

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Darja KONDA

**BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKTOV ZLATE
ROZGE (*Solidago* spp.)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Darja KONDA

BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKTOV ZLATE ROZGE
(*Solidago spp.*)

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

BIOLOGICAL ACTIVITY OF GOLDENROD (*Solidago spp.*)
EXTRACTS

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija Biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Jasno Dolenc Koce, za somentorico asist. dr. Sabino Anžlovar in za recenzentko prof. dr. Kristino Sepčič.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Katarina VOGEL MIKUŠ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Jasna DOLENC KOCE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Član: prof. dr. Kristina SEPČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 7. 3. 2012

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Darja Konda

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
 DK 58:577(043.2)=163.6
 KG protibakterijska aktivnost/protiglivna aktivnost/zlata rozga/*Solidago virgaurea/Solidago canadensis/Solidago gigantea*/vodni ekstrakti/organski ekstrakti/antioksidativni encimi
 AV KONDA, Darja
 SA DOLENC KOCE, Jasna (mentorica)/ANŽLOVAR, Sabina (somentorica)/SEPČIČ, Kristina (recenzentka)
 KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
 LI 2012
 IN BIOLOŠKA AKTIVNOST EKSTRAKTOV ZLATE ROZGE (*Solidago* spp.)
 TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
 OP X, 48 str., 5 pregl., 6 sl., 2 pril., 91 vir.
 IJ sl
 JI sl/en
 AI V diplomski nalogi smo ugotavljali biološko aktivnost ekstraktov treh vrst zlate rozge, ki uspevajo v Sloveniji. Zanimalo nas je ali obstajajo razlike med domorodno navadno zlato rozgo (*Solidago virgaurea*) in tujerodnima kanadsko zlato rozgo (*Solidago canadensis*) ter orjaško zlato rozgo (*Solidago gigantea*). Pripravili smo vodne in organske ekstrakte in testirali njihovo protibakterijsko ter protiglivno aktivnost. Protibakterijsko aktivnost smo testirali z difuzijsko metodo v agarju z luknjami, protiglivno pa z difuzijsko metodo v agarju z diski. Z vodnimi ekstrakti smo tretirali semena ovčje bilnice (*Festuca ovina*) in črne detelje (*Trifolium pratense*) ter v kalicah izmerili aktivnost antioksidativnih encimov (askorbat peroksidaze, gvajakol peroksidaze in katalaze). Ugotovili smo le manjše razlike med domorodno in tujerodnima vrstama. Protibakterijsko aktivnost so imeli le ekstrakti tujerodnih vrst. Največjo protibakterijsko aktivnost je imela orjaška zlata rozga. Protiglivna aktivnost ekstraktov je bila šibka. Največjo protiglivno aktivnost je imela orjaška zlata rozga, medtem ko je bila aktivnost navadne zlate rozge in kanadske zlate rozge primerljiva. Vodni ekstrakti niso imeli ne protibakterijske ne protiglivne aktivnosti, zato sklepamo, da so biološko aktivne snovi v zlati rozgi manj polarne snovi. Aktivnost antioksidativnih encimov v kalicah je bila različna in ne vrstno specifična. Razlik med vrstami zlate rozge na aktivnost antioksidativnih encimov nismo ugotovili.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC 58:577(043.2)=163.6
- CX antibacterial activity/antifungal activity/goldenrod/*Solidago virgaurea*/*Solidago canadensis*/*Solidago gigantea*/water extracts/organic extracts/antioxidant enzymes
- AU KONDA, Darja
- AA DOLENC KOCE, Jasna (supervisor)/ANŽLOVAR, Sabina (co-advisor)/SEPČIČ, Kristina (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- PY 2012
- TI BIOLOGICAL ACTIVITY OF GOLDENROD (*Solidago* spp.) EXTRACTS
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO X, 48 p., 5 tab., 6 fig., 2 ann., 91 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The thesis focuses on the biological activity of extracts of three different species of goldenrod growing in Slovenia. The main interest was to determine the differences between the indigenous goldenrod (*Solidago virgaurea*), the invasive canadian goldenrod (*Solidago canadensis*), and the giant goldenrod (*Solidago gigantea*). We prepared water and organic extracts that were tested for antibacterial or antifungal activity. The antibacterial activity was tested with the agar well diffusion method, while the antifungal activity was tested using agar diffusion method with disks. The seeds of sheep fescue (*Festuca ovina*) and red clover (*Trifolium pratense*) were treated with *Solidago* water extracts and the antioxidant enzymes activity (ascorbate peroxidase, gvajakol peroxidase and catalase) was measured in the sprouts. We observed minor differences between the effectiveness of the indigenous and invasive species. Antibacterial activity was observed only in the invasive species. Giant goldenrod had the strongest antibacterial activity. Antifungal activity of the extracts was weak. Again, the strongest activities were observed in the giant golderod extracts, while the results of the other two species where comparable. The water extracts of all samples had no antibacterial or antifungal activity so we concluded that the biologicaly active compounds of the plants are less polar. Enzyme activities of the antioxidants in the sprouts were different and non-specific. We were unable to determinate the differences in activities of the antioxidant enzymes among different species of goldenrod.

