

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ EKOLOGIJE IN BIODIVERZITETE

Filip KÜZMIČ

**VPLIV VODNEGA IZVLEČKA AJDE NA KALITEV
IZBRANIH INVAZIVNIH TUJERODNIH RASTLIN**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ EKOLOGIJE IN BIODIVERZITETE

Filip KÜZMIČ

**VPLIV VODNEGA IZVLEČKA AJDE NA KALITEV IZBRANIH
INVAZIVNIH TUJERODNIH RASTLIN**

MAGISTRSKO DELO
(Magistrski študij – 2. stopnja)

**Effect of a buckwheat water extract on germination of selected invasive
alien species**

M. SC. THESIS
(Master Study Programmes)

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek Univerzitetnega študija – 2. stopnja Ekologija in biodiverziteta na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, Oddelku za biologijo, Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin.

Študijska komisija magistrskega programa Ekologija in biodiverziteta je dne 21. 2. 2014 odobrila naslov magistrskega dela in za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Simono Strgulc Krajšek, za recenzenta pa prof. dr. Ivana Krefta.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Matevž LIKAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Simona STRGULC KRAJŠEK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Ivan KREFT

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačano, 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.

Filip Küzmič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	GDK
KG	Alelopatija/ <i>Fagopyrum</i> /kalitveni test/ <i>Conyza canadensis</i> / <i>Erigeron annuus</i> / <i>Solidago canadensis</i> / <i>Solidago gigantea</i> / <i>Lactuca sativa</i> /log-rank test
AV	KÜZMIČ, Filip, diplomirani biolog (UN)
SA	STRGULC KRAJŠEK, Simona (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij ekologije in biodiverzitete
LI	2015
IN	VPLIV VODNEGA IZVLEČKA AJDE NA KALITEV IZBRANIH INVAZIVNIH TUJERODNIH RASTLIN
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	VIII, 55 str., 6 pregl., 12 sl., 93 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	V naši raziskavi smo poskusili združiti dva fenomena – močno alelopatsko delovanje dveh vrst ajd in močno invazivnost nekaterih invazivnih tujerodnih vrst v Sloveniji. Alelopatski vpliv dveh koncentracij izvlečkov (2,5 in 5 %) dveh vrst ajd (navadna in tatarska) na invazivne vrste kanadska hudoletnica, enoletna suholetnica ter kanadska in orjaška zlata rozga smo ocenjevali z več znaki, predvsem s kalitvenim testom, kjer smo opazovali kalitev in razpiranje kličnih listov, ter dolžino korenin dva tedna starih kalic. Tretmaje smo primerjali s kontrolo z destilirano vodo, opravili pa smo tudi pozitivno kontrolo z navadno solato. Za obdelavo rezultatov kalitvenega testa smo uporabili redko uporabljeno statistično metodo v te vrste raziskavah "log-rank test", ki pa predstavlja močan potencial na tem področju. Preživetvene krivulje, s katerimi so predstavljeni ti rezultati, so pokazale močnejši negativen vpliv 5 % izvlečkov obeh ajd v primerjavi z 2,5 % za vse testirane vrste, vendar v primerjavi s kontrolo z vodo tretiranje z izvlečki ni bilo vedno statistično značilno različno. Nasprotno so se dolžine korenin pri vseh vrstah in pri vseh tretmajih znižale. Obe vrsti ajde tako zaviralno vplivata na zgodnji razvoj kalic in zato predstavljata potencial za uporabo pri zatiranju invazivnih tujerodnih vrst.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	FDC
CX	Allelopathy/ <i>Fagopyrum</i> /germination test/ <i>Conyza canadensis</i> / <i>Erigeron annuus</i> / <i>Solidago canadensis</i> / <i>Solidago gigantea</i> / <i>Lactuca sativa</i> /log-rank test
AU	KÜZMIČ, Filip
AA	STRGULC KRAJŠEK Simona (supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Ecology and biodiversity studies
PY	2015
TI	EFFECT OF A BUCKWHEAT WATER EXTRACT ON GERMINATION OF SELECTED INVASIVE ALIEN SPECIES
DT	M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO	VIII, 55 p., 6 tab., 12 fig., 93 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	<p>In our research we tried to combine two phenomena – strong allelopathic activity of two buckwheat species and high invasiveness of a few selected invasive alien species in Slovenia. Allelopathic effect of two extract concentrations (2.5 and 5 %) from two buckwheat species (common and Tartary) on invasive species Canadian horseweed, annual fleabane, Canadian and giant goldenrod has been assessed with several parameters, in most part with a germination test, where we observed germination and opening up of cotyledons, and root length of two weeks old seedlings. We compared treatments with control on distilled water and we also performed the test with a positive control with common lettuce. To analyse the results we used a rarely used statistical method in these type of research log-rank test, which does represent a great potential in this field. Survival curves, which represent the obtained results, showed stronger negative effect of 5 % extract in comparison to the one of 2.5 % for all tested species, although in comparison to the negative control, treatments with extracts have not been always statistically significantly different. To the contrary root lengths of all the species were shortened when being treated. Both buckwheat species do restrain the early development of seedlings and therefore represent a potential for use in invasive alien species management.</p>

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ALELOPATIJA	3
2.1.2 <i>Ajda (Fagopyrum spp.)</i>	4
2.1.2.1 Alelopatija in ajda	5
2.2 INVAZIVNOST	6
2.2.1 Izbrane invazivne vrste	7
2.2.1.1 <i>Conyza canadensis</i> - kanadska hudoletnica	8
2.2.1.2 <i>Erigeron annuus</i> - enoletna suholetnica	8
2.2.1.3 <i>Solidago canadensis</i> - kanadska zlata rozga in <i>Solidago gigantea</i> - orjaška zlata rozga	9
2.3 UPRAVLJANJE Z INVAZIVNIMI TUJERODNIMI RASTLINAMI S POMOČJO ALELOPATSKIH SNOVI	9
2.3.1 Kalitev	10
2.3.2 Log-rank test	10
2.4 HIPOTEZE	11
3 MATERIAL IN METODE	12
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	12
3.2 KALITVENI TEST	13
3.3 DOLŽINA KORENIN	14
3.4 VSEBNOST MALONDIALDEHIDA (MDA)	14
4 REZULTATI	15
4.1 KALITVENI TEST	15
4.1.1 <i>Lactuca sativa</i>	16
4.1.2 <i>Conyza canadensis</i>	18
4.1.3 <i>Erigeron annuus</i>	20
4.1.4 <i>Solidago canadensis</i>	22
4.1.5 <i>Solidago gigantea</i>	24
4.1.6 Primerjava testiranih vrst	25
4.1.7 Nepredvideve težave pri poskusu	28
4.2 DOLŽINE KORENIN	28
4.2.1 <i>Conyza canadensis</i>	29
4.2.2 <i>Erigeron annuus</i>	31
4.2.3 <i>Solidago canadensis</i>	33
4.2.4 <i>Solidago gigantea</i>	35
4.3 MASA KALIC VRSTE LACTUCA SATIVA	37
4.4 VSEBNOST MALONDIALDEHIDA (MDA)	38
5 RAZPRAVA	40
5.1 KALITVENI TEST	40

5.2	RAZVOJ KORENIN	42
5.3	VSEBNOST MALONDIALDEHIDA (MDA).....	44
5.4	PRESOJA HIPOTEZ.....	45
5.5	PREDLOGI IZBOLJŠAV	46
6	SKLEPI	47
7	VIRI	48

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Končni odstotki skaljenih semen	15
Pregl. 2: Končni odstotki kalic z razprtimi ključnimi listi	15
Pregl. 3: Statistično značilna različnost med posameznimi tretmaji za vrsto <i>Conyza canadensis</i>	30
Pregl. 4: Statistično značilna različnost med posameznimi tretmaji za vrsto <i>Erigeron annuus</i>	32
Pregl. 5: Statistično značilna različnost med posameznimi tretmaji za vrsto <i>Solidago canadensis</i>	34
Pregl. 6: Statistično značilna različnost med posameznimi tretmaji za vrsto <i>Solidago gigantea</i>	36

KAZALO SLIK

Sl. 1: Rezultati kalitvenega testa z navadno solato (<i>Lactuca sativa</i>).	16
Sl. 2: Rezultati kalitvenega testa s kanadsko suholetnico (<i>Conyza canadensis</i>).	18
Sl. 3: Rezultati kalitvenega testa z enoletno suholetnico (<i>Erigeron annuus</i>).	20
Sl. 4: Rezultati kalitvenega testa s kanadsko zlato rozgo (<i>Solidago canadensis</i>).	22
Sl. 5: Rezultati kalitvenega testa z orjaško zlato rozgo (<i>Solidago gigantea</i>).	24
Sl. 6: Kalice tarčnih invazivnih tujerodnih vrst ob koncu poskusa	27
Sl. 7: Dolžine korenin kalic vrste <i>Conyza canadensis</i> v odvisnosti od tretmaja.	29
Sl. 8: Dolžine korenin kalic vrste <i>Erigeron annuus</i> v odvisnosti od tretmaja.	31
Sl. 9: Dolžine korenin kalic vrste <i>Solidago canadensis</i> v odvisnosti od tretmaja.	33
Sl. 10: Dolžine korenin kalic vrste <i>Solidago gigantea</i> v odvisnosti od tretmaja.	35
Sl. 11: Absolutne in relativne sveže mase kalic vrste <i>Lactuca sativa</i>	37
Sl. 12: Vsebnost malondialdehida (MDA) v kalicah vrste <i>Lactuca sativa</i>	38

1 UVOD

V zadnjih desetletjih je prišlo do razmaha raziskav o pojavljanju, širjenju in ekologiji tujerodnih invazivnih rastlin ter posledično o metodah preprečevanja naselitve, širjenja ter kontrole in izkoreninjenja že vzpostavljenih populacij. Te informacije z nekoliko zamude dosegajo tudi širšo javnost, predvsem v primerih invazivnih rastlin, ki poleg negativnih učinkov na okolje lahko povzročajo tudi ekonomsko škodo (v kmetijstvu, gradbeništvu) ali škodujejo zdravju (alergije, vnetja).

Podobno v zadnjih desetletjih doživlja močan porast priljubljenost sonaravnih načinov kmetovanja in gospodarjenja z okoljem, ki med drugim narekujejo zmanjšano rabo sintetičnih pesticidov ali celo njihovo opustitev. Ker pleveli in invazivne rastlinske vrste še vedno povzročajo gospodarsko škodo, se je izkazalo, da je treba iskati alternativne načine njihovega zatiranja oz. uničevanja. Pokazalo se je, da nekatere rastline močno (negativno) vplivajo na rast drugih rastlin. Ene takih so tudi vrste iz rodu *Fagopyrum* (Xuan in Tsuzuki, 2004), med katerimi sta najbolj poznani in raziskovani *F. esculentum* ali navadna ajda in *F. tataricum* ali tatarska ajda in sta tako morebitna kandidata za uporabo kot naravni herbicid. Obe vrsti sta že dolgo v uporabi tako za prehrano ljudi kot v zdravilne namene, obenem pa so kmetje že pred stoletji ugotovili zaviralni učinek ajd na rast plevelov. Vpliv nekega organizma na rast in razvoj nekega drugega organizma (*sensu lato*) imenujemo alelopatija (Rice, 1984, cit. po Iderjit in Nilsen, 2003).

V ajdi so bili odkriti mnogi sekundarni metaboliti, ki se jim pripisuje tako zdravilne kot tudi/ali alelopatične učinke (Li in Zhang, 2001; Wijngaard in Arendt, 2006). Nas je zanimal predvsem učinek vodnega izvlečka omenjenih vrst ajde na kalitev semen in zgodnji razvoj kalic izbranih invazivnih vrst rastlin, med katerimi se mnoge obnašajo podobno kot pleveli - so pionirske rastline, ki med sekundarno sukcesijo med prvimi naselijo motena območja, in nato zaradi gostih sestojev onemogočajo postopno naselitev domorodnih rastlinskih vrst. Zaradi različnih vzrokov, kot so opuščanje kmetijskih površin, gradnja cest in druge infrastrukture, nedokončanje gradbenih načrtov zaradi finančne krize itn. je motenih rastišč, primernih za sekundarno sukcesijo, veliko in jih invazivke z dobrimi strategijami za razširjanje hitro naselijo (Lonsdale, 1999). Kot tujerodne vrste, ki imajo ustrezne lastnosti, da postanejo invazivne, se na takih mestih še dodatno razvijajo in evolucijsko spreminjajo ter lahko začnejo prodirati tudi v naravna rastišča domorodnih vrst, kar takim ekosistemom povzroči veliko škode. Iz več razlogov je zato iskanje novih metod za nadzor in zatiranje invazivnih vrst rastlin pozitivno in mora biti spodbujano, skupaj z osveščanjem javnosti o tej problematiki (Holt, 2009)

Glavni namen te naloge je preveriti, ali ima ajda sposobnost zavirati kalitev in rast izbranih invazivnih rastlin, da bi se jo v tem primeru lahko v prihodnosti uporabljalo za njihovo zatiranje.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ALELOPATIJA

Alelopatijo lahko definiramo kot vpliv neke rastline na rast in razporejenost drugih rastlin s sproščanjem kemičnih spojin v okolje (Rice, 1984, cit. po Iderjit in Nilsen, 2003). Taka široka definicija zajema tako negativne kot pozitivne vplive med rastlinami, se pa izraz v večini primerov uporablja predvsem za negativne vplive.

Alelopatijo v zadnjih desetletjih prepoznavajo kot eno od alternativ kemičnemu zatiranju plevelov (Tesio in Ferrero, 2010). Za ta namen so nedvomno uporabne predvsem tujerodne rastline, ki se s tarčnimi rastlinami, proti katerim je usmerjeno delovanje alelopatskih snovi, niso skupaj evolucijsko razvijale (koevoluirale) in slednje posledično nimajo razvitih obrambnih mehanizmov (Callaway in Ashehoug, 2000; Iderjit et al., 2011). Posebej primerne so t. i. pokrovne poljščine (ang. "cover crops"), katerih prvotna funkcija je prekrivanje prsti, ko na zemljišču ni glavnih poljščin. Pokrovne poljščine morajo biti izbrane glede na glavno poljščino in poleg zatiranja plevelov varujejo prst pred erozijo, ohranjajo vlažnost, povečujejo vsebnosti mineralov (oz. vsaj preprečujejo spiranja teh), produkcijo biomase in posledično količino organske komponente tal ter so lahko vir krme za živali (Caamal-Maldonado et al., 2001; Norsworthy, 2004; Tesio in Ferrero, 2010; Brust et al., 2014). Kot eno dobrih alternativ za že uveljavljene pokrovne poljščine v osrednji Evropi se je izkazala tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum*), ki kot manj zahtevna poljščina zaradi hitre rasti in kopičenja velike količine suhe mase (poleg alelopatskih spojin) relativno močno zavira rast plevelov (Brust et al., 2014)

Alelopatske snovi, ki jih določena rastlina proizvaja, nimajo izključno funkcije neposrednega zaviranja rasti organizmov v bližini, temveč lahko vplivajo tudi na obrambo rastline, vezavo mineralnih hranil in na sestavo organizmov v prsti (Iderjit et al., 2011). V okolju se te snovi pojavijo zaradi spiranja iz listov, izločanja iz korenin, hlapenja (volatilizacije), razgradnje opada donorske rastline itd. (Reigosa et al., 1999; Khanh, 2005). Snovi, ki se jim pripisuje alelopatsko delovanje, spadajo v različne skupine glede na kemično zgradbo: fenoli (predvsem fenolne kisline), flavonoidi (rutin, kvercetin), terpeni (nekateri monoterpeni), dušične spojine (alkaloidi, glukozinolati), kinoni (juglon) itd. (Reigosa et al., 1999; Weir et al., 2004; Khanh et al., 2005; Rac, 2013). Zaradi kemične raznolikosti teh snovi te delujejo na različne procese v rastlinah, recimo na fotosintezo, dihanje, vodno in hormonsko ravnotežje (Soltys et al., 2013).

Ena najbolj dokumentiranih alelopatskih vrst rastlin je črni oreh (*Juglans nigra*), pod katerim netopna snov juglon ostaja v prsti (se ne spira) in se kopiči ter deluje močno zaviralno na rast in razvoj mnogih vrst rastlin (Tesio in Ferrero, 2010). Fiziološki stresni odgovori zaradi izpostavljenosti alelopatskim snovem ali drugim stresnim dejavnikom so si lahko precej podobni (Lovett 1989, cit. po Tesio in Ferrero 2010).

Zanimivo tezo je zapisal Harper (1994, cit. po Inderjit in Nilsen, 2003), ki se glasi: "Almost all species can, by appropriate digestion, extraction and concentration be persuaded to yield a product that is toxic to one species or another." Torej, iz skoraj vseh vrst je s primerno obdelavo, ekstrakcijo in koncentracijo možno pridobiti snov, ki bo toksična za neko drugo vrsto. Pa vendar nekatere rastline izkazujejo močnejše alelopatsko delovanje. Ene takih so tudi vrste rodu *Fagopyrum*.

2.1.2 Ajda (*Fagopyrum* spp.)

Divje rastočih vrst v rodu *Fagopyrum* je okrog 16 (Ohnishi, 2004), vendar se v prehrani uporablja in v ta namen tudi prideluje le tri - enoletni: navadna ajda (*Fagopyrum esculentum* Moench) in tatarska ajda (*F. tataricum* (L.) Gaertner) ter trajna ajda vrste *F. cymosum* (Trev.) Meissn. (Stojilkovski et al., 2013). Za center diverzitete vrst rodu *Fagopyrum* velja južna Kitajska, kjer je več vrst tudi endemnih, divje rastoče ajde pa so razširjene tudi v sosednjih državah vse do Pakistana (Ohnishi, 1998). Največ navadne ajde, *F. esculentum*, pridelajo v Rusiji in na Kitajskem, sledijo jima Ukrajina, Francija in ZDA (FAO, 2015).

Semena ajd se uporabljajo na podobne načine kot semena žit, vendar pa je prehranska vrednost precej drugačna: škrob iz ajdinih semen je slabše in počasneje prebavljiv, izmed aminokislin, iz katerih so zgrajene beljakovine v semenih, je 9 esencialnih, vsebnosti mineralov in nekaterih vitaminov so višje kot v semenih ostalih žit. *F. tataricum* v primerjavi s *F. esculentum* vsebuje več mineralov in vitaminov kot tudi flavonoidov (rutin, kvercetin) (Wijngaard in Arendt, 2006). Obenem pa ajda ne vsebuje glutena, zaradi česar je ena boljših alternativ za bolnike s celiakijo (Li in Zhang, 2001; Wijngaard in Arendt, 2006). Za živila iz ajde niso primerna le semena, ampak tudi zeleni deli rastlin - listi in mladi poganjki kot dodatek solati ali tudi toplotno obdelani, podobno kot špinača. Zmleti zeleni deli rastline se lahko dodajajo živilom za obarvanje, iz ajdine moke izdelujejo rezance, kruh ... (za več glej Kreft et al., 2003; Kreft et al., 2006). Poleg tega (in tudi zaradi prej omenjenih lastnosti) se semena, moka in zeleni deli rastline uporabljajo tudi v zdravilne namene za zniževanje nivoja holesterola v krvi, zdravljenje in preprečevanje drugih srčno žilnih obolenj, kot je visok krvni tlak, arterioskleroza in vensko popuščanje; povišan vnos antioksidantov, pomoč pri sladkorni bolezni, pa tudi kot protivnetna droga

(Li in Zhang, 2001; Wijngaard in Arendt, 2006; Salvamani et al., 2014). Pri občutljivejših ljudeh lahko uživanje izdelkov iz ajde povzroči alergije (Li in Zhang, 2001; Wijngaard in Arendt, 2006) in tudi fototoksične učinke, ko izpostavljanje soncu po uživanju večjih količin izdelkov iz ajde povzroči nastanek opeklinam podobnih simptomov na koži (Wijngaard in Arendt, 2006; Stojilkovski et al., 2013). Slednjo lastnost pripisujejo kinonom fagopirinom, ki so po zgradbi in zato delovanju podobni hipericinu v šentjanževki, *Hypericum perforatum*. Predvsem svetlopoltim ljudem zato odsvetujejo uživanje večjih količin zelenih delov ajde in tudi kalčkov, ki vsebujejo mnogo več fagopirinov kot semena (Kreft et al., 2013; Stojilkovski et al., 2013).

2.1.2.1 Alelopatija in ajda

Ajda ima znano alelopatsko delovanje (Xuan in Tsuzuki, 2004) in v ta namen jo kot poljščino za zatiranje plevelov kmetje na Japonskem že tradicionalno gojijo (Khanh et al., 2005). Poleg tega je ajda uporabna tudi za t. i. zeleno gnojenje zaradi visokih vsebnosti dušika in tudi fosforja. Slednjega z izločanjem šibkih kislin v tleh raztaplja, torej mobilizira, in naredi biološko dostopnega (Xuan in Tsuzuki, 2004).

