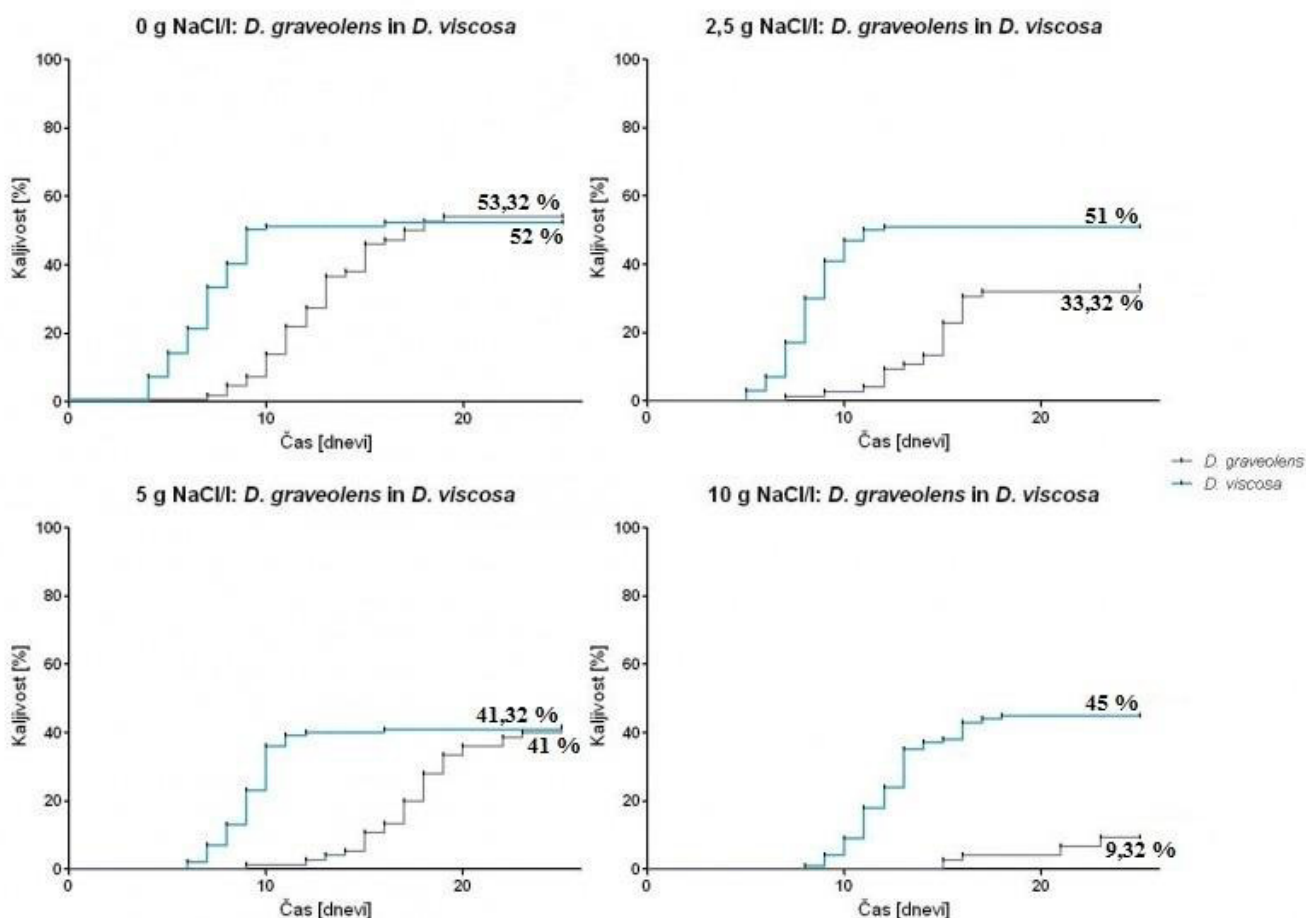
Preglednica 17: Prikaz statistično značilnih razlik med vsemi tretmaji NaCl skupaj na podlagi Log-rank (Mantel-Cox) testa za kaljivost semen smrdljive in lepljive ditrihovke ter solate. $P < 0,05$; $N = 3$ pri *D. graveolens*, $N = 4$ pri *D. viscosa* in *L. sativa*

Log-rank test	Smrdljiva ditrihovka	Lepljiva ditrihovka	Solata
P vrednost	$< 0,0001$	0,0159	$< 0,0001$

4.2.2.1 Ontogenetski razvoj

Z višanjem koncentracije NaCl se je proces kalitve v splošnem upočasnjeval. Pri vseh treh testnih vrstah se je pričetek procesa kalitve tudi vedno bolj časovno zamaknil (slika 31). Negativen vpliv povišane slanosti na proces kalitve semen vseh treh testnih vrst lahko razberemo tudi iz preglednice 17. Učinek povišane slanosti je bil najmanjši pri solati, saj je njen proces kalitve nekoliko bolj upočasnila le najvišja koncentracija NaCl (slika 31). Pri tej koncentraciji NaCl se je dinamika kalitve solate v primerjavi z dinamiko njene kalitve pri preostalih treh koncentracijah občutno spremenila. Pri prvih treh koncentracijah NaCl je večina izmed vseh skaljenih semen vzklila v prvih dneh poskusa, pri najvišji koncentraciji pa je krivulja postala nekoliko položnejša, saj so semena dokaj enakomerno kalila skozi celoten poskus (slika 31). Oblika kalitvene krivulje se je pri smrdljivi ditrihovki z višanjem koncentracije NaCl spreminjala, saj se je njen naklon dokaj enakomerno nižal, medtem ko se v primeru lepljive ditrihovke oblika kalitvene krivulje z višanjem koncentracije NaCl ni bistveno spremenila (slika 31).

Krivulji obeh vrst imata pri kontrolnem tretmaju izgled dokaj podoben, kar kaže na podobnost splošne dinamike njune kalitve (slika 32 in preglednica 18). Semena lepljive ditrihovke pričnejo kaliti nekaj dni prej kot semena smrdljive ditrihovke; temu primerno se njihova kalitev tudi konča nekaj dni prej kot pri smrdljivi ditrihovki (slika 32).



Slika 32: Primerjava kalitve smrdljive in lepljive ditrihovke pri vseh štirih tretmajih. Ob koncu vsake krivulje je naveden končen odstotek kaljivosti. N = 3 pri *D. graveolens*, N = 4 pri *D. viscosa*

Preglednica 18: Prikaz statistično značilnih razlik med kaljivostjo semen smrdljive in lepljive ditrihovke pri istem tretmaju na podlagi Log-rank (Mantel-Cox) testa. $P < 0,05$; N = 3 pri *D. graveolens*, N = 4 pri *D. viscosa*

Log-rank test za obe vrsti ditrihovk skupaj	P vrednost
0 g NaCl/l (dH ₂ O, kontrola)	0,1715
2,5 g NaCl/l	0,0011
5 g NaCl/l	0,3396
10 g NaCl/l	< 0,0001

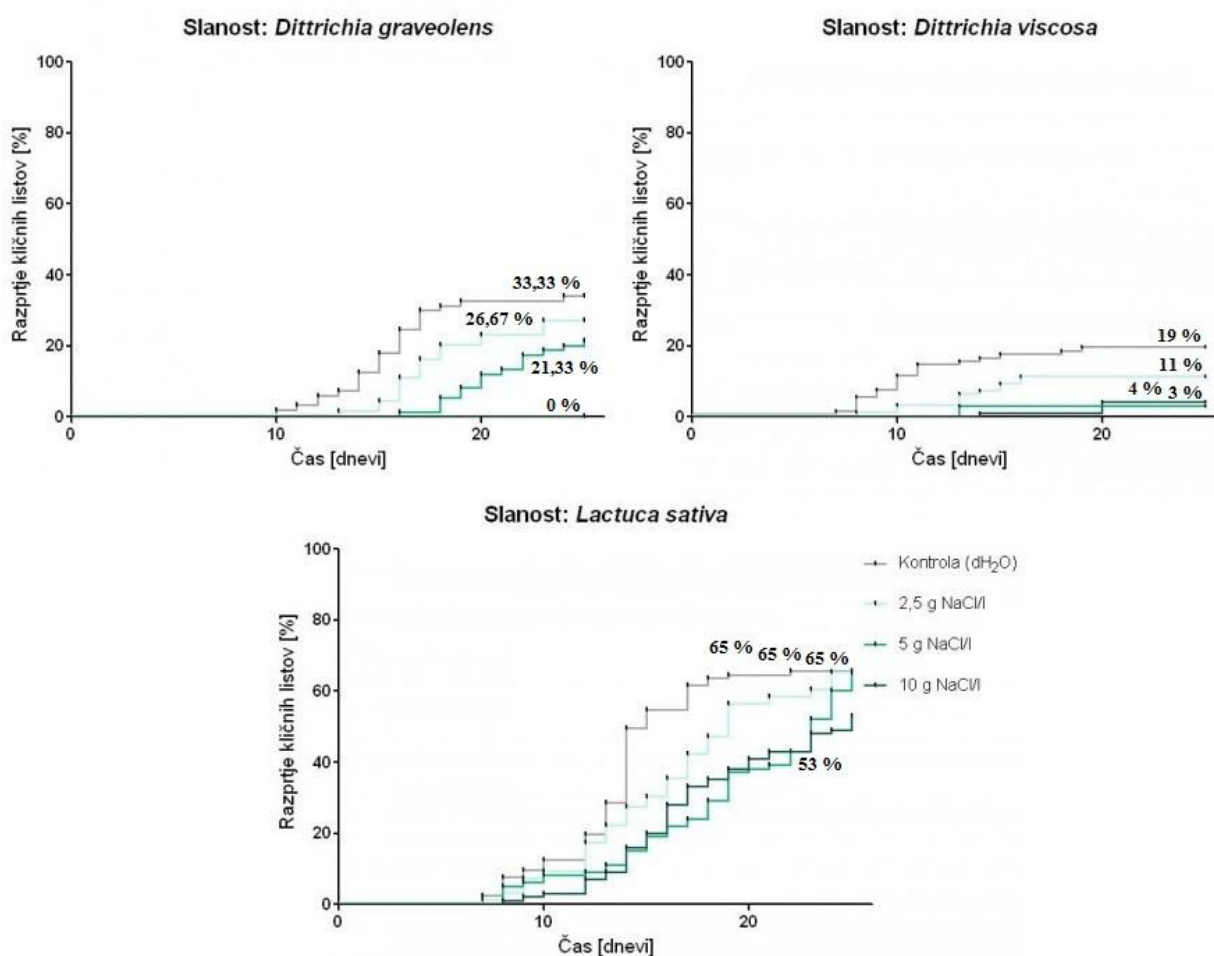
4.2.2.2 Glivne okužbe

Glivne okužbe so se v petrijevkah z oreški lepljive ditrihovke pričele razraščati od drugega dne naprej, v petrijevkah z oreški smrdljive ditrihovke in solate pa od tretjega dne od nastavitve poskusa naprej. V primeru lepljive ditrihovke so okužbe večinoma širile s predela kodeljic oreškov, v petrijevkah z oreški smrdljive ditrihovke so se pojavljale na gojišču, pri solati pa tako na gojišču kot tudi na oreških. Glive so se najpočasneje razvijale v petrijevkah z oreški solate, najhitreje pa v petrijevkah z oreški lepljive ditrihovke. Do

konca poskusa so bile okužbe prisotne v vseh petrijevkah z oreški obeh vrst ditrihovk ter le v polovici petrijev z oreški solate. V dveh kontrolnih petrijevkah (v eni z oreški lepljive ditrihovke ter v eni z oreški solate) smo na gojišču opazili tudi po eno bakterijsko okužbo. V petrijevkah z oreški smrdljive in lepljive ditrihovke so bile okužbe ob zaključku poskusa pri vseh koncentracijah NaCl približno enako razvite, medtem ko so bile pri solati najbolj razvite v kontrolnih petrijevkah, najmanj pa v petrijevkah z najvišjo koncentracijo NaCl. Pri vseh treh testnih vrstah so se večinoma prej začele razraščati pri nižjih koncentracijah NaCl (0 in 2,5 g NaCl/l). Vse glivne okužbe so izgledale podobno; najprej so se pojavile prozorne oz. belkaste niti okoli centra okužbe, ki so se v naslednjih dneh razraščale in ob tem postajale sivkaste. V kasnejših fazah njihove razrasti so se na njih pojavile temne pike. Okužbe so se običajno širile hitro in sčasoma povzročile propad okuženih kalic, pogosto pa so okužile tudi številne prej neokužene oreške in tako zavrle kalitev semen v njih. Nekatera semena so vzklila kljub okužbam z glivami, vendar le v primeru, ko oreški s temi semeni niso bili popolnoma obrasli z njimi.

4.2.3 Razprtje kličnih listov

Do razprtja prvih kličnih listov pri kalicah smrdljive ditrihovke je preteklo deset dni, medtem ko so se prvi klični listi pri kalicah lepljive ditrihovke in solate začeli razpirati že sedmi dan po nastavitvi poskusa. Temu ustrezno se je proces razpiranja kličnih listov pri lepljivi ditrihovki do konca poskusa že zaključil, medtem ko je pri smrdljivi ditrihovki še vedno potekal (slika 33). Tudi pri solati je ob koncu poskusa proces še vedno potekal vsaj pri najvišji koncentraciji NaCl (slika 33). Podobno kot pri stopnji kaljivosti lahko tudi pri pojavu razprtja kličnih listov vidimo, da je najvišji končen odstotek v kontroli dosegla solata (65 %). Končen odstotek pri smrdljivi ditrihovki je bil ponovno manjši kot pri solati (33 %), a višji kot pri lepljivi ditrihovki, pri kateri je znašal 19 % (slika 33). Končen odstotek kalic z razprtima kličnima listoma je pri obeh vrstah ditrihovk v splošnem upadal z višanjem koncentracije NaCl. Pri lepljivi ditrihovki med najvišjima koncentracijama NaCl skoraj ni bilo razlike. Dinamika razpiranja njenih kličnih listov se je glede na kontrolo že bistveno upočasnila pri 5 in 10 g NaCl/l (preglednica 20). Pri smrdljivi ditrihovki se je končen odstotek kalic z razprtima kličnima listoma pri najvišjih dveh tretmajih močno razlikoval (slika 33). Tudi pri tej vrsti sta na proces razpiranja kličnih listov imeli bistven negativen vpliv najvišji koncentraciji NaCl (preglednica 19). Končen odstotek kalic solate z razprtima kličnima listoma je bil pri prvih treh tretmajih popolnoma enak in se je nekoliko znižal ter razlikoval od kontrolnega tretmaja le pri najvišji koncentraciji NaCl (slika 33). Tudi statistična analiza je pokazala, da se je dinamika razpiranja kličnih listov pri tej vrsti bistveno spremenila šele pri 10 g NaCl/l (preglednica 21).