KAZALO VSEBINE

		str.
	Ključna dokumentacijska informacija	III
	Key words documentation	IV
	Kazalo vsebine	V
	Kazalo preglednic	VII
	Kazalo slik	VIII
	Kazalo prilog	IX
	Okrajšave in simboli	X
1	UVOD	1
1.1	NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE	2
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	ZLATA ROZGA (<i>SOLIDAGO</i> SP.)	3
2.1.1	Navadna zlata rozga, <i>Solidago virgaurea</i> L.	3
2.1.2	Kanadska zlata rozga, <i>Solidago canadensis</i> L.	4
2.1.3	Orjaška zlata rozga, <i>Solidago gigantea</i> Ait.	5
2.2	INVAZIVNOST	6
2.3	BIOLOŠKA AKTIVNOST RODU <i>SOLIDAGO</i>	9
2.4	ALELOPATIJA	11
2.5	OKSIDATIVNI STRES	14
3	MATERIAL IN METODE	16
3.1	MATERIAL	16
3.2	PRIPRAVA EKSTRAKTOV	16
3.2.1	Vodni ekstrakti	16
3.2.2	Organski ekstrakti	16
3.2.3	Ekstrakti za proteinske in encimske teste	17
3.2.3.1	Proteinski ekstrakti zlate rozge (<i>Solidago</i> sp.)	17
3.2.3.2	Proteinski ekstrakti črne detelje (<i>Trifolium pratense</i>) in ovčje bilnice (<i>Festuca ovina</i>)	17
3.3	DOLOČANJE KONCENTRACIJE SUHE SNOVI V EKSTRAKTIH	18
3.4	DOLOČANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI	18

3.4.1	Protibakterijska aktivnost	18
3.4.2	Protiglivna aktivnost	19
3.4.2.1	Priprava gojišč	19
3.5	VSEBNOST PROTEINOV	20
3.6	ANTIOKSIDATIVNI ENCIMI	21
3.6.1	Gvajakol peroksidaza	21
3.6.2	Askorbat peroksidaza	21
3.6.3	Katalaza	22
3.7	STATISTIČNA ANALIZA	23
4	REZULTATI	24
4.1	DOLOČANJE KONCENTRACIJE SUHE SNOVI V EKSTRAKTIH	24
4.2	PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST	25
4.3	PROTIGLIVNA AKIVNOST	28
4.4	OKSIDATIVNI STRES	31
4.4.1	Gvajakol peroksidaza	31
4.4.2	Askorbat peroksidaza	33
4.4.3	Katalaza	34
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	35
5.1	RAZPRAVA	35
5.2	SKLEPI	39
	POVZETEK	40
	VIRI	41
	ZAHVALA	49
	PRILOGE	50

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Koncentracija suhe snovi v ekstraktih.	24
Preglednica 2: Protibakterijska aktivnost listnih ekstraktov.	26
Preglednica 3: Protibakterijska aktivnost koreninskih ekstraktov.	27
Preglednica 4: Protiglivna aktivnost listnih ekstraktov.	29
Preglednica 5: Protiglivna aktivnost koreninskih ekstraktov.	30

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Navadna zlata rozga, <i>Solidago virgaurea</i> L.	4
Slika 2: Kanadska zlata rozga, <i>Solidago canadensis</i> L.	5
Slika 3: Orjaška zlata rozga, <i>Soidago gigantea</i> Ait.	6
Slika 4: Relativna specifična encimska aktivnost gvajakol peroksidaze	32
Slika 5: Relativna specifična encimska aktivnost askorbat peroksidaze	33
Slika 6: Relativna specifična encimska aktivnost katalaze	34

KAZALO PRILOG

Priloga A: Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov v vzorcu

Priloga B: Koncentracije proteinov v listih in koreninah različnih vrst *Solidago*

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

$^1\text{O}_2$	singletni kisik
A-POD	askorbat peroksidaza
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BCA	bicinchonic acid (bikinkonska kislina)
BSA	bovine serum albumin (goveji serumski albumin)
CAT	katalaza
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EA	encimska aktivnost
G-POD	gvajakol peroksidaza
H_2O_2	vodikov peroksid
HO^\bullet	hidroksilni radikal
K_2HPO_4	dikalijev hidrogen fosfat
KH_2PO_4	kalijev dihidrogen fosfat
$\text{O}_2^{\bullet-}$	superoksidni radikal
PDA	potato dextrose agar (krompirjev dekstrozni agar)
PVC	polyvinyl chloride (polivinil klorid)
ROS	reactive oxygen species (reaktivne kisikove zvrsti)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. canadensis</i>	<i>Solidago canadensis</i>
<i>S. gigantea</i>	<i>Solidago gigantea</i>
<i>S. virgaurea</i>	<i>Solidago vigaurea</i>
SEA	specifična encimska aktivnost
UV	ultravijolično