Kot snovi z alelopatskim delovanjem (uporabljene posamično) so se izkazali nekateri flavonoidi (rutin, kvercetin, +katehin, -epikatehin), fenolne kisline (klorogena, kafeinska, ferulična, galična), alkaloidi (fagomin, 4-piperidon) (Iqbal et al., 2002; Iqbal et al., 2003; Golisz et al., 2007a) in še razne druge, vendar pa se po moči delovanja razlikujejo glede na specifično in totalno učinkovitost ter seveda vrsto ajde, del rastline, ki je uporabljen, vrsto tarčne rastline in še nekatere druge dejavnike. Največja pozornost je usmerjena v rutin, ki se mu poleg alelopatskih učinkov pripisuje tudi veliko uporabnost v zdravstvene namene (Hosseinzadeh in Nassiri-Asl, 2014; Salvamani et al., 2014).

V poskusih ugotavljanja intenzivnosti alelopatskega učinka posameznih snovi na zaviranje kalitve in/ali rasti rastlin je pri interpretaciji rezultatov pomembno ločiti med specifično in totalno aktivnostjo:

1. prva (specifična aktivnost) pomeni aktivnost na enoto teže preiskovane snovi, pri čemer je zelo uporabna ocena "EC50" (ang. "*effective concentration*"), ki pomeni koncentracijo snovi, pri kateri opazovani znak doseže polovično vrednost glede na kontrolo.

2. Druga ocena (totalna aktivnost) pa pomeni aktivnost preiskovane snovi na enoto mase rastlinskega materiala, ki to snov vsebuje. Totalna aktivnost torej združuje dve lastnosti snovi: specifično aktivnost in koncentracijo oz. vsebnost v rastlini (Hiradate, 2004).

Golisz et al. (2007a) so ugotovili, da ima med osmimi preiskovanimi alelopatskimi snovmi najmočnejšo specifično aktivnost galična kislina, z vrednostjo EC50 38 mg/kg, medtem ko je ta vrednost za rutin 88 mg/kg. Vsebnosti rutina in galične kisline se sicer spreminjajo skozi sezono (Metzger et al., 2010), vendar je rutin med vsemi preiskovanimi alelopatskimi snovmi prisoten v največjih koncentracijah, ne glede na preiskovani rastlinski organ, zato mu lahko pripišemo najvišjo celokupno (totalno) učinkovitost in torej verjetno največji prispevek k alelopatskemu delovanju rastlinskega materiala ajde.

2.2 INVAZIVNOST

Invazivna tujerodna vrsta ali invazivka je tujerodna vrsta, ki se je ustalila izven območja naravne razširjenosti ter povzroča spremembe v okolju in ogroža zdravje ljudi, gospodarstvo in/ali domorodno biotsko raznovrstnost (definicija Svetovne zveze za varstvo narave - IUCN, cit. po Kus Veenvliet in Veenvliet, 2009).

Hipotez, ki razlagajo vzroke uspešnosti tujerodnih vrst, ki postanejo invazivne, je več (glej Uvod v Lamarque et al., 2011; Hierro et al., 2005). Ena čedalje bolj dokumentiranih in zato širše sprejetih teorij je t. i. hipoteza novih orožij (ang. "*novel weapons hypothesis*") (Callaway in Aschehoug, 2000; Lamarque et al., 2011), ki pravi, da tujerodne rastline predstavljajo morebitno visoko tekmovalnost zaradi svojih lastnosti, proti katerim domorodne vrste na nimajo obrambe. Kot te lastnosti so v hipotezi mišljene alelopatske snovi (Hierro, 2005) in nekatere raziskave kažejo da lahko nekatere invazivke na novih območjih razvijejo celo močnejše alelopatsko delovanje kot v naravnih območjih razširjenosti (Yuang, 2013).

Dovzetnost (eko)sistema za invazijo (ang. "*invasibility*") je po Lonsdale (1999) odvisna tako od prisotnosti (oz. pritiska) razmnoževalnih struktur rastlin kot možnosti teh rastlin za preživetje, na kar pa vpliva več dejavnikov. Katera okolja so bolj podvržena invazivnim tujerodnim vrstam od drugih, je zelo težko določiti zaradi mnogih spremenljivk in težav pri pridobivanju podatkov (recimo število vseh tujerodnih vrst na nekem območju). Pa vendar se je ob analizi pokazalo, da se v nekaterih okoljih, recimo kmetijska in urbana območja v zmernem pasu, pojavlja večje število tujerodnih rastlin, kot v drugih (Lonsdale, 1999). V Sloveniji se največ invazivk pojavlja na ruderalnih rastiščih (Jogan, 2012: 171), kamor lahko prištevamo tudi njivske površine.

Opuščena kmetijska zemljišča so posebej dovzetna za naselitev tujerodnih invazivnih rastlinskih vrst (Bohren, 2011). Zaželjena je seveda naselitev in rast avtohtonih (pionirskih, ruderalnih) vrst rastlin, čeprav obravnavanih kot "plevelne". Zasejevanje opuščenih površin s semeni avtohtonih rastlinskih vrst lahko deluje zaviralno na rast invazivnih vrst in tudi

spodbuja naselitev avtohtonih (Perry et al., 2009), vendar so taki vplivi zelo specifični glede na vpletene vrste. Zavrta rast določenih vrst rastlin ni nujno le posledica delovanja kemičnih snovi, temveč se večja tekmovalnost izraža tudi kot uspešnost pri izkoriščanju virov, kot so mineralne snovi, voda in svetloba. Hitra začetna rast lahko tako pomeni zasenčenje drugih vrst in posledično zavrta rast (Perry et al., 2009; Lamarque et al., 2011; Zou, 2014; Brust et al., 2014).

Upravljanje z invazivnimi vrstami lahko razdelimo na tri področja: (i) preprečevanje vzpostavljanja populacij na območjih, kjer vrsta še ni naseljena, (ii) izkoreninjenje rastline z določenega območja (vključno z morebitnimi semeni ali brsti pod zemljo) in (iii) nadzor, ki zmanjšuje oz. zavira razraščanje in razširjanje invazivnih vrst, ne da bi bil končni cilj iztrebljenje (Holt, 2009). V primeru, ko je neka invazivna vrsta v naravi že zelo razširjena in oblikuje večje strnjene sestoje, je popolna odstranitev iz narave praktično nemogoča (v Sloveniji npr. dresniki, žlezava nedotika ob rekah, zlata rozga na Ljubljanskem barju). V takem primeru je nujno spremljanje stanja in omejevanje nadaljnjega širjenja, kar pomeni stalno aktivnost in tudi stalne stroške, vrste pa zaradi semen in/ali brstov v tleh najverjetneje iz narave ne moremo v celoti odstraniti (Jogan et al., 2012: 178; Holt, 2009).

Odstranjevanje invazivnih rastlin je poseg, ki se ga lahko lotimo na več načinov. Katerega bomo izbrali, je odvisno od več dejavnikov, kot so vrsta invazivne rastline, okolje, v katerem raste, velikost njene populacije itd. Prva možnost je fizično odstranjevanje (ročno ali strojno - puljenje, izkopavanje, košnja, prekrivanje; nadzorovan požig), potem kemično (uporaba herbicidov) ali tudi biotično (vnos naravnih škodljivcev) (Holt, 2009; Bačić in Frajman, 2009; Jogan et al., 2012: 178–179). Ne glede na uporabljeno metodo odstranjevanja je treba območje nadzorovati še nekaj rastnih sezon po posegu (Jogan et al., 2012: 179).

2.2.1 Izbrane invazivne vrste

Vse štiri tarčne invazivne tujerodne vrste, ki smo jih izbrali za naš poskus, spadajo v družino košarnic (Asteraceae), poddružino Asteroideae (Nikolić, 2013). Kot je značilno za večino košarnic, se te vrste razširjajo z vetrom, čemur so prilagojene tudi razširjevalne enote. Te niso le plodovi, ki so oreški (pri košarnicah imenovani rožke), ampak pri razširjanju pomembno sodeluje tudi čaša, imenovana kodeljica (papus) (Nikolić, 2013). Naravno območje razširjenosti naših izbranih vrst je Severna Amerika. Zaradi tamkajšnjih podnebnih razmer imajo te rastlinske vrste že v osnovi večji potencial za naturalizacijo in kasneje morebitno invazijo v podnebno podobnih predelih sveta, kot sta Evropa in vzhodna do jugovzhodna Azija (Jogan in Kus Veenvliet, 2012). Med severnoameriškimi invazivnimi vrstami iz družine košarnic je bil ugotovljen splošno razširjen alelopatski

potencial, ki jim skladno s hipotezo novih orožij zelo verjetno pomaga pri invazivnosti (Ni et al., 2012).

2.2.1.1 *Conyza canadensis* - kanadska hudoletnica

V Sloveniji se je pojavila kot plevel sredi 18. stoletja (Scopoli, 1760, cit. po Jogan, 2012), zanešena pa je po vsem svetu (Weaver, 2001). Je zimska/poletna¹ enoletnica, ki se razmnožuje le s semeni. V svetovnem merilu je plevel med mnogimi poljščinami, predvsem na poljih brez oranja oz. s trajnostnim upravljanjem (sadovnjaki, opuščena polja ...), uspeva prav tako na robovih cest, železniških tirov, na motenih naravnih rastiščih (jase in poseke v gozdovih) in v urbanih območjih (Weaver, 2001). Obilica semen, ki jih na večje razdalje raznaša veter bolj učinkovito od mnogih drugih vrst košarnic (Andersen, 1993; Weaver, 2001), in začetek rasti rozete jeseni in s tem visoka tekmovalnost pri rasti spomladi sta pomembna dejavnika uspešnosti te vrste. Vrsta je samoopraševalna, semena ob zrelosti niso dormantna, potrebujejo pa svetlobo, da lahko kalijo. Kemično jo je najbolje zatirati s herbicidi pozno jeseni ali zgodaj spomladi, ko so rozete še majhne, a metabolno aktivne, mehanično pa se z oranjem jeseni ali spomladi uspešno zmanjšuje vzpostavitev sestojev. *C. canadensis* je sicer že pokazala odpornost na določene herbicide (Weaver, 2001). Za njeno zatiranje so že ugotovili tudi alelopatski potencial vrste *Secale cereale* (Weaver, 2001).

2.2.1.2 *Erigeron annuus* - enoletna suholetnica

V Evropi se je ta vrsta razširila v naravo v 2. polovici 18. stoletja, v Sloveniji je bila prvič zabeležena sredi 19. stoletja (Bačič, 2008). Je zimska enoletnica, ki prezimi v obliki rozete in zacveti naslednjo sezono (Stratton, 1992). Zunaj območja naravne razširjenosti uspeva na ruderalnih mestih: ob cestah, v okolici hiš, na gradbiščih, opuščenih kmetijskih površinah, pa tudi na suhih do vlažnih traviščih (Bačič, 2008; Walker et al., 2015). V Sloveniji je v zadnjih letih travišča že marsikje prerasla (Jogan, 2012: 174). *E. annuus* se zakoreninja do 1 m globoko in po košnji ponovno požene, poganjki pa lahko cvetijo že pri 10 cm višine. Semena med rastjo pokošenih rastlin so lažja, slabše in manj enakomerno kaljiva, plodovi pa bolj spremenljivi po velikosti in obliki, kar v končni fazi morda poveča prilagodljivost rastline (Bačič, 2008; Yong et al., 2015).

¹ Zimske enoletnice skalijo jeseni, prezimijo v vegetativni fazi in zacvetijo ter odmrejo spomladi oz. poleti. Poletne enoletnice zaključijo nadzemni življenjski krog v isti sezoni - v toplih mesecih, brez obdobja mirovanja (Gurevitch et al., 2002: 171)

2.2.1.3 *Solidago canadensis* - kanadska zlata rozga in *Solidago gigantea* - orjaška zlata rozga

V Evropi sta bili ti dve vrsti zlate rozge v naravi prvič najdeni v 19. stoletju, v Sloveniji pa orjaška zlata rozga sredi 19. stoletja in kanadska zlata rozga sredi 20. stoletja (Strgulc Krajšek, 2008.). V Severni Ameriki vrsti uspevata na gozdnih robovih, ob cestah in na motenih rastiščih, kamor se hitro razširjata. V Evropi sta kot tujerodni vrsti pogosti na ruderalnih mestih: ob železniških progah in cestah, na opuščeni njivah in drugih površinah, kjer je človek odstranil vegetacijo, pa tudi na gozdnih robovih, na posekah ter na bregovih vodotokov (Strgulc Krajšek, 2008).

Na rastlinah se razvije ogromna količina rožk, ki jih veter lahko raznese precej daleč naokrog (Strgulc Krajšek, 2008). Obe zlati rozgi sta zelnati trajnici. Prezimi korenika, ki služi tudi vegetativnemu razmnoževanju, zaradi katerega vrsti tvorita zelo goste sestoje, ki so trajni, v njih pa ne more uspevati nobena druga rastlinska vrsta (Strgulc Krajšek, 2008). Uporaba socvetij kot okras za rezano cvetje ali izruvanje rastline v času cvetenja še ne preprečita plodenja, saj se hranila iz zelenih delov preusmerjajo v nastanek in zorenje plodov. Ko se te dele zavrže, so semena viabilna in se plodovi lahko razširjajo, zato je za preprečevanje razširjanja ob odstranjevanju zlatih rozg treba nadzemne dele uničiti (Guo et al., 2009). S košnjo dvakrat letno (pred in tik pred cvetenjem) rastline zaradi podzemnih brstov ne uničimo, zmanjšamo pa številčnost poganjkov (Bačič in Frajman, 2009: 39).

2.3 UPRAVLJANJE Z INVAZIVNIMI TUJERODNIMI RASTLINAMI S POMOČJO ALELOPATSKIH SNOVI

Potencial zatiranja invazivnih vrst rastlin s pomočjo alelopatskih snovi preizkušajo na različnih tako tarčnih kot donorskih rastlinah, vendar v nobeno od teh raziskav, vsaj po našem vedenju, niso bile vključene naše izbrane tarčne rastlinske vrste. Po drugi strani so veliko bolj pogoste raziskave, ki se ukvarjajo z ravno obratno smerjo alelopatskega delovanja, to je vpliv alelopatskega delovanja invazivnih rastlin na domorodne vrste (Abhilasha et al., 2008). Namen teh raziskav je potrditi hipotezo novih orožij, kot možen prispevek k lastnostim invazivnih vrst, s katerimi te tako uspešno osvajajo nova območja.

Zaviranje kalitve in zgodnjega razvoja kalic lahko predstavlja močno orodje nadzora populacij invazivnih tujerodnih rastlin, predvsem tistih vrst, ki se razširjajo izključno (ali v večji meri) s semeni.

2.3.1 Kalitev

Pogledov na to, kaj kalitev sploh je, je več, odvisno tako od področja znanosti oziroma vrste stroke kot od posameznega avtorja definicij (glej Nonogaki et al., 2007: 264). "Kalitev se začne s privzemom vode v mirujoče suho seme in se zaključi s prodrtnjem radikule skozi tkiva, ki obkrožajo zarodek." (Bewley in Black, 1994, cit. po Debeaujon et al., 2007: 29). Da do tega procesa sploh lahko pride, mora seme prekiniti dormanco, ki pa ni prisotna pri semenih vseh vrst.

Prvi pogoj za začetek kalitve je torej privzem vode (imbibicija). Do tega pride zaradi gradnikov semena, ki po povsem fizikalnih načelih zaradi negativnega vodnega potenciala matriksa vežejo vodo, zato pride do privzema vode tako pri živih kot neživih semenih (Salisbury in Ross, 1992: 61–63; Bewley, 1997). V živih semenih se kmalu, že nekaj minut po ponovni hidraciji, močno poveča stopnja metabolizma in porabe kisika. V naslednji, 2. fazi kalitve se tako privzem vode kot stopnja metabolizma ne povečujeta veliko, saj se do ravnotežne stopnje hidrirata tako simplast kot apoplast, difuzija kisika pa je zaradi omejitev teste in morda osemenja počasna oz. določena z zmožnostjo difuzije in ne razpoložljivostjo substrata (Bewley in Black, 1985: 136–137). Potekajo pa v tej fazi razvoj mitohondrijev, razgradnja založnih snovi, sinteza potrebnih encimov itd. Sčasoma tako začne rasti tudi sam kalček, katerega radikula prodre skozi zmehčan morebiten endosperm in testo, čemur simultano sledi ponovni hiter privzem vode in močan dvig oksidativnega metabolizma (Bewley in Black, 1985: 136–137; Bewley, 1997). S tem se po prej podani definiciji konča kalitev (*sensu stricto*) in prične rast kalčka. Rast kalčka do te faze se ponavadi ne dogaja na račun delitve celic temveč le privzema vode. Rast na oba načina se prične šele po kalitvi *sensu stricto* (Bewley, 1997).

V raziskavah vpliva različnih okoljskih dejavnikov na kalitev semen učinke ocenjujejo z različnimi znaki, med katerimi sta najpogostejša hitrost kalitve in končni odstotek kalitve (Chiapusio et al., 1997). Alelopatske snovi lahko preko vplivanja na dihanje in vodno ravnotežje spreminjajo potek kalitve (Soltys et al., 2013).

2.3.2 Log-rank test

Redko uporabljen, a s potencialom za raziskave kalitev, je log-rank test, ki med sabo primerja krivulje, ki jih dajo rezultati v odvisnosti od časa. Log-rank test je najpogostejši statistični test, ki primerja krivulje, kjer podatki predstavljajo t. i. čas do dogodka (ang. "time-to-event") (Kleinbaum, 2005; Hopkins, 2014). V nekem določenem obdobju trajanja poskusa se za vsak osebek posebej zabeleži čas, ko opazimo spremembo, ki nas zanima. Pri zbiranju tega tipa podatkov ni nujno, da se določen znak zabeleži za vsak posamezen

osebek, saj je (i) obdobje spremljanja dogajanja omejeno in (ii) ker lahko določeni osebki izpadejo iz raziskave pred njenim končanjem (pri kliničnih testiranjih ne sledijo protokolom, umrejo, odstopijo od raziskave ipd.). Ravno zaradi tega so ti tipi podatkov (lahko) t. i. desno cenzurirani in zahtevajo posebno statistično obdelavo (Kleinbaum, 2005; McNair, 2012; Hopkins, 2014). Analiza takega tipa podatkov je daleč najbolj pogosta v raziskavah na področju medicine, kjer je pomembno določiti čas do okužbe, čas do smrti ipd., ko se recimo primerja nova zdravila s starimi ali uporabo nekega zdravila v primerjavi s placebom (Hopkins, 2014). Podoben tip podatkov je mogoče spremljati tudi pri nekaterih ekoloških raziskavah, recimo pri oceni vplivov toksične hrane na preživetje živali (da Silva et al., 2010), oceni dovzetnosti poljščin za škodljivce (Navia, 2014) ter pri testih kaljivosti (McNair, 2012), kar smo storili tudi mi.

2.4 HIPOTEZE

Ker ob pregledu literature nismo zasledili podatkov o vplivu ajde na kalitev in/ali rast invazivnih rastlin in ker glede na podatke iz literature obstaja velika verjetnost, da imata izbrani vrsti ajde to sposobnost, smo želeli testirati naslednji hipotezi:

1. Navadna in tatarska ajda imata negativni alelopatski učinek na kalitev in zgodnji razvoj izbranih invazivnih tujerodnih rastlinskih vrst.
2. Tatarska ajda ima močnejše negativno alelopatsko delovanje v primerjavi z navadno ajdo.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Za potrebe te naloge smo nabrali rastlinski material invazivnih tujerodnih rastlinskih vrst: *Conyza canadensis*, *Erigeron annuus*, *Solidago canadensis* in *S. gigantea*. Nabrali smo zeli v plodečem stanju, od vsake vrste pa tudi zeli skupaj s podzemnimi deli kot dokazni herbarijski material, ki je shranjen v herbariju LJU Univerze v Ljubljani. Material smo nabrali 7. 11. 2012 v Ljubljani, v Tomačevem, Pot k Savi, na ruderalnem zemljišču na desnem bregu reke Save, vzhodno od Štajerske ceste na nadmorski višini 300 m n. m.

Material smo najprej posušili na sobni temperaturi in ga zatem shranili v hladnilniku pri 4 °C (s tem smo semena tudi stratificirali, da smo prekinili morebitno dormanco). S pomočjo stereolupe smo izbrali večje število polnih, lepo razvitih rožk testnih invazivnih tujerodnih vrst. Pri tem smo pazili, da smo izločili že na videz prazne ("jalove") plodove.

Seme solate za pozitivno kontrolo smo kupili. Preizkusili smo semena več kupljenih sort solate (*Lactuca sativa*) tako, da smo jih nakalili na z vodo omočenem filtrirnem papirju in preverili njihovo kaljivost. Izbrali smo sorto 'Bionda ricciolina o di Trieste' podjetja Agrina, pakirano v sezoni 2014/2015, ki je najboljše kalila.

Zeli navadne (*Fagopyrum esculentum*) in tatarske (*F. tataricum*) ajde so bile že predhodno nabrane in posušene septembra 2013 (tik pred plodenjem), prva v Tacnu pri Ljubljani in druga v Dolenjem Vrhpolju pri Rangusovem mlinu. Material je bil sušen in shranjen na sobni temperaturi. Uporabili smo le liste z listnimi peclji, brez stebel in cvetov, saj so listi poleg cvetov najbolj bogati z rutinom (Kalinova et al., 2006) in predstavljajo tudi večjo biomaso v primerjavi s cvetovi.

Liste obeh vrst ajde smo zmleli v mlinčku KIKA werke M20. V napol napolnjenem mlinčku smo material mleli 4-krat po 10 sekund in ga shranili v plastične epruvete. Na koncu dobljen material je bil zelo droben, a ne prašnat (največji delci veliki 2 mm). Ponovno smo ga do uporabe shranili na sobni temperaturi.