Slika 33: Odstotek kalic smrdljive in lepljive ditrihovke ter solate z razprtima kličnima listoma pri različnih koncentracijah NaCl v odvisnosti od časa. Ob koncu vsake krivulje je naveden končen odstotek kalic z razprtima kličnima listoma. N = 3 pri *D. graveolens*, N = 4 pri *D. viscosa* in *L. sativa*

Preglednica 19: Prikaz statistično značilnih razlik med posameznim tretmajem NaCl in kontrolo za razprte klične liste kalic smrdljive ditrihovke na podlagi Log-rank (Mantel-Cox) testa. $P < 0,05$; N = 3

Log-rank test za smrdljivo ditrihovko	P vrednost
Kontrola in 2,5 g NaCl/l	0,2387
Kontrola in 5 g NaCl/l	< 0,0001
Kontrola in 10 g NaCl/l	< 0,0001

Preglednica 20: Prikaz statistično značilnih razlik med posameznim tretmajem NaCl in kontrolo za razprte klične liste kalic lepljive ditrihovke na podlagi Log-rank (Mantel-Cox) testa. $P < 0,05$; N = 4

Log-rank test za lepljivo ditrihovko	P vrednost
Kontrola in 2,5 g NaCl/l	0,096
Kontrola in 5 g NaCl/l	0,0003
Kontrola in 10 g NaCl/l	0,0007

Preglednica 21: Prikaz statistično značilnih razlik med posameznim tretmajem NaCl in kontrolo za razprte klične liste kalic solate na podlagi Log-rank (Mantel-Cox) testa. $P < 0,05$; $N = 4$

Log-rank test za solato	P vrednost
Kontrola in 2,5 g NaCl/l	0,3338
Kontrola in 5 g NaCl/l	0,0674
Kontrola in 10 g NaCl/l	0,0039

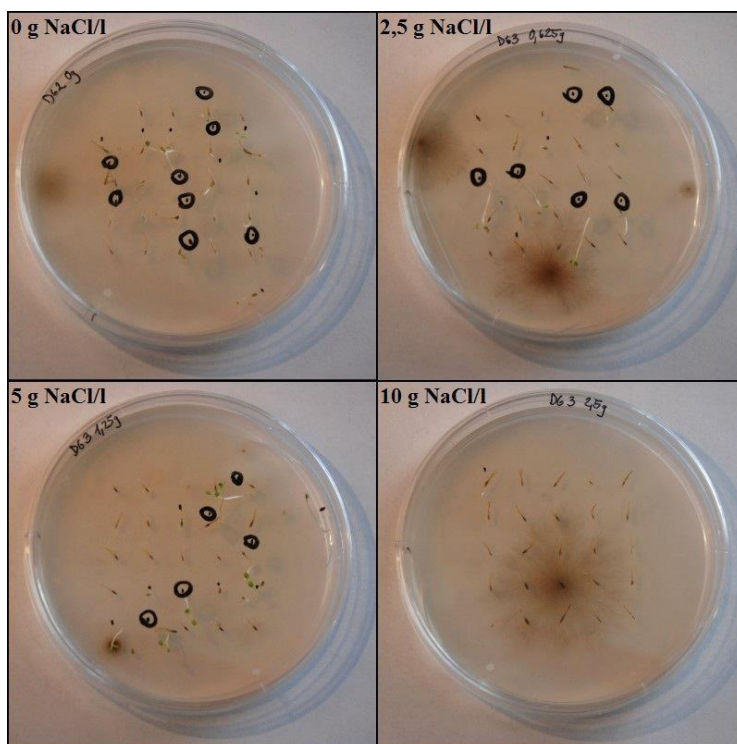
Preglednica 22: Prikaz statistično značilnih razlik med vsemi tretmaji NaCl skupaj na podlagi Log-rank (Mantel-Cox) testa za razprte klične liste kalic smrdljive in lepljive ditrihovke ter solate. $P < 0,05$; $N = 3$ pri *D. graveolens*, $N = 4$ pri *D. viscosa* in *L. sativa*

Log-rank test	Smrdljiva ditrihovka	Lepljiva ditrihovka	Solata
P vrednost	< 0,0001	0,0001	0,0263

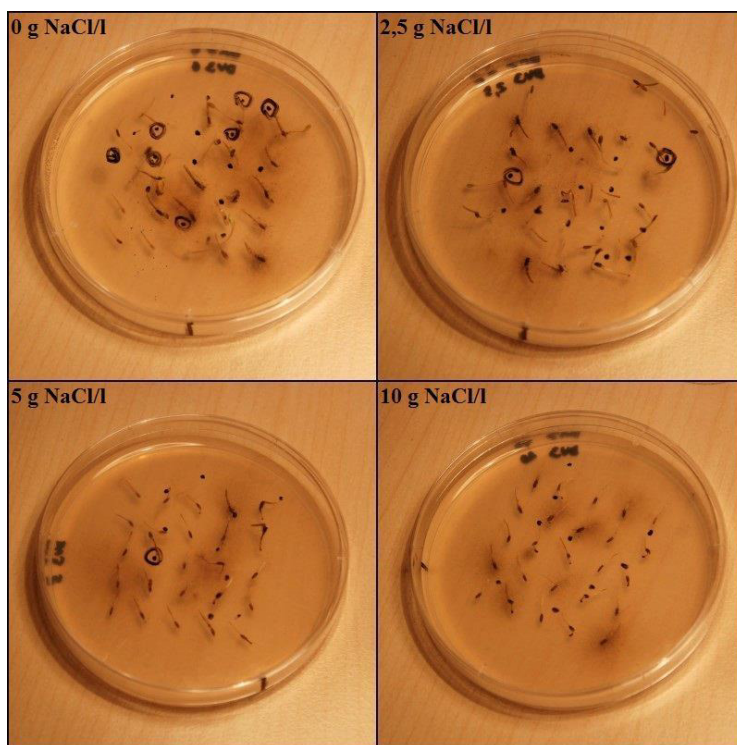
4.2.3.1 Ontogenetski razvoj

Osnovna oblika krivulje je bila pri vsaki od treh testnih vrst nekoliko drugačna in se ni bistveno spreminjala z višanjem koncentracije NaCl (slika 33). Višanje koncentracije NaCl je na proces razpiranja kličnih listov vplivalo negativno pri vseh treh testnih vrstah (preglednica 22). Poleg tega je časovno zamaknilo pričetek procesa razpiranja kličnih listov pri obeh vrstah ditrihovk, kar je bilo najbolj očitno pri smrdljivi ditrihovki (slika 33). Na proces razpiranja kličnih listov pri kalicah solate višanje koncentracije NaCl ni imelo večjega vpliva v smislu časovnega zamika (slika 33).

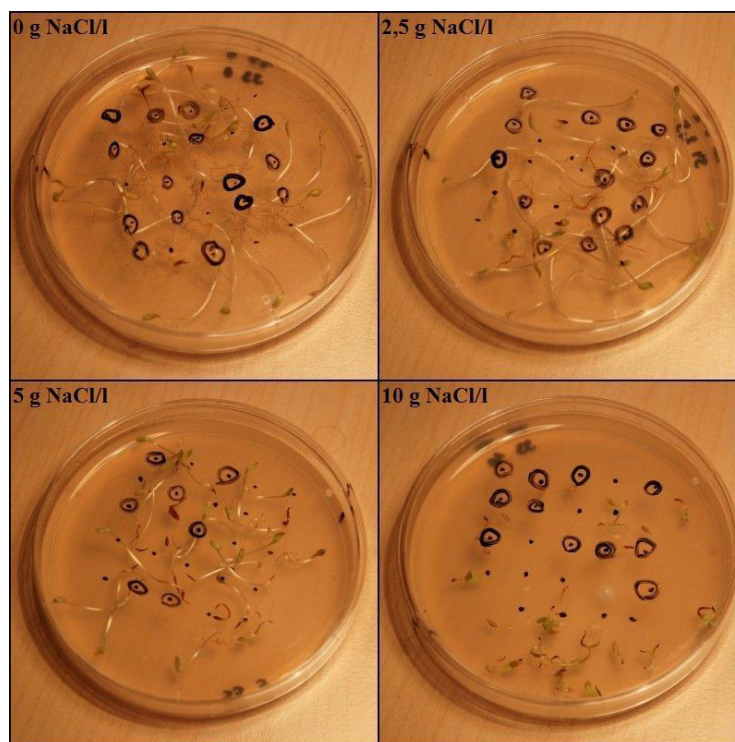
Med polno razvitimi kalicami z razprtima kličnima listoma iz skaljenih semen smrdljive ditrihovke pri prvih treh koncentracijah NaCl (0, 2,5 ter 5 g NaCl/l) ob koncu poskusa na videz ni bilo večjih razlik, medtem ko je bila pri najbolj razvitih kalicah pri najvišji koncentraciji (10 g NaCl/l) v času zaključka poskusa še vedno vidna le razvijajoča se primarna korenina (slika 34). Tudi pri lepljivi ditrihovki ni bilo večjih razlik med polno razvitimi kalicami z razprtima kličnima listoma pri prvih treh koncentracijah NaCl in tudi pri tej vrsti je bila pri najvišji koncentraciji NaCl stopnja razvitosti kalic podobno kot pri smrdljivi ditrihovki šele v fazi razvijajoče se primarne korenine (slika 35). Pri tej vrsti smo pri višjih koncentracijah NaCl (pri 5 in še pogosteje pri 10 g NaCl/l) opazili pojav rdečih vršičkov na koncu korenin. Za solato velja podobno kot za lepljivo ditrihovko; med polno razvitimi kalicami z razprtima kličnima listoma na videz ni bilo večjih razlik (slika 36). Pri tej vrsti je bila razlika v velikosti med razvijajočimi se kalicami pri različnih koncentracijah NaCl v prvih dneh poskusa nekoliko bolj očitna; kalice pri nižjih koncentracijah (0 in 2,5 g NaCl/l) so bile nekoliko bolj razvite in višje od kalic pri višjih koncentracijah (5 in predvsem 10 g NaCl/l). Opazili smo tudi, da so bili konci korenin pri vedno višjih koncentracijah NaCl vedno bolj porjaveli. Kljub porjavelosti korenin so se kalice razvijale normalno.



Slika 34: Smrdljiva ditrihovka na zadnji dan poskusa pri različnih tretmajih z NaCl. Prikazana je le po ena ponovitev za vsak tretma. S piko so na petrijevkah označena skaljena semena, s krožcem okoli pike pa kalice z razprtima kličnima listoma. Foto: Mateja Grašič



Slika 35: Lepljiva ditrihovka na zadnji dan poskusa pri različnih tretmajih z NaCl. Prikazana je le po ena ponovitev za vsak tretma. S piko so na petrijevkah označena skaljena semena, s krožcem okoli pike pa kalice z razprtima kličnima listoma. Foto: Mateja Grašič



Slika 36: Solata na zadnji dan poskusa pri različnih tretmajih z NaCl. Prikazana je le po ena ponovitev za vsak tretma. S piko so na petrijevkah označena skaljena semena, s krožcem okoli pike pa kalice z razprtima kličnima listoma. Foto: Mateja Grašič

Od desetega dne dalje smo v petrijevkah z oreški smrdljive ditrihovke pri nekaterih kalicah začeli opazovati navzgor obrnjene koreninice, ki so imele pogosto navidez pokrnele vršičke rdeče barve in običajno tudi manj koreninskih laskov. Pri lepljivi ditrihovki in solati so se nam kalice med poskusom premešale in obrnile v skoraj polovici petrijev, zato glede orientiranosti korenin pri teh dveh testnih vrstah zanesljivih informacij ne moremo podati.

Od osemnajstega dne poskusa dalje so v petrijevkah z oreški smrdljive ditrihovke okužene ali previsoke kalice postopoma začele propadati. Kalice lepljive ditrihovke so pričele propadati že od trinajstega dne dalje, kalice solate pa od petnajstega dne naprej. Pri vseh testnih vrstah so najprej propadle kalice v kontrolnih petrijevkah, najkasneje pa kalice v petrijevkah z najvišjo koncentracijo NaCl.

4.2.3.2 Glivne okužbe

Glivne okužbe so se odražale tudi na pojavu razpiranja kličnih listov. Številnim okuženim kalicam sta se klična lista razprla kasneje kot bi se sicer, nekterim sta med poskusom pokrnela, pri določenih pa sta bila nekoliko deformirana že od samega začetka.

4.2.4 Pregled pomembnejših rezultatov v sklopu slanosti

Pri smrdljivi ditrihovki in solati je bil negativen vpliv povišane slanosti nekoliko bolj zaznaven na fazi kalitve kot na kasnejših razvojnih fazah njunih kalic (preglednica 23),

medtem ko je bil pri lepljivi ditrihovki negativen vpliv povišane slanosti na fazo kalitve in kasnejše razvojne faze kalic primerljiv (preglednica 23).

Preglednica 23: Vpliv različnih koncentracij NaCl na kaljivost semen in razprtje kličnih listov pri smrdljivi in lepljivi ditrihovki ter solati, ponazorjen na podlagi izračunanih P vrednosti. Večji krožci zaznamujejo P vrednosti, manjše od 0,001. Rdeča barva označuje zaviralen vpliv obravnavanega tretmaja na spremljan znak pri obravnavani testni vrsti glede na kontrolo; modra barva kaže nevtralen vpliv glede na kontrolo. $P < 0,05$; $N = 3$ pri *D. graveolens*, $N = 4$ pri *D. viscosa* in *L. sativa*

Spremljana znaka	Kaljivost	Klični listi
2,5 g NaCl/l	Smrdljiva ditrihovka	●
	Lepljiva ditrihovka	●
	Solata	●
5 g NaCl/l	Smrdljiva ditrihovka	●
	Lepljiva ditrihovka	●
	Solata	●
10 g NaCl/l	Smrdljiva ditrihovka	●
	Lepljiva ditrihovka	●
	Solata	●

4.2.5 Elektroprevodnost tal

Meritve elektroprevodnosti tal z različnih mest vzorčenja na isti lokaciji (ob cesti in ob kolovozu v Ljubljani) so zelo podobne. Tudi povprečji vseh meritev z obeh lokacij vzorčenja (Ljubljana in Koper) se ne razlikujeta bistveno. Temperatura ob merjenju elektroprevodnosti vzorcev tal iz Kopra je znašala 24,5 °C, pri vseh preostalih meritvah pa 21,7 °C.

Obvozna cesta v Ljubljani, povprečje ob cesti: 60,8 $\mu\text{S/cm}$

Obvozna cesta v Ljubljani, povprečje ob kolovozu: 67 $\mu\text{S/cm}$

Povprečje Ljubljana (nahajališče smrdljive ditrihovke): **63,9 $\mu\text{S/cm}$**

Povprečje Koper (nahajališče lepljive ditrihovke): **80,5 $\mu\text{S/cm}$**

Z informativnega vidika smo izvedli še naslednje meritve elektroprevodnosti:

- Voda iz pipe: **507 $\mu\text{S/cm}$**
- Destilirana voda: **1 $\mu\text{S/cm}$**
- Milli-Q voda: **0,5 $\mu\text{S/cm}$**
- 10 ml vode iz pipe + 40 ml Milli-Q vode: **117 $\mu\text{S/cm}$**
- 5 g NaCl/l: **9 000 $\mu\text{S/cm}$**
- 10 g NaCl/l: **18 000 $\mu\text{S/cm}$**
- 20 g NaCl/l: **34 000 $\mu\text{S/cm}$**

5 RAZPRAVA

5.1 VODNI IZVLEČKI

5.1.1 Kalitev testnih vrst in nadaljnji razvoj

Najvišji končen odstotek kaljivosti in tudi največjo uspešnost nadaljnjega razvoja kalic glede na druge znake, ki smo jih spremljali (razprtje kličnih listov oz. izrast koleoptil ter izrast nadomestnih korenin), je dosegla pšenica. Pšenica je ena izmed najbolj razširjenih kulturnih rastlin. Semena takšnih vrst so zaradi komercialne uporabe izselekcionirana in imajo tako že v osnovi višjo kaljivost v primerjavi z v naravi nabranimi semeni, kot so v našem primeru semena pelinolistne žvrklje. Povsem mogoče je sklepati, da se zaradi umetne selekcije tudi kasnejši znaki (izrast koleoptil in nadomestnih korenin) pri pšenici razvijejo hitreje kot pri vrstah, ki jih najdemo le v naravi (razprtje kličnih listov pri pelinolistni žvrklji).

Večina skaljenih semen pelinolistne žvrklje je izhajala iz oluščenih plodov. Na podlagi te ugotovitve bi lahko rekli, da so kalitev semen v neoluščenih plodovih ovirale strukture okrog semen. Willemsen in Rice (1972) sta v svoji raziskavi kot možen razlog za dormanco semen pelinolistne žvrklje navedla prisotnost netopnega inhibitorja v perikarpu njenih plodov.