1 UVOD

Zlata rozga (*Solidago* spp.) je zelnata trajnica iz družine nebinovk (*Asteraceae*). V Sloveniji uspevajo tri vrste zlate rozge (Wraber, 2007). Avtohtona je le ena in sicer navadna zlata rozga (*Solidago virgaurea*), medtem ko sta kanadska zlata rozga (*Solidago canadensis*) in orjaška zlata rozga (*Solidago gigantea*) tujerodni vrsti. Obe vrsti izhajata iz Severne Amerike od koder so ju sredi 18. stoletja prinesli v Evropo (Weber in Schmid, 1993, cit. po Weber, 2001). Zaradi bogatih rumenih socvetij sta bili zanimivi kot okrasni rastlini, kar je pripomoglo k njuni razširjenosti. Vrsti sta hitro postali naturalizirani in se v 19. stoletju že močno razširili po Evropi, tudi po Sloveniji. Danes sta kanadska in orjaška zlata rozga dve izmed najbolj invazivnih rastlinskih vrst v Sloveniji in svetu (Veenvliet in sod., 2009; Weber, 1998).

Zaradi pritrjenega načina življenja so rastline razvile svoje strategije preživetja. Ena izmed njih je produkcija fitokemičnih spojin, ki rastline ščitijo in imajo pomemben vpliv na njihovo razmnoževanje in obstoj. Da je sestava spojin vrstno specifična, so ugotovili že naši predniki, ki so uporabljali različne rastline za zdravljenje različnih bolezni. Raziskave kažejo, da imajo fitokemične spojine, ki jih rastline izločajo, pomembno vlogo tudi pri rastlinskih invazijah, saj vplivajo na okoliške rastline, živali in mikroorganizme (Whittaker in Feeny, 1971).

Vrste rodu *Solidago* se že stoletja uporabljajo v ljudskem zdravilstvu, predvsem pri težavah s prostato in ledvičnimi kamni, pri vnetju sečnega mehurja, novejša raziskava pa kažejo, da ima rod *Solidago* številne biološke aktivnosti (Thiem in Goslinska, 2002). To nas je spodbudilo k testiranju biološke aktivnosti treh vrst zlate rozge, ki uspevajo v Sloveniji.

1.1 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

V nalogi smo želeli ugotoviti ali izvlečki treh različnih vrst zlate rozge vplivajo:

- a) na rast izbranih bakterij in gliv,
- b) na aktivnost antioksidativnih encimov v kalicah izbranih rastlin.

Poleg tega nas je zanimalo ali se ta vpliv razlikuje med posameznimi vrstami zlate rozge, predvsem pa ali se razlikuje med tujerodnima invazivnima vrstama in domorodno vrsto. Zanimalo nas je tudi, kako vpliva način ekstrakcije (uporaba različnega topila) na biološko aktivnost.

Predvidevali smo, da bo biološka aktivnost tujerodnih vrst večja od aktivnosti domorodne vrste, saj je to eden izmed možnih razlogov za invazivnost. Glede na to, da je alelopatija eden od mnogih stresnih dejavnikov, s katerim se rastline spopadajo v svojem okolju, smo predpostavljali, da bo vsebnost antioksidativnih encimov večja v kalicah, ki jih bomo izpostavili izvlečkom tujerodnih vrst.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZLATA ROZGA (*Solidago* sp.)

Zlato rozgo uvrščamo v družino nebinovk (*Asteraceae*). Skoraj vse vrste tega rodu rastejo divje v Ameriki, posebno v Severni Ameriki, nekatere pa tudi v Evropi in Aziji. Točno število vrst je težko navesti, verjetno jih je okoli 130. Ime rodu izvira iz latinskih besed *solidus*, ki pomeni trden, in *agere*, ki pomeni delati. Rastlina naj bi naredila bolnika trdnega in zdravega (Witt, 1978).

V Sloveniji uspevajo tri vrste zlate rozge. Navadna zlata rozga, *S. virgaurea*, je domorodna vrsta, kanadska zlata rozga, *S. canadensis*, in orjaška zlata rozga, *S. gigantea*, pa sta tujerodni (Wraber, 2007) in dve izmed najbolj invazivnih rastlinskih vrst na svetu (Weber, 1998). V Sloveniji sodita med najhujše invazivke (Veenvliet in sod., 2009). Vse tri vrste so zelnate trajnice, pri katerih iz podzemnih korenin poženejo enoletni nadzemni poganjki (Wraber, 2007). Zlata rozga ima številna, majhna, lahka semena, ki se na dolge razdalje prenašajo z vetrom, vodo, transportnimi sredstvi, s posredovanjem človeka ali živali in kalijo na različnih tipih tal. Ko je populacija enkrat vzpostavljena, se razmnožuje predvsem vegetativno. V ugodnih pogojih dolge, plazeče korenike enostavno fragmentirajo in se ukoreninijo (Weber, 2001).