Zmlet material vsake od vrst ajde posebej smo zamešali v destilirano vodo, v razmerju 10 g zmletih listov / 200 ml destilirane vode. Zmes smo dali na stresalnik Gerhardt in pustili stresati 3 ure pri 150 obratih. Po koncu stresanja smo zmes dvakrat prefiltrirali skozi grob Whatman 520 A filter papir z nučiranjem. Dobljena filtrata sta predstavljala približno 5 % založna izvlečka, ki smo ju do uporabe zamrznili na -20 °C.

3.2 KALITVENI TEST

Izvečka navadne in tatarske ajde smo v mlačni vodni kopeli odtalili in iz dela 5 % izvlečkov z dodatkom enakega volumna destilirane vode pripravili še 2,5 % izvlečka navadne in tatarske ajde.

Filtrirni papir smo izrezali v obliki krogov ustreznih dimenzij za petrijevke premera 9 cm in ga suho avtoklavirali, zavitega v aluminijasto folijo.

Rožke invazivnih tujerodnih vrst smo na dan poskusa stresli v čajne filter vrečke, jih v teh vrečkah z namakanjem površinsko sterilizirali 15 minut v 3-krat redčeni 67 g/L raztopini natrijevega hipoklorita (NaClO) ter jih potem 3-krat po 5 minut namakali v destilirani vodi, da smo sprali ostanke NaClO. Med sterilizacijo in spiranjem smo rožke občasno premešali s stekleno palčko, da bi bile čimbolj enakomerno izpostavljene tekočini.

V vsako sterilno petrijevko smo položili en krožni filtrirni papir in ga omočili s 3 ml destilirane vode oz. izvlečka ajde. Aseptično (ob ognju in z razkuženim priborom) smo s pinceto nanj razporedili 25 rožk (5 vrstic po 5 rožk v razmaku približno 1 cm) in petrijevko pokrili s pokrovom. Za vsak tip tretmaja smo pripravili 4 ponovitve, tako da je bilo število rožk na posamezen tretma 100. Petrijevke smo predhodno tudi označili.

Semena smo inkubirali v gojitvenih komorah pri 18–21 °C, 60 % vlažnosti in 16-urni svetlobi. Vsak dan smo petrijevke pregledali pod stereolupo in zabeležili število skaljenih semen (za znak smo upoštevali jasno vidno radikulo izven teste) in število kalic s povsem (pribl. 180°) razprtimi kličnimi listi. Slednji znak smo spremenili pri kalitvi navadne solate, ko je bilo dovolj razmikanje kličnih listov med sabo in ne razprtje do 180°, saj so bili po našem opažanju dolgo ujeti v testi in se dolgo niso mogli povsem razpreti. Ob štetju, ki smo ga opravljali med 9. in 11. uro zjutraj, smo občasno v petrijevko dodali nekaj destilirane vode, da se papir in semena niso izsušili. Propadlih rastlin med poskusom nismo posebej označili/beležili.

Poskus smo pustili teči 12 dni. Na koncu smo kalice fotografirali ter jih zavrgli, razen v primeru solate, kjer smo kalice shranili za analizo znakov stresa. O tem več v poglavju 3.4.

Kalitvene teste smo opravili v treh sklopih: 24. 3. 2014: *Solidago canadensis* in *Solidago gigantea*, 13. 10. 2014: *Erigeron annuus* in *Lactuca sativa* ter 1. 12. 2014: *Conyza canadensis*.

Podatke o dinamiki kalitve in razpiranja kličnih listov smo statistično obdelali v programu GraphPad Prism 5 z metodo preživetvenega testa. Statistično značilno različnost smo

ovrednotili z Log-rank testom za trend preživetvene krivulje za vsak tretma posebej v primerjavi s kontrolo.

3.3 DOLŽINA KORENIN

Ker smo med poskusom opazili, da so veliko bolj opazne razlike med tretmaji v dolžini in videzu korenin kot le v hitrosti kalitve, smo ob koncu kalitvenega testa (na 12. dan) kalice fotografirali v programu AxioVision 4.8. Na fotografijah smo izmerili dolžine najdaljših korenin vseh kalic testnih invazivnih tujerodnih vrst, razen pri solati, kjer so bile korenine predolge in preveč prepletene.

Rezultate smo statistično obdelali v programu GraphPad Prism 5 z metodo ANOVA. Za statistično obdelavo smo za vsako rastlinsko vrsto meritve v posameznih petrijevkah združili po tretmajih.

3.4 VSEBNOST MALONDIALDEHIDA (MDA)

Kalice solate smo zaradi relativno velike biomase v primerjavi z ostalimi vrstami po koncu kalitvenega testa, torej 12. dan, pripravili za nadaljno biokemijsko analizo, s katero smo ocenili stopnjo stresa. Kalice smo osušili na filtrirnem papirju, jih po petrijevkah stehali in v Eppendorfovih epruveh zamrznili v tekočem dušiku ter jih shranili v zamrzovalniku pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. V terilnici smo 0,1 g sveže mase zamrznjenega vzorca strli v 1,5 ml raztopine 0,5 % 2-tiobarbiturične kisline (TBA – $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$) in 20 % triklorocentne kisline (TCA – $\text{C}_2\text{HCl}_3\text{O}_2$), ki smo jo predhodno pripravili iz 0,75 g TCA, 30 g TBA in 150 ml destilirane vode (prirejeno po Tkalec, 2007). Dobljen homogenat smo v pokritih steklenih epruveh 30 minut segrevali na $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, jih nato ohladili v ledeni kopeli in centrifugirali. Dobljenemu supernatantu smo na spektrofotometru izmerili absorpcijo malondialdehida (MDA) pri 532 in 600 nm valovne dolžine. Vsebnost MDA smo določili po sledeči enačbi:

$$\text{MDA}/\text{FW} = x / (\epsilon * 1000 * m) \text{ } [\mu\text{M}/\text{g}] \quad \dots(1)$$

kjer je:

FW=sveža masa vzorca

$$x = A_{532} - A_{600}$$

ϵ = koeficient za MDA [$155\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$]

m=masa vzorca [g]

Za statistično analizo rezultatov smo uporabili metodo ANOVA v računalniškem programu GraphPad Prism 5.

4 REZULTATI

4.1 KALITVENI TEST

Rezultati kalitev in razpiranja ključnih listov za vsako tarčno vrsto posebej so prikazani v preglednicah 1 in 2 ter na slikah 1–5.

Preglednica 1: Končni odstotki skaljenih semen

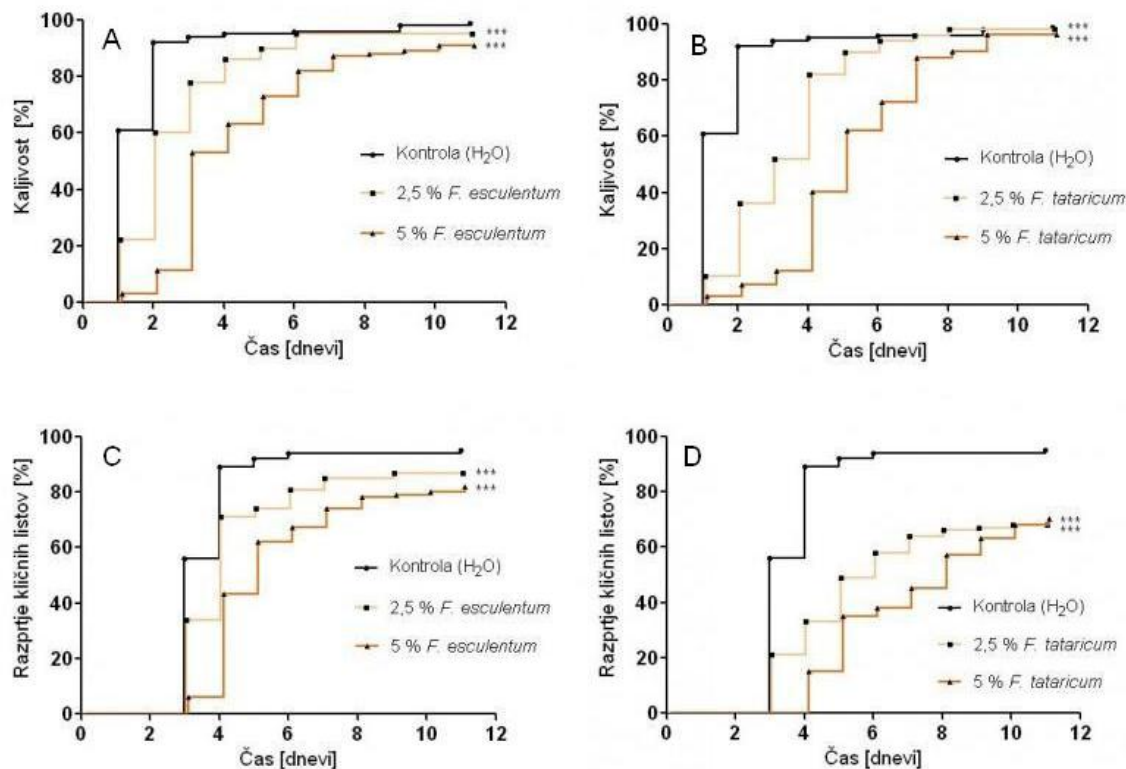
Tretma	Tarčna vrsta				
	<i>L. sativa</i>	<i>C. canadensis</i>	<i>E. annuus</i>	<i>S. canadensis</i>	<i>S. gigantea</i>
H2O	99	99	83	98	100
FE25	95	99	90	97	96
FE5	91	96	80	92	98
FT25	98	95	90	98	98
FT5	96	94	80	97	95

Preglednica 2: Končni odstotki kalic z razprtimi ključnimi listi

Tretma	Tarčna vrsta				
	<i>L. sativa</i>	<i>C. canadensis</i>	<i>E. annuus</i>	<i>S. canadensis</i>	<i>S. gigantea</i>
H2O	95	98	73	91	86
FE25	87	99	86	93	94
FE5	82	93	61	81	81
FT25	68	91	75	96	92
FT5	70	98	60	78	75

Na vseh grafih na slikah 1–5 je s črno barvo ponazorjena kontrola (destilirana voda), manj koncentriran izvleček s svetlo oranžno in bolj koncentriran s temno oranžno barvo. Za boljše ponazoritev poteka krivulj so te med sabo vodoravno nekoliko zamaknjene, da je vidna celotna črta oz. da se te ne prekrivajo. Minimalni zamiki med krivuljami tako ne prikazujejo razlik v rezultatih, temveč so prisotni zgolj za boljši prikaz krivulj. Ti zamiki med krivuljami so prisotni v vodoravni smeri: 1. z leve je krivulja kontrole, 2. manj koncentriranega izvlečka in 3. bolj koncentriranega izvlečka.

4.1.1 *Lactuca sativa*



Slika 1: Rezultati kalitvenega testa z navadno solato (*Lactuca sativa*).

Grafa v prvi vrsti prikazujeta odstotek skaljenih semen v odvisnosti od časa, v drugi vrsti grafa prikazujeta odstotek razprtih kličnih listov v odvisnosti od časa. Legenda:

- z "ns" so označene krivulje, ki niso statistično značilno različne v primerjavi s kontrolo ($p < 0,05$),
- z "*" so označene krivulje, ki so statistično značilno različne v primerjavi s kontrolo ($p < 0,05$),
- z "**" so označene krivulje, ki so statistično značilno različne v primerjavi s kontrolo ($p < 0,01$),
- z "***" so označene krivulje, ki so statistično značilno različne v primerjavi s kontrolo ($p < 0,001$).

Trend kalitve vrste *L. sativa* je statistično značilno različen pri vseh primerjavah ($p < 0,001$) (sliki 1A in 1B). V začetku je kalitev potekala zelo hitro, prve radikule so pri kontroli iz teste prodrle že 1. opazovani dan in to že pri 60 % semen. 2. dan je skalila že večina semen (nad 90 %). Prva semena pri vseh štirih tretmajih so skalila ravno tako 1. opazovani dan, toda le do 10 % (oz. 20 % pri FE25). Končni odstotek skaljenih semen je bil podoben pri kontroli in tretmajih (> 95 %), le pri FE5 je bil nekoliko nižji (91 %) (preglednica 1). Kljub istemu prvemu dnevu kalitve in podobnim končnim odstotkom so bile med kontrolo in posameznimi tretmaji kalitve statistično značilno upočasnjene.

Pri kalitvi so si krivulje kontrole, FE25 in FT25 po obliki podobne (sliki 1A in 1B). Ko so semena začela kaliti, se je njihovo število hitro povečevalo, proti koncu poskusa so kalila le še posamezna semena, vendar pa so pri tretmajih krivulje bolj položne, kar kaže na manj

naglo kalitev na začetku kot pri kontroli. To so pokazale tudi statistično značilne razlike. Krivulji FE5 in FT5 kažeta že drugačno obliko, saj je kalitev dobila največji zagon šele 2. oz. 3. dan po prvih skaljenih semenih. Krivulja FT5 je bolj položna kot FE5, kar kaže pri prvi na še močnejše zaviranje kalitve.

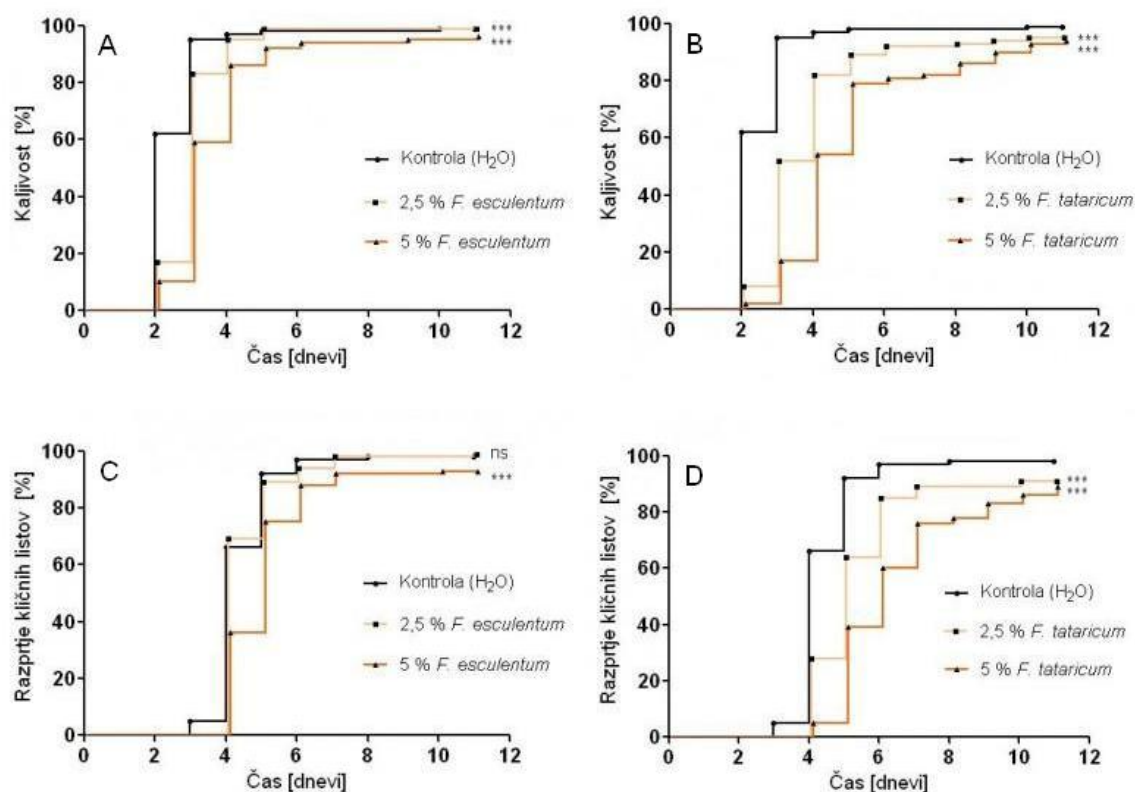
Trend razpiranja kličnih listov je enako kot trend kalitve statistično značilno različen pri vseh primerjavah ($p < 0,001$) (sliki 1C in 1D). Prvi klični listi so bili razprti 3. dan pri kontroli in vseh tretmajih, razen pri FT5, kjer so prve kalice dosegle to stopnjo dan kasneje, torej 4. dan. Končni odstotek kalic, ki so se razvile do te stopnje je bil najvišji pri kontroli (95 %), nižji pri FE25 (87 %), še nižji pri FE5 (82 %) in najnižji pri FT25 in FT5 (68 oz. 70 %) (preglednica 2). Tudi za ta znak so rezultati v vseh primerih statistično značilno različni.

Pri grafih razpiranja kličnih listov so vse krivulje podobne oblike (sliki 1C in 1D), le da se z večanjem koncentracije izvlečka posamezne vrste ajde naklon v primerjavi s kontrolo zmanjša - razvoj je upočasnen, na kar kažejo tudi statistično značilne razlike.

Pri kalitvi solate se je pogosto zdelo, da se kalček znotraj teste razvija, korenina debeli in daljša, klični listi ravno tako podaljšujejo in tudi zelenijo, a sta se oba organa izven teste pojavila šele čez nekaj časa. Dogodek kalitve smo zabeležili, ko je bila radikula vidna izven teste, razprtje kličnih listov pa smo zabeležili kot drugi znak že, ko sta se klična lista med sabo opazno ločila (a ne povsem razprla), kar je običajno sovpadalo z začetkom ozelenevanja.

Pri kalitvi solate je bila v zadnjih dneh poskusa opazna tudi večja potreba po vodi - potrebno je bilo povišano vsakodnevno dodajanje vode na filtrirni papir.

4.1.2 *Conyza canadensis*



Slika 2: Rezultati kalitvenega testa s kanadsko suholetnico (*Conyza canadensis*).

Grafa v prvi vrsti prikazujeta odstotek skaljenih semen v odvisnosti od časa, v drugi vrsti grafa prikazujeta odstotek razprtih kličnih listov v odvisnosti od časa. Za razlago simbolov glej sliko 1.

Trend kalitve vrste *C. canadensis* je statistično značilno različen pri vseh primerjavah ($p < 0,001$) (sliki 2A in 2B). Kot kažeta sliki 2A in 2B, so prva semena skalila 2. dan opazovanja. Pri kontroli jih je takrat skalilo že okrog 60 %, naslednji, 3. dan pa že nad 90 %. V nadaljnjih dneh so postopoma skalila še preostala semena. Tudi pri vseh tretmajih pod vplivom izvlečkov so prva semena skalila 2. dan, vendar je bilo takih le do 10 % (do 20 % pri FE25). Nadalje je bila kalitev pri tretmajih bolj postopna kot pri kontroli. Končni odstotek skaljenih semen je padal po vzorcu $H_2O = FE25 > FE5 > FT25 > FT5$, pri čemer je bil pri FT5 94 % (preglednica 1) in bi bil ob daljšem trajanju poskusa verjetno na koncu še višji.

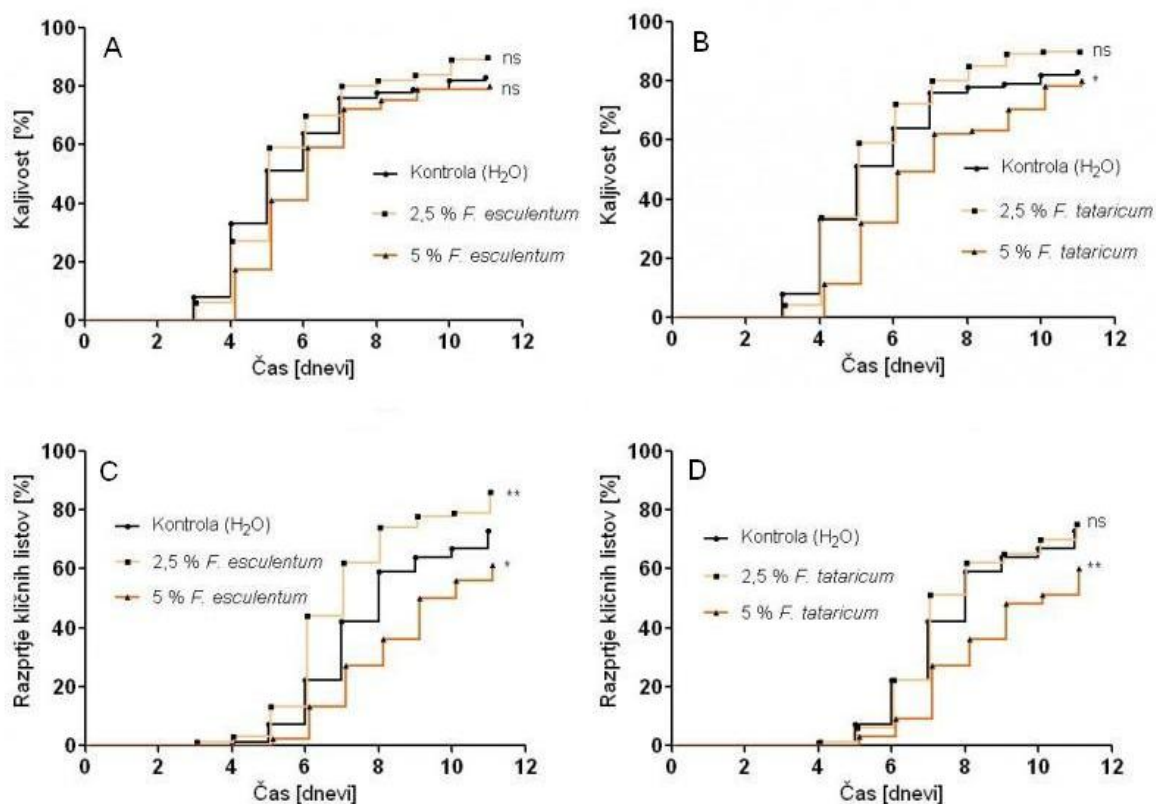
Trend razpiranja kličnih listov je statistično značilno različen pri vseh primerjavah ($p < 0,001$), razen za H₂O vs. FE25 (sliki 2C in 2D). Razpiranje kličnih listov je potekalo s podobnim trendom kot kalitev. Pri kontroli so bili prvi klični listi razprti 3. opazovani dan, naslednji, 4. dan, je to stopnjo doseglo že čez 60 % kalic in 5. dan že čez 90 %. Pri tretiranju z izvlečki so se prvi klični listi razprli en dan kasneje kot pri kontroli (4. dan).