Pri semenih solate v poskusu z vodnimi izvlečki ditrihovk smo pričakovali podobno stopnjo kaljivosti kot pri pšenici, saj gre prav tako za kulturno vrsto z že izvedeno umetno selekcijo. Glede na prispevek, ki ga je objavil Cortese (2012), bi bila lahko vzrok za tako slabo kaljivost solate berivke previsoka temperatura (saj smo semena kalili na sobni temperaturi). V našem primeru tega ne moremo trditi, saj smo preizkusili tudi semena berivke druge blagovne znamke (Agrina), ki je pri isti temperaturi kalila zelo dobro. Poleg tega smo kalili tudi semena druge sorte solate iste blagovne znamke kot uporabljena semena berivke pri poskusu z vodnimi izvlečki (Semenarna Ljubljana), ki so prav tako kalila zelo slabo, ter semena druge sorte solate znamke Agrina, ki so tako kot semena berivke te blagovne znamke kalila zelo dobro. Iz navedenega je jasno razvidno, da so vsa semena blagovne znamke Agrina kalila dobro, vsa semena blagovne znamke Semenarna Ljubljana pa zelo slabo. Lahko rečemo, da je bila najverjetneje razlog za slabo kaljivost semen solate pri poskusu z vodnimi izvlečki slaba kakovost semen blagovne znamke Semenarna Ljubljana.

5.1.2 Delovanje vodnih izvlečkov

Levizou in sod. (2002), Stavrianakou in sod. (2004) ter Omezzine in sod. (2011a, 2011b) so v sklopu svojih raziskav izvedli predhodne poskuse, s katerimi so dokazali, da so bili učinki na njihovih testnih vrstah (med drugim na solati, ki smo jo uporabili tudi v naši

raziskavi) rezultat alelopatske aktivnosti vodnih izvlečkov in ne posledica njihove osmolarnosti ali pH vrednosti. Na podlagi teh ugotovitev smo sklepali, da učinke na testnih vrstah tudi v našem poskusu lahko pripišemo alelopatski aktivnosti vodnih izvlečkov, zato tovrstnih poskusov nismo izvajali.

Z višanjem koncentracije vodnih izvlečkov obeh vrst ditrihovk se je zniževal končen odstotek semen oz. kalic vseh testnih vrst z izraženim opazovanim znakom (kaljivost, razprta klična lista oz. izrastla koleoptila ter izrastle nadomestne korenine). Vodni izvlečki torej niso upočasnili le procesa kalitve, temveč so vplivali tudi na druge fiziološke procese, ki so vpleteni v kasnejše faze razvoja mladih kalic. Poleg tega je višanje koncentracije vodnih izvlečkov tudi nekoliko časovno zamaknilo potek razvoja pelinolistne žvrklje. Zakasnitev razvoja ima lahko za rastline v naravnem okolju zelo velike ekološke posledice; takšne rastline se v primerjavi z drugimi pozneje razvijejo do faze, ko so že sposobne izkoriščati dobrine iz okolice, s tem pa imajo manjšo dolgoročno verjetnost preživetja (Chaves in sod., 2001). O zaviranju in upočasnjevanju kalitve ter kasnejših razvojnih faz drugih vrst z izvlečki ditrihovk so poročali tudi številni drugi avtorji (Levizou in sod., 2002, 2004; Stavrianakou in sod., 2004; Omezzine in sod., 2011a, 2011b, 2011c; Dor in Hershenhorn, 2012; Andolfi in sod., 2013). Vodni izvlečki ditrihovk so v splošnem imeli večji zaviralen učinek na pelinolistno žvrkljo. Podobno so tudi Stavrianakou in sod. (2004) ter Dor in Hershenhorn (2012) v svojih raziskavah poročali o tem, da so plevelne vrste, kot je v našem primeru pelinolistna žvrklja, na alelokemikalije lepljive ditrihovke bolj občutljive od kulturnih vrst, kot je v našem primeru pšenica. V splošnem smo največji razkorak v razvitosti med kontrolnim in preostalimi tretmaji opazili pri pšenici, saj je bila njena dinamika razvoja najhitrejša. Pšeničnih semen je tako v krajšem času vzkliko več v primerjavi s semeni pelinolistne žvrklje. Poleg tega so se kalice pšenice v kontrolnem tretmaju do konca poskusa razvile do višje stopnje kot kalice pelinolistne žvrklje in tako kot že rečeno kazale na večje razlike med tretmaji. Kot smo že omenili, smo pri kalicah solate opazili mnogo koreninic z navzgor obrnjenimi pokrnelimi vršički brez koreninskih laskov. Podoben pojav so v svoji raziskavi prav tako na kalicah solate opazili Levizou in sod., 2002, 2004). Razlog za ta pojav bi bila v našem poskusu lahko tudi degeneriranost samih semen solate.

Na vse spremljane procese pri pelinolistni žvrklji in pšenici (kalitev semen, razprtje kličnih listov oz. izrast koleoptil ter izrast nadomestnih korenin) sta imela oba vodna izvlečka zaviralen učinek pri obeh koncentracijah. V celoti se je kot nekoliko učinkovitejši vseeno izkazal vodni izvleček smrdljive ditrihovke. Do podobne ugotovitve so v svoji raziskavi prišli tudi Omezzine in sod. (2011c).

5.1.3 Glivne okužbe

Na plodovih pelinolistne žvrklje, ki smo jih nabrali v naravi, je bilo okužb več kot na plodovih pšenice in solate, ki smo jih kupili v trgovini. Slednje je lahko v primeru solate

posledica morebitne predhodne obdelave z različnimi postopki za preprečevanje razvoja mikroorganizmov. Nasprotno smo plodove pšenice pridobili iz ekološke pridelave, ki izključuje uporabo kemičnega zatiranja škodljivih organizmov, kar nakazuje tudi na morebitne druge vzroke za nižjo frekvenco okužb. Okužbe na plodovih pelinolistne žvrklje so večinoma izvirale z otrdelih ovojnikov listov. Njihova površina je bila zelo razbrazdana in najverjetneje ob površinski sterilizaciji teh plodov z varekino nismo dosegli vseh težje dostopnih delov površine, zaradi česar so se na njih okužbe razvile pogostejše. Pogostost glivnih okužb na teh plodovih bi bila potencialno lahko manjša, če bi pred sterilizacijo v varekino plodove za nekaj ur postavili pod tekočo vodo iz pipe. Na tak način so Levizou in sod. (2002) v svoji raziskavi preprosto in učinkovito odstranili glivne spore s površine.

Glive so večinoma zavrle kalitev še neskaljenih semen. Kadar so okužile semena v začetnih fazah prodiranja korenice skozi semensko ovojnico, so prav tako največkrat povzročile njihov propad. Ob dosegu že nekoliko bolj razvitih kalic pelinolistne žvrklje njihov vpliv ni bil tako uničujoč, saj jih je veliko nemoteno uspevalo naprej. Verjetno so imele preživele okužene kalice koreninski sistem že dovolj dobro razvit in so najobčutljivejšo fazo za propad zaradi razrasti gliv prebrodile že pred okužbo.

V poglavju o sekundarnih metabolitih ditrihovk smo navedli številne avtorje, ki so poročali o protiglivnem in protibakterijskem učinku izvlečkov ditrihovk. Kljub temu smo v naši raziskavi več okužb kot v kontrolnem tretmaju zaznali v petrijevkah z dodanim vodnim izvlečkom lepljive ditrihovke. Vodni izvlečki ditrihovk očitno ne zavirajo razvoja vseh vrst gliv. K večji pogostosti okužb v petrijevkah z dodanim vodnim izvlečkom lepljive ditrihovke bi lahko prispeval sam vodni izvleček, saj naši vodni izvlečki niso bili sterilni. Glede na navedeno bi pričakovali, da bo okužb najmanj v kontrolnih petrijevkah, saj tem petrijevkam vodnih izvlečkov nismo dodajali. Okužb je bilo v resnici najmanj v petrijevkah z dodanim vodnim izvlečkom smrdljive ditrihovke. Iz tega bi lahko sklepali, da je vodni izvleček smrdljive ditrihovke učinkovitejši pri zaviranju rasti gliv. Po drugi strani bi bil lahko razlog za več okužb v petrijevkah z vodnim izvlečkom lepljive ditrihovke tudi ta, da je bilo na oreških lepljive ditrihovke že v osnovi prisotnih več glivnih spor, iz katerih so se med poskusom razvile okužbe. Za natančnejše odgovore v povezavi s protiglivno učinkovitostjo vodnih izvlečkov obeh vrst ditrihovk bi bili potrebni novi testi. Iz vodnih izvlečkov izhajajoče glivne okužbe bi lahko preprečili s filtriranjem vodnih izvlečkov (Levizou in sod., 2002; Stavrianakou in sod., 2004; Omezzine in sod., 2011a, 2011b, 2011c; Dor in Hershenhorn, 2012).

5.1.4 Sveža in suha masa

Mase so bile majhne, saj smo imeli poskus v teku relativno kratek čas. Če bi ga pustili dlje časa, bi bile izmerjene mase in s tem tudi razlike med tretmaji verjetno večje. Skladno z opažanji glede kaljivosti semen ter drugih opazovanih znakov (razprtje kličnih listov oz. izrast koleoptil ter izrast nadomestnih korenin) so tudi sveže in suhe mase pokazale na

zaviralen učinek vodnih izvlečkov ditrihovk, ki je bil z naraščanjem koncentracije vedno večji. Zaradi hitrejšje dinamike razvoja in tako večjih mas je bil zaviralen učinek vodnih izvlečkov ditrihovk na razvoj ponovno bolj očiten pri pšenici. Razlike med tretmaji so bile pri suhih masah manjše, saj so bile izredno majhne že same izmerjene suhe mase. Tudi glede na izmerjene sveže in suhe mase kalic se je kot nekoliko močnejši izkazal vodni izvleček smrdljive ditrihovke, kar je v skladu z našimi splošnimi ugotovitvami.

Rahla pomečkanost nekaterih koleoptil pšenic v kontrolnem tretmaju zaradi njihove velikosti ter občasna izsušenost vsebine v teh petrijevkah na samo rast nista imela bistvenega vpliva. Tako s slik kot z grafa za suho maso pšenice je bilo razvidno, da so se v naslednjih dneh poskusa vsi poganjki normalno razvijali naprej. Medtem ko je bila razlika med suho maso pšenice v kontroli v primerjavi s preostalimi tretmaji dovolj velika, pa je izsušenost verjetno vplivala na svežo maso pšenice. Razlika med svežo maso pšenice kontrolnega tretmaja ter najnižje koncentracije obeh vodnih izvlečkov je bila namreč precej manjša kot pri suhi masi.

5.1.5 Malondialdehid (MDA)

Statistično značilnih razlik med posameznimi tretmaji za isti del pšenice ni bilo, saj so bile izmerjene količine malondialdehida (MDA) izredno majhne. Če bi poskus pustili teči dlje časa, bi bile količine MDA verjetno nekoliko večje, s tem pa bi morebitne razlike med tretmaji zaznali lažje. Kljub tako majhnim količinam MDA je statistična analiza celotnega poskusa pokazala na močne razlike med tretmaji na račun večje količine MDA v poganjkih v primerjavi s koreninami. Podoben rezultat so v svojih raziskavah dobili tudi Janmohammadi in sod. (2012) ter Pérez-Clemente in sod. (2012). Razlog za to bi lahko bila drugačna sestava membran koreninskih celic v primerjavi z membranami celic poganjkov, in sicer v smislu manjše vsebnosti maščobnih komponent, ki so pogoj za nastanek MDA. To bi lahko preverili v nadaljnjih raziskavah.

V poganjkih je količina MDA naraščala z višanjem koncentracije vodnih izvlečkov ditrihovk. Pri obeh koncentracijah vodnih izvlečkov ditrihovk je bila višja ob tretiranju z vodnim izvlečkom smrdljive ditrihovke. Na podlagi tega bi lahko rekli, da vodni izvlečki ditrihovk vsaj v poganjkih drugih rastlin povzročajo stres, predvsem izvleček smrdljive ditrihovke. Če pogledamo rezultate izmerjene količine MDA v koreninah, pa tega ne moremo trditi. Tako kot v našem primeru so tudi Pérez-Clemente in sod. (2012) v koreninah najvišjo količino MDA izmerili prav v kontrolnem tretmaju. Ta rezultat je zelo težko pojasniti drugače kot na podlagi mase, a večja masa korenin v kontrolnem tretmaju zagotovo ne more biti razlog za večjo količino MDA. Pri postopku merjenja količine MDA je že na začetku treba zatehtati enako količino vsakega vzorca, torej so vse kasneje izmerjene vrednosti že preračunane na enako maso.

5.2 SLANOST

Semena lepljive ditrihovke iz prvega vzorčenja (september 2013) so kalila zelo slabo, kar je bila skoraj zagotovo posledica njihove nedozorelosti. Na to so kazali tudi sami oreški, ki so bili pogosto drobni ali na videz prazni. Najverjetneje smo prvo vzorčenje lepljive ditrihovke izvedli prezgodaj v sezoni; oreški te vrste namreč dozoriijo šele v oktobru (Parolin in sod., 2013a). Kaljivost semen lepljive ditrihovke iz drugega vzorčenja (oktober 2014) je bila precej višja in bolj podobna stopnji kaljivosti semen smrdljive ditrihovke.

5.2.1 Ugotovitve pri spremljevalnih poskusih

Pri poskusu ugotavljanja svetlobnih in temperaturnih potreb za kalitev ditrihovk smo tudi v najugodnejših razmerah zabeležili precej nižjo stopnjo kaljivosti kot v vseh nadaljnjih poskusih, kar je bila najverjetneje posledica odstranitve vseh priveskov (vključno s kodeljicami). V sledečih poskusih kodeljic nismo odstranjevali, semena pa so vselej kalila bolje.

V predhodnih raziskavah s smrdljivo in lepljivo ditrihovko so ugotovili, da je pri smrdljivi ditrihovki primarna dormanca najverjetneje odsotna (Brownsey in sod., 2013a), medtem ko so za lepljivo ditrihovko poročali ravno nasprotno (Doussi in Thanos, 1997). V našem poskusu se je izkazalo, da je kalitev smrdljive ditrihovke najboljša na svetlobi ter ob predhodni inkubaciji na hladnem. Kot že omenjeno, zanesljivih sklepov iz naših rezultatov za lepljivo ditrihovko zaradi obsežnejšega razraščanja glivnih okužb nismo mogli podati. Ker gre za sorodni vrsti, ki spadata v isti rod, smo ugotovitve za smrdljivo ditrihovko posplošili na obe vrsti ditrihovk. Lahko bi rekli, da je za kalitev smrdljive ditrihovke poleg prisotnosti svetlobe potrebna tudi prekinitev primarne dormance z nizkimi temperaturami (stratifikacija), vendar se s predhodno inkubacijo oreškov na hladnem končen odstotek kaljivosti ni drastično spremenil v primerjavi s končnim odstotkom kaljivosti oreškov, inkubiranih na sobni temperaturi. Sklenili smo, da takšna prekinitev primarne dormance pri obeh vrstah najverjetneje ni potrebna, zato smo v vseh sledečih poskusih uporabljali tako oreške iz hladilnika kot oreške iz sušilnice (sobna temperatura), katerih semena smo kalili na svetlobi. V dveh virih (False yellowhead ..., 2003; Parolin in sod., 2014) smo naleteli na podatek, da je za prekinitev dormance semen lepljive ditrihovke potrebna tema. V članku, ki so ga objavili Parolin in sod. (2014), so ta podatek navedli kot citat iz publikacije, ki so jo objavili Sinden in sod. (2004). Ob pregledu slednjega vira nismo našli nobenega podatka o dormanci ali lepljivi ditrihovki, zato sklepamo, da je najverjetneje prišlo do napake pri navajanju virov.

Razlog za več glivnih okužb na oreških lepljive ditrihovke pri prvem spremljevalnem poskusu bi lahko bili ostanki vratov pestičev ter venčnih listov, ki so bili na številnih oreških te vrste prisotni poleg kodeljice. Na oreških smrdljive ditrihovke teh ostankov praktično ni bilo. Tudi v kasnejših poskusih se je mnogokrat izkazalo, da se številne

okužbe na oreških lepljive ditrihovke širijo s predela kodeljice. V naslednjih poskusih smo odstranili vse priveske z izjemo kodeljice, okužb pa je bilo kljub temu več na oreških lepljive ditrihovke. Na podlagi te trditve bi lahko sklepali na drugačno strukturo kodeljice pri lepljivi ditrihovki, na katero se ujame več glivnih spor, ki jih ob površinski sterilizaciji oreškov težje odstranimo. Za to bi bile potrebne dodatne raziskave. Možna razlaga bi bila tudi ta, da so bile razmere na samem nahajališču lepljive ditrihovke ugodnejše za razvoj gliv kot razmere na nahajališču smrdljive ditrihovke, zaradi česar je bilo na oreških lepljive ditrihovke kljub podobni strukturi oreškov že v samem začetku prisotnih več glivnih spor. Tudi to trditev bi morali z nadaljnjimi raziskavami preveriti na vzorcih nahajališč teh dveh vrst.