2.1.1 Navadna zlata rozga, *Solidago virgaurea* L.

Navadna zlata rozga, *S. virgaurea* L., je ena izmed redkih v Evropi divje rastočih vrst tega rodu. Divje raste tudi v severni Afriki, v Severni Ameriki in v severni Aziji do 71° severne zemljepisne širine. Raste v svetlih gozdovih, na posekah, na kamnitih in grmovnatih mestih in je v Sloveniji zelo pogosta. Do enega metra visoko steblo nosi na vrhu v ozek grozd združene koške (Witt, 1978). Koški so dolgi 7-18 mm in so v enostavnih ali sestavljenih grozdih (Wraber, 2007). Cevasti cvetovi so rumeni, rumeni so tudi na robu koška stoječi jezičasti svetovi, ki jih je 6 do 8. Pri nas navadna zlata rozga cvete od avgusta do oktobra (Witt, 1978). V Sloveniji uspevata dve podvrsti. *S. virgaurea* subsp. *virgaurea*, navadna zlata rozga, ima koške široke 10-15 mm, v sestavljenih grozdih, ovojek je dolg 5-7 mm, steblo pa je višje (30-100 cm) in bolj razraslo. Najdemo jo v svetlih gozdovih, na posekah, kamnitih in grmovnatih mestih od nižine do subalpinskega pasu. *S. virgaurea* subsp. *minuta*, planinska zlata rozga, ima koške široke 15-20 mm, v enostavnih, redkeje sestavljenih grozdih. Steblo je nižje (do 20 cm) in večinoma ne razraslo. Najdemo jo na travnikih in pašnikih, med rušjem in grmovjem, v svetlih gozdovih v montanskem in subalpinskem pasu (Wraber, 2007). Vrstno ime *virgaurea* pomeni zlata šiba, zlata rozga (Witt, 1978). Navadna zlata rozga je namreč zdravilna rastlina. V zdravstvene namene se uporabljajo nadzemni deli. Rastlina vsebuje saponine, diterpene, fenolne glukozide, acetilene, cinamate, flavonoide, čreslovine, hidroksibenzoate in inulin (Chevallier, 1998). Zlata rozga pospešuje izločanje seča in izkašljevanje ter pomaga pri celjenju ran in drugih

kožnih obolenjih. Čreslovine, ki krčijo tkivo, povečujejo njene celilne sposobnosti in blažijo drisko. Flavonoidi zmanjšujejo prepustnost krvnih žil in jih krepijo ter s tem izboljšujejo pretok krvi. Zlata rozga učinkovito lajša vnetja in okužbe sečil, kot sta cistitis (vnetje mehurja) in uretritis (vnetje sečnice). Njene protibolečinske in protivnetne sposobnosti pripisujejo fenolni kislini, imenovani leiokarpozid (Digest, 2007). Zelišče velja za učinkovito sredstvo, ki pripomore k izločanju kamnov iz sečil. Saponini iz zlate rozge delujejo protiglivno. Uspešni so predvsem proti glivicam rodu *Candida*, ki povzročajo kandidozo v nožnici in ustih (Chevallier, 1998). Thiem in Goslinska (2002) poročata tudi o protibakterijski, protivnetni, protirakavi, pomirjevalni in hipotenzivni aktivnosti.

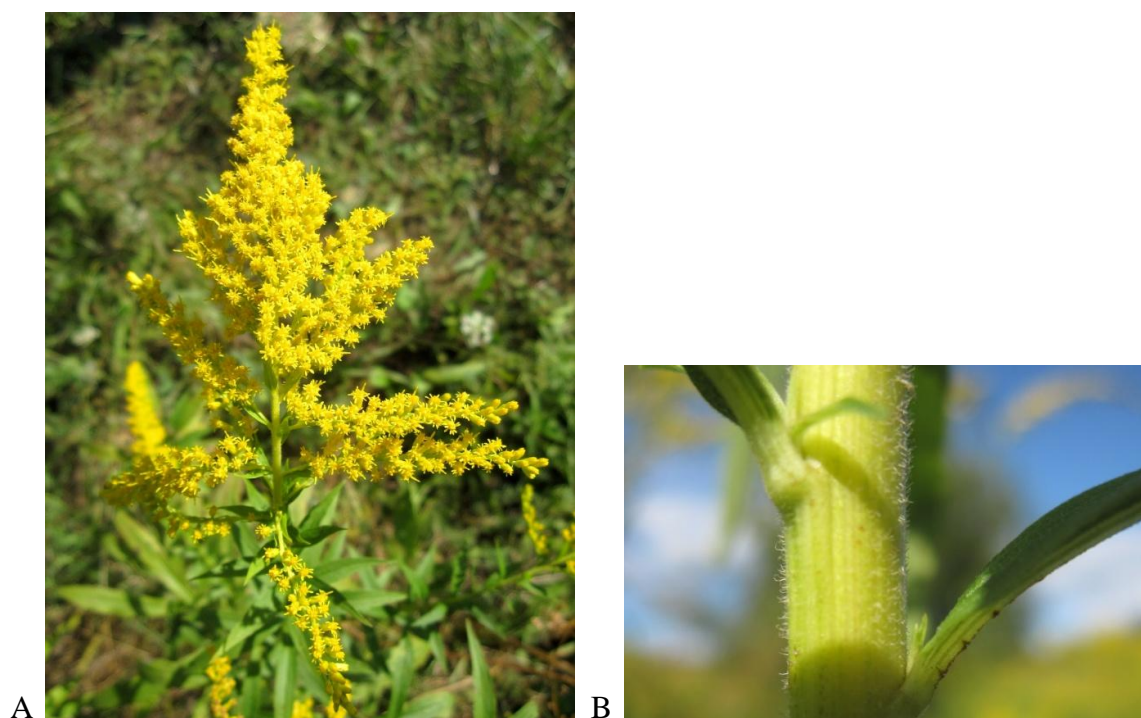


Slika 1: Navadna zlata rozga, *Solidago virgaurea* L.