Kalice, tretirane s FE25, kažejo podoben trend kot kontrola (krivulja tudi ni statistično značilno različna), medtem ko je izvleček FE5 upočasnil razpiranje kličnih listov. Tretiranje s FT25 je upočasnilo razpiranje kličnih listov podobno kot FE5, medtem ko ga je izvleček FT5 najbolj zaviral in tudi najbolj znižal končni odstotek takih kalic na 89 % (preglednica 2), ki pa bi lahko bil ob daljšem trajanju poskusa še nekoliko višji.

Oblika vseh krivulj kaljivosti in razpiranja kličnih listov (slike 2A–D) je zelo podobna, kvečjemu so zamaknjene v desno glede na sosednjo krivuljo; v začetku je njihov naklon strm in se v drugi polovici poskusa zmanjša. Edina izjema je krivulja kaljivosti pri tretiranju s FT5, ki doseže največji naklon šele 3. dan. Dobro je vidno, da bolj koncentriran izvleček katere koli od vrst ajde bolj zavira kalitev in razvoj kalic kot manj koncentriran, prav tako pa tatarska ajda kaže močnejše alelopatske učinke v primerjavi z navadno ajdo.

Primarne korenine, ki so pri tretiranju z izvlečki (najbolj opazno pri FT5) prodrle iz teste, so se že takoj rjavkasto obarvale v obliki izrazitega rjavega obroča malo za koreninskim vršičkom; predvidevamo, da v coni podaljševanja korenine / izrasti koreninskih laskov (slika 6 I, M, R). Pri kontroli so bile korenine bele (slika 6 A).

4.1.3 *Erigeron annuus*



Slika 3: Rezultati kalitvenega testa z enoletno suholetnico (*Erigeron annuus*).

Grafa v prvi vrsti prikazujeta odstotek skaljenih semen v odvisnosti od časa, v drugi vrsti grafa prikazujeta odstotek razprtih ključnih listov v odvisnosti od časa. Za razlago simbolov glej sliko 1.

Trend kalitve vrste *E. annuus* je statistično značilno različen pri H₂O vs. FT5 ($p < 0,05$), ni pa statistično značilen pri ostalih primerjavah ($p < 0,05$) (sliki 3A in 3B). Prve kalitve smo opazili 3. dan, in sicer pri kontroli ter tretmajih FE25 in FT25. Končni odstotek skaljenih semen pri teh dveh tretiranjih je bil ob koncu poskusa 90 % in tako nekoliko višji od kontrole, kjer je dosegel 83 %. Prve kalitve pri bolj koncentriranih izvlečkih FE5 in FT5 smo opazili en dan kasneje, torej 4. dan, končni odstotek skaljenih semen je bil 80 % in tako nekoliko nižji v primerjavi s kontrolo, kjer je dosegel 83 % (preglednica 1).

Krivulje kalitve (sliki 3A in 3B) tako kontrole kot tretmajev kažejo nekoliko hitrejšo kalitev v začetku poskusa, ki se postopoma zmanjšuje. V primerjavi s prej obravnavanimi vrstama je kalitev v začetku precej počasnejša. Krivulji tretmajev s 5 % izvlečkoma sta zamaknjena v desno v primerjavi s kontrolo, medtem ko se krivulji tretmajev z 2,5 % izvlečkoma v 1. polovici poskusa večinoma prekrivata s krivuljo kontrole, v 2. polovici pa

odstotki postanejo višji kot pri kontroli, saj je krivulja kalitve pri teh tretmajih nekoliko bolj strma. Razlike sicer niso statistično značilne.

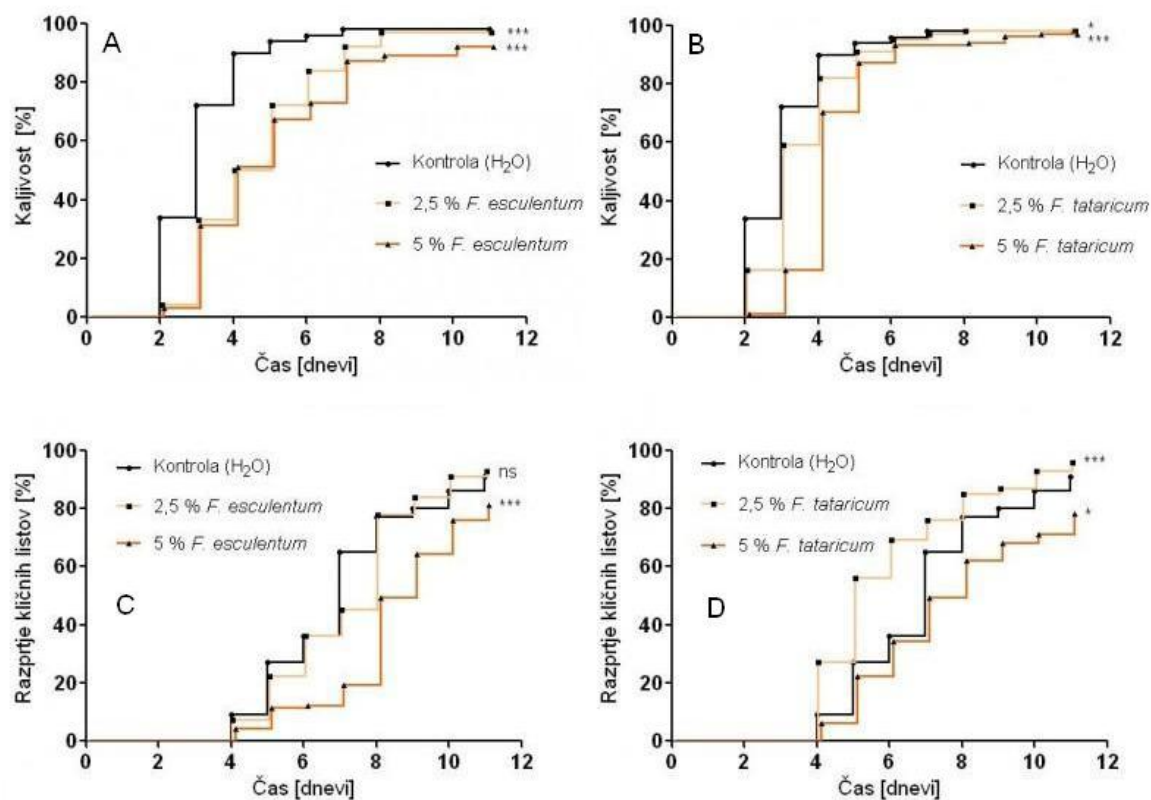
Trend razpiranja kličnih listov je statistično značilno različen pri primerjavah H₂O vs. FE25 in H₂O vs. FT5 ($p < 0,01$), H₂O vs. FE5 ($p < 0,05$), ni pa pri H₂O vs. FT25 ($p < 0,05$) (sliki 3C in 3D). Postopno počasno razpiranje kličnih listov se je pri FE25 začelo 3. dan, pri kontroli in FT25 4. dan, in pri bolj koncentriranih izvlečkih FE5 in FT5 5. dan. Pri slednjih tretmajih je bila tudi kalitev za 1 dan zakasnjena v primerjavi s kontrolo. Tako kot pri kalitvi je tudi končni odstotek kalic z razprtimi listi bil višji pri tretmajih z manj koncentriranim izvlečkom (FE25 86 % in FT25 75 %) v primerjavi s kontrolo, kjer je bil 73 %, medtem ko sta tretiranji s FE5 in FT5 ta odstotek znižala na 61 oz. 60 % (preglednica 2).

Krivulje razpiranja kličnih listov (sliki 3C in 3D) so drugačnega oblika kot krivulje kalitev. Krivulje kontrole in tretmajev z 2,5 % izvlečkoma imajo še nekoliko bolj strm osrednji del (krivulja tretmaja FE25 najbolj očitno), ki kaže hitrejši razvoj kot na začetku in proti koncu krivulje, a je ta veliko manj izrazit kot pri krivuljah kalitve. Krivulji razpiranja kličnih listov pri tretmajih FE5 in FT5 pa sta skoraj linearni, kar kaže na povsem enakomeren (torej zavrt) razvoj kalic brez hitrejših delov v sredini. Obe sta tudi statistično značilno različni v primerjavi s kontrolo.

Pri vrsti *E. annuus* je na vseh grafih (3A–D) vidna hitrejša kalitev in razpiranje kličnih listov tretmajev s koncentracijami izvlečkov 2,5 % v primerjavi s kontrolo (čeprav statistično značilno različno le v enem primeru). Krivulje tretmajev s 5 % izvlečkoma ajd so zamaknjene v desno v primerjavi s kontrolo in so od te vse tudi statistično značilno različne, kar pomeni, da 5 % izvleček upočasni potek kalitve in zgodnjega razvoja. Izjema je le krivulja kalitve tretmaja FE5.

Pri vrsti *E. annuus* se je (verjetno zaradi majhnih rožk) pogosto zdelo, da je bil ves kalček naenkrat izven teste, da torej ni korenina prva in bi ji sledil še preostali del kalčka. Morda gre za težjo zaznavo primarne korenine, ki je v začetku bela kot papir in zelo kratka, morda pa je bilo tudi objektivno tako, saj je bil filtrirni papir, omočen z izvlečki, rjave barve in bi bela barva zato izstopala.

4.1.4 *Solidago canadensis*



Slika 4: Rezultati kalitvenega testa s kanadsko zlato rozgo (*Solidago canadensis*).

Grafa v prvi vrsti prikazujeta odstotek skaljenih semen v odvisnosti od časa, v drugi vrsti grafa prikazujeta odstotek razprtih ključnih listov v odvisnosti od časa. Za razlago simbolov glej sliko 1.

Trend kalitve vrste *S. canadensis* je statistično značilno različen pri primerjavah H₂O vs. FE25, H₂O vs. FE5 in H₂O vs. FT5 ($p < 0,001$) ter za H₂O vs. FT25 ($p < 0,05$) (sliki 4A in 4B). Kalitev je bila upočasnjena tako pri tretiranju z 2,5 % izvlečkoma ajd v primerjavi s kontrolo, še bolj pa s 5 % izvlečkoma. Razlike so tudi statistično značilne.

Pri vseh tretmajih in kontroli so bile prve kalice opažene 2. dan, maksimalno vrednost so pri kontroli dosegle 7. dan in pri FE25 in FT25 8. dan, pri bolj koncentriranih izvlečkih pa so semena kalila postopoma do konca poskusa. Prav tako kot enak prvi dan zabeležene kalitve, so bili končni odstotki skaljenih semen podobni (97–98 %) z izjemo tretmaja FE5, kjer je bil nekoliko nižji (92 %) (preglednica 1). Kljub temu so krivulje vseh tretmajev statistično značilno različne v primerjavi s kontrolo.

Krivulje kalitve (sliki 4A in 4B) z začetnim strmim naklonom kažejo na hitro začetno kalitev, ki se v drugi polovici poskusa upočasni. Krivulja kontrole ima največji naklon,

krivulje tretiranj z 2,5 % izvlečki so zamaknjene nekoliko v desno in krivulje tretiranj s 5 % izvlečki še bolj. Vse so statistično značilno različne v primerjavi s kontrolo.

Trend razpiranja kličnih listov je statistično značilno različen pri primerjavah H₂O vs. FT25, H₂O vs. FE5 ($p < 0,001$), H₂O vs. FT5 ($p < 0,05$), ne pa pri H₂O vs. FE25 ($p < 0,05$) (slike 4C in 4D). Vpliv ekstraktov na trend razpiranja kličnih listov ni tako jasen. Pri tretmaju FE25 ni statistično značilnih razlik, medtem ko izvleček FT25 statistično značilno pospešuje razpiranje. Bolj koncentrirana izvlečka FE5 in FT5 statistično značilno zavirata razpiranje kličnih listov.

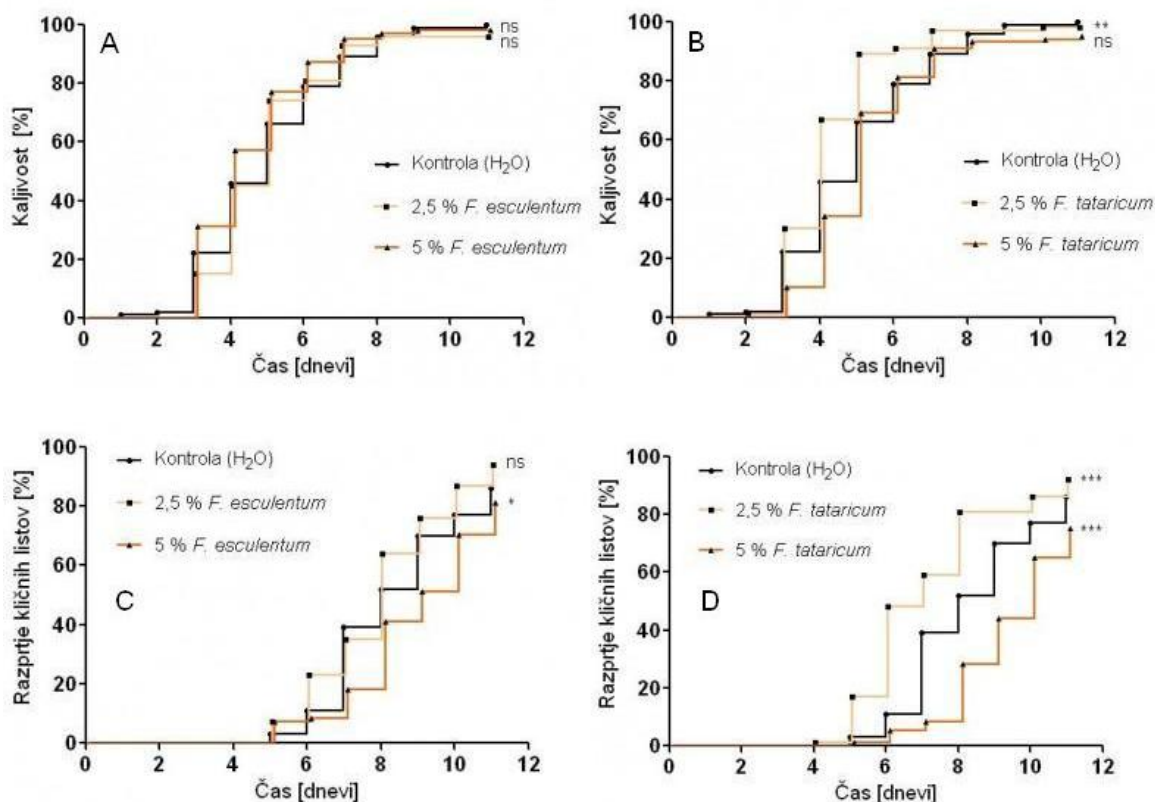
Prve razprte klične liste smo pri vseh tretmajih in kontroli opazili 4. dan, je pa bil končni odstotek kalic v tej fazi za razliko od kalitve pri obeh bolj koncentriranih izvlečkih - FE5 in FT5 manjši, in to za vsaj 10 % (preglednica 2), vendar bi morda ob daljšem trajanju poskusa odstotek prav tako dosegel podobne vrednosti kot pri ostalih tretmajih. Končna odstotka kalic z razprtimi kličnimi listi pri FE25 in FT25 sta bila nekoliko višja od kontrole (preglednica 2).

Krivulje razpiranja kličnih listov se po obliki razlikujejo od krivulj kalitve (slike 4A–D). Prve za razliko od slednjih nimajo začetnega strmega naklona, ki bi se proti koncu poskusa uravnal (izjema je tretma FT25, ki je pospešil razvoj v primerjavi s kontrolo), temveč so krivulje kontrole in tretmajev FE25 in FT5 po obliki skoraj linearne, kar kaže na zavrt razvoj kalic. Po obliki najbolj izstopa krivulja tretmaja FE5, ki v začetku poskusa kaže upočasnen razvoj kalic, ki se proti koncu pospeši.

Pri vrsti *S. canadensis* grafi na slikah 4A–D kažejo, da je kalitev ob tretiranju s katerim koli izvlečkom zavrt, razpiranje kličnih listov pa le ob tretiranju s 5 % izvlečkoma. Tretiranje z izvlečkoma z 2,5 % koncentracijo je razvoj pospešilo.

9. dan so bile kalice pri tretmaju FE25 v petrijevki številka 3 ovenele zaradi suhega filtrirnega papirja, zato tisti dan rezultatov nismo zabeležili, saj ne bi bilo mogoče določiti števila kalic z razprtimi kličnimi listi. Predvidevamo, da to ni imelo vpliva na statistično obdelavo, saj analiza predvideva takšne dogodke oz. omogoča ne povsem linearen vnos podatkov. Krivulje na slikah 4A in 4C ne kažejo opaznih anomalij, ki bi jih lahko pripisali temu.

4.1.5 *Solidago gigantea*



Slika 5: Rezultati kalitvenega testa z orjaško zlato rozgo (*Solidago gigantea*).

Grafa v prvi vrsti prikazujeta odstotek skaljenih semen v odvisnosti od časa, v drugi vrsti grafa prikazujeta odstotek razprtih ključnih listov v odvisnosti od časa. Za razlago simbolov glej sliko 1.

Trend kalitve vrste *Solidago gigantea* je statistično značilno različen pri primerjavi H₂O vs. FT25 ($p < 0,01$), ni pa pri ostalih primerjavah ($p < 0,05$) (sliki 5A in 5B). Tretiranja z izvlečki na kalitev semen niso statistično značilno vplivala, razen v primeru izvlečka FT25, ki je kalitev pospešil.

Prva semena so skalila pri kontroli že 1. dan, pri FT25 2. dan in pri FE25, FE5, FT5 3. dan. Ob koncu poskusa je bila kaljivost v vseh primerih zelo podobna, in sicer enaka ali višja od 95 % (preglednica 1). Maksimalne odstotke kaljivosti so semena pri vseh tretmajih in kontroli dosegale v zadnjih treh dneh.

Krivulje kalitve (sliki 5A in 5B) so si po obliki zelo podobne – vse imajo po 2. dnevno strm naklon, kar kaže na naglo kalitev, ki se je proti koncu poskusa upočasnila in so kalila le še posamezna semena. Da so krivulje zelo podobne in se tudi večinoma prekrivajo, kažejo

tudi rezultati statističnega testa, po katerem je statistično značilno različna le krivulja tretmaja FT25.

Trend razpiranja kličnih listov je statistično značilno različen pri primerjavah H₂O vs. FT25, H₂O vs. FT5 ($p < 0,001$), H₂O vs. FE5 ($p < 0,05$), ni pa pri H₂O vs. FE25 ($p < 0,05$) (slike 5C in 5D). Tretiranje z 2,5 % izvlečkoma ajd je pospešilo razvoj kalic do 2. stopnje (pri FE25 sicer ne statistično značilno), medtem ko je tretiranje s 5 % izvlečkoma razvoj zavrlo.

Prvi klični listi so se razprli pri FT25 4. dan, pri kontroli, FE25, FE5, FT5 pa 5. dan. Ob koncu poskusa se je odstotek kalic z razprtimi listi precej razlikoval med kontrolo in posameznimi tretmaji. Pri tretiranju z manj koncentriranim izvlečkoma FE25 in FT25 je bil ta odstotek višji (94 oz. 96 %) kot pri kontroli, kjer je dosegel 86 %, medtem ko je bil pri bolj koncentriranim FE5 in FT5 nižji kot pri kontroli (81 oz. 75 %) (preglednica 2).

Opazne so tudi razlike med oblikami krivulj kaljivosti in razpiranje kličnih listov (slike 5A–D). Slednje so pri kontroli in tretiranju z navadno ajdo skoraj linearne, kar kaže na upočasnjem razvoj kalic v primerjavi s kalitvijo. Krivulja tretiranja z 2,5 % izvlečkom tatarske ajde kaže v začetku še nekoliko hitrejši razvoj v primerjavi z zadnjimi dnevi poskusa, medtem ko je tretiranje s FT5 ravno nasprotno zavrlo razvoj v začetku poskusa in so se klični listi bolj naglo razpirali proti koncu poskusa.