V naslednjem od naših spremljevalnih poskusov se je filtrirni papir v primerjavi z agarjem izkazal kot boljši substrat za kalitev ditrihovk, saj je bil končen odstotek kaljivosti v petrijevkah s filtrirnim papirjem vselej višji kot na agarnih ploščah. Največjo težavo pri agarnih ploščah so predstavljale številne glivne okužbe; agar je kot substrat za glive primernejši od filtrirnega papirja tako z vidika večje dostopnosti mineralov kot zadrževanja vlage. Kljub temu smo za vse poskuse s slanostjo izbrali agarne plošče, saj v njih lažje zamešamo in vzdržujemo ustrezno koncentracijo NaCl, kar je za poskuse s slanostjo ključno. Če bi bilo okužb na agarnih ploščah manj, bi bil končen odstotek kaljivosti semen na njih skoraj zagotovo precej višji, zato smo v sledečih poskusih več pozornosti namenili sterilnosti pri delu.

Navidezno zakrnavanje korenin v prej omenjenem spremljevalnem poskusu bi bilo lahko posledica močnega razraščanja gliv po petrijevkah, saj smo takšne koreninice večinoma opazili le v petrijevkah z zelo razrastlimi glivami. Možen razlog za to je tudi pomanjkanje kisika, saj smo petrijevke zatesnili s parafilmom, poskus pa je trajal kar sedemnajst dni.

5.2.2 Kalitev testnih vrst in nadaljnji razvoj

Končen odstotek kaljivosti semen solate je bil v tem sklopu poskusov izredno visok, saj gre podobno kot v primeru pšenice za kulturno vrsto z že izvedeno umetno selekcijo. Stopnja kaljivosti semen smrdljive in lepljive ditrihovke je bila v primerjavi s solato precej nižja, saj smo njune oreške nabrali v naravi. Temu primerno je bila tudi dinamika razvoja solate hitrejša kot pri obeh vrstah ditrihovk, kar se je lepo videlo ne le na kalitvi, temveč tudi na razpiranju kličnih listov. Tudi Parolin in sod. (2014) so poročali o počasnem razvoju pri lepljivi ditrihovki. Dobro kaljivost semen solate v tem sklopu poskusov bi lahko deloma pripisali tudi dejstvu, da solato na vrtu običajno zalivamo z vodo iz pipe, katere elektroprevodnost glede na naše meritve znaša približno 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ in je tako precej višja od elektroprevodnosti tal iz lokacij uspevanja obeh vrst ditrihovk.

Potek razvoja smrdljive in lepljive ditrihovke je bil podoben, saj gre za sorodni vrsti. Kljub temu je glede na oba spremljana procesa (kalitev in razprtje kličnih listov) hitrejšo dinamiko razvoja imela lepljiva ditrihovka.

5.2.3 Učinek povišane slanosti

Povišana slanost je gledano v celoti imela zaviralen učinek na oba spremljana procesa (kalitev in razprtje kličnih listov) pri vseh treh testnih vrstah. Z višanjem koncentracije NaCl se je upočasnil razvoj ter zmanjšal končen odstotek semen oz. kalic testnih vrst z izraženim opazovanim znakom (kaljivost in razprtje kličnih listov). Učinek povišane slanosti je bil na vseh treh testnih vrstah ob koncu poskusa opazno največji pri najvišji koncentraciji soli (10 g NaCl/l), saj so bile kalice pri tej koncentraciji manj razvite, medtem ko so bile pri vseh nižjih koncentracijah NaCl ob koncu poskusa na podobni razvojni stopnji. Tudi te koncentracije NaCl so sicer razvoj testnih vrst (predvsem ditrihovk) upočasnile in časovno zamaknile njegov pričetek, a pri 10 g NaCl/l se je razvoj v primerjavi s preostalimi tretmaji pričel toliko kasneje, da kalice pri tem tretmaju do konca poskusa še niso dosegle enake razvojne stopnje kot pri preostalih tretmajih. Poleg tega je višanje koncentracije NaCl tudi časovno zamaknilo pričetek razvoja testnih vrst, predvsem smrdljive in lepljive ditrihovke. Višje koncentracije NaCl razvoja kalic niso ovirale le neposredno, temveč tudi posredno; z višanjem koncentracije NaCl so bile namreč korenine kalic na videz vedno manj razvite in vedno bolj pokrnele, kar še dodatno ustavlja razvoj kalic zaradi zmanjšane sposobnosti črpanja mineralov in vode iz substrata.

Končen odstotek kaljivosti smrdljive ditrihovke je z višanjem koncentracije NaCl upadal, le pri 5 g NaCl/l se je nekoliko povešal v primerjavi z nižjim tretmajem (2,5 g NaCl/l). To bi lahko obrazložili na podlagi glivnih okužb, ki so bile pri 2,5 g NaCl/l nekoliko bolj razvite in so tako dodatno znižale končen odstotek kaljivosti semen v teh petrijevkah. Pri najvišji koncentraciji se klična lista nista razprla pri nobeni od kalic smrdljive ditrihovke. Da bi bil končen odstotek kalic z razprtima kličnima listoma pri najvišji koncentraciji NaCl vsaj nekoliko višji, bi poskus verjetno morali pustiti teči dlje časa, saj se krivulje razpiranja kličnih listov pri tej vrsti do zadnjega dne poskusa še niso ustalile.

Glede na trend pri obeh vrstah ditrihovk bi pričakovali, da bo končen odstotek kaljivosti tudi pri lepljivi ditrihovki najnižji pri najvišji koncentraciji NaCl. Ta je bil pri 5 g NaCl/l sicer le za 4 % nižji kot pri 10 g NaCl/l, kar bi lahko obravnavali kot naključje, lahko pa bi to situacijo ponovno pojasnili na podlagi glivnih okužb. Te so se nekoliko bolj razrastle pri 5 g NaCl/l in tako verjetno dodatno znižale končen odstotek kaljivosti v teh petrijevkah.

Solata je pri prvih treh koncentracijah NaCl dosegla enak končen odstotek kaljivosti in tudi pri najvišji koncentraciji NaCl se je končen odstotek kaljivosti semen glede na preostale tretmaje le nekoliko znižal. Ta krivulja bi potencialno sčasoma prav tako lahko dosegla primerljiv končen odstotek kaljivosti kot krivulje pri preostalih koncentracijah NaCl,

vendar bi poskus morali pustiti teči še nekoliko dlje časa. Pri tej vrsti so bile v prvih dneh poskusa razlike med kalicami pri nižjih koncentracijah NaCl in kalicami pri višjih koncentracijah večje kot pri obeh vrstah ditrihovk. To lahko pojasnimo na podlagi hitrejše dinamike razvoja pri solati v prvih dneh poskusa. Tudi pri solati bi višji končen odstotek kalic z razprtima kličnima listoma pri najvišji koncentraciji NaCl dosegli s podaljšanjem poskusa, saj se podobno kot pri smrdljivi ditrihovki njena krivulja do zadnjega dne poskusa še ni ustalila.

Končen odstotek kaljivosti semen lepljive ditrihovke je bil pri 2,5 g NaCl/l nekoliko višji, pri 10 g NaCl/l pa izrazito višji kot pri smrdljivi ditrihovki. Vzrok za opaženo razliko med ditrihovkama pri 2,5 g NaCl/l bi bile lahko glivne okužbe v petrijevkah z oreški smrdljive ditrihovke. Pri 10 g NaCl/l bi se razlika med obema vrstama ditrihovk lahko nekoliko zmanjšala s podaljšanjem trajanja poskusa, saj se je pri tej koncentraciji NaCl pričetek kalitve semen smrdljive ditrihovke v primerjavi z lepljivo ditrihovko pričel kar en teden kasneje in tako verjetno končen odstotek kaljivosti še ni bil dosežen.

V splošnem lahko rečemo, da povišana slanost na obe vrsti ditrihovk deluje zaviralno. Kot smo že omenili, je uspešnost smrdljive ditrihovke pri povišanih koncentracijah soli v primerjavi z lepljivo ditrihovko manjša (Öztürk in Mert, 1983; Ghorbanali in sod., 2013). Na podlagi manjših razlik med končnim odstotkom skaljenih semen in kalic z razprtima kličnima listoma ter manj spremenjeno dinamiko krivulj lahko tudi glede na naše rezultate rečemo, da je lepljiva ditrihovka v boju s povišano slanostjo nekoliko uspešnejša od smrdljive ditrihovke. Večjo uspešnost lepljive ditrihovke v tovrstnih razmerah v primerjavi s smrdljivo ditrihovko bi lahko povezali tudi z našo ugotovitvijo, da povišana slanost pri smrdljivi ditrihovki v večji meri negativno vpliva na fazo kalitve, ki je prva ključna faza za vzpostavitev mladih rastlin, medtem ko je lepljiva ditrihovka v primerjavi s smrdljivo ditrihovko v tej fazi nekoliko manj občutljiva.

Izmerjena elektroprevodnost tal je bila na obeh lokacijah vzorčenja podobna in dokaj nizka, predvsem če jo primerjamo z izmerjeno elektroprevodnostjo vode iz pipe. Razlog za nizko elektroprevodnost tal na nahajališču smrdljive ditrihovke bi lahko bile padavine v dneh pred vzorčenjem. Nizka elektroprevodnost tal na nahajališčih obeh vrst ditrihovk bi bila lahko tudi posledica nekoliko poznega vzorčenja; tla smo namreč vzorčili šele pozno spomladi, ko cest že nekaj časa ne solijo več. K nekoliko višji elektroprevodnosti na nahajališču lepljive ditrihovke bi lahko prispevala večja zbitost tal na tem nahajališču; skozi zbita tla odteka manj vode, s tem pa se iz njih spira manj soli.

Obe lokaciji vzorčenja padeta pod mejo za zasoljena tla, ki znaša 4 000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Criteria for Diagnosing Saline ..., 2006). Glede na ta podatek lahko z izjemo kontrole vse tretmaje v našem poskusu opredelimo kot tretmaje s povišano slanostjo. Kljub negativnemu učinku povišane slanosti sta tako lepljiva kot smrdljiva ditrihovka povečini normalno uspevali pri

vseh koncentracijah soli, tudi pri 10 g NaCl/l (171 mM NaCl), medtem ko glavnina rastlinskih vrst pri 100–200 mM NaCl uspeva izredno slabo ali celo propade (Carillo in sod., 2011). V našem poskusu s povišano slanostjo sta obe vrsti ditrihovk preživel tudi več kot tisočkrat višje vrednosti elektroprevodnosti substrata kot se pojavljajo na njunih običajnih rastiščih. Kot že omenjeno, lepljiva ditrihovka lahko preživi celo pri 52 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ Curadi in sod. (2005) in jo že dlje časa obravnavamo kot tolerantno do soli (Aronson, 1989). Glede na naše rezultate lahko rečemo, da sta obe vrsti zelo tolerantni do povišanih koncentracij soli.

5.2.4 Glivne okužbe

Glivne okužbe so se pri vseh treh testnih vrstah začele razraščati približno istočasno. Najmanj so prizadele petrijevke z oreški solate. Solato smo kupili v trgovini, zaradi česar so bili njeni plodovi verjetno že predhodno obdelani z različnimi postopki za preprečevanje razvoja okužb. Poleg tega so imeli plodovi solate tudi nekoliko bolj gladko in s tem dostopnejšo površino kot plodovi ditrihovk, zaradi česar je ob površinski sterilizaciji plodov varekina lažje prišla v stik z večjim delom površine kot v primeru oreškov ditrihovk. Semena so kalila kljub okužbam z glivami, razen v primeru popolne prerastlosti plodov s temi semeni z glivami. Okužene kalice so običajno še nekaj časa dokaj normalno uspevale naprej, sčasoma pa so vseeno začele postopoma propadati. Okužbe so se pri že bolj razvitih kalicah kazale predvsem na kličnih listih, ki so se zaradi okužb razprli kasneje, ali pa so pokrneli.

Tudi pri tem poskusu smo tako kot v enem od spremljevalnih poskusov opazili nekaj kalic z navzgor obrnjenimi in navidez pokrnelimi koreninicami. Razlog za napačno orientiranost korenin pri teh kalicah bi lahko bile okužbe z glivami.

Kalice v petrijevkah z nižjimi koncentracijami NaCl so začele propadati pred kalicami v petrijevkah z višjimi koncentracijami NaCl. Možno je, da je do tega prišlo zato, ker so kalice v kontroli prej dosegle višjo stopnjo razvitosti in tako prej porabile vse dostopne minerale, vodo in kisik. Poleg tega so se kot že omenjeno tudi glive pri nižjih koncentracijah NaCl razvijale hitreje. Kalice lepljive ditrihovke so začele propadati že več dni pred kalicami smrdljive ditrihovke, saj je bila njihova dinamika razvoja kot že omenjeno hitrejša. Glede na pravkar opisano bi pričakovali, da bodo najprej začele propadati kalice solate, saj je bila dinamika razvoja pri tej vrsti najhitrejša. Propad kalic solate se je kljub hitrejšemu razvoju v primerjavi s kalicami lepljive ditrihovke začel nekoliko kasneje; ta semena so namreč produkt umetne selekcije, zaradi česar je njihova odpornost proti glivnim okužbam najverjetneje višja.

Višanje koncentracije NaCl vsaj do neke mere zavira rast gliv, saj je bil njihov razvoj pri višjih koncentracijah NaCl počasnejši.

6 SKLEPI

6.1 POTRDITEV HIPOTEZ

1. Obe vrsti ditrihovk sta tolerantni do povišane slanosti.
2. Vodni izvleček smrdljive ditrihovke učinkovito omejuje uspevanje drugih rastlin, predvsem pelinolistne žvrklje, ki se pogosto pojavlja na skupnih nahajališčih ob cestah.

Povišana slanost ima na obe vrsti ditrihovk zaviralen učinek. Višanje koncentracije soli zavira kalitev njunih semen ter nadaljnji razvoj kalic. Negativen učinek soli je nekoliko bolj opazen na smrdljivi ditrihovki. Do določene mere se z višanjem koncentracije soli upočasni tudi rast gliv. Mesta vzorčenja ditrihovk niso zasoljena, vseeno pa lahko glede na rezultate kalitvenih poskusov našo hipotezo potrdimo in obe vrsti obravnavamo kot izredno tolerantni do soli, saj lahko preživita v zelo širokem razponu slanosti. Njun obstoječi vzorec razširjenosti očitno ni pogojen s povišano slanostjo, temveč je verjetno posledica njune nezahtevnosti glede razmer na rastišču. Na stalno motenih in suhih ruderalnih rastiščih, kjer se ditrihovke večinoma pojavljajo, so razmere za večino drugih rastlinskih vrst preostre, kar daje prednost ditrihovkam. Poleg tega si lahko po ustalitvi na določenem rastišču dodatno prednost pred drugimi vrstami ustvarijo tudi s pomočjo svojih sekunarnih metabolitov z alelopatsko sposobnostjo. Najverjetneje se lepljiva ditrihovka proti notranjosti Slovenije ne bo razširila, saj jo pri tem močno ovira gosta vegetacijska odeja iz drugih vrst, je pa verjetno, da se bo smrdljiva ditrihovka kot nekoliko bolj agresivna vrsta širila naprej le po ruderalnih mestih predvsem ob cesti. Njeno uhajanje iz juga v osrednjo Evropo in naprej proti severu bi bilo lahko rezultat spreminjanja podnebja, ki postaja vse toplejše, kar smrdljivi ditrihovki ugaja.