2.1.2 Kanadska zlata rozga, *Solidago canadensis* L.

Kanadska zlata rozga, *S. canadensis* L., ki jo nekateri avtorji navajajo pod znanstvenim imenom *Solidago altissima* L., je od 70-210 cm visoka zelnata trajnica. Steblo kanadske zlate rozge je v celoti olistano, v spodnjem delu golo, v zgornjem pa vedno dlakavo. Listi so spiralno nameščeni, sedeči ali zelo kratko pecljati in suličaste oblike. Po spodnji strani so dlakavi, listni rob je nazobčan. Na vrhu poganjkov je razvejano socvetje s številnimi 7-15 mm dolgimi koški. Cvetovi so rumeni. Jezičasti cvetovi komaj presegajo dolžino ovojka. Plod je 0,9-1,2 mm dolga rožka z do 2,5 mm dolgim šopom laskov, ki služijo razširjanju plodov s pomočjo vetra (Strgulc Krajšek, 2009a). Pri nas cvete avgusta in septembra. Rastlino gojijo po vrtovih v vseh zmerno toplih območjih in tudi pri nas. Iz vrtov pa rada uide in podivja. Ker je zelo trdoživa, se na primernih mestih izredno

razmnoži in postane nadležen plevel (Witt, 1978). Domovina kanadske zlate rozge je Severna Amerika (Wraber, 2007). V Sloveniji je kanadska zlata rozga prvič omenjena leta 1937 (Strgulc Krajšek, 2009a). Danes je vrsta razširjena po nižinah po vsej Sloveniji, vendar je redkejša od orjaške zlate rozge. Pogosta je ob železniških progah in cestah, na opuščenih njivah in drugih površinah, kjer je človek odstranil prvotno vegetacijo. Najdemo jo tudi na gozdnih robovih, na posekah ter na bregovih rek in potokov. Je zelo nezahtevna rastlina, saj dobro uspeva na rastiščih z zelo različnimi ekološkimi pogoji, vse od suhih do vlažnih tal, na bogatih in pustih rastiščih. Sprva je bila pogosta predvsem v okolici naselij, s širjenjem ob prometnicah in vodah pa se je razširila tudi na bolj odročna mesta. Osnovno kromosomsko število kanadske zlate rozge je 9. V Severni Ameriki so večinoma prisotni heksaploidni osebki ($2n=54$), v Evropi pa se pojavljajo le diploidi ($2n=18$). Medtem, ko Strgulc Krajšek (2009a) piše o nepoznanih vplivih kanadske zlate rozge na zdravje ljudi, Chevialler (1998) poroča o podobnih zdravilnih lastnostih kot jih ima navadna zlata rozga. Uporablja se tudi v ljudskem zdravilstvu (Apáti, 2003).

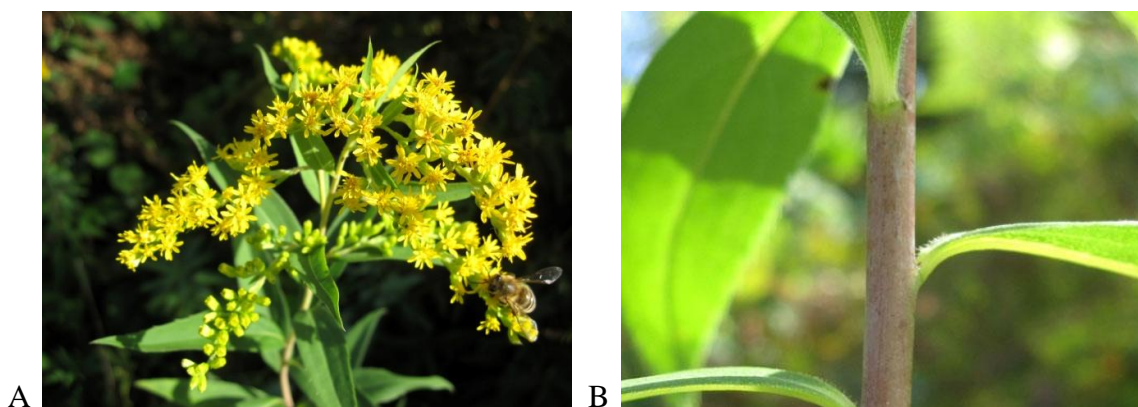


Slika 2: Kanadska zlata rozga, *Solidago canadensis* L.. Slika A-socvetje, Slika B-steblo

2.1.3 Orjaška zlata rozga, *Solidago gigantea* Ait.

Kanadski zlati rozgi je močno podobna orjaška zlata rozga, *S. gigantea* Ait. Ta zelnata trajnica je visoka od 30-280 cm. Steblo je v celoti olistano, razvejano le v socvetju (Strgulc Krajšek, 2009b). Od kanadske zlate rozge se razlikuje predvsem po tem, da ima golo steblo (Wraber, 2007). Listi so spiralno nameščeni, sedeči ali zelo kratko pecljati in podolgovate do suličaste oblike. Večinoma so goli, lahko pa so po spodnji strani nekoliko dlakavi.