Tako kot pri vrsti *S. canadensis*, so bile 9. dan kalice pri tretmaju FE25 v petrijevkah št. 2 in 3 ter pri tretmaju FE5, petrijevki št. 1 in 2, ovenele zaradi suhega filtrirnega papirja. Rezultatov zato nismo zabeležili. Vpliv na statistično obdelavo ne bi smel biti opazen, saj analiza omogoča ne povsem linearen vnos podatkov. Na slikah 5A in 5C ni opaznih anomalij, ki bi jih lahko pripisali manjkajočim podatkom.

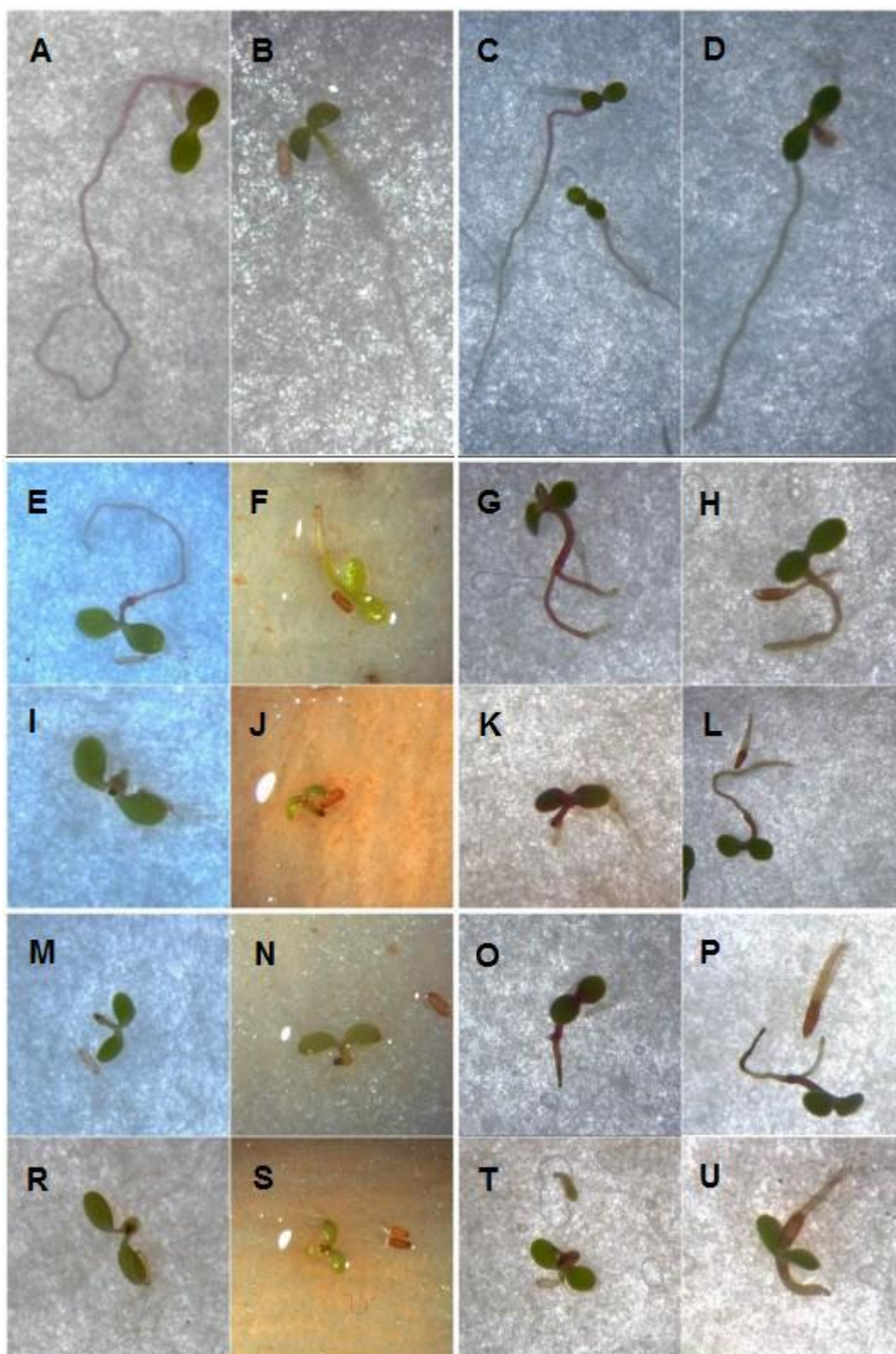
4.1.6 Primerjava testiranih vrst

Kalitev je pri kontrolnem poskusu najbolj naglo potekala pri vrstah *C. canadensis* in *L. sativa*, medtem ko so semena *E. annuus* kalila zelo postopoma. *S. canadensis* in *S. gigantea* sta bili nekje vmes (slike 1–5). Najnižje odstotke skaljenih semen smo opazili ob tretiranju s FE5 in/ali FT5 (5–8 % nižje končne vrednosti v primerjavi s kontrolo) (preglednica 1), najnižje odstotke kalic, razvitih do druge opazovane faze, pa prav tako ob tretiranju s FE5 in/ali FT5 (5–13 % nižjih končnih vrednosti v primerjavi s kontrolo, pri solati celo do 27 %) (preglednica 2).

Potek kalitve je bil statistično značilno počasnejši (pri vsaj $p < 0,05$) pri vseh tretmajih pri vrstah *C. canadensis*, *S. canadensis* in *L. sativa*. Pri vrsti *E. annuus* je bil potek kalitve počasnejši le ob dodanem izvlečku FT5 ($p < 0,05$), vrsta *S. gigantea* pa ni pokazala upočasnjene kalitve ob tretiranju (ob dodatku izvlečka FT25 je bila ta celo pospešena). Razpiranje kličnih listov je bilo (pri vsaj $p < 0,05$) statistično značilno upočasnjeno pri vseh rastlinskih vrstah, tretiranih s FE5 in FT5. Ravno tako je bil upočasnen razvoj vrst *C. canadensis* pri FT25 in *L. sativa* pri FE25 in FT25. Pri ostalih tretiranjih z 2,5 % izvlečkoma ajd ni bilo zamikov v razvoju - razlike niso bile statistično značilno različne ali pa se je razvoj pospešil. Končni odstotek kalic, ki so prišle do te druge opazovane faze razvoja, je že odražal negativne vplive izvlečkov (predvsem FE5 in FT5) na rast kalic.

Kot najbolj dovzetna za vplive izvlečkov se je izkazala vrsta *L. sativa*, ki smo jo torej ustrezno izbrali za pozitivno kontrolo. Kot druga najbolj občutljiva tarčna rastlina se je izkazala *C. canadensis*.

Na sliki 6 (spodaj) so prikazane izbrane kalice vseh tarčnih vrst pri vseh različnih tretmajih.



Slika 6: Kalice tarčnih invazivnih tujerodnih vrst ob koncu poskusa

A–D – H₂O; E–H – FE25; I–L – FE5; M–P – FT25; R–U – FT5; 1. stolpec (A, E, I, M, R) – *Conyza canadensis*; 2. stolpec (B, F, J, N, S) – *Erigeron annuus*; 3. stolpec (C, G, K, O, T) – *Solidago canadensis*; 4. stolpec (D, H, L, P, U) – *Solidago gigantea*

4.1.7 Nepredvideve težave pri poskusu

Ob vsakodnevnem pregledu petrijevok smo pogosto opazili precejšnje nihanje vlažnosti filtrirnega papirja pri vseh petrijevokah, česar pred izvedbo poskusa nismo predvideli. Zaradi tega smo glede na videz omočenosti filtrirnega papirja vsak dan po občutku dodajali dH_2O , da bi vsaj približno ohranjali koncentracijo snovi v ekstraktu. Zavedamo se, da so bile kalice podvržene rednemu nihanju koncentracij od manjših do večjih, kot pa so bili predvideni na začetku. Temu bi se verjetno lahko izognili s kalitvijo v neprepustno zaprtih petrijevokah, pri čemer pa bi povečali verjetnost za razrast gliv in močno omejili dostopnost kisika za potrebe semen oz. kalic. Tudi vsakodnevno pregledovanje kalic bi bilo zaradi kapljic kondenzirane vode na pokrovu oteženo.

V prvem sklopu poskusa (vrsti rodu *Solidago*) smo opazili tudi rahlo močnejše koncentriranje ekstrakta na določenih mestih v petrijevki (tako sklepamo zaradi močnejše obarvanosti), predvidoma zaradi ne povsem enakomernega dodajanja vode (kar s kapalko niti ni možno). To je bilo opazno tudi pri semenih oz. kalicah, ki so nekoliko zaostajali pri kalitvi oz. rasti. Pri naslednjih sklopih poskusa smo poskušali dodajati vodo čim bolj enakomerno po celi površini filtrirnega papirja, da bi izničili vpliv koncentriranja ekstrakta na določenih mestih.

Morebitnih povsem propadlih rastlin, na kar smo sklepali zaradi rjave do rjavozelene barve, prosojnosti in izgube turgorja kljub zalitosti (slika 6: R), nismo posebej zabeležili, omejili smo se le na dva zastavljena znaka, propada rastlin v kateri koli fazi (pred kalitvijo, pred razprtjem kličnih listov ali po njem) nismo upoštevali pri rezultatih niti jih nismo analizirali.

V 2. polovici trajanja kalitvenega testa so se v nekaterih petrijevokah pojavili maloštevilni morebitni "škodljivci", nekaj listnih uši in skakačev (*Collembola*), ki smo jih sprti odstranili, poškodb na rastlinah pa nismo opazili.

4.2 DOLŽINE KORENIN

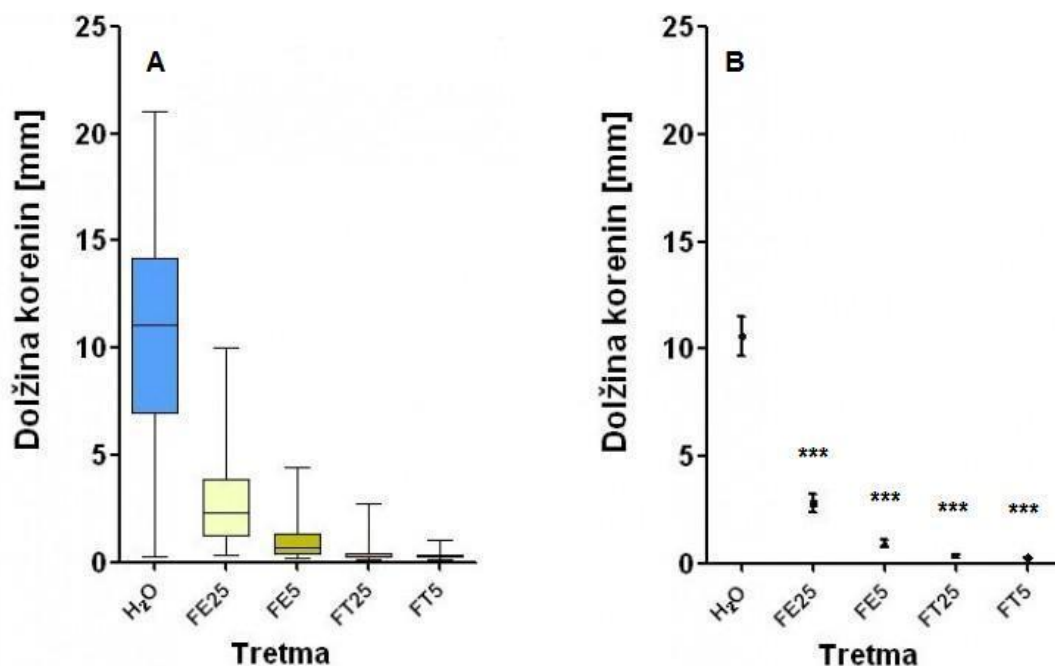
Dolžino korenin vseh kalic vseh tarčnih vrst smo izmerili, ker so bile razlike med tretmaji veliko bolj očitne kot razlike v sami kaljivosti.

Dolžine korenin so za vsako testirano vrsto prikazane na dva načina - na grafih "škatla z ročaji" (ang. "*box and whiskers plot*") so dolžine prikazane od minimalnih do maksimalnih vrednosti, da je vidna razpršenost podatkov, na preostalih grafih so prikazane le povprečne

vrednosti s 95 % intervali zaupanja, ki dajejo bolj jasno sliko razmerij med kontrolo in posameznimi tretmaji.

Pri vrstah *Solidago canadensis* in *S. gigantea* smo fotografirali in izmerili dolžine korenin le ene petrijevke na tretma, ne pa vseh štirih. Ostale kalice teh dveh vrst smo zamrzili za analizo vsebnosti antocianov (rezultati niso vključeni v nalogo).

4.2.1 *Conyza canadensis*



Slika 7: Dolžine korenin kalic vrste *Conyza canadensis* v odvisnosti od tretmaja.

Graf na levi prikazuje rezultate od minimuma do maximuma in zgoščenost srednje polovice podatkov s povprečno vrednostjo kot črto v polju (škatla z ročajji). Graf na desni prikazuje povprečja izmerjenih dolžin korenin z označenimi intervali zaupanja s 95 % zaupanjem. Simbol "***" označuje statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolo ($p < 0,001$).

Na sliki 7A je viden zelo močan upad maksimalnih in povprečnih dolžin korenin vrste *Conyza canadensis* pri tretiranju z izvlečki. Maksimalna vrednost pri tretmaju FE25 ne dosega polovice maksimalne vrednosti pri kontroli (prav tako ne dosega niti povprečne vrednosti), medtem ko povprečna vrednost pri tretmaju FE25 ne dosega niti četrtnine povprečne vrednosti pri kontroli. Dolžine korenin se pri FE5, FT25 in FT5 v tem vrstnem redu še manjšajo, a so vendarle vse že tako nizke, da med njimi ni statistično značilnih razlik, so pa različne od FE25 (preglednica 3). Padanje (povprečnih in maksimalnih) dolžin je torej strmo že pri tretiranju z izvlečki navadne ajde, še bolj strmo pa je pri tretiranju s

tatarsko, kjer so povprečne vrednosti minimalne. Razlike med kontrolo in posameznimi tretmaji so statistično značilno različne za $p < 0.001$ (slika 7B).

Na sliki 7A je opazno tudi zelo očitno manjšanje razpršenosti podatkov ob večanju koncentracije izvlečka v primerjavi s kontrolo. Pri vseh tretmajih so bile prisotne tudi kalice z zelo kratkimi koreninami, tiste, ki so skalile proti koncu poskusa. Zgornje meje (maksimalne vrednosti) dolžin in zgoščenost podatkov so očitno znaki, ki kažejo na razlike med posameznimi tretmaji.

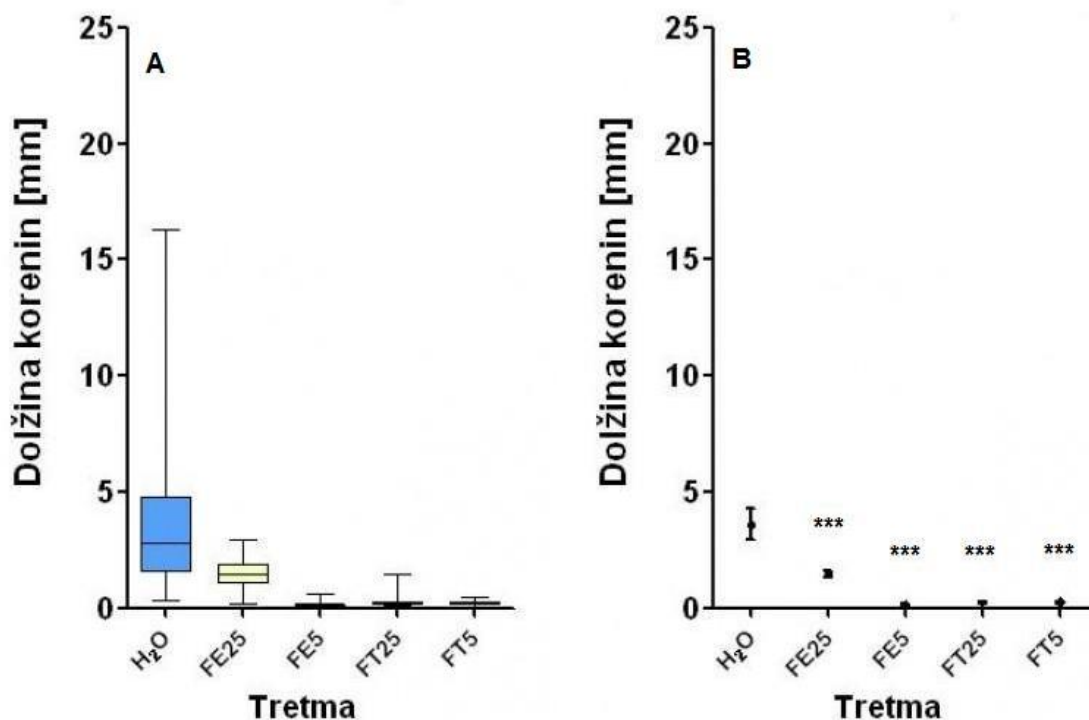
Preglednica 3: Statistično značilna različnost med posameznimi tretmaji za vrsto *Conyza canadensis*

Tukey-ev primerjalni test	H2O	FE25	FE5	FT25	FT5
H2O		***	***	***	***
FE25			***	***	***
FE5				ns	ns
FT25					ns
FT5					

Opazili smo tudi, da so pri FE5 trem kalicam izrasle stranske korenine, ki so bile krajše od primarnih. Tega pri kontroli ali ostalih tretmajih nismo zabeležili.

Rezultati na sliki 7 so, gledano statistično vrednotenje, v skladu z rezultati kalitvenega testa (slika 2), saj so meritve korenin vseh tretmajev statistično značilno različne v primerjavi s kontrolo, enako tudi kalitev in razpiranje kličnih listov, razen slednje pri FE25.

4.2.2 *Erigeron annuus*



Slika 8: Dolžine korenin kalic vrste *Erigeron annuus* v odvisnosti od tretmaja.

Graf na levi prikazuje rezultate od minimuma do maximuma in zgoščenost srednje polovice podatkov s povprečno vrednostjo kot črto v polju (škatla z ročajji). Graf na desni prikazuje povprečja izmerjenih dolžin korenin z označenimi intervali zaupanja s 95 % zaupanjem. Simbol "****" označuje statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolo ($p < 0,001$).

Na sliki 8A je opazen zelo očiten vpliv tretiranja vrste *Erigeron annuus*, ki se kaže v nižjih maksimalnih in povprečnih dolžin korenin. Tretiranje s FE25 je zmanjšalo maksimalno vrednost na približno šestino v primerjavi s kontrolo in povprečno vrednost na polovico. Povprečne vrednosti pri vseh ostalih tretmajih so minimalne, med njimi tudi ni statistično značilnih razlik, so pa različne od FE25 (preglednica 4). Razlike med kontrolo in posameznimi tretmaji so statistično značilno različne za $p < 0,001$ (slika 8B).

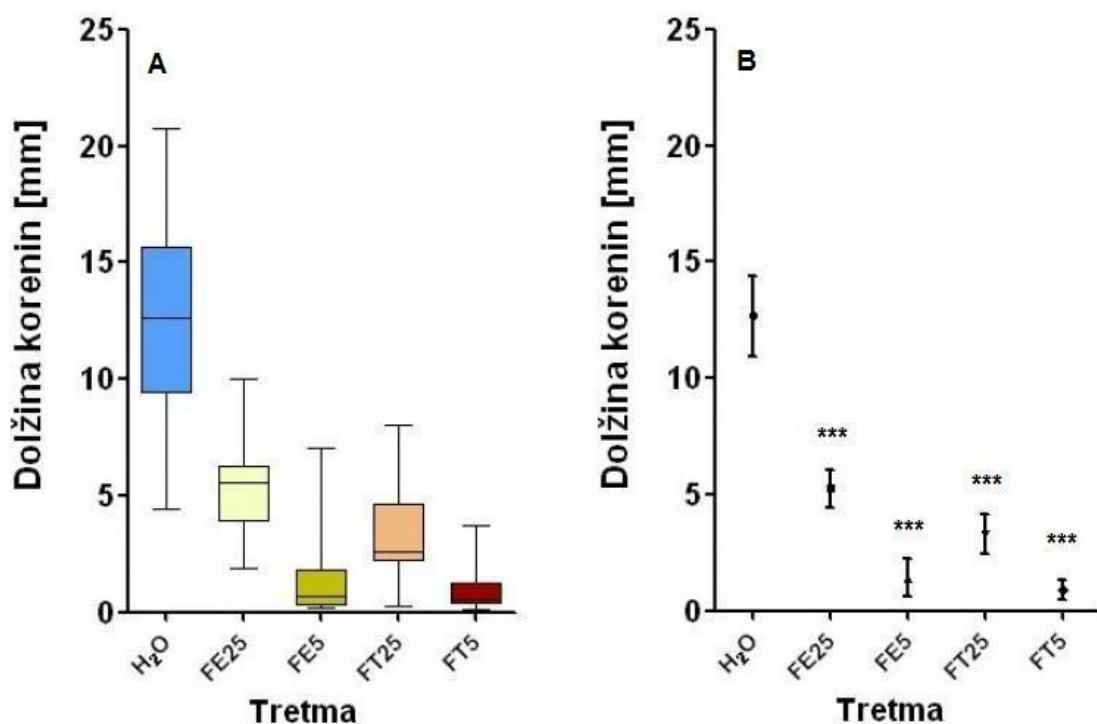
Na sliki 8A je opazno tudi očitno manjšanje razpršenosti podatkov ob tretiranju z izvlečki ter njihovemu večanju koncentracije v primerjavi s kontrolo. Pri vseh tretmajih so bile prisotne tudi kalice z zelo kratkimi koreninami, tiste, ki so skalile proti koncu poskusa (slika 6: T). Zgornje meje (maksimalne vrednosti) dolžin in zgoščenost podatkov so očitni znaki, ki kažejo na vpliv tretiranja z izvlečki.