Vodna izvlečka obeh vrst ditrihovk zavirata kalitev drugih rastlinskih vrst in vse sledeče razvojne procese, ki smo jih spremljali. Njuna učinkovitost se povečuje z višanjem koncentracije. Zaviralen učinek vodnih izvlečkov ditrihovk na pelinolistno žvrkljo je dokaj velik. Na dolgi rok bi smrdljiva ditrihovka pelinolistno žvrkljo potencialno lahko celo izpodrinila z nahajališč, kjer se pojavljata skupaj. Obe vrsti ditrihovk bi lahko uporabljali v proizvodnji naravnih herbicidov, pri čemer pa moramo nekoliko večjo učinkovitost pripisati vodnemu izvlečku smrdljive ditrihovke. Hipotezo, ki smo si jo zastavili, smo torej potrdili.

6.2 KAJ BI ŠE LAHKO RAZISKALI?

Vodni izvlečki ditrihovk ne zavirajo rasti vseh vrst gliv. Z dodatnimi testi bi lahko preverili, na katere vrste gliv delujejo zaviralno in na katere vrste nimajo vpliva. Za potrebe ugotavljanja vzrokov za dobljen rezultat glede količine malondialdehida v koreninah in poganjkih pšenice bi lahko izvedli nadaljnje teste, pri katerih bi analizirali sestavo membran v celicah poganjkov in korenin pšenice. Zanimivo bi bilo preveriti tudi,

kako obe vrsti ditrihovk kalita ob dodatku svojih vodnih izvlečkov ter kako s svojimi vodnimi izvlečki vplivata ena na drugo.

Z dodatnimi raziskavami bi lahko preučili strukturo kodeljice oreškov smrdljive in lepljive ditrihovke pod stereolupo ali mikroskopom in s tem ugotovili, ali se zgradba njune kodeljice razlikuje in potencialno omogoča boljši oprijem glivnim sporam pri lepljivi ditrihovki. Lahko bi izvedli tudi raziskave na samih mestih vzorčenja obeh vrst in s tem ugotovili, ali so razmere na nahajališču lepljive ditrihovke res bolj ugodne za razvoj gliv, ali ne. Za natančnejšo sestavo vzorcev tal s teh nahajališč bi lahko izvedli razklop. S tem bi ugotovili, kateri ioni v teh vzorcih prevladujejo in jih tako primerjali med seboj še s tega vidika. Celoten poskus s slanostjo bi lahko poleg z NaCl izvedli tudi z $MgCl_2$ ali $CaCl_2$, saj so nekdanj pozimi za soljenje cest uporabljali tudi ti dve vrsti soli. Če bi poleg agarne plošče z različnimi koncentracijami NaCl pripravili še agarne plošče z istimi koncentracijami polietilen glikola, bi lahko ugotavljali tudi pomen same suše za kalitev in nadaljnji razvoj ditrihovk, ter primerjali vpliv suše in soli na njuno uspevanje.

6.3 KAJ BI LAHKO IZVEDLI BOLJE?

S podrobnejšim pregledom magistrske naloge vidimo, da bi marsikaj lahko izvedli bolje. Kot prvo bi bili lahko nekoliko bolj pazljivi in natančni pri izvedbi določenih poskusov. Za zmanjšanje verjetnosti pojavljanja okužb in povečanje verjetnosti kalitve neoluščenih plodov pelinolistne žvrklje bi morali tem plodovom otrdele ovojke liste odstraniti. Celoten poskus z vodnimi izvlečki bi lahko ponovili in pri tem uporabili bolj kakovostne plodove solate. Poleg tega bi petrijevke namesto v rastni komori lahko inkubirali na istem mestu kot smo kasneje hranili petrijevke v poskusih s slanostjo in s tem zmanjšali izhlapevanje vode iz petrijevk. Vodne izvlečke bi lahko filtrirali na podoben način kot v raziskavah, ki so jih opravili Levizou in sod. (2002), Stavrianakou in sod. (2004), Omezzine in sod. (2011a, 2011b, 2011c) ter Dor in Hershenhorn (2012) in s tem zmanjšali verjetnost pojavljanja okužb iz samih vodnih izvlečkov. Pri pripravi vodnih izvlečkov bi lahko uporabili avtoklavirano destilirano vodo in s tem še bolj omejili možnost pojavljanja okužb iz vodnih izvlečkov. Sterilizirano destilirano vodo bi lahko uporabljali tudi kasneje med poskusom za zalivanje. Z ozirom na to, da smo tehtanje svežih in suhih mas kalic pšenice in pelinolistne žvrklje izvedli z znanim številom kalic, bi lahko dobljene rezultate preračunali na število kalic. Za suho in svežo maso pelinolistne žvrklje bi morali pripraviti več ponovitev, saj bi s tem statistiko lahko izvedli tudi za njeno suho maso. Pred sterilizacijo bi oreške ditrihovk lahko kot Levizou in sod. (2002) za nekaj ur postavili pod tekočo vodo iz pipe in s tem potencialno nekoliko zmanjšali verjetnost razvoja okužb na njihovi površini. Za natančnejše rezultate glede primarne dormance pri semenih ditrihovk bi poskus lahko izvedli še s predhodno na hladnem inkubiranimi oreški lepljive ditrihovke. Poskuse v sklopu slanosti bi lahko pustili teči še toliko dni, da bi se krivulje ustalile tudi pri najvišjih koncentracijah soli. S statističnega vidika bi bilo bolje, da bi v poskusih s slanostjo tudi s smrdljivo ditrihovko pripravili štiri ponovitve namesto le treh. Vzorcev tal

za merjenje elektroprevodnosti ne bi smeli nabrati v obdobju s padavinami, predvsem pa bi jih lahko nabrali prej v sezoni, ko je učinek soljenja cest bolj zaznaven. Meritve elektroprevodnosti vzorcev tal z lokacij nabiranja ditrihovk bi bile najbolj informativne, če bi jih izvedli že ob samem vzorčenju ditrihovk. Kljub vsem manjšim spodrseljajem smo gledano v celoti delo izvedli korektno in temu ustrezno prišli do tehtnih zaključkov.

7 POVZETEK

Smrdljiva ditrihovka (*Dittrichia graveolens*) in lepljiva ditrihovka (*D. viscosa*) sta širši javnosti večinoma nepoznani vrsti iz družine nebinovk (Asteraceae), ki imata v slovenskem prostoru različen status. Lepljivo ditrihovko obravnavamo kot domorodno vrsto, ki pri nas uspeva le v bližini morske obale oz. kjer je vpliv morja še zaznaven, medtem ko so pojavljanje smrdljive ditrihovke v Sloveniji prvič zabeležili šele leta 2008. Vse od takrat naprej se hitro razrašča le vzdolž avtocestnega križa (Frajman in Kaligarič, 2009). Glede na opisana vzorca razširjenosti obeh vrst smo domnevali, da obravnavani vrsti zelo dobro prenašata povišano slanost. K povišani slanosti na rastiščih lepljive ditrihovke najverjetneje prispeva morje, v primeru smrdljive ditrihovke pa se slanost tal poviša na račun zimskega soljenja avtocest.

Obravnavani vrsti nista zanimivi le z vidika njunega vzorca razširjenosti; obe sta sposobni proizvodnje sekundarnih metabolitov z alelopatsko aktivnostjo, kar oznanjata že navzven s svojim močnim vonjem, gosto poraslostjo z žleznimi laski in lepljivostjo (Werker in Fahn, 1981; Thong in sod., 2008, Frajman in Kaligarič, 2009). V številnih raziskavah so že poročali o zaviralnem učinku izvlečkov obeh vrst na kalitev, rast korenin in poganjkov drugih vrst (Levizou in sod., 2002, 2004; Stavrianakou in sod., 2004; Aşkin Çelik in Aslantürk, 2010; Omezzine in sod., 2011a, 2011b, 2011c; Dor in Hershenhorn, 2012; Andolfi in sod., 2013), a večina omenjenih raziskav se nanaša le na lepljivo ditrihovko. Želeli smo opraviti primerjalno analizo vodnih izvlečkov obeh vrst ditrihovk in predvsem ovrednotiti učinek vodnega izvlečka smrdljive ditrihovke na uspevanje pelinolistne žvrklje, ki se pogosto pojavlja na istih nahajališčih kot smrdljiva ditrihovka.

V obeh sklopih magistrske naloge smo izvedli kalitvene teste v petrijevkah, pri katerih smo spremljali število skaljenih semen testnih vrst ter razprtje kličnih listov. Za poskuse z vodnimi izvlečki ditrihovk smo kot substrat uporabili filtrirni papir in kot testni vrsti poleg pelinolistne žvrklje izbrali še pšenico in solato. Pri pšenici smo spremljali tudi izrast nadomestnih korenin ter izrast koleoptil namesto razprtja kličnih listov. Pripravili smo dve različni koncentraciji vodnih izvlečkov obeh vrst ditrihovk (2,5 in 5%) ter kot kontrolo uporabili destilirano vodo. V sklopu slanosti smo kalitvene teste izvedli na agarnih ploščah. Poleg obeh vrst ditrihovk smo kot pozitivno kontrolo uporabili še solato. Pripravili smo štiri različne koncentracije NaCl vključno s kontrolo, kamor smo dodali le destilirano vodo (0, 2,5, 5 in 10 g NaCl/l). V obeh sklopih smo izvedli tudi več spremljevalnih poskusov, ki so dodatno osvetlili glavne rezultate. Tako smo v sklopu vodnih izvlečkov ditrihovk izmerili tudi svežo in suho maso poganjkov ter korenin pšenice in pelinolistne žvrklje ter količino malondialdehida (MDA) v poganjkih in koreninah pšenice, v sklopu slanosti pa kalili semena ditrihovk pri različnih svetlobnih in temperaturnih razmerah, izvedli test ugotavljanja potrebe po prekinitvi primarne dormance z obema vrstama ditrihovk in izmerili elektroprevodnost vzorcev tal z nahajališč obeh vrst ditrihovk.

Vodna izvlečka obeh vrst ditrihovk sta vidno zavirala kalitev in nadaljnje fiziološke procese v razvoju testnih vrst, predvsem pri pelinolistni žvrklji. Kalitev določenih semen sta zavrla popolnoma, medtem ko so preostala semena večinoma vzknila nekoliko kasneje glede na kontrolo. Učinek vodnih izvlečkov je naraščal z višanjem koncentracije. Tudi sveža in suha masa testnih vrst sta pokazali na zaviralen učinek vodnih izvlečkov ditrihovk, saj so bile izmerjene mase z naraščanjem koncentracije vodnih izvlečkov vedno manjše. Količina MDA je bila sicer zelo nizka, a je v poganjkih pšenice naraščala skladno z naraščanjem koncentracije vodnih izvlečkov in s tem nakazala na stres zaradi dodanih vodnih izvlečkov ditrihovk, medtem ko za korenine takšnih zaključkov ne moremo podati. V splošnem se je kot nekoliko učinkovitejši izkazal vodni izvleček smrdljive ditrihovke, predvsem pri najvišji koncentraciji. Oba vodna izvlečka bi lahko uporabljali v proizvodnji naravnih herbicidov kot alternativo okolju manj prijaznim umetnim herbicidom. Uporabljali bi jih med drugim lahko za zatiranje kalitve in nadaljnjega uspevanja invazivnih tujerodnih vrst kot je pelinolistna žvrklja, a za to bi bili potrebni še dodatni testi na samih rastiščih pojavljanja pelinolistne žvrklje.

Stopnja kaljivosti smrdljive in lepljive ditrihovke ter sama dinamika njune kalitve je v kontrolnih razmerah zelo podobna s to razliko, da se razvoj pri lepljivi ditrihovki začne nekaj dni prej kot pri smrdljivi ditrihovki. Obe vrsti sta najboljše kalili v kontrolnih razmerah (0 g NaCl/l). Višanje koncentracije soli je vse bolj zaviralo kalitev ter nadaljnji razvoj kalic, poleg tega pa tudi rast gliv. Določena semena do konca poskusa niso vzknila, preostala pa so glede na kontrolo vzknila kasneje. Zaviralen učinek soli je bil nekoliko bolj opazen na smrdljivi ditrihovki. Rezultati so kljub vsemu pokazali, da sta obe vrsti ditrihovk zmožni kaliti in uspevati pri zelo različnih koncentracijah soli, ki so tudi tisočkrat višje kot na njunih rastiščih v naravi. Prav zaradi tako širokega razpona uspevanja pri različnih koncentracijah soli ju lahko v odnosu do slanosti obravnavamo kot zelo tolerantni vrsti. Iz naših rezultatov lahko razberemo, da vzorec razširjenosti smrdljive in lepljive ditrihovke ni prvenstveno pogojen s povišano slanostjo tal. Razlog za takšen vzorec razširjenosti se najverjetneje skriva v njuni plastičnosti in s tem zmožnosti uspevanja tudi v bolj zaostrenih razmerah, ki pogosto vladajo na mestih pojavljanja ditrihovk. Večina rastlinskih vrst v tovrstnih razmerah uspeva slabše od ditrihovk. V prihodnosti lahko pričakujemo nadaljnje širjenje smrdljive ditrihovke le po rastiščih, podobnih njihovim dosedanjim. V gosti vegetacijski odeji, kjer so razmere bolj ugodne tudi za uspevanje drugih vrst, je namreč njena konkurenčnost premajhna.

8 VIRI

- Abad M. J., Guerra J. A., Bermejo P., Irurzun A., Carrasco L. 2000. Search for antiviral activity in higher plant extracts. *Phytotherapy research*, 14, 8: 604-607
- Abdelgaleil S. A. M., Hashinaga F. 2007. Allelopathic potential of two sesquiterpene lactones from *Magnolia grandiflora* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 11: 737-742
- Abou-Douh A. M. 2008. New eudesmane derivatives and other sesquiterpenes from the epigeal parts of *Dittrichia graveolens*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56, 11: 1535-1545
- Abou-Jawdah Y., Sobh H., Salameh A. 2002. Antimycotic activities of selected plant flora, growing wild in Lebanon, against phytopathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 11: 3208-3213
- Abou-Jawdah Y., Wardan R., Sobh H., Salameh A. 2004. Antifungal activities of extracts from selected Lebanese wild plants against plant pathogenic fungi. *Phytopathologia Mediterranea*, 43, 3: 377-386
- Abraham G., Dovrat S., Bessler H., Grossman S., Nir U., Bergman M. 2010. Inhibition of inflammatory cytokine secretion by plant-derived compounds inuviscolide and tomentosin: the role of NF κ B and STAT1. *The Open Pharmacology Journal*, 4: 36-44
- Abu Zarga M. H., Hamed E. M., Sabri S. S., Voelter W., Zeller K.-P. 1998. New sesquiterpenoids from the Jordanian medicinal plant *Inula viscosa*. *Journal of Natural Products*, 61, 6: 798-800
- Abu Zarga M. H., Sabri S. S., Hamed E. M., Khanfar M. A., Zeller K. P., Atta-Ur-Rahman. 2003. A new eudesmane type sesquiterpene from *Inula viscosa*. *Natural Product Research*, 17, 2: 99-102
- Abu-Dahab R., Afifi F. 2007. Antiproliferative activity of selected medicinal plants of Jordan against a breast adenocarcinoma cell line (MCF7). *Scientia Pharmaceutica*, 75, 3: 121-136
- Acevedo E., Silva P., Silva H. 2002. Wheat growth and physiology. V: Bread wheat. Improvement and production. Curtis B. C., Rajaram S., Gómez Macpherson H. (eds.). Rome, FAO: 53
- Aghel N., Mahmoudabadi A. Z., Darvishi L. 2011. Volatile constituents and anti candida activity of the aerial parts essential oil of *Dittrichia graveolens* (L.) Greuter grown in Iran. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5, 6: 772-775
- Al-Dissi N. M., Salhab A. S., Al-Hajj H. A. 2001. Effects of *Inula viscosa* leaf extracts on abortion and implantation in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 77, 1: 117-121
- Al-Qura'n S. 2009. Ethnopharmacological survey of wild medicinal plants in Showbak, Jordan. *Journal of Ethnopharmacology*, 123, 1: 45-50