Listni rob je nazobčan. Na vrhu poganjkov je razvejano socvetje s številnimi koški. Cvetovi so rumeni. Jezičasti cvetovi razločno presegajo dolžino ovojka. Plod je 1-1,8 mm dolga rožka s šopom laskov, ki služijo razširjanju plodov s pomočjo vetra (Strgulc Krajšek, 2009b). Pri nas cvete avgusta in septembra. Tudi to vrsto gojijo po vrtovih, od koder pogosto uide, podivja in se ponekod močno razširi. (Witt, 1978). Domovina orjaške zlate rozge je Severna Amerika (Wraber, 2007). Prvi podatek o pojavljanju vrste v Sloveniji je iz leta 1852 (Strgulc Krajšek, 2009b). V Severni Ameriki uspeva predvsem na bogatih, vlažnih tleh in dobro osvetljenih mestih. V Evropi pa je glede pogojev za rast bistveno manj zahtevna, saj ji ustrezajo zelo različni tipi rastišč glede na vlažnost prsti, količino dušika v tleh, zgradbo tal ali osvetljenost. Uspešno se širi tudi na senčna in s hranili revnejša mesta. Tako kot v njenem prvotnem območju uspevanja je tudi v naših krajih pogosta na vlažnih bregovih voda in na gozdnih robovih, zelo velike strjene sestoje pa tvori tudi na sušnejših rastiščih ob cestah, železnicah in na drugih ruderalnih mestih. Na bogatih tleh so sestoji gostejši, rastline pa višje z bogatejšimi socvetji. Ob ugodnih pogojih se sestoji hitro večajo. Osnovno kromosomsko število orjaške zlate rozge je 9. Tako v severni Ameriki kot tudi v Evropi pa je prisotna z več različnimi kromosomskimi števili, zaradi česar nekateri avtorji vrsto delijo v tri ločene taksone: *S. gigantea* ($2n=2x=18$) – rastline imajo dlakave osrednje listne žile, *S. serotina* ($2n=4x=36$) – ozki listi so popolnoma goli, *S. shinnersii* ($2n=6x=54$) – široki listi so popolnoma goli. Vplivi orjaške zlate rozge na zdravje ljudi niso znani (Strgulc Krajšek, 2009b). Grünwald in Jänicke (2006) pa poročata o njenih zdravilnih učinkih.



Slika 3: Orjaška zlata rozga, *Solidago gigantea* Ait.. Slika A-socvetje, Slika B-steblo

2.2 INVAZIVNOST

Premik vrste iz enega geografskega območja na drugo lahko vodi v ustalitev vrste v novem okolju. Ko so naravne združbe in ekosistemi moteni zaradi širjenja in povečevanja številčnosti tujerodnih vrst, govorimo o biološki invaziji (Weaver in Clements, 1929). Biološka invazija je eden od glavnih razlogov za manjšanje biotske raznovrstnosti. Invazivne rastline so vzrok za izumrtje številnih domorodnih rastlin in za degradacijo ekosistemov, vplivajo na kroženje dušika, na požare, hidrologijo, številčnost domorodnih

vrst in njihovo preživetje (Wilcove in sod., 1998; Xie in sod., 2010; Mack in sod., 2000). Invazivne tujerodne vrste so postale globalen problem, saj imajo velik vpliv na ekonomijo, ekosisteme in zdravje ljudi (Xie in sod., 2010).

K širjenju rastlin pomembno prispeva človek že od začetka civilizacije. Z razvojem znanosti in tehnike je prenos rastlin postajal vedno bolj pospešen in vedno manj omejen. Rastline se prenašajo iz ene celine na drugo, iz ene države v drugo ali znotraj države.

Biološke invazije so pogosto posledica antropogene aktivnosti (trgovanja, potovanja, gradnja prekopov in kanalov ipd.). Tako so vrste prenešene preko naravnih ovir na nova območja, ki jih sicer ne bi dosegle. V novo okolje pridejo namerno (za kmetijstvo ali v okrasne namene) ali nenamerno, kot slepi potniki. Tam na njihovo uspevanje vplivajo mnogi (drugačni) parametri (Hierro in sod., 2005). Večina vrst v novem okolju ne preživi, ker novim razmeram niso prilagojene ali je prisotnih premalo osebkov za uspešno razmnoževanje. Le nekaj vrst postane naturaliziranih. Te se uspešno razmnožujejo, vzdržujejo stalne populacije in v naravi ne povzročajo zaznavnih sprememb. Sčasoma lahko nekatere naturalizirane vrste postanejo invazivne, zlasti ko se njihovo število močno poveča (Weber, 1998).

Za razvoj rastlinskih invazij obstaja mnogo hipotez.