Preglednica 4: Statistično značilna različnost med posameznimi tretmaji za vrsto *Erigeron annuus*

Tukey-ev primerjalni test	H2O	FE25	FE5	FT25	FT5
H2O		***	***	***	***
FE25			***	***	***
FE5				ns	ns
FT25					ns
FT5					

V primerjavi s preživetvenimi krivuljami kalitve in razpiranja kličnih listov, kjer so tretmaji v primerjavi s kontrolo redko in/ali slabo statistično značilno različni (slika 3), so dolžine korenin v vseh primerih statistično značilno manjše kot pri kontroli. Stimulacije rasti in razvoja s strani izvlečkov tako pri merjenju korenin ni nikjer zaznati (niti brez statistične značilnosti), čeprav so rezultati na sliki 3 to nakazovali.

4.2.3 *Solidago canadensis*



Slika 9: Dolžine korenin kalic vrste *Solidago canadensis* v odvisnosti od tretmaja.

Graf na levi prikazuje rezultate od minimuma do maximuma in zgoščenost srednje polovice podatkov s povprečno vrednostjo kot črto v polju (škatla z ročajji). Graf na desni prikazuje povprečja izmerjenih dolžin korenin z označenimi intervali zaupanja s 95 % zaupanjem. Simbol "***" označuje statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolo ($p < 0,001$).

Na sliki 9A je opazen očiten vpliv tretiranja vrste *Solidago canadensis*, ki se kaže v manjših maksimalnih in povprečnih vrednostih dolžin korenin, na kar pri obeh vrstah ajde vpliva tudi koncentracija izvlečka. Povprečna vrednost pri FE25 je manjša od polovice tiste pri kontroli, pri FT25 manjša od polovice FE25, povprečni vrednosti FE5 in FT5 sta zelo nizki (pod 1 mm). Razlike med kontrolo in posameznimi tretmaji so statistično značilno različne za $p < 0,001$ (slika 9B).

Na sliki 9A je opazno tudi manjšanje razpršenosti podatkov ob tretiranju z izvlečki ter večanju njihove koncentracije v primerjavi s kontrolo. Pri tej tarčni vrsti so očitni znaki razlik osrednja zgoščenost podatkov. Minimumi dolžin korenin pri kontroli in tudi FE25 niso povsem pri dnu kot pri vrstah *E. annuus* in *C. canadensis*, saj semena (v petrijevki z merjenimi koreninami) niso kalila do zadnjega dne, temveč so maksimum kaljivosti dosegla pri kontroli 7. dan. ter pri FE25 8. dan (podatki niso prikazani). Do konca poskusa so bile torej najmlajše korenine stare že 4 oz. 3 dni.

V primeru vrste *S. canadensis* so bile za merjenje korenin uporabljene le kalice po ene izbrane petrijevke na tretma.

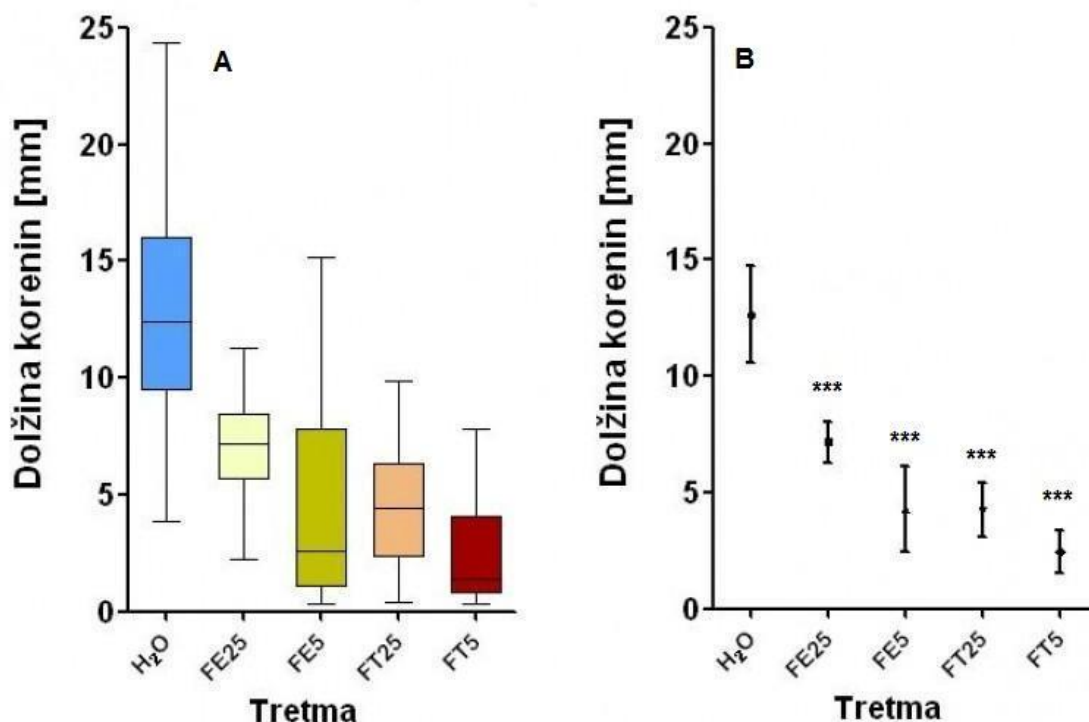
Preglednica 5: Statistično značilna različnost med posameznimi tretmaji za vrsto *Solidago canadensis*

Tukey-ev primerjalni test	H2O	FE25	FE5	FT25	FT5
H2O		***	***	***	***
FE25			***	*	***
FE5				ns	ns
FT25					*
FT5					

Kot statistično značilno različne so se izkazale še primerjave med FE25 in FE5 (bolj koncentriran izvleček bolj zavira rast), FE25 in FT25 (izvleček tatarske ajde bolj zavira rast korenin) ter med FT25 in FT5 (bolj koncentriran izvleček bolj zavira rast) (preglednica 5). Predvidevamo, da bi bile ob večjem vzorcu statistično značilne razlike očitnejše zaradi manjše razpršenosti podatkov. Na sliki 9 tudi ni opaziti nobenih stimulacij s strani izvlečkov kljub hitrejšemu razpiranju kličnih listov pri FT25 v primerjavi s kontrolo (slika 4D).

Opazili smo tudi, da se je pri tretmajih pojavilo nekaj kalic, ki so jim izrasle stranske korenine (Slika 6: G, K, O). Pri kontroli sta bili taki le dve kalici, medtem ko jih je bilo pri FE25 8, pri FE5 4, pri FT25 10 in pri FT5 2. Opazno več jih je torej pri izvlečkih nižjih koncentracij. Pri FE5, FT25 in FT5 so bile nekatere od teh stranskih korenin daljše od primarnih.

4.2.4 *Solidago gigantea*



Slika 10: Dolžine korenin kalic vrste *Solidago gigantea* v odvisnosti od tretmaja.

Graf na levi prikazuje rezultate od minimuma do maximuma in zgoščenost srednje polovice podatkov s povprečno vrednostjo kot črto v polju (škatla z ročajji). Graf na desni prikazuje povprečja izmerjenih dolžin korenin z označenimi intervali zaupanja s 95 % zaupanjem. Simbol "***" označuje statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolo ($p < 0,001$).

Na sliki 10A je opazen vpliv tretiranja vrste *Solidago gigantea*, ki se kaže v manjših maksimalnih in povprečnih vrednostih pri uporabi izvlečkov obeh vrst ajde. Pri tretiranju z izvlečkoma višje koncentracije sta bili povprečni vrednosti nižji kot pri manj koncentriranih. Povprečna vrednost dolžine korenin pri tretiranju s FE25 je približno dve tretjini tiste pri kontroli, medtem ko je pri FE5 le šestino kontrolne. Padanje vrednosti dolžin je pri tretiranju s tatarsko ajdo bolj naglo – pri tretiranju s FT25 dosega tretjino tiste pri kontroli, pri FT5 pa je le še okrog 1 mm. Razlike med kontrolo in posameznimi tretmaji so statistično značilne za $p < 0,001$ (slika 10B).

Na sliki 10A je opazno tudi zmanjšanje razpršenosti podatkov ob tretiranju z izvlečki FE25, FT25 in FT5, ne pa FE5, v primerjavi s kontrolo. Zgornje meje (maksimalne vrednosti) dolžin in zgoščenost podatkov so očitno znaki, ki najbolj nazorno kažejo na razlike med posameznimi tretmaji. Minimumi dolžin korenin pri kontroli in pri FE25 niso povsem pri ničli kot pri vrstah *E. annuus* in *C. canadensis*, saj je vidno na sliki 5A, da semena niso kalila do zadnjega dne, temveč so maksimum kaljivosti dosegla (v petrijevki z

merjenimi koreninami) pri kontroli ter pri FE25 8. dan (podatki niso prikazani). Na koncu poskusa so bile torej najmlajše korenine stare 3 dni.

V primeru vrste *S. gigantea* so bile tako kot pri vrsti *S. canadensis* za merjenje korenin uporabljene le kalice po ene izbrane petrijevke na tretma.

Preglednica 6: Statistično značilna različnost med posameznimi tretmaji za vrsto *Solidago gigantea*

Tukey-ev primerjalni test	H2O	FE25	FE5	FT25	FT5
H2O		***	***	***	***
FE25			*	*	***
FE5				ns	ns
FT25					ns
FT5					

Kot statistično značilni različne se pokažejo še primerjave med FE25 in FE5 (bolj koncentriran bolj zavira rast) ter med FE25 in FT25 (izvleček tatarske ajde bolj zavira rast korenin) (preglednica 6). Predvidevamo, da bi večji vzorec prikazal močnejše razlike med primerjavami.

Če primerjamo rezultate merjenja dolžin korenin z rezultati kalitvenega poskusa (slika 5), pridemo do drugačnih zaključkov. Log-rank statistični test je med primerjavami krivulj statistično značilne razlike zaviranja našel le pri razpiranju kličnih listov pri tretiranju s FE5 in FT5. Rezultati merjenja dolžin korenin so pokazali statistično značilne razlike za primerjave vseh tretmajev s kontrolo.

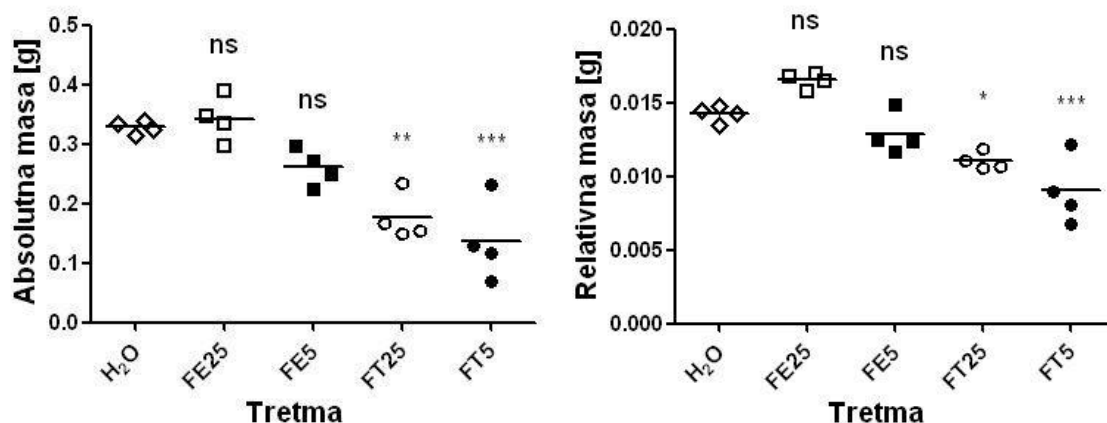
Opazili smo tudi, da se je pri tretmajih pojavilo nekaj kalic, ki so jim izrasle stranske korenine (slika 6: P). Tega pri kontroli nismo zabeležili. Takih kalic je bilo pri tretiranju s FE25 3, pri FE5 5, pri FT25 7 in pri FT5 4. Razlike med posameznimi tretmaji tako niso zelo očitne. Pri FE5 in FT25 je bilo nekaj stranskih korenin daljših od primarnih. Ker smo merili dolžine korenin vseh kalic, tudi tistih, ki so skalile bolj pozno in so zato imele krajše korenine, sta tako razpon kot razpršenost podatkov velika.

Iz zbranih rezultatov vseh testiranih rastlin (slike 7–10) lahko razberemo, da so bile korenine vseh testiranih rastlin pri vseh tretmajih v primerjavi s kontrolo statistično značilno krajše ($p < 0.001$).

Podatkov merjenja korenin je bilo pri obravnavi nekaterih petrijevk nekaj manj ali nekaj več kot pa dejanskega števila kalic. Ker smo korenine merili posredno preko računalniških fotografij, smo pri fotografiranju določene kalice nehote fotografirali dvakrat, določene pa tudi spregledali. Podvojene kalice smo poskusili najti in jih ne upoštevati. Število neskladij je bilo največ 7 pri posamezni vrsti na posamezen tretma.

Pri mnogih koreninah tretiranih kalic smo opazili izgubo zaznave težnosti – koreninski vršički so se zavihali navzgor (slika 6: I, N, R, S, T). Korenine tretiranih kalic tudi niso imele koreninskih laskov, ki so bili pri kontroli dobro vidni že pod stereolupo (slika 6: B). Proti koncu poskusa so pri večini rastlinskih vrst zaradi rjavenja in propadanja koreninskih vršičkov primarnih korenin pri nekaterih kalicah že izraščale stranske korenine na bazi primarnih (slika 6: G, K, O, P). Pri merjenju dolžin korenin smo vedno upoštevali najdaljšo korenino. V vseh primerih, razen nekaterih kalic vrst *S. canadensis* in *S. gigantea*, so bile to primarne korenine.

4.3 MASA KALIC VRSTE *LACTUCA SATIVA*



Slika 11: Absolutne in relativne sveže mase kalic vrste *Lactuca sativa*.

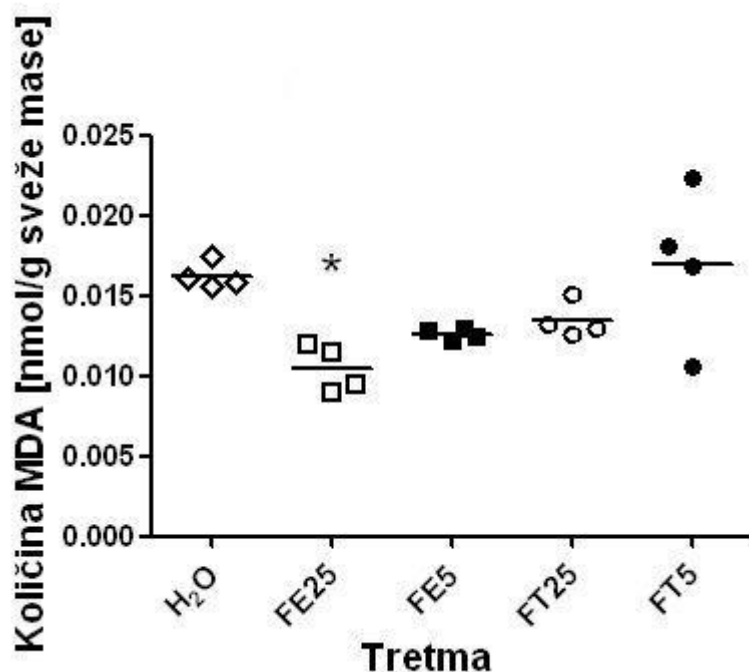
Simboli na grafu A prikazujejo absolutne mase kalic v posamezni petrijevki glede na tretma, simboli na grafu B prikazujejo povprečne vrednosti relativnih mas posameznih kalic (masa vseh kalic v petrijevki / število stehanih kalic). Legenda:

- "ns" - ni statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolo ($p < 0,05$),
- "*" - statistično značilno različno v primerjavi s kontrolo ($p < 0,05$),
- "***" - statistično značilno različno v primerjavi s kontrolo ($p < 0,01$),
- "****" - statistično značilno različno v primerjavi s kontrolo ($p < 0,001$).

Absolutne mase kalic vrste *L. sativa* v posameznih petrijevkah se glede na tretma precej razlikujejo (slika 11A). Absolutna masa pri FE25 sicer ni različna v primerjavi s kontrolo, je pa celotno zaporedje mas naslednje: H₂O ≈ FE25 > FE5 > FT25 > FT5, pri čemer povprečna vrednost slednje ne dosega polovice povprečne vrednosti kontrole. Le zadnja dva tretmaja sta statistično značilno različna v primerjavi s kontrolo (slika 11A). Izračun relativnih mas posamezne kalice v posamezni petrijevki pokaže nekoliko drugačno sliko. Razporeditev tretiranj z različnimi izvlečki je zelo podobna kot na sliki 11A, drugačna pa je postavitev kontrolnih relativnih mas. Njihova povprečna vrednost je tako med FE25 in FE5; FT25 in FT5 sta spet statistično značilno manjši od kontrole.

Razmerje med kontrolo in tretmajem FE25 na sliki 11B ni pričakovano, saj kaže, da so posamezne kalice težje, kar je v nasprotju z opaznimi razlikami v dolžini korenin in statistično značilno zakasnjem razvoju kalic (slika 1C). Morda večji delež mase predstavljajo klični listi, poleg tega dopuščamo možnost vpliva ostankov vode na kalicah po osuševanju na filtrirnem papirju. Morda bi suha masa pokazala drugačna razmerja med tretmaji.

4.4 VSEBNOST MALONDIALDEHIDA (MDA)



Slika 12: Vsebnost malondialdehida (MDA) v kalicah vrste *Lactuca sativa*
Graf prikazuje vsebnost MDA pri kontroli oz. posameznih tretmajih. Vsak simbol prikazuje vsebnosti MDA v kalicah ene petrijevke, črta označuje povprečno vrednost (N=4). Simbol "*" označuje statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolo (p<0,05).

Statistična analiza vsebnosti MDA je pokazala značilne razlike ($p < 0,05$) med kontrolo in FE25 (slika 12) ter med FE25 in FT5 (ni prikazano).

Pri FT5 so se vrednosti MDA v kalicah posameznih petrijevok v primerjavi z ostalimi tretmaji med sabo zelo razlikovale. Po ponovnem pregledu rezultatov se je izkazalo, da so lahko te razlike povezane z odstotkom kalic, ki so se razvile do druge faze, to je razprtja kličnih listov, ali pa z različnimi masami vzorcev, ki smo ji uporabili za analizo. Pri ostalih tretmajih je bil delež kalic z razprtimi kličnimi listi glede na vse kalice med posameznimi petrijevokami relativno primerljiv, medtem ko je bil pri FT5 v razponu 54–96 %. Tudi uporabljene mase so bile pri ostalih tretmajih zelo podobne - $1 \text{ g} \pm 0,009 \text{ g}$, medtem ko sta pri FT5 v dveh petrijevokah z nizkim deležen bolj razvitih kalic masi znašali le 0,081 oz. 0,045 g, saj več materiala ni bilo na voljo (slika 11A). Petrijevke z več manj razvitimi kalicami in nižjimi absolutnimi masami pomenile tudi nižje vsebnosti MDA.

Sklepamo, da različne uporabljene mase z enakim volumnom reagenta vplivajo na količino nastalega MDA, čeprav smo predvidevali, da smo reagenta dodajali v prebitku in se masa upošteva pri izračunu količine MDA iz absorpcije in ekstinkcijskega koeficienta.

5 RAZPRAVA

5.1 KALITVENI TEST

Končni odstotki skaljenih semen pri kontroli so bili pri vseh vrstah relativno visoki (98–100 %), čeprav smo jih nabrali 1,5–2 leti preden smo jih uporabili za kalitveni test. Izjema je bila vrsta *Erigeron annuus*, pri kateri je bil odstotek nekoliko nižji (83 %), vendar so Yong et al. (2015), ki so kalili semena brez tretiranja z alelopatskimi snovmi le 3 mesece po zrelosti v podobnih razmerah pred in med testom, zabeležili celo slabšo kaljivost ($\approx 65\%$), čeprav je poskus trajal dlje - 36 dni. Iz zapisanih metod ni razvidno, ali so izbirali vsako seme posebej glede na izgled, kot smo naredili mi, da bi izločili jalova semena, zato lahko predvidevamo, da je to možen vzrok za nižji končni odstotek skaljenih semen. Rastlinske vrste, ki se pojavljajo v zgodnjih sukcesijskih stopnjah, recimo po večjih motnjah, v splošnem nimajo izrazito kratkoživih semen, čeprav so relativno majhna (Fenner in Thompson, 2005: 143). Take so tudi naše tarčne vrste, zato dobra kaljivost ni presenetljiva.