- Alexenizer M., Dorn A. 2007. Screening of medicinal and ornamental plants for insecticidal and growth regulating activity. *Journal of Pest Science*, 80, 4: 205-215
- Al-Fartosy A. J. M. 2011. Antioxidant properties of methanolic extract from *Inula graveolens* L. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35: 591-596
- Ali-Shtayeh M. S., Yaghmour R. M.-R., Faidei Y. R., Salem K., Al-Nuri M. A. 1998. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestinian area. *Journal of Ethnopharmacology*, 60, 3: 265-271
- Ali-Shtayeh M. S., Abu Ghdeib S. I. 1999. Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses*, 42, 11-12: 665-672
- Ali-Shtayeh M. S., Yaniv Z., Mahajna J. 2000. Ethnobotanical survey in the Palestinian area: a classification of the healing potential of medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 73, 1-2: 221-232
- Alkofahi A., Atta A. H. 1999. Pharmacological screening of the anti-ulcerogenic effects of some Jordanian medicinal plants in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 67, 3: 341-345
- Amini F., Ehsanpour A. A., Hoang Q. T., Shin J. S. 2007. Protein pattern changes in tomato under in vitro salt stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54, 4: 464-471
- Anaya A. L. 1999. Allelopathy as a tool in the management of biotic resources in agroecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18, 6: 697-739
- Andolfi A., Zermane N., Cimmino A., Avolio F., Boari A., Vurro M., Evidente A. 2013. Inuloxins A-D, phytotoxic bi- and tri-cyclic sesquiterpene lactones produced by *Inula viscosa*: potential for broomrapes and field dodder management. *Phytochemistry*, 86: 112-120
- Aronson J. A. 1989. HALOPH: a data base of salt tolerant plants of the world. Office of Arid Land Studies, University of Arizona, Tucson, Arizona, USA.
<http://www.sussex.ac.uk/affiliates/halophytes/index.php?content=plantView&id=1867>
(29. apr. 2015)
- Askarne L., Talibi I., Boubaker H., Boudyach E. H., Msanda F., Saadi B., Serghini M. A., Ait Ben Aoumar A. 2012. In vitro and in vivo antifungal activity of several Moroccan plants against *Penicillium italicum*, the causal agent of citrus blue mold. *Crop Protection*, 40: 53-58
- Askarne L., Talibi I., Boubaker H., Boudyach E. H., Msanda F., Saadi B., Ait Ben Aoumar A. 2013. Use of Moroccan medicinal plant extracts as botanical fungicide against citrus blue mould. *Letters in Applied Microbiology*, 56, 1: 37-43
- Aşkin Çelik T., Aslantürk Ö. S. 2010. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *Inula viscosa* leaf extracts with *Allium* test. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010: 189252, doi: 10.1155/2010/189252: 8 str.

- Aswathaiah B., Gupta D. G., Ramegowda, Reddy M. V. 1993. Germination testing. V: Handbook of seed testing. Agrawal P. K. (ed.). New Delhi, Ministry of Agriculture: 48 str.
- Ater M., Lefèbvre C., Gruber W., Meerts P. 2000. A phytogeochemical survey of the flora of ultramafic and adjacent normal soils in North Morocco. *Plant and Soil*, 218, 1-2: 127-135
- Atlas okolja. Agencija RS za okolje.
http://gis.arso.gov.si/atlasokolja/profile.aspx?id=Atlas_Okolja_AXL@Arso
(27. jan. 2015)
- Bamuamba K., Gammon D. W., Meyers P., Dijoux-Franca M.-G., Scott G. 2008. Antimycobacterial activity of five plant species used as traditional medicines in the Western Cape Province (South Africa). *Journal of Ethnopharmacology*, 117, 2: 385-390
- Barbafieri M., Dadea C., Tassi E., Bretzel F., Fanfani L. 2011. Uptake of heavy metals by native species growing in a mining area in Sardinia, Italy: discovering native flora for phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation*, 13, 10: 985-997
- Bartosz G. 1997. Oxidative stress in plants. *Physiologiae Plantarum*, 19, 1: 47-64
- Batič L. 2013. Semenska banka pelinolistne žvrklje na različnih rastiščih v Sloveniji. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 70 str.
- Bister H. 2013. Occasional & escaped flowers in Sweden. Kamferkrissla (*Dittrichia graveolens*).
http://www.pbse.com/bister/occasional__escaped_flowers_in_sweden (23. feb. 2015)
- Bedoya L. M., Sanchez Palomino S., Abad M. J., Bermejo P., Alcamí J. 2002. Screening of selected plant extracts for in vitro inhibitory activity on human immunodeficiency virus. *Phytotherapy Research*, 16, 6: 550-554
- Ben Sassi A., Harzallah-Skhiri F., Aouni M. 2007. Investigation of some medicinal plants from Tunisia for antimicrobial activities. *Pharmaceutical Biology*, 45, 5: 421-428
- Ben Sassi A., Harzallah-Skhiri F., Bourgougnon N., Aouni M. 2008. Antiviral activity of some Tunisian medicinal plants against *Herpes simplex* virus type 1. *Natural Product Research*, 22, 1: 53-65
- Bewley J. D. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9, 7: 1055-1066
- Blanc M.-C., Bradesi P., Gonçalves M. J., Salgueiro L., Casanova J. 2006. Essential oil of *Dittrichia viscosa* ssp. *viscosa*: analysis by ¹³C-NMR and antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal*, 21, 2: 324-332
- Bohlmann F., Czerson H., Schöneweiß S. 1977. Natürlich vorkommende Terpen-Derivate, 83. Neue Inhaltsstoffe aus *Inula viscosa* Ait. *Chemische Berichte*, 110, 4: 1330-1334

- Bohlmann F., Gupta R. K. 1982. Ineupatorolide-like sesquiterpene lactones from *Dittrichia viscosa*. *Phytochemistry*, 21, 6: 1443-1445
- Bourgau F., Gravot A., Milesi S., Gontier E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161, 5: 839-851
- Brownsey R. N. 2012. Biology of *Dittrichia graveolens* (stinkwort): Implications for management. M. Sc. Thesis. California, University of California, Davis, Department of Horticulture and Agronomy: 107 str.
- Brownsey R. N., Kyser G. B., DiTomaso J. M. 2013a. Seed and germination biology of *Dittrichia graveolens* (stinkwort). *Invasive Plant Science and Management*, 6, 3: 371-380
- Brownsey R. N., Kyser G. B., DiTomaso J. M. 2013b. Stinkwort is rapidly expanding its range in California. *California Agriculture*, 67, 2: 110-115
- Brownsey R. N., Kyser G. B., DiTomaso J. M. 2014. Growth and phenology of *Dittrichia graveolens*, a rapidly spreading invasive plant in California. *Biological Invasions*, 16, 1: 43-52
- Brullo S., de Marco G. 2000. Taxonomical revision of the genus *Dittrichia* (Asteraceae). *Portugaliae Acta Biologica*, 19, 1: 341-354
- Butterschön M. R., Waldispühl S., Bohren C., Simončič A., Lešnik M., Leskovšek R. 2008–2009. Navodila za zatiranje in preprečevanje širjenja pelinolistne ambrozije (*Ambrosia artemisiifolia*). Kopenhagen, Karin Kristensen, Univerza v Kopenhagenu: 47 str.
<http://www.furs.si/svn/zvr/POSNadzori/Ambrosia/U%C5%A1hresconavodila.pdf>
(7. maj 2015)
- Cortese D. 2012. Mlada zelena solata. Zeleni raj.
<http://www.zeleniraj.si/2012/04/mlada-zelena-solata/> (29. jul. 2015)
- Cândido A. C. S., Schmidt V., Laura V. A., Faccenda O., Hess S. C., Simionatto E., Peres M. T. L. P. 2010. Potencial alelopático da parte aérea de *Senna occidentalis* (L.) Link (Fabaceae, Caesalpinioideae): bioensaios em laboratório. *Acta Botanica Brasilica*, 24, 1: 235-242
- Carillo P., Annunziata M. G., Pontecorvo G., Fuggi A., Woodrow P. 2011. Salinity stress and salt tolerance. V: *Abiotic stress in plants – mechanisms and adaptations*. Shanker A. (ed.). Rijeka, InTech: 23-38
- Ceccherelli P., Curini M., Marcotullio M. C., Menghini A. 1985. Sesquiterpene acids from *Dittrichia viscosa*. *Phytochemistry*, 24, 12: 2987-2989
- Chaves N., Sosa T., Escudero J. C. 2001. Plant growth inhibiting flavonoids in exudate of *Cistus ladanifer* and in associated soils. *Journal of Chemical Ecology*, 27, 3: 623-631
- Chiappini I., Fardella G., Menghini A., Rossi C. 1982. Flavonoids from *Dittrichia viscosa*. *Planta Medica*, 44, 3: 159-161

- Cohen Y. 1996. Preparation and use of *Inula* extracts as a fungicide for the control of plant diseases. United States Patent 5 853 727: 7 str.
- Cohen Y., Wang W., Ben-Daniel B.-H., Ben-Daniel Y. 2006. Extracts of *Inula viscosa* control downy mildew of grapes caused by *Plasmopara viticola*. Phytopathology, 96, 4: 417-424
- Conesa H. M., María-Cervantes A., Álvarez-Rogel J., González-Alcaraz M. N. 2011. Influence of soil properties on trace element availability and plant accumulation in a Mediterranean salt marsh polluted by mining wastes: implications for phytomanagement. Science of the Total Environment, 409, 20: 4470-4479
- Constant B., Grenier S., Bonnot G. 1996. Artificial substrate for egg laying and embryonic development by the predatory bug *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae). Biological Control, 7, 2: 140-147
- Criteria for Diagnosing Saline and Sodic Soils. Research Accomplishments. 2006. United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service.
<http://www.ars.usda.gov/Research/docs.htm?docid=10492> (1. jul. 2015)
- Croteau R., Kutchan T. M., Lewis N. G. 2000. Natural products (secondary metabolites). V: Biochemistry & molecular biology of plants. Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.). Rockville, Maryland, American Society of Plant Physiologists: 1250-1318
- Curadi M., Graifenberg A., Magnani G., Giustiniani L. 2005. Growth and element allocation in tissues of *Inula viscosa* in sodic-saline conditions: a candidate for programs of desertification control. Arid Land Research and Management, 19, 3: 257-265
- Danino O., Gottlieb H. E., Grossman S., Bergman M. 2009. Antioxidant activity of 1,3-dicaffeoylquinic acid isolated from *Inula viscosa*. Food Research International, 42, 9: 1273-1280
- Davey M. W., Stals E., Panis B., Keulemans J., Swennen R. L. 2005. High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. Analytical Biochemistry, 347, 2: 201-207
- Dayan F. E., Cantrell C. L., Duke S. O. 2009. Natural products in crop protection. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 17, 12: 4022-4034
- De Laurentis N., Losacco V., Milillo M. A., Lai O. 2002. Chemical investigations of volatile constituents of *Inula viscosa* (L.) Aiton (Asteraceae) from different areas of Apulia, Southern Italy. Delpinoa, 44: 115-119
- Debat J., Lemoine J., Lier née Gabillaut F. 1981. *Inula* extract, its method of preparation and its use as pharmaceutical. United States Patent 4 254 112: 3 str.
- Dias T., Malveiro S., Martins-Loução M. A., Sheppard L. J., Cruz C. 2011. Linking N-driven biodiversity changes with soil N availability in a Mediterranean ecosystem. Plant and Soil, 341, 1-2: 125-136

- DiTommaso A. 2004. Germination behaviour of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) populations across a range of salinities. *Weed Science*, 52, 6: 1002-1009
- Djenane D., Yangüela J., Gómez D., Roncalés P. 2011. Perspectives on the use of essential oils as antimicrobials against *Campylobacter jejuni* CECT 7572 in retail chicken meats packaged in microaerobic atmosphere. *Journal of Food Safety*, 32, 1: 37-47
- Dmitrović S., Perišić M., Stojić A., Živković S., Boljević J., Nestorović Živković J., Aničić N., Ristić M., Mišić D. 2015. Essential oils of two *Nepeta* species inhibit growth and induce oxidative stress in ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) shoots in vitro. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37, 3: 64
- Dohi S., Terasaki M., Makino M. 2009. Acetylcholinesterase inhibitory activity and chemical composition of commercial essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10: 4313-4318
- Dor E., Hershenhorn J. 2012. Allelopathic effects of *Inula viscosa* leaf extracts on weeds. *Allelopathy Journal*, 30, 2: 281-290
- Doussi M. A., Thanos C. A. 1997. Ecophysiology of seed germination in Composites inhabiting fire-prone Mediterranean ecosystems. V: Basic and applied aspects of seed biology. Ellis R. H., Black M., Murdoch A. J., Hong T. D. (eds.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 641-649
- Dragoeva A. P., Koleva V. P., Nanova Z. D., Kaschieva M. Z. 2014. Allelopathy of cold water extracts from *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* L. *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*, 3, 4: 144-150
- Duke S. O., Lydon J. 1987. Herbicides from natural compounds. *Weed Technology*, 1, 2: 122-128
- El Ayeb A., Ben Jannet H., Harzallah-Skhiri F. 2013. Effects of *Acacia cyanophylla* Lindl. extracts on seed germination and seedling growth of four crop and weed plants. *Turkish Journal of Biology*, 37, 3: 305-314
- Esler A. E. 1988. The naturalisation of plants in urban Auckland, New Zealand 6. Alien plants as weeds. *New Zealand Journal of Botany*, 26, 4: 585-618
- Essl F., Dullinger S., Kleinbauer I. 2009. Changes in the spatio-temporal patterns and habitat preferences of *Ambrosia artemisiifolia* during its invasion of Austria. *Preslia*, 81, 2: 119-133
- Euro+Med PlantBase. 2006a. The Euro+Med PlantBase - the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity. *Dittrichia viscosa*.
http://euromed.luomus.fi/euromed_map.php?taxon=416709&size=medium
(12. feb. 2015)
- Euro+Med PlantBase. 2006b. The Euro+Med PlantBase - the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity. *Dittrichia graveolens*.

http://euromed.luomus.fi/euromed_map.php?taxon=416703&size=medium
(12. feb. 2015)

False yellowhead (*Dittrichia viscosa*) weed management guide. Alert list for environmental weeds. 2003. Australian Government. Department of the Environment and Heritage and the CRC for Australian Weed Management.
<http://www.environment.gov.au/biodiversity/invasive/weeds/publications/guidelines/alert/d-viscosa.html> (17. feb. 2015)

Ferguson J. J., Rathinasabapathi B., Chase C. A. 2013. Allelopathy: how plants suppress other plants. University of Florida, IFAS Extension.
<http://edis.ifas.ufl.edu/HS186> (12. apr. 2015)

Finch-Savage W. E., Leubner-Metzger G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171, 3: 501-523

Flann C. (ed.). 2009+. Global Compositae Checklist.
<http://dixon.iplantcollaborative.org/CompositaeWeb/Default.aspx?Page=NameSearch&searchText=Dittrichia> (12. feb. 2015)

Fontana G., La Rocca S., Passannanti S., Paternostro M. P. 2007. Sesquiterpene compounds from *Inula viscosa*. *Natural Product Research*, 21, 9: 824-827

Frajman B., Kaligarič M. 2009. *Dittrichia graveolens*, nova tujerodna vrsta slovenske flore. *Hladnikia*, 24: 35-43

Franco-Micán S., Castro J., Campos M. 2010. Preliminary study of the parasitic complex associated with *Dittrichia viscosa* in Andalusia (Spain). *Integrated Protection of Olive Crops*, 53: 139-143

Gavlak R. G., Horneck D. A., Miller R. O. 1994. Plant, soil and water reference methods for the western region. Western regional extension publication 125. University of Alaska, Fairbanks

Ghorbanali M., Satei A., Esmaeeli M. 2013. Determining the optimum temperature and the effect of different salinity concentrations on germination and growth of the seedlings of *Dittrichia graveolens* (L.) Greuter. *Plant and Ecosystem*, 9, 34-1: 40-52

Gisbert C., Almela C., Vélez D., López-Moya J. R., de Haro A., Serrano R., Montoro R., Navarro-Aviño J. 2008. Identification of As accumulation plant species growing on highly contaminated soils. *International Journal of Phytoremediation*, 10, 3: 185-196