1. Tujerodne vrste postanejo invazivne zaradi odsotnosti naravnih sovražnikov (sesalcev, žuželk, mehkužcev, gliv, bakterij, virusov) v novem okolju (Darwin, 1859, cit. po Hierro in sod., 2005; Williams, 1954, cit. po Hierro in sod., 2005; Elton, 1985, cit. po Hierro in sod., 2005). Naravni nasprotniki so pomembni regulatorji velikosti rastlinskih populacij. Zaradi skupne evolucije je njihov vpliv večji na domorodne kot na tujerodne vrste. S prihodom rastlin v nova območja se rastline osvobodijo predvsem nasprotnikov specialistov, generalisti v novem okolju pa imajo navadno večji vpliv na domorodne vrste. Invazivke so tako v novem okolju manj izpostavljene rastlinojedom, glivam, bakterijam in virusom, kar vodi v povečevanje številčnosti in uspešno širjenje (Xie in sod., 2010; Keane in Crawley, 2002).
2. Tujerodne vrste postanejo invazivne na račun hitrih genetskih sprememb, ki so posledica novih selekcijskih pritiskov v novem okolju. Ker so osvobojene nasprotnikov (zlasti specialistov), lahko energijo, ki so jo v naravnem okolju vlagale v obrambo, uporabijo za druge lastnosti npr. višjo rast ali boljšo reprodukcijo (Lee, 2002; Stockwell in sod., 2003).
3. Tujerodne vrste uspešno uporabljajo hranila, ki jih domorodne vrste ne uporabljajo (Elton, 1985, cit. po Hierro in sod., 2005; MacArthur, 1970, cit. po Hierro in sod., 2005). Vrstno bogate združbe imajo bolj popolno izrabo hranil, zato so bolj odporne proti invazijam, medtem ko imajo vrstno revne združbe slabšo izrabo

hranil, zato imajo več prostih niš in so tako bolj dovzetne za invazije tujerodnih vrst (Levine in D'Antonio, 1999).

4. Za uspešno invazijo je ključnega pomena alelopatija (Muller, 1969, cit. po Hierro in sod., 2005; Xie in sod., 2010). Tujerodne vrste prinesejo v novo združbo nov način medvrstnih interakcij. Fitokemične spojine, na katere domorodne rastline in patogeni niso prilagojeni, dajejo tujerodnim vrstam prednosti v novem okolju in služijo kot kemična obramba proti rastlinskim patogenom, rastlinojedcem ter negativno vplivajo na rast domorodnih rastlin (Callaway in Aschehoug, 2000; Bais in sod., 2003).
5. Tujerodne vrste so bolj prilagojene na motenje naravnih sistemov (prekomerno gnojenje, prekomerna paša domačih živali, spremenjen pretok vode, klimatske spremembe ipd.) kot domorodne vrste (Baker, 1974; Mack in sod., 2000), kar poveča dovzetnost habitatov za tujerodne vrste (Müller-Schärer, 2004).
6. Vrstno revne združbe imajo šibkejšje interspecifične odnose in imajo tako več praznih niš, ki jih lahko zasedejo tujerodne vrste (Elton, 1985, cit. po Hierro in sod., 2005; MacArthur, 1970, cit. po Hierro in sod., 2005).
7. Uspešnost invazije je odvisna od števila prispelih tujerodnih rastlin (propagacijskih enot rastlin). Večje je število prispelih rastlin (propagacijskih enot), večja je verjetnost ustalitve vrste in razvoja invazivnosti (Lonsdale, 1999; Mack in sod., 2000; Williamson, 1996, cit. po Hierro in sod., 2005).

Večina teh hipotez sloni le na enem mehanizmu za razvoj invazije, Daneshgar in Jose (2009) pa ugotavljata, da rastline za uspešno prevlado v novem habitatu uporabijo več kot enega.

Vnaprej ugotoviti ali bo vrsta postala invazivna ali ne je težko, saj je invazivnost odvisna od ekoloških značilnosti posamezne vrste in njenih interakcij z drugimi organizmi (Weber, 1998). S stališča varstva narave je vsak vnos tujerodne vrste v naravno okolje tvegan.

Naravni in antropogeni dejavniki določajo ali se bo invazivna vrsta širila hitro ali počasi in ali bo zavzela veliko ali majhno območje (Weber, 1998).

Invazivne rastline imajo nekatere skupne značilnosti. Večinoma se najbolj uspešno širijo na ruderalnih rastiščih, posekah, cestnih robovih in rečnih bregovih. V večini primerov velja, da invazivke zrastejo večje, se bolje razmnožujejo in živijo dlje v novem okolju kot na območju naravne razširjenosti (Keane in Crawley, 2002). Jakobs in sod. (2004) so v raziskavi, v kateri so primerjali domorodno *S. gigantea* v Ameriki in invazivno v Evropi, ugotovili, da vrsta boljše raste v Evropi. Evropske populacije so po njihovih raziskavah štirikrat večje od ameriških. Tudi same rastline so višje, z večjimi socvetji, številčnejšimi

in večjimi koreniki. Invazivne rastline spremenijo floristično sestavo in v skrajnem primeru invazivna vrsta popolnoma prevlada. Vplivajo tudi na razmere v tleh, kar se kaže v zmanjšanju mineralnega dušika, nižji vsebnosti fosforja in manjši stabilnosti talnih agregatov ter spremenijo talne združbe (Zhang CB in sod., 2009; Inderjit in van der Putten, 2010).