Analiza rezultatov kalitvenega testa (kalitev in razpiranje kličnih listov) je pokazala precejšnje razlike med tarčnimi vrstami. Končni odstotek skaljenih semen pri tretmajih z izvlečki obeh vrst ajde pri nobeni od izbranih vrst ni bil bistveno drugačen od kontrole, kar kaže na to, da so bila semena sposobna kaliti (prodreti skozi semensko ovojnico) kljub različnim pogojem v okolju in ne glede na to, ali so ti kasneje kalici škodovali. Kalček (in torej radikula) v začetku raste predvsem na račun podaljševanja celic zaradi privzema vode in ne na račun delitve celic, ki bi zahtevali nemoteno delovanje metabolizma (Bewley in Black, 1985: 125). V semenu so tudi zaloge sladkorjev in mineralov, ki jih kalček izkorišča v prvih dneh/tednih. Vpliv pomanjkanja mineralov v večji meri postaja očiten po približno 9 dneh, kar sta Fenner in Lee (1989, cit. po Fenner in Thompson, 2005: 154) raziskala pri vrstah *Lolium perenne* in *Trifolium repens*.

Tako kot v našem poskusu, so tudi Chiapusio et al. (1997) končnemu odstotku kaljivosti semen pripisali zelo slabo občutljivost za oceno alelopatskega vpliva snovi in za to oceno kot znak predlagali uporabo hitrosti kaljenja, kar smo mi na podoben način pokazali s preživetvenim testom. Na hitrost kalitve na začetku, če seme ni dormantno, najbolj vpliva hitrost privzemanja vode, ki je odvisno od vodnega potenciala struktur, ki so vpletene v kalitev, ter okolja. Tako lahko kalitev teoretično zakasni tudi le vodni potencial izvlečka, ki je nižji kot tisti destilirane vode, in ne nujno lastnosti snovi v raztopini. Zaradi razlike v vodnih potencialih voda pri tretmajih počasneje difundira v seme in se tudi metabolni procesi reaktivirajo počasneje. Kasnejši privzem vode v kalico je prav tako počasnejši,

zaradi česar se korenine počasneje podaljšujejo. V raziskavah, kjer so raziskovali alelopatski vpliv izvlečkov rastlin (*Dittrichia viscosa* in *D. graveolens*) na kalitev solate in so ob tem posebej preverili tudi le vpliv znižanega vodnega potenciala s polietilen glikolom (PEG), slednjemu niso mogli pripisati učinka - ne glede na končni odstotek skaljenih semen ne na rast korenin ali poganjkov (Omezzine et al., 2011a, Omezzine et al., 2011b). V drugi raziskavi je Golisz (2004, cit. po Golisz et al., 2007b) izmerila osmotski potencial in viskoznost 1,25–10 % koncentracij izvlečka navadne ajde in zaradi majhnih razlik v vrednostih teh znakov pri različnih koncentracijah temu ni pripisala opaznejšega učinka. Večje razlike so se pojavile v pH vrednosti, ki je nižja v bolj koncentriranem izvlečku, vendar ločen vpliv nobenega od treh omenjenih znakov ni bil raziskan. Kljub temu glede na izsledke omenjenih raziskav lahko z veliko verjetnostjo glavnino učinkov na kalitev naših semen pripišemo izvlečkoma obeh vrst ajd.

Glede na rezultate kalitvenega testa bi bila uporaba izvlečkov ajde uporabna predvsem za zatiranje vrste *Conyza canadensis*, najmanj pa za vrsti *Erigeron annuus* in *Solidago gigantea*. Pri vrsti *E. annuus* sta bila končna odstotka skaljenih semen pri tretiranju z 2,5 % izvlečkoma višja (90 % pri obeh izvlečkih) v primerjavi s kontrolo (83 %). Pri tretiranju s 5 % izvlečkoma je ta odstotek znašal 80 %, torej je bil nekoliko nižji kot pri kontroli. Spodbujevalnih učinkov vodnega izvlečka ajde na kalitev semen ni mogoče enostavno najti v literaturi. Edini tak primer, ki smo ga zasledili, je raziskava, ki so jo opravili Golisz et al. (2007), v kateri so različnim koncentracijam (1,25–10 %) vodnega izvlečka navadne ajde izpostavili semena 15 plevelnih vrst (vse lahko najdemo tudi v Sloveniji) ter bele gorjušice in pšenice. Kalitveni poskus je trajal 14 dni. Vpliv izvlečka je bil odvisen od tarčne vrste. Pri najbolj dovzetnih (*Capsella bursa pastoris*, *Thlaspi arvense*, *Hieracium pratense*, *Taraxacum officinale* in *Artemisia vulgaris*) so vse koncentracije znižale končni odstotek skaljenih semen, medtem ko so semena nekaterih drugih vrst bolje kalila pri vseh koncentracijah (*Rumex acetosa* – neodvisno od koncentracije) ali le pri nižjih (*Amaranthus retroflexus*, *Plantago major*, *Papaver rhoeas* in pšenica, vsi pri 1,25 %), kot pri višjih. Na ostale vrste je izvleček vplival zaviralno le ob višjih koncentracijah ali pa vpliv z njimi ni bil jasno povezan. Med naštetimi primeri kljub temu ni takega, v katerem bi koncentracija izvlečka do 2,5 % zvišala kaljivost in jo pri 5 % in 10 % znižala. Kljub relativno velikemu številu testiranih vrst za take vrste raziskavo, lahko domnevamo da bi ob povečanem obsegu vrst lahko našli še več takih, ki bi pokazale še večjo raznolikost občutljivosti na izvlečke ajd.

Kot morebitni alelopatski mehanizem zaviranja ali celo popolnega zavrtja kalitve in zgodnjega razvoja pri rastlinah, ki imajo semena z večinoma oljnimi založnimi snovmi (kamor spada tudi *Lactuca sativa*), je bila predlagana zmanjšana aktivnost encimov za razgradnjo lipidnih založnih snovi (Gniazdowska in Bogatek, 2005), prav tako je bil že

ugotovljen zaviralni vpliv nekaterih flavonoidov (tudi rutina) na delovanje izoliranih mitohondrijev, kar povzroči zmanjšano nastajanje molekul ATP in posledično manj proste energije za presnovne procese (Gniazdowska in Bogatek, 2005).

5.2 RAZVOJ KORENIN

Analiza dolžin korenin je pokazala, da so korenine bolj občutljive na dodajanje izvlečkov ajd kot prej obravnavana znaka. Večja občutljivost korenin na prisotnost alelopatskih snovi ajde v primerjavi z drugimi znaki (recimo odstotek skaljenih semen) je že bila pokazana pri testiranju z drugimi tarčnimi rastlinami, kot so *Chenopodium album*, *Amaranthus retroflexus*, *Digitaria sanguinalis*... (Uddin et al., 2011).

Čprav dolžin korenin posameznih kalic solate nismo mogli izmeriti, ker so bile pri kontroli povsem prepletene, so bile razlike v dolžinah med kontrolo in posameznimi tretmaji zelo očitne (enako kot pri ostalih tarčnih rastlinah), je pa vpliv vodnih izvlečkov listov navadne ajde na dolžino korenin solate bil že dokazan (Golisz et al., 2007a). Rezultati meritev tri dni po nastavitvi njihovega poskusa so pri 5 % izvlečku navadne ajde pokazali, da je bila rast korenin povsem zavrta, medtem ko so bile pri 2,5 % dolžine dolge v povprečju približno 12 % povprečne dolžine korenin pri kontroli. Ekstrakcijo so sicer izvedli v 24 urah in ne 3 kot mi, vendar pa so preizkušali tudi veliko nižje koncentracije izvlečka (najmanjša 0,156 %) in že pri 0,316 % so bile korenine tretiranih kalic dolge manj kot polovico v primerjavi s kontrolo.

Po našem védenju vpliv vodnega izvlečka katerekoli vrste ajde na tarčne vrste, ki smo jih izbrali mi, še ni bil raziskan, so pa Uddin et al. (2011) pokazali močan zaviralni učinek izvlečka kulture lasastih korenin (ang. "*hairy root culture*") tatarske ajde na biomaso *Conyza canadensis*. Izvlečki korenin optimiziranih kultur so bili pripravljene z metanolnim topilom v koncentracijah od 2 do 10 mg mL⁻¹. Vsi so zmanjšali suho maso *C. canadensis*, in to v večji meri, če so bile 3 tedne stare kalice poškopljene z izvlečkom, kot pa če je bil izvleček dodan že pred kalitvijo.

V nasprotju s testiranji alelopatskih učinkov vodnih izvlečkov zeli ajde, ki jih v literaturi ni veliko, je mnogo več raziskav narejenih s celokupnimi izvlečki, pripravljenimi z organskimi topili, ali le s posameznimi, kemijsko čistimi snovmi. Izvlečki, pripravljene z različnimi topili ali posamezne alelopatske snovi imajo zelo različne učinke na dolžino korenin, kar je odvisno od tarčne vrste, vrste oz. mešanice topil, časa ekstrakcije, temperature ob ekstrakciji ter specifične oz. totalne učinkovitosti alelopatske(-ih) snovi (Iqbal et al., 2002; Hinneburg in Neubert, 2005; Golisz et al., 2007a). Izvlečki navadne ajde z organskimi topili (etanol, kloroform, etil acetat itd.) kažejo veliko močnejše

negativno delovanje na podaljševanje korenin solate kot pa le celokupni vodni izvleček (Iqbal et al., 2003) in podobni izsledki se pojavljajo pri več različnih testiranih vrstah, kar je treba upoštevati pri oceni potenciala za uporabo ajde. Za naš poskus smo posušene in zmlete dele ajde zamešali v destilirano vodo in tri ure stresali na stresalniku pri sobnih pogojih. Tako smo se odločili, ker se nam glede na raznolike metode, najdene v literaturi, to zdijo najbolj naravni oz. enostavni pogoji za morebitno uporabo alelopatskih učinkov ajde - kot vgradnja biomase v prst ali za izdelavo bioherbicidov (za več glej poglavje 6 Sklepi). Hinneburg in Neubert (2005) sta opravila ekstrakcijo zeli navadne ajde v kombinacijah dveh temperatur (25 in 60 °C), dveh trajanjih ekstrakcije (2 in 24 h) ter dveh koncentracijah etanola kot topila (30 in 70 %). Izvlečkov sicer nista testirala na semenih, temveč sta med drugim analizirala vsebnosti rutina. Največ rutina je bilo v izvlečku, pripravljenem z manjšo koncentracijo etanola, pri višji temperaturi in krajšem času ekstrakcije. Nižanje temperature in podaljševanje časa ekstrakcije sta zmanjšala vsebnost rutina, kar avtorja razlagata z encimsko razgradnjo. Našim pogojem najbližja kombinacija, ki sta jo uporabila v raziskavi (30 % etanol, 25 °C in 2 h), je pomenila drugo najslabšo ekstrakcijo rutina, medtem ko bi povišanje temperature na 60 °C dalo najvišjo. Ti izsledki nakazujejo, da bi celokupni vodni izvleček, pripravljen pri višji temperaturi lahko imel večji zaviralni učinek na kalitev semen in razvoj kalic.

Glede na specifično učinkovitost in koncentracijo različnih preiskovanih alelopatskih učinkovin v ajdi, verjetno največ tega učinka v celokupnem izvlečku prispeva rutin (Golisz et al., 2007a). Ta tudi samostojno močno zavira rast korenin modelne vrste *Arabidopsis thaliana* (Hussain in Reigosa, 2014), pri čemer je dolžina korenin najbolj občutljiva za oceno alelopatskega vpliva v primerjavi z drugimi znaki. Fenolne kisline, ki jih je več tudi v ajdi (galična, klorogena, ferulična (Golisz et al., 2007a)), dokazano povečujejo prepustnost membran, omejujejo privzem ionov (in povzročajo dodatno izgubo teh iz celic) in s tem zmanjšajo tako razpoložljivost mineralov in posredno vode za rast in razvoj rastlin (Einhellig, 2004; Gniazdowska in Bogatek, 2005), vendar v našem primeru glede na popoln propad ali celo odmrtnje korenin to verjetno ni edini vzrok razlik v dolžinah.

Pri vseh izbranih tarčnih vrstah smo opazili rjavenje koreninskega vršička, tako pri 2,5 % koncentracijah kot, še bolj izrazito, pri 5 % koncentracijah izvlečkov obeh vrst ajde, kjer je bila vzporedno s tem tudi rast oz. podaljševanje korenine povsem zavrta. Z molekularnimi in mikroskopskimi metodami so Bais et al. (2003) na koreninah modelne vrste *Arabidopsis thaliana* pokazali, da se ob izpostavitvi nekaj dni starih kalic nekaterim alelopatskim snovem v roku nekaj minut do ur začnejo kopičiti reaktivne kisikove spojine. Te preko signalizacijskih poti povzročijo, da se začnejo prepisovati geni, ki so sicer vključeni v odzive ob napadu patogenov ali uporabi herbicidov (Lovett 1989, cit. po Tesio in Ferrero 2010; Bais et al., 2003; Golisz et al., 2008). V končni fazi celice doživijo apoptozo, najprej

tiste v meristemu, torej delečem se delu korenine, potem pa se propadanje kaskadno pomika navzgor po korenini (Bais et al., 2003).

Poleg samega rjavenja koreninskega vršička smo pri večini tretiranih kalicev, ne glede na tarčno rastlinsko vrsto, opazili tudi izgubo zaznavanja sile težnosti - vršiček je izgubil stik s podlago in se v določenih primerih tudi zavihal navzgor. Wasteneys (2000) je v svojem preglednem članku povzel tako starejša predvidevanja kot novejše dokaze, da so za rast v smer sile težnosti (gravitropizem) odgovorni predvsem elementi citoskeleta, na razporeditev katerih pa pogosto vplivajo avksini. Katere snovi v izvlečkih ajd onemogočajo zaznavanje težnosti, ni znano, so pa Levizou et al. (2002) na koreninah solate pokazali, da tretiranje z izvlečki vrste *Dittrichia viscosa* močno vpliva na število in zgradbo statocit, celic, ki z razporeditvijo amiloplastov igrajo ključno vlogo pri zaznavanju sile težnosti. Statocite so bile ali povsem odsotne v tretiranih koreninah ali pa redke, poleg tega amiloplasti v njih niso bili zbrani na eni (spodnji) strani celic, temveč so bili enakomerno razporejeni okrog jedra, zaradi česar so se korenine zavihale navzgor.

Prizadete korenine, ki ne morejo normalno opravljati svojih nalog, vplivajo na razvoj in vitalnost/zdravje celotne rastline. Krajše korenine z malo ali brez koreninskih laskov in zmožnosti zaznavanja sile težnosti zmanjšajo sposobnost tekmovanja kalicev z drugimi, neprizadetimi rastlinami (Levizou et al., 2002; Hierro in Callaway, 2003). Za določitev časa, koliko v rasti zaostane tretirana oz. občutljiva rastlina v primerjavi z drugimi, so potrebni poljski poskusi. Korenine s povsem odmrlim vršičkom sicer sploh ne morejo opravljati svojih nalog, predvsem preskrbeti rastline z vodo in mineralnimi snovmi, zato take rastline nimajo možnosti za dolgoročno preživetje.

5.3 VSEBNOST MALONDIALDEHIDA (MDA)

MDA je pokazatelj poškodovanosti membran zaradi nastajanja reaktivnih kisikovih spojin (ang. "*reactive oxygen species*" - ROS), ki med drugim povzročajo peroksidacije lipidov (Schopfer et al., 2001; Cai et al., 2011). To se sicer dogaja tudi ob normalnem metabolizmu in je nujno za določene procese (so sekundarni sporočevalci pri uravnavanju celičnega metabolizma). Določeni stresni dejavniki, med katere lahko štejemo tudi alelopatske snovi, pa preko vpletanja v elektronske transportne verige povečajo nastajanje ROS (Weir, 2004). Ker zavirata rast oz. celo propad korenin v našem poskusu nakazuje rast v stresnem okolju, ki se pogosto odraža v povišanem nastajanju ROS, smo pričakovali močne poškodbe membran in posledično višje vrednosti MDA pri tretiranju z 2,5 % izvlečkoma obeh vrst ajde v primerjavi s kontrolo in še višje odstopanje v primeru uporabe 5 % izvlečkov.

Skladno s tretiranjem solate z zaviralnimi izvlečki nekaterih afriških dreves in juglonom, tretiranjem nekaterih poljščin z izvlečkom vrste *Hemistepta lyrata*, ali uporabo herbicida na čebulo, *Allium cepa*, (da je vpliv zaviralen, se kaže v kaljivosti, dolžini korenin in kalice...) se je povečala količina MDA v tretiranih rastlinah v primerjavi s kontrolo (Gao et al., 2009; Çavuşoğlu et al., 2012; Sunmonu in Van Staden, 2013; Babula et al., 2014). Odziv pa je lahko tudi obraten znotraj iste vrste med različnimi sortami, torej da je rast nekaterih sort spodbujena, drugih pa zavirna, kar so Altikat et al. (2013) ugotovili pri dveh sortah melon. Toda v tem primeru so kalice rasle bolje od kontrolnih, kar se v naši raziskavi ni zgodilo.

Naši rezultati kažejo le na morebitno koncentracijsko odvisnost, saj je bila vsebnost MDA večja pri izpostavitvi višji koncentraciji izvlečka, vendar so bile te razlike statistično neznačilne glede na kontrolni tretma. Ravno tako ni bilo razlik v učinkih tatarske in navadne ajde. Eden od razlogov za tako nespecifičen odgovor je lahko nizka starost rastlin (samo 12 dni), ko intenzivno potekajo reakcije po kalitvi. Poleg tega bi bilo smiselno ločiti korenine od poganjkov, saj so vrednosti MDA v različnih tkivih/organih različne - raziskavi, ki so jo opravili Mahmoudi et al. (2010), so izmerili 10-krat višje vsebnosti v poganjkih solate kot v koreninah. S skupno analizo vsega materiala se tako lahko poveča metodološka napaka, vendar smo se zaradi premalo materiala morali tako odločiti.

5.4 PRESOJA HIPOTEZ

1. Navadna in tatarska ajda imata negativni alelopatski učinek na kalitev in zgodnji razvoj izbranih invazivnih tujerodnih rastlinskih vrst.

Prvo hipotezo lahko v večini potrdimo. Predvidevali smo zaviranje tako kalitve kot zgodnjega razvoja kalic s strani obeh vrst ajd, vendar se je kot najbolj zaviralen pokazal učinek na dolžino korenin tarčnih rastlin. Rezultati, zbrani v nalogi, so sicer zelo mozaični in v preseku z redkimi res zanesljivimi trendi, kar pa glede na število vrst uporabljenih rastlin (7), 2 koncentraciji izvlečkov, 2 vrsti ajde in pa število izbranih znakov (5), ni presenetljivo.

2. Tatarska ajda ima močnejše negativno alelopatsko delovanje v primerjavi z navadno ajdo.

Drugo hipotezo lahko potrdimo na podlagi rezultatov večine izbranih znakov. Pri večini tarčnih vrst je tatarska ajda nekoliko bolj zavirna končna odstotka kalitev in kalic v 2. fazi, medtem ko rezultati dolžin korenin dosledno kažejo močnejši vpliv tatarske ajde v primerjavi z izvlečkom navadne ajde enake koncentracije.

5.5 PREDLOGI IZBOLJŠAV

Med poskusom smo opazili več dejavnikov, ki vplivajo na rezultate in bi jih v primeru ponovnega testiranja spremenili.

1. Ob testiranju vplivov izvlečkov na kalitev in rast kalic bi bilo primerno izločiti morebitni vpliv drugih dejavnikov v izvlečku kot le alelopatskih snovi z vključitvijo še ene kontrole, kjer voda ne bi bila destilirana, temveč s podobnimi vrednostmi pH in osmolarnosti kot izvlečki.
2. Treba bi bilo izboljšati metodo inkubacije petrijevke s semeni, s čimer bi zmanjšali nihanje koncentracij izvlečkov zaradi izhlapevanja vode.
3. Testirali smo zgolj dve različni koncentraciji izvlečkov obeh ajd. Da bi dobili bolj natančno sliko alelopatskega vpliva na kalitev in razvoj kalic, bi morali testirati več različnih koncentracij (do 5 %, ki se je izkazal za zelo škodljivega).
4. V navezavi na zgornji predlog bi bilo smiselno ugotoviti tudi, kakšen razpon koncentracij izvlečkov lahko pričakujemo v naravi glede na različne vremenske razmere.
5. Zanimivo bi bilo tudi ugotoviti, ali in koliko kalic posamezne vrste pri posamezni koncentraciji izvlečkov bi se uspelo razviti do faze cvetenja, kar bi bilo možno raziskati le v prsti.
6. Najbolj uporabni bi seveda bili rezultati poskusov, izvedenih na prostem, tako na že zraslih površinah kot na relativno praznih, nedavno motenih zemljiščih, kjer bi na sproščanje alelopatskih snovi in njihov obstoj vplivali vsi dejavniki, za katere je bil vpliv že ugotovljen.

6 SKLEPI

Glede na dobljene rezultate lahko zaključimo, da imata tako navadna kot tatarska ajda potencial za zatiranje invazivnih tujerodnih rastlin. V ta namen bi teoretično lahko ta potencial izkoristili na dva načina: (i) s sejanjem ajde na prazna območja, dovzetna za naselitev invazivnih rastlin (preventivno) ali na že porasla območja po košnji ali drugem mehanskem odstranjevanju invazivnih tujerodnih vrst (kurativno), in (ii) z uporabo zelenih delov ajde kot bioherbicid (kurativno), ki bi ob pravilni uporabi močno zavrla rast in razvoj invazivnih rastlin ter tako olajšali njihovo odstranjevanje in/ali nadzor na druge načine.