Gonçalo M., Gonçalo S. 1991. Allergic contact dermatitis from *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter. *Contact Dermatitis*, 24, 1: 40-44

Grande M., Piera F., Cuenca A., Torres P., Bellido I. S. 1985. Flavonoids from *Inula viscosa*. *Planta Medica*, 51, 5: 414-419

Grande M., Bellido I. S. 1992. 9-hydroxynerylidol esters and bicyclic sesquiterpenoids from *Dittrichia viscosa*. *Journal of Natural Products*, 55, 8: 1074-1079

- Grande M., Torres P., Piera F., Bellido I. S. 1992. Triterpenoids from *Dittrichia viscosa*. *Phytochemistry*, 31, 5: 1826-1828
- Greuter W. 1973. *Exsiccatorium genavensium a conservatorio botanico distributorum, fasciculus quartus*. Genève: 71
- Greuter W. 2003. The Euro+Med treatment of Gnaphalieae and Inuleae (Compositae): generic concepts and required new names. *Willdenowia*, 33, 2: 239-244
- Grisi P. U., Gualtieri S. C. J., Ranal M. A., Santana D. G. 2013. Phytotoxic activity of crude aqueous extracts and fractions of young leaves of *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 27, 1: 62-70
- Groom Q. 2011. Manual of the alien plants of Belgium. *Dittrichia viscosa*. <http://alienplantsbelgium.be/content/dittrichia-viscosa> (13. feb. 2015)
- Guinoiseau E., Luciani A., Rossi P. G., Quilichini Y., Ternengo S., Bradesi P., Berti L. 2010. Cellular effects induced by *Inula graveolens* and *Santolina corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 29, 7: 873-879
- Hasegawa P. M., Bressan R. A., Zhu J.-K., Bohnert H. J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51: 463-499
- Hernández V., Máñez S., Recio M. C., Giner R. M., Ríos J.-L. 2005. Anti-inflammatory profile of dehydrocostic acid, a novel sesquiterpene acid with a pharmacophoric conjugated diene. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26, 2: 162-169
- Hernández V., Recio M. C., Máñez S., Giner R. M., Ríos J.-L. 2007. Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism. *Life sciences*, 81, 6: 480-488
- Hierro J. L., Callaway R. M. 2003. Allelopathy and exotic plant invasion. *Plant and Soil*, 256, 1: 29-39
- Higuera P., Oyarzun R., Biester H., Lillo J., Lorenzo S. 2003. A first insight into mercury distribution and speciation in soils from the Almadén mining district, Spain. *Journal of Geochemical Exploration*, 80, 1: 95-104
- Hudaib M., Mohammad M., Bustanji Y., Tayyem R., Yousef M., Abuirjeie M., Aburjai T. 2008. Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Jordan, Mujib Nature Reserve and surrounding area. *Journal of Ethnopharmacology*, 120, 1: 63-71
- Inderjit, Nilsen E. T. 2003. Bioassays and field studies for allelopathy in terrestrial plants: progress and problems. *Critical Reviews in Plant Science*, 22, 3: 221-238
- Janmohammadi M., Abbasi A., Sabaghnia N. 2012. Influence of NaCl treatments on growth and biochemical parameters of castor bean (*Ricinus communis* L.). *Acta agriculturae Slovenica*, 99, 1: 31-40

- Jiménez M. N., Bacchetta G., Casti M., Navarro F. B., Lallena A. M., Fernández-Ondoño E. 2011. Potential use in phytoremediation of three plant species growing on contaminated mine-tailing soils in Sardinia. *Ecological Engineering*, 37, 2: 392-398
- Jogan N., Bačič T., Frajman B., Leskovar I., Naglič D., Podobnik A., Rozman B., Strgulc Krajšek S., Trčak B./Jogan N. (ur.). 2001. Gradivo za Atlas flore Slovenije. Miklavž na Dravskem polju, Center za kartografijo favne in flore: 443 str.
- Jogan N. 2009. Pelinolistna žvrklja (ambrozija), *Ambrosia artemisiifolia*. Informativni list 27. V: Tujerodne vrste: informativni listi izbranih invazivnih vrst. Jogan N. (ur.). Gradivo Projekta Thuja.
<http://www.tujerodne-vrste.info/informativni-listi/INF27-pelinolistna-zvrklja.pdf>
(6. maj 2015)
- Jogan N. 2012. Tujerodne vrste v Sloveniji. V Slovenijo kar po avtocesti.
<http://www.tujerodne-vrste.info/tujerodne-vrste/tujerodne-rastline/> (17. feb. 2015)
- John J., Shirmila J., Sarada S., Anu S. 2010. Role of allelopathy in vegetables crops production. *Allelopathy Journal*, 25, 2: 275-312
- Jouyban Z. 2012. The effects of salt stress on plant growth. *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences*, 2, 1: 7-10
- Karageorgou P., Levizou E., Manetas Y. 2002. The influence of drought, shade and availability of mineral nutrients on exudate phenolics of *Dittrichia viscosa*. *Flora*, 197, 4: 285-289
- Karrfalt R. P. 2008. Seed testing. V: The woody plant seed manual. Bonner F. T., Karrfalt R. P. (eds.). USA, Washington, D.C., Department of Agriculture, Forest Service: 97-115
- Kavallieratos N. G., Stathas G. J., Athanassiou C. G., Papadoulis G. T. 2002. *Dittrichia viscosa* and *Rubus ulmifolius* as reservoirs of aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) and the role of certain coccinellid species. *Phytoparasitica*, 30, 3: 231-242
- Kazinczi G., Béres I., Onofri A., Nádas E., Takács A., Horváth J., Torma M. 2008. Allelopathic effects of plant extracts on common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.). *Journal of Plant Diseases and Protection*, 21: 335-339
- Khalil E. A., Afifi F. U., Al-Hussaini M. 2007. Evaluation of the wound healing effect of some Jordanian traditional medicinal plants formulated in Pluronic F127 using mice (*Mus musculus*). *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 1: 104-112
- Koornneef M., Bentsink L., Hilhorst H. 2002. Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 1: 33-36
- Kotuby-Amacher J., Koenig R., Kitchen B. 2000. Salinity and plant tolerance. Utah State University Extension.
<https://extension.usu.edu/files/publications/publication/AG-SO-03.pdf> (27. apr. 2015)

- Labudda M. 2013. Lipid peroxidation as a biochemical marker for oxidative stress during drought. An effective tool for plant breeding. E-wydawnictwo, Poland: 12 str.
- Lanzetta R., Lama G., Mauriello G., Parrilli M., Racioppi R., Sodano G. 1991. Ichthyotoxic sesquiterpenes and xanthanolides from *Dittrichia graveolens*. *Phytochemistry*, 30, 4: 1121-1124
- Lau J. A., Puliafico K. P., Kopshever J. A., Steltzer H., Jarvis E. P., Schwarzländer M., Strauss S. Y., Hufbauer R. 2008. Inference of allelopathy is complicated by effects of activated carbon on plant growth. *New Phytologist*, 178, 2: 412-423
- Lawlor D. W. 1970. Absorption of polyethylene glycols by plants and their effects on plant growth. *New Phytologist*, 69, 2: 501-513
- Lentini F. 2000. The role of ethnobotanics in scientific research. State of ethnobotanical knowledge in Sicily. *Fitoterapia*, 71, 1: 83-88
- Levizou E., Karageorgou P., Psaras G. K., Manetas Y. 2002. Inhibitory effects of water soluble leaf leachates from *Dittrichia viscosa*, on lettuce root growth, statocyte development and graviperception. *Flora*, 197, 2: 152-157
- Levizou E., Karageorgou P., Petropoulou Y., Grammatikopoulos G., Manetas Y. 2004. Induction of ageotropic response in lettuce radicle growth by epicuticular flavonoid aglycons of *Dittrichia viscosa*. *Biologia plantarum*, 48, 2: 305-307
- Macías F. A., Simonet A. M., Pacheco P. C., Barrero A. F., Cabrera E., Jiménez-González D. 2000. Natural and synthetic podolactones with potential use as natural herbicide models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 7: 3003-3007
- Mamoci E., Cavoski I., Simeone V., Mondelli D., Al-Bitar L., Caboni P. 2011. Chemical composition and in vitro activity of plant extracts from *Ferula communis* and *Dittrichia viscosa* against postharvest fungi. *Molecules*, 16, 3: 2609-2625
- Mamoci E., Cavoski I., Andrés M. F., Díaz C. E., Gonzalez-Coloma A. 2012. Chemical characterization of the aphid antifeedant extracts from *Dittrichia viscosa* and *Ferula communis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 43: 101-107
- Mansour F., Azaizeh H., Saad B., Tadmor Y., Abo-Moch F., Said O. 2004. The potential of Middle Eastern flora as a source of new safe bio-acaricides to control *Tetranychus cinnabarinus*, the carmine spider mite. *Phytoparasitica*, 32, 1: 66-72
- Máñez S., Recio M. C., Gil I., Gómez C., Giner R.-M., Waterman P. G., Ríos J.-L. 1999. A glycosyl analogue of diacylglycerol and other antiinflammatory constituents from *Inula viscosa*. *Journal of Natural Products*, 62, 4: 601-604
- Máñez S., Hernández V., Giner R.-M., Ríos J.-L., Recio M. C. 2007. Inhibition of pro-inflammatory enzymes by inuviscolide, a sesquiterpene lactone from *Inula viscosa*. *Fitoterapia*, 78, 4: 329-331

- Maoz M., Neeman I. 1998. Antimicrobial effects of aqueous plant extracts on the fungi *Microsporum canis* and *Trichophyton rubrum* and on three bacterial species. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 1: 61-63
- Maoz M., Kashman Y., Neeman I. 1999. Isolation and identification of a new antifungal sesquiterpene lactone from *Inula viscosa*. *Planta Medica*, 65, 3: 281-282
- Maoz M., Neeman I. 2000. Effect of *Inula viscosa* extract on chitin synthesis in dermatophytes and *Candida albicans*. *Journal of ethnopharmacology*, 71, 3: 479-482
- Marín M., Giner R. M., Recio M. C., Mánez S. 2011. Phenylpropanoid and phenylisoprenoid metabolites from Asteraceae species as inhibitors of protein carbonylation. *Phytochemistry*, 72, 14-15: 1821-1825
- Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Podobnik A., Turk B., Vreš B., Ravnik V., Frajman B., Strgulc Krajšek S., Trčak B., Bačič T., Fischer M.A., Eler K., Surina B./Martinčič A. (ur.). 2010. Mala flora Slovenije. Ključ za določanje praprotnic in semenk. 4. izdaja. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 967 str.
- Mazandarani M., Ghafourian M., Khormali A. 2014. Ethnopharmacology, antibacterial and antioxidant activity of *Dittrichia graveolens* (L.) W. Greuter. Which has been used as remedies antirheumatic, anti-inflammation and antiinfection against leishmaniasis in the traditional medicine of Gorgan, Iran. *Crescent Journal of Medical and Biological Sciences*, 1, 4: 125-129
- McDonald M. B. 2008. Physiology of seed germination. The Ohio State University, Columbus, Ohio, USA.
http://seedbiology.osu.edu/HCS631_files/4A%20Seed%20germination.pdf (1. maj 2015)
- McNeil S. D., Nuccio M. L., Hanson A. D. 1999. Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiology*, 120, 4: 945-949
- Melendo M., Benitez E., Nogales R. 2002. Assessment of the feasibility of endogenous Mediterranean species for phytoremediation of lead-contaminated areas. *Fresenius Environmental Bulletin*, 11, 12: 1105-1109
- Merghoub N., Benbacer L., Amzazi S., Morjani H., El Mzibri M. 2009. Cytotoxic effect of some Moroccan medicinal plant extracts on human cervical cell lines. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3, 12: 1045-1050
- Meteo. Agencija RS za okolje.
<http://meteo.arso.gov.si/met/sl/app/webmet/#webmet==8Sdwx2bhR2cv0WZ0V2bvEGcw9ydlJWblR3LwVnaz9SYtVmYh9iclFGbt9SaulGdugXbsx3cs9mdl5WahxXYyNGapZXZ8tHZv1WYp5mOnMHbvZXZulWYnwCchJXYtVGdlJnOn0UQQdSf;> (1. jun. 2015)
- Meyer T. 2005-. Flora-de: Flora von Deutschland. Gattung: Klebalant (*Dittrichia*).
<http://www.blumeninschwaben.de/Zweikeimblaettrige/Korbbluetler/GelbeArten/dittrichia.htm> (13. feb. 2015)

- Miguel G., Faleiro L., Cavaleiro C., Salgueiro L., Casanova J. 2008. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to essential oil of *Dittrichia viscosa* subsp. *revoluta*. *Phytotherapy Research*, 22, 2: 259-263
- Miransari M., Smith D. L. 2014. Plant hormones and seed germination. *Environmental and Experimental Botany*, 99: 110-121
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7, 9: 405-410
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment*, 25, 2: 239-250
- Murciego Murciego A., García Sánchez A., Rodríguez Gonzáles M. A., Pinilla Gil E., Toro Gordillo C., Cabezas Fernández J., Buyolo Triguero T. 2007. Antimony distribution and mobility in topsoils and plants (*Cytisus striatus*, *Cistus ladanifer* and *Dittrichia viscosa*) from polluted Sb-mining areas in Extremadura (Spain). *Environmental Pollution*, 145, 1: 15-21
- Namdeo A. G. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy reviews*, 1, 1: 69-79
- Nilsson M.-C. 1994. Separation of allelopathy and resource competition by the boreal dwarf shrub *Empetrum hermaphroditum* Hagerup. *Oecologia*, 98, 1: 1-7
- Oka Y., Ben-Daniel B.-H., Cohen Y. 2001. Nematicidal activity of powder and extracts of *Inula viscosa*. *Nematology*, 3, 8: 735-742
- Oka Y., Ben-Daniel B.-H., Cohen Y. 2006. Control of *Meloidogyne javanica* by formulations of *Inula viscosa* leaf extracts. *Journal of Nematology*, 38, 1: 46-51
- Omezzine F., Rinez A., Ladhari A., Farooq M., Haouala R. 2011a. Allelopathic potential of *Inula viscosa* against crops and weeds. *International Journal of Agriculture & Biology*, 13, 6: 841-849
- Omezzine F., Ladhari A., Rinez A., Haouala R. 2011b. Allelopathic potential of *Inula graveolens* on crops and weeds. *Allelopathy Journal*, 28, 1: 63-76
- Omezzine F., Rinez A., Ladhari A., Haouala R. 2011c. Phytotoxicity of the genus *Inula* (Asteraceae). 3rd International Symposium on Weeds and Invasive Plants: 6 str.
- Oskay M., Sarı D. 2007. Antimicrobial screening of some Turkish medicinal plants. *Pharmaceutical Biology*, 45, 3: 176-181
- Oskay M., Oskay D., Kalyoncu F. 2009. Activity of some plant extracts against multi-drug resistant human pathogens. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 8, 4: 293-300
- Öksüz S., Topçu G. 1992. A eudesmanolide and other constituents from *Inula graveolens*. *Phytochemistry*, 31, 1: 195-197

- Öztürk M., Mert H. H. 1983. Water relations and germination of seeds of *Inula graveolens* (L.) Desf. Biotronics, 12: 11-17
- Parker C. 2009. Observations on the current status of *Orobanche* and *Striga* problems worldwide. Pest Management Science, 65, 5: 453-459
- Parolin P., Ion-Scotta M., Bresch C. 2013a. Notes on the phenology of *Dittrichia viscosa*. Journal of Mediterranean Ecology, 12: 27-35
- Parolin P., Bresch C., Ottenwalder L., Ion-Scotta M., Brun R., Fatnassi H., Poncet C. 2013b. False yellowhead (*Dittrichia viscosa*) causes over infestation with the whitefly pest (*Trialeurodes vaporariorum*) in tomato crops. International Journal of Agricultural Policy and Research, 1, 10: 311-318
- Parolin P., Ion Scotta M., Bresch C. 2014. Biology of *Dittrichia viscosa*, a Mediterranean ruderal plant: a review. Phytion, International Journal of Experimental Botany, 83: 251-262
- Parsons W. T., Cuthbertson E. G. 2001. Stinkwort. V: Noxious weeds of Australia. 2. izd. Collingwood, CSIRO Publishing: 281-283
- Peng S.-L., Wen J., Guo Q.-F. 2004. Mechanism and active variety of allelochemicals. Acta Botanica Sinica, 46, 7: 757-766
- Perdikis D., Favas C., Lykouressis D., Fantinou A. 2007. Ecological relationships between non-cultivated plants and insect predators in agroecosystems: the case of *Dittrichia viscosa* (Asteraceae) and *Macrolophus melanotoma* (Hemiptera: Miridae). Acta Oecologica, 31, 3: 299-306
- Pérez-Alonso M. J., Velasco-Negueruela A., Emin Duru M., Harmandar M., García Vallejo M. C. 1996. Composition of the volatile oil from the aerial parts of *Inula viscosa* (L.) Aiton. Flavour and Fragrance Journal, 11, 6: 349-351
- Pérez-Clemente R. M., Montoliu A., Zandalinas S. I., de Ollas C., Gómez-Cadenas A. 2012. Carrizo citrange plants do not require the presence of roots to modulate the response to osmotic stress. Scientific World Journal, 2012: 795396, doi: 10.1100/2012/795396: 13 str.
- Philbey A. W., Morton A. G. 2000. Pyogranulomatous enteritis in sheep due to penetrating seed heads of *Dittrichia graveolens*. Australian Veterinary Journal, 78, 12: 858-860
- Pires B. A., Belo A. F., Rabaça J. E. 2012. Aromatic plants in Eurasian blue tit nests: the 'nest protection hypothesis' revisited. The Wilson Journal of Ornithology, 124, 1: 162-165
- Plant Protection and Quarantine. 2013. Weed risk assessment for *Dittrichia graveolens* (L.) Greuter (Asteraceae) – stinkwort. USA, North Carolina, Raleigh, United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service: 17 str.
- Podboj M. 2014. Vpliv izvlečkov nedotik na rast in razvoj izbranih rastlinskih vrst. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 66 str.