Da bi neka snov postala tudi potrjen herbicid, je treba o njej pridobiti veliko informacij, kot so učinkovita koncentracija, kemična struktura, mesto delovanja, trajanje nespremenjene strukture v tleh, morebitni vplivi na netarčne organizme, tudi človeka, in dobičkonosnost proizvodnje (Soltys et al., 2013).

Zaviranje rasti invazivnih tujerodnih vrst s sejanjem ajde kljub očitnim zaželjenim učinkom kot posledico alelopatskega delovanja in močne tekmovalnosti s senčenjem (Tesio in Ferrero, 2010) ni nujno dolgoročno perspektivno. Močan negativen alelopatski učinek je med drugim posledica prostorsko ločenega evolucijskega razvoja (Callaway in Ashehoug, 2000), ki bi ob skupni rasti na nekem območju postal hiter zaradi nenadnega močnega evolucijskega pritiska. V nekaj letih bi se lahko populacije invazivnih rastlin z naravnim izborom prilagodile na prisotnost ajde in bi se njen potencial za zatiranje močno znižal (Callaway et al., 2005).

Iz zgoraj navedenih razlogov kot tudi sicer je na degradiranih območjih zaželjena naselitev domorodnih vrst. Do te lahko pride po naravni poti ali namensko z zasejevanjem. Sočasna uporaba ajde in mešanic semen domorodnih rastlin bi zahtevala temeljito pripravo, saj ajda zavira rast in razvoj mnogih takih rastlin (pogosto obravnavanih kot pleveli), na primer *Stellaria media*, *Echinochloa crus-galii*, *Artemisia vulgaris* itd. (Xuan in Tsuzuki, 2004).

Naša raziskava je tako nakazala potencialno uporabo ajde v naravovarstvene namene, vendar bi bilo do končne stopnje dejanske uporabe treba raziskati še veliko zgoraj omenjenih vidikov.

7 VIRI

- Abhilasha D., Quintana N., Vivanco J., Joshi J. 2008. Do allelopathic compounds in invasive *Solidago canadensis* s.l. restrain the native European flora? *Journal of ecology*, 96, 5: 993–1001
- Acar R., Ünver A., Arslan D., Özcan M.M., Günes A. 2011. Effect of plant parts and harvest period on rutin, quercetin, total phenol contents and antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Möench) cultivated in Turkey. *Asian journal of chemistry*, 23, 7: 3240–3242
- Altikat S., Terzi I., Kuru H.I., Kocacaliskan I. 2013. Allelopathic effects of juglone on growth of cucumber and muskmelon seedlings with respect to antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation. *Journal of environmental protection and ecology*, 14, 3A: 1244–1253
- Andersen M.C. 1993. Diaspore morphology and seed dispersal in several wind-dispersed Asteraceae. *American journal of botany*, 80, 5: 487–492
- Babula P., Vaverkova V., Poborilova Z., Ballova L., Masarik M., Provaznik I. 2014. Phytotoxic action of naphthoquinone juglone demonstrated on lettuce seedling roots. *Plant physiology and biochemistry*, 84: 78–86
- Bačič M. 2008. Enoletna suholetnica *Erigeron annuus*, Informativni list 6: 2 str.
<http://www.tujerodne-vrste.info/informativni-listi/INF6-enoletna-sucholetnica.pdf> (12. avg. 2015)
- Bačič M., Frajman B. 2009. Metode odstranitve in nadzora tujerodnih rastlin. V: *Tujerodne vrste - priročnik za naravovarstvenike*. Kus Veenvliet J. (ur.). Grahovo, Zavod Symbiosis: 39–43
- Bais H.P., Vepachedu R., Gilroy S., Callaway R.M., Vivanco J.M. 2003. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. *Science*, 301, 5638: 1377–1380
- Bewley J.D., Black M. 1985. *Seeds: Physiology of development and germination*. New York, Plenum Press: 347 str.
- Bewley J.D. 1997. Seed germination and dormancy. *The plant cell*, 9: 1055–1066
- Bohren C. 2011. Exotic weed contamination in Swiss agriculture and the non-agricultural environment. *Agronomy for sustainable development*, 31, 5: 319–327
- Brust J., Claupein W., Gerhards R. 2014. Growth and weed suppression ability of common and new cover crops in Germany. *Crop protection*, 63: 1–8

- Caamal-Maldonado J.A., Jiménez-Osornio J.J., Torres-Barragán A., Anaya A.L. 2001. The use of allelopathic legume cover and mulch species for weed control in cropping systems. *Agronomy journal*, 93: 27–36
- Cai F., Mei L.J., An X.L., Gao S., Tang L., Chen F. 2011. Lipid peroxidation and antioxidant responses during seed germination of *Jatropha curcas*. *International journal of agriculture and biology*, 13, 1: 25–30
- Callaway R.M., Aschehoug E.T. 2000. Invasive plants versus their new and old neighbours: A mechanism for exotic invasion. *Science*, 290, 5491: 521–523
- Callaway R.M., Ridenour W.R., Laboski T., Weir T., Vivanco J.M. 2005. Natural selection for resistance to the allelopathic effects of invasive plants. *Journal of ecology*, 93: 576–583
- Çavuşoğlu K., Yalçın E., Türkmen Z., Yapar K., Sağır S. 2012. Physiological, anatomical, biochemical, and cytogenetic effects of thiamethoxam treatment on *Allium cepa* (Amaryllidaceae) L. *Environmental toxicology*, 27, 11: 635–643
- Chiapusio G., Sánchez A.M., Reigosa M.J., González L., Pellissier F. 1997. Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on the germination process?. *Journal of chemical ecology*, 23, 11: 2445–2453
- Debeaujon I., Lepiniec L., Pourcel L., Routaboul J.M. 2007. Seed coat development and dormancy. V: Seed development, dormancy and germination. Bradford K., Nonogaki H. (ur.). Oxford, Blackwell Publishing: 25–49
- Einhellig F.A. 2004. Mode of allelochemical action of phenolic compounds. V: Allelopathy: chemistry and mode of action of allelochemicals. Macías F.A., Galindo J.C.G., Molinillo J.M.G., Cutler H.G. (ur.). Boca Raton, CRC Press: 217–238
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. Buckwheat (DimensionMember).
<http://data.fao.org/ref/f8bd2c52-d721-44d3-81f9-bfa4aa70e89e.html?version=1.0> (21. jul. 2015)
- Gao X.X., Li M., Gao Z.J., Li C.S., Sun Z.W. 2009. Allelopathic effects of *Hemistepta lyrata* on the germination and growth of wheat, sorghum, cucumber, rape, and radish seeds. *Weed biology and management*, 9, 3: 243–249
- Gniazdowska A., Bogatek R. 2005. Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. *Acta physiologiae plantarum*, 27, 3B: 395–407
- Golisz A., Lata B., Gawronski S.W., Fujii Y. 2007a. Specific and total activities of the allelochemicals identified in buckwheat. *Weed biology and management*, 7: 164–171

- Golisiz A., Gawronska H., Gawronski S.W. 2007b. Influence of buckwheat allelochemicals on crops and weeds. *Allelopathy journal*, 19, 2: 337–350
- Golisiz A., Sugano M., Fujii Y. 2008. Microarray expression profiling of *Arabidopsis thaliana* L. in response to allelochemicals identified in buckwheat. *Journal of experimental botany*, 59, 11: 3099–3109
- Guo S.L., Jiang H.W., Fang F., Chen G.Q. 2009. Influences of herbicides, uprooting and use as cut flowers on sexual reproduction of *Solidago canadensis*. *Weed research*, 49, 3: 291–299
- Gurevitch J., Scheiner S.M., Fox G.A. 2002. *The ecology of plants*. Sunderland, Sinauer Associates: 523 str.
- Hierro J.L., Callaway R.M. 2003. Allelopathy and exotic plant invasion. *Plant and soil*, 256: 29–39
- Hierro J.L., Maron J.L., Callaway R.M. 2005. A biogeographical approach to plant invasions: the importance of studying exotics in their introduced and native range. *Journal of ecology*, 93: 5–15
- Hinneburg I., Neubert R.H.H. 2005. Influence of extraction parameters on the phytochemical characteristics of extracts from buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) herb. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53: 3–7
- Hiradate S. 2004. Isolation strategies for finding bioactive compounds: specific activity vs. total activity. *Abstracts of papers of the American chemical society*, 227: U28–U28
- Holt J.S. 2009. Management of invasive terrestrial plants. V: Invasive species management. *Handbook of principles and techniques*. Clout M.N., Williams P.A. (ur.). Oxford, Oxford University Press: 126–140
- Hopkins A. 2014. Logrank Test. *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118445112.stat06881/abstract> (12. avg. 2015)
- Hosseinzadeh H., Nassiri-Asl M. 2014. Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. *Journal of endocrinological investigation*, 37: 783–788
- Hussain M.I., Reigosa M.J. 2014. Evaluation of herbicide potential of sesquiterpene lactone and flavonoid: impact on germination, seedling growth indices and root length in *Arabidopsis thaliana*. *Pakistan journal of botany*, 46, 3: 995–1000
- Inderjit, Nilson E.T. 2003. Bioassays and field studies for allelopathy in terrestrial plants: Progress and problems. *Critical reviews in plant sciences*, 22, 3–4: 221–238

- Inderjit, Wardle D.A., Karban R., Callaway R.M. 2011. The ecosystem and evolutionary contexts of allelopathy. *Trends in ecology and evolution*, 26, 12: 655–662
- Iqbal Z., Hiradate S., Noda A., Isojima S.I., Fujii Y. 2002. Allelopathy of buckwheat: Assessment of allelopathic potential of extract of aerial parts of buckwheat and identification of fagomine and other related alkaloids as allelochemicals. *Weed biology and management*, 2, 2: 110–115
- Iqbal Z., Hiradate S., Noda A., Isojima S.I., Fujii Y. 2003. Allelopathic activity of buckwheat: isolation and characterization of phenolics. *Weed science*, 51, 5: 657–662
- Jogan N., Kus Veenvliet J. 2009. Tujerodne vrste v Sloveniji. V: Tujerodne vrste - priročnik za naravovarstvenike. Kus Veenvliet J. (ur.). Grahovo, Zavod Symbiosis: 14–19
- Jogan N., Bačič M., Strgulc Krajšek S. 2012. Tujerodne in invazivne rastline v Sloveniji. V: Neobiota Slovenije, končno poročilo projekta. Jogan N., Bačič M., Strgulc Krajšek S. (ur.): Ljubljana, Oddelek za biologijo BF UL: 161–182
- Kabuce, N. and Priede, A. (2010). NOBANIS – Invasive Alien Species Fact Sheet – *Solidago canadensis*.
<https://www.nobanis.org/globalassets/speciesinfo/s/solidago-canadensis/solidago-canadensis.pdf> (12. avg. 2015)
- Kalinova J., Triska J., Vrchotova N. 2006. Distribution of Vitamin E, Squalene, Epicatechin, and Rutin in Common Buckwheat Plants (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Journal of agricultural and food chemistry*, 54: 5330–5335
- Kalinova J., Vrchotova N., Triska J. 2007. Exudation of allelopathic substances in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Journal of agricultural and food chemistry*, 55: 6453–6459
- Khanh T.D., Chung M.I., Xuan T.D., Tawata S. 2005. The exploitation of crop allelopathy in sustainable agricultural production. *Journal of agronomy and crop science*, 191: 172–184
- Kleinbaum D.G., Klein M. 2005. *Survival analysis: A self-learning text*. 2nd Edition. New York, Springer: 590 str.
- Kreft I., Chang K.J., Choi Y.S., Park C.H. 2003. *Ethnobotany of buckwheat*. Seoul, Jinsol Publishing: 154
- Kreft I., Fabjan N., Yasumoto K. 2006. Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products. *Food chemistry*, 98, 3: 508–512
- Kreft S., Janeš D., Kreft I. 2013. The content of fagopyrin and polyphenols in common and tartary buckwheat sprouts. *Acta pharmaceutica*, 63: 553–560

- Kus Veenvliet J., Veenvliet P. 2009. Uvod. V: Tujerodne vrste - priročnik za naravovarstvenike. Kus Veenvliet J. (ur.). Grahovo, Zavod Symbiosis: 1–12
- Lamarque L.J., Delzon S., Lortie C.J. 2011. Tree invasions: a comparative test of the dominant hypotheses and functional traits. *Biological invasions*, 13: 1969–1989
- 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: 152–157
- Li S.Q., Zhang Q.H. 2001. Advances in the development of functional foods from buckwheat. *Critical reviews in food science and nutrition*, 41, 6: 451–464
- Lonsdale W.M. 1999. Global patterns of plant invasions and the concept of invasibility. *Ecology*, 80, 5: 1522–1536
- Mahmoudi H., Huang J., Gruber M.Y., Kaddour R., Lachaâl M., Ouerghi Z., Hannoufa A. 2010. The impact of genotype and salinity on physiological function, secondary metabolite accumulation, and antioxidative responses in lettuce. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58, 8: 5122–5130
- McNair J.N., Sunkara A., Frobish D. 2012. How to analyse seed germination data using statistical time-to-event analysis: non-parametric and semi-parametric methods. *Seed science research*, 22, 2: 77–95
- Monteiro C., Sato C., Pinho S., Oliveira H., Pedrosa T., Dias M.C. 2012. Cadmium-induced cyto- and genotoxicity are organ-dependent in lettuce. *Chemical research in toxicology*, 25, 7: 1423–1434
- Navia E.A., Ávila R.A., Daza E.E., Restrepo E.F., Romero H.M. 2014. Assessment of tolerance to bud rot in oil palm under field conditions. *European journal of plant pathology*, 140, 4: 711–720
- Ni G.Y., Zhao P., Huang Q.Q., Hou Y.P., Zhou C.M., Cao Q.P., Peng S.L. 2012. Exploring the Novel Weapons Hypothesis with invasive plant species in China. *Allelopathy journal*, 29, 2: 199–214
- Nikolić T. 2013. *Sistematska botanika: Raznolikost i evolucija biljnog svijeta*. 1. izd. Zagreb, Alfa: 871
- Nishida N., Tamotsu S., Nagata N., Saito C., Sakai A. 2005. Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. *Journal of chemical ecology*, 31, 5: 1187–1203

- Nonogaki H., Chen F., Bradford K.J. 2007. Mechanisms and genes involved in germination *sensu stricto*. V: Seed development, dormancy and germination. Bradford K., Nonogaki H. (ur.). Oxford, Blackwell Publishing: 264–304
- Norsworthy J.K. 2004. Small-grain cover crop interaction with glyphosate-resistant corn (*Zea mays*). Weed technology, 18, 1: 52–59
- Ohnishi O. 1998. Search for the wild ancestor of buckwheat: I. Description of new *Fagopyrum* (Polygonaceae) species and their distribution in China and the Himalayan hills. *Fagopyrum*, 15: 18–28
- Ohnishi O. 2004. On the origin of cultivated buckwheat. V: Advances in buckwheat research. Proceedings of the 9th International symposium on buckwheat. Faberová I., Dvořáček V., Čepková P., Hon I., Holubec V., Stehno Z. (eds.). Praga, Research institute of crop production: 16–21
- Omezzine F., Ladhari A., Rinez A., Haouala R. 2011a. Allelopathic potential of *Inula graveolens* on crops and weeds. *Allelopathy journal*, 28, 1: 63–76
- Omezzine F., Rinez A., Ladhari A., Farooq M., Haouala R. 2011b. Allelopathic potential of *Inula viscosa* against crops and weeds. *international journal of agriculture & biology*, 13: 841–849
- Perry L.G., Cronin S.A., Paschke M.W. 2009. Native cover crops suppress exotic annuals and favor native perennials in a greenhouse competition experiment. *Plant ecology*, 204, 2: 247–259
- Rac I. 2013. Alelokemikalije in mehanizmi njihovega delovanja v kmetijstvu: diplomski projekt. Ljubljana, samozaložba: 20 str.
- Reigosa M.J., Sánchez-Moreiras A., González L. 1999. Ecophysiological approach in allelopathy. *Critical reviews in plant sciences*, 18, 5: 577–608
- Salisbury F.B., Ross C.W. 1992. *Plant physiology* 4th ed. Belmont, Wadsworth Publishin Company: 682 str.
- Salvamani S., Gunasekaran B., Shaharuddin N.A., Ahmad S.A., Shukor M.Y. 2014. Antiatherosclerotic effects of plant flavonoids. *BioMed research international*, 2014: 1–11
- Schopfer, P., Plachy C., Frahy G. 2001. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. *Plant physiology*, 125: 1591–1602

- da Silva C.V., de Mesquita L.X., Maracajá P.B., Soto-Blanco B. 2010. Toxicity of *Mimosa tenuiflora* pollen to Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.). *Acta scientiae veterinariae*, 38, 2: 161–163
- Soltys D., Krasuska U., Bogatek R., Gniazdowska A. 2013. Allelochemicals as bioherbicides – Present and perspectives V: Herbicides – current research and case studies in use. Price A.J., Kelton J.A. (ur.), InTech: 517–542
<http://www.intechopen.com/books/herbicides-current-research-and-case-studies-in-use> (16. avg. 2015)
- Stojilkovski K., Kočevar Glavač N., Kreft S., Kreft I. 2013. Fagopyrin and flavonoid contents in common, Tartary, and cymosum buckwheat. *Journal of food composition and analysis*, 32: 126–130
- Stratton D.A. 1992. Life-cycle components of selection in *Erigeron annuus*: I. Phenotypic selection. *Evolution*, 46, 1: 92–106
- Strgulc Krajšek, S. 2008. Kanadska zlata rozga *Solidago canadensis*, Informativni list 5a: 4 str.
<http://www.tujerodne-vrste.info/informativni-listi/INF5a-kanadska-zlata-rozga.pdf> (12. avg. 2015)
- Sunmonu T.O., Van Staden J. 2014. Phytotoxicity evaluation of six fast-growing tree species in South Africa. *South African journal of botany*, 90: 101–106
- Tang W., Kuang J., Qiang S., 2013. Biological control of the invasive alien weed *Solidago canadensis*: combining an indigenous fungal isolate of *Sclerotium rolfsii* SC64 with mechanical control. *Biocontrol science and technology*, 23, 10: 1123–1136
- Tesio F., Ferrero A. 2010. Allelopathy, a chance for sustainable weed management. *International journal of sustainable development & world ecology*, 17, 5: 377–389
- Tkalec M. 2007. Biokemijski pokazatelji toksičnosti. V: Metode u molekularnoj biologiji. Ambriović Ristov A. (gl. ur.). Zagreb, Institut Ruđer Bošković: 900–904
- Uddin M.R., Li X., Won O.J., Park S.U., Pyon J.Y. 2012. Herbicidal activity of phenolic compounds from hairy root cultures of *Fagopyrum tataricum*. *Weed research*, 52: 25–33
- Walker E.A., Herrman J.M., Kollmann J. 2015. Grassland restoration by seeding: seed source and growth form matter more than density. *Applied vegetation science*, 18, 3: 368–378
- Wasteneys G.O. 2000. The cytoskeleton and growth polarity. *Current opinion in plant biology*, 3: 503–511

- Weaver S.E. 2001. The biology of canadian weeds. 115. *Conyza canadensis*. Canadian journal of plant science, 81: 867–875
- Weir T.L., Park S.W., Vivanco J.M. 2004. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. Current opinion in plant biology, 7: 472–479
- Wijngaard H.H., Arendt E.K. 2006. Buckwheat. Cereal chemistry, 83, 4: 391–401
- Xuan T.D., Tsuzuki E. 2004. Allelopathic plants: Buckwheat (*Fagopyrum* spp.). Allelopathy journal, 13, 2: 137–148
- Yong X.H., Liu J.H., Li Z., Du S.F., Zhang Z.W., Meng X.F., Wu X.J., Wang Y.J. 2015. Maternal Mowing effect on seed traits of an invasive weed, *Erigeron annuus*, in farmland. Sains malaysia, 44, 3: 347–354
- Yuan Y., Wang B., Zhang S., Tang J., Tu C., Hu S., Yong J.W.H., Chen X. 2013. Enhanced allelopathy and competitive ability of invasive plant *Solidago canadensis* in its introduced range. Journal of plant ecology: 1–11
- Zou L., Santanen A., Tein B., Stoddard F.L., Mäkela P.S.A. 2014. Interference potential of buckwheat, fababean, oilseed hemp, vetch, white lupine and caraway to control couch grass weed. Allelopathy journal, 33, 2: 227–236

ZAHVALA

Najprej bi se rad zahvalil svoji mentorici Simoni Strgulc Krajšek za stalno dostopnost, hitro pomoč in pregledovanje naloge ter stalno prijaznost in dobrovoljnost, zaradi katerih sta bila tako eksperimentalni del kot pisanje bolj sproščena in bolj zabavna.

Na tem mestu gre zahvala tudi vsem zaposlenim v skupinah za splošno in za sistematsko botaniko – za pomoč pri poskusih, nasvete pri pisanju ter domačno in spodbudno delovno okolje. In da me po večmesečni stalni prisotnosti na faksu še vedno prijazno pozdravljajo.

Iskreno se zahvaljujem tudi recenzentu Ivanu Kreftu in predsedniku komisije Matevžu Likarju za hiter pregled naloge.

Nenazadnje pa hvala tudi staršema za vso podporo "iz ozadja" ter podporo pri izbiri in tekom izobraževalne poti do biologa oz. ekologa.