Pomladne setve na prosto. Zelenjavni vrt. Vrtni centri Kalia.

<http://www.kalia.si/sl/clanki/clanki/zelenjavni-vrt/497-pomladne-setve-na-prosto>
(1. jul. 2015)

Pušenjaka M. 2010. Solata je na naši mizi od nekdaj. Dom in vrt.

<http://www.dominvrt.si/clanek/zunanja-ureditev/solata-je-na-nasi-mizi-od-nekdaj.html>
(1. jun. 2015)

Kaiser M., Abid R. 2005. Distribution pattern of *Inula* (L.) (s. str.) and its allied genera from Pakistan and Kashmir. *Pakistan Journal of Botany*, 37, 3: 551-558

Quattrocchi U. 2012. *Dittrichia* Greuter Asteraceae. V: CRC world dictionary of medicinal and poisonous plants. Common names, scientific names, eponyms, synonyms and etymology. London, CRC Press: 1452

Rao N. K., Hanson J., Dulloo M. E., Ghosh K., Nowell D., Larinde M. 2006. Seed quality testing. V: Manual of seed handling in genebanks. Rome, Biodiversity International: 50-85

Razinger J., Dermastia M., Dolenc Koce J., Zimec A. 2008. Oxidative stress in duckweed (*Lemna minor* L.) caused by short-term cadmium exposure. *Environmental Pollution*, 153, 3: 687-694

Rice E. L. 1979. Allelopathy: an update. *Botanical Review*, 45, 1: 15-109

Rich T. C. G. 1994. Ragweeds (*Ambrosia* L.) in Britain. *Grana*, 33, 1: 38-43

Rozenblat S., Grossman S., Bergman M., Gottlieb H., Cohen Y., Dovrat S. 2008. Induction of G₂/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines. *Biochemical Pharmacology*, 75, 2: 369-382

Ruiz-Carrasco K., Antognoni F., Coulibaly A. K., Lizardi S., Covarrubias A., Martínez E. A., Molina-Montenegro M. A., Biondi S., Zurita-Silva A. 2011. Variation in salinity tolerance of four lowland genotypes of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) as assessed by growth, physiological traits, and sodium transporter gene expression. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49, 11: 1333-1341

Rustaiyan A., Jakupovic J., Chau-Thi T. V., Bohlmann F., Sadjadi A. 1987. Further sesquiterpene lactones from the genus *Dittrichia*. *Phytochemistry*, 26, 9: 2603-2606

Rúa M. A., Nijjer S., Johnson A., Rogers W. E., Siemann E. 2008. Experimental approaches to test allelopathy: a case study using the invader *Sapium sebiferum*. *Allelopathy Journal*, 22, 1: 1-14

SANBI. *Dittrichia graveolens*. 2009. South African National Biodiversity Institute.
<http://sibis.sanbi.org/faces/SearchSpecies/SearchDetails.jsp?l=1> (17. feb. 2015)

- Sanz J. F., Ferrando C., Marco A. 1991. Oxygenated nerolidol esters and eudesmane acids from *Inula viscosa*. *Phytochemistry*, 30, 11: 3653-3655
- Schinella G. R., Tournier H. A., Prieto J. M., Mordujovich de Buschiazzi P., Ríos J.-L. 2002. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sciences*, 70, 9: 1023-1033
- Scott J. K., Batchelor K. L., Ota N., Yeoh P. B. 2008. Modelling climate change impacts on sleeper and alert weeds: appendix B. Results of climex models part 2 – tables of model parameters and tests of association. Wembley, CSIRO Entomology: 12 str.
- Shallari S., Schwartz C., Hasko A., Morel J. L. 1998. Heavy metals in soils and plants of serpentine and industrial sites of Albania. *The Science of the Total Environment*, 209, 2-3: 133-142
- Shtacher G., Kashman Y. 1970. 12-carboxyeudesma-3,11(13)-diene. A novel sesquiterpenic acid with a narrow antifungal spectrum. *Journal of Medicinal Chemistry*, 13, 6: 1221-1223
- Shtacher G., Kashman Y. 1971. Chemical investigation of volatile constituents of *Inula viscosa* Ait. *Tetrahedron*, 27, 6: 1343-1349
- Sies H. 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *American Journal of Medicine*, 91: 31-38
- Silva D., Denham E., Faleiro R., Miguel G., Cavaleiro C., Salgueiro L. 2005. Antimicrobial activity of the essential oils of *Dittrichia viscosa* subsp. *viscosa* on *Helicobacter pylori*. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 680: 147-151
- Sinden J., Jones R., Hester S., Odom D., Kalisch C., James R., Cacho O. 2004. The economic impact of weeds in Australia. South Australia, Adelaide, Glen Osmond, CRC for Australian Weed Management, University of Adelaide: 65 str.
- Stamatakis K., Konstantopoulou M. 2001. Allelopathy effects of aqueous rinses of *Dittrichia viscosa* (L.) on the photosynthesis and cell proliferation of N₂-fixing soil cyanobacteria. *Proceedings of the 12th International Congress on Photosynthesis*, 3, 1: 4 str.
- Stamatis G., Kyriazopoulos P., Golegou S., Basayiannis A., Skaltsas S., Skaltsa H. 2003. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines. *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 2-3: 175-179
- Stavrianakou S., Liakoura V., Levizou E., Karageorgou P., Delis C., Liakopoulos C., Karabourniotis G., Manetas Y. 2004. Allelopathic effects of water-soluble leaf epicuticular material from *Dittrichia viscosa* in seed germination of crops and weeds. *Allelopathy Journal*, 14, 1: 35-41
- Stephanou M., Manetas Y. 1995. Allelopathic and water conserving functions of leaf epicuticular exudates in the Mediterranean shrub *Dittrichia viscosa*. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22, 5: 755-759

- Stephanou M., Manetas Y. 1997a. Seasonal variations in UV-B absorbing capacity and allelopathic potential of *Dittrichia viscosa* leaf rinsates. *Canadian Journal of Botany*, 75, 8: 1371-1374
- Stephanou M., Manetas Y. 1997b. Ultraviolet-B radiation effects on the Mediterranean ruderal *Dittrichia viscosa*. *Plant Ecology*, 128, 1: 109-112
- Survival Analysis. Prism 5 Statistics Guide. 2007. GraphPad Software.
http://www.graphpad.com/guides/prism/5/user-guide/prism5help.html?using_prism_users_guide.htm (1. jul. 2015)
- Swaileh K. M., Hussein R. M., Abu-Elhaj S. 2004. Assessment of heavy metal contamination in roadside surface soil and vegetation from the West Bank. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 47, 1: 23-30
- Taiz L., Zeiger E. 2010. Types of seed dormancy and the roles of environmental factors. V: *Plant Physiology*. 5th ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
<http://5e.plantphys.net/article.php?ch=23&id=8> (1. maj 2015)
- Talib W. H., Mahasneh A. M. 2010a. Antimicrobial, cytotoxicity and phytochemical screening of Jordanian plants used in traditional medicine. *Molecules*, 15, 3: 1811-1824
- Talib W. H., Mahasneh A. M. 2010b. Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. *Scientia Pharmaceutica*, 78, 1: 33-45
- Talib W. H., Abu Zarga M. H., Mahasneh A. M. 2012. Antiproliferative, antimicrobial and apoptosis inducing effects of compounds isolated from *Inula viscosa*. *Molecules*, 17, 3: 3291-3303
- Talibi I., Askarne L., Boubaker H., Boudyach E. H., Msanda F., Saadi B., Ait Ben Aoumar A. 2012. Antifungal activity of some Moroccan plants against *Geotrichum candidum*, the causal agent of postharvest citrus sour rot. *Crop Protection*, 35: 41-46
- The Global Biodiversity Information Facility: GBIF Backbone Taxonomy. 2013a. *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter.
<http://www.gbif.org/species/3101184> (23. feb. 2015)
- The Global Biodiversity Information Facility: GBIF Backbone Taxonomy. 2013b. *Dittrichia graveolens* (L.) Greuter.
<http://www.gbif.org/species/3101193> (23. feb. 2015)
- Thong H.-Y., Yokota M., Kardassakis D., Maibach H. I. 2008. Allergic contact dermatitis from *Dittrichia graveolens* (L.) Greuter (stinkwort). *Contact dermatitis*, 58, 1: 51-53
- Tkalec M. 2007. Biokemijski pokazatelji toksičnosti. V: *Metode u molekularnoj biologiji*. Ambriović Ristov A., Brozović A., Bruvo Mađarić B., Četković H., Hranilović D., Herak Bosnar M., Katušić Hećimović S., Meštrović Radan N., Mihaljević S., Slade N., Vujaklija D. (ur.). Zagreb, Institut Ruđer Bošković: 900-904
- Tommasini M. G. 2004. Collection of *Orius* species in Italy. *Bulletin of Insectology*, 57, 2: 65-72

- Topçu G., Öksüz S., Shieh H.-L., Cordell G. A., Pezzuto J. M., Bozok-Johansson C. 1993. Cytotoxic and antibacterial sesquiterpenes from *Inula graveolens*. *Phytochemistry*, 33, 2: 407-410
- Ulubelen A., Öksüz S., Gören N. 1987. Sesquiterpene acids from *Inula viscosa*. *Phytochemistry*, 26, 4: 1223-1224
- USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network - (GRIN) [Online Database]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland.
<http://www.ars-grin.gov/~sbmljw/cgi-bin/taxon.pl?104195#dist> (13. feb. 2015)
- USDA, NRCS. 2015a. The PLANTS Database. National Plant Data Team, Greensboro, NC 27401-4901 USA. *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter.
<http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=DIVI6> (12. feb. 2015)
- USDA, NRCS. 2015b. The PLANTS Database. National Plant Data Team, Greensboro, NC 27401-4901 USA. *Dittrichia graveolens* (L.) Greuter.
<http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=DIGR3> (12. feb. 2015)
- Vyvyan J. R. 2002. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron*, 58, 9: 1631-1646
- Wang W., Ben-Daniel B.-H., Cohen Y. 2004. Control of plant diseases by extracts of *Inula viscosa*. *Phytopathology*, 94, 10: 1042-1047
- Weißhuhn K., Prati D. 2009. Activated carbon may have undesired side effects for testing allelopathy in invasive plants. *Basic and Applied Ecology*, 10, 6: 500-507
- Werker E., Fahn A. 1981. Secretory hairs of *Inula viscosa* (L.) Ait. – development, ultrastructure, and secretion. *Botanical Gazette*, 142, 4: 461-476
- Willemsen R. W., Rice E. L. 1972. Mechanism of seed dormancy in *Ambrosia artemisiifolia*. *American Journal of Botany*, 59, 3: 248-257
- Williams D. H., Stone M. J., Hauck P. R., Rahman S. K. 1989. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *Journal of Natural Products*, 52, 6: 1189-1208
- Willis R. J. 2007. What is allelopathy? V: The history of allelopathy. Willis R. J. (ed.). Dordrecht, Springer: 1-13
- Wollenweber E., Mayer K., Roitman J. N. 1991. Exudate flavonoids of *Inula viscosa*. *Phytochemistry*, 30, 7: 2445-2446
- Wraber T. 2010. *Dittrichia*. V: Mala flora Slovenije. Ključ za določanje praprotnic in semenk. Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Podobnik A., Turk B., Vreš B., Ravnik V., Frajman B., Strgulc Krajšek S., Trčak B., Bačič T., Fischer M.A., Eler K., Surina B. (ur.). 4. izdaja. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 651

- Yaniv Z., Dafni A., Friedman J., Palevitch D. 1987. Plants used for the treatment of diabetes in Israel. *Journal of Ethnopharmacology*, 19, 2: 145-151
- Zeggwagh N.-A., Ouahidi M.-L., Lemhadri A., Eddouks M. 2006. Study of hypoglycaemic and hypolipidemic effects of *Inula viscosa* L. aqueous extract in normal and diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 2: 223-227
- Zhang Q., Wang S., Rue K. 2011. Salinity tolerance of 12 turfgrasses in three germination media. *HortScience*, 46, 4: 651-654
- Zhang Q., Rue K., Wang S. 2012. Salinity effect on seed germination and growth of two warm-season native grass species. *HortScience*, 47, 4: 527-530
- Zhu J.-K. 2007. *Plant Salt Stress*. eLS, John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
<http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0001300.html> (26. apr. 2015)

ZAHVALA

V prvi vrsti se iz vsega srca zahvaljujem mentorici doc. dr. Simoni Strgulc Krajšek ter somentorici asist. dr. Sabini Anžlovar, ki sta se v največji možni meri izkazali tako na profesionalni kot tudi na osebnostni ravni. Hvala vama za samo zasnovo tega magistrskega dela, vajin takojšen interes in izredno topel sprejem, podporo, vse nasvete in pomoč pri terenskem in laboratorijskem delu, za mnogo potrpljenja glede mojih vprašanj in pregled naloge ter nenazadnje za pozitivno energijo, sproščeno vzdušje ter vse prijetne klepete, kar je neizmerno vplivalo na mojo motivacijo in užitek pri delu.

Iskrena zahvala gre sošolcu in dobremu prijatelju Filipu Kūzmiču za vso pomoč pri delu ter številne koristne predloge in prijetno preživete ure ob nastajanju te magistrske naloge. Posebej bi se zahvalila tudi Katarini Šoln za njeno pomoč, dobro voljo in požrtvovalnost. Tudi brez vajinih bogatih vrlin to magistrsko delo ne bi bilo tako celovito.

Hvala doc. dr. Jasni Dolenc Koce za pomoč in usmeritve pri magistrskem delu. Hvala tudi Tjaši Pogačnik Lipovec in vsem ostalim iz Katedre za botaniko za popestritev delovnega okolja.

Zahvalila bi se recenzentu doc. dr. Matevžu Likarju za hiter pregled magistrske naloge, popravke in dodatne nasvete.

Mileni Kubelj se zahvaljujem za njeno prijaznost in pomoč pri delu.

Hvala tudi vsem ostalim, ki ste mi kadar koli delali družbo ob delu in na kakršen koli način prispevali k nastanku moje magistrske naloge.

Na koncu bi se rada zahvalila še staršema za potrpežljivost in materialno podporo v času študija ter Anžetu za zaupanje, podporo in vzpodbudne besede.