2.3 BIOLOŠKA AKTIVNOST RODU *SOLIDAGO*

Posebna značilnost rastlin je njihova sposobnost proizvodnje širokega spektra sekundarnih metabolitov. Sekundarni metaboliti igrajo pomembno vlogo v ekologiji rastlin in so ključnega pomena za njihovo preživetje. Številni izmed njih imajo biološko aktivnost in služijo za obrambo rastlin pred mikroorganizmi (virusi, bakterijami, glivami), rastlinojedimi živalmi (glistami, mehkužci, žuželkami, vretenčarji) in pred kompeticijskimi rastlinskimi vrstami (alelopatija). Sekundarni metaboliti so potencialni vir novih zdravil, antibiotikov, insekticidov in herbicidov (Wink in Twardowski, 1992; Crozier in sod., 2006).

Vrste iz rodu *Solidago* se že stoletja uporabljajo v ljudskem zdravilstvu predvsem za zdravljenje vnetij, pri uroloških težavah, težavah s prostato in ledvičnimi kamni. V zdravstvene namene se uporabljajo zlasti *S. virgaurea*, *S. gigantea* in *S. canadensis* (Skrzypczak in sod., 1999, cit. po Kalemba in sod., 2001). Njihove zdravilne sposobnosti so potrdile številne študije in klinični testi (Apáti, 2003). Danes aktivne snovi iz vrst rodu *Solidago* najdemo v mnogih farmacevtskih pripravkih, predvsem diuretikih (Apáti in sod., 2002).

Najpomembnejše biološko aktivne snovi, ki jih najdemo v rodu *Solidago*, so flavonoidi, terpeni (diterpeni) in saponini (Apáti in sod., 2002; Starks in sod., 2010; Reznicek in sod., 1996; Apáti, 2003). Zlata rozga vsebuje tudi številne minerale, v največji meri kalij, magnezij, železo, baker in cink (Apáti, 2003).

Rastlinski fenoli so raznolika skupina sekundarnih metabolitov, med katere prištevamo vse tiste spojine, ki imajo vsaj en aromatski obroč, na katerega je direktno vezana ena ali več hidroksilnih skupin. So ena izmed najbolj številčnih in najbolj razširjenih sestavin v rastlinskem svetu (Apáti, 2003). Fenolne snovi, predvsem flavonoidi, imajo farmakološko aktivnost; zmanjšujejo tvorbo prostih radikalov in odstranjujejo proste radikale. Pomembni so za obarvanost rastlin, UV-zaščito in odpornost proti boleznim (Apáti, 2003). Flavonoidi so učinkovite protimikrobne spojine (Cowan, 1999). Ker imajo flavonoidi praviloma nizko toksičnost in visoko antioksidativno kapaciteto, so zelo uporabna farmakološka sredstva (Apáti in sod., 2003). Nekateri flavonoidi delujejo proti vnetjem (antiflogistiki), proti alergijam (antialergiki), znižujejo krvni tlak (hipotenzorji), pospešujejo tvorbo žolča in njegovo odtekanje (holagogi), so blaga odvajala (laksanti) in pospešujejo izločanje seča (diuretiki) (Petauer, 1993). Zlata rozga vsebuje širok spekter fenolnih spojin, zlasti flavonoidov, med katerimi so najpomembnejši rutin (kvercetin-3-O- β -D-rutinozid),

kvercitrin (kvercetin-3-O- β -D-ramnozid), kvercetin in kampferol (Sabir in sod., 2011; Apáti in sod., 2002; Mishra in sod., 2010). Natančno analizo flavonoidov *S. canadensis* so naredili Apáti in sod. (2002).

Terpeni so spojine, sestavljene iz dveh ali več izoprenskih enot. V rastlinskem svetu so terpeni zelo razširjeni kot sekundarni metaboliti. Med seboj se razlikujejo po kemijskih in farmakoloških značilnostih. Nekateri terpeni služijo kot zaščita pred žuželkami, rastlinojedci in patogeni. Terpeni so učinkoviti proti bakterijam, glivam, virusom in praživalim (Cowan, 1999). Zlata rozga vsebuje številne terpene (Lu in sod., 1995; Johnson in sod., 2007). Starks in sod. (2010) so izolirali diterpene iz vrste *S. virgaurea* in ugotovili, da ima večina od njih zmerno protibakterijsko delovanje ter prišli do zaključka, da diterpeni lahko predstavljajo izhodišče za sintezo bolj aktivnih komponent.

Saponini so rastlinski glikozidi, sestavljeni iz vodotopne sladkorne in lipofilne steroidne ali terpenoidne komponente. Takšna kemijska zgradba ob prisotnosti vode in stresanju povzroča penjenje, kar je lastnost detergentov. Saponini imajo številne biološke aktivnosti; protivnetno, hemolitično, protiglivno, protibakterijsko, protiparazitsko, protivirusno, citotoksično in protitumorsko ter so toksični za večino mrzlokrvnih živali (Sparg in sod., 2004). Nekateri saponini iz rodu *Solidago* so bili že določeni (giganteasaponini 1-4) (Reznicek in sod., 1996). Plohmann in sod. (1997) so ugotovili, da imajo saponini iz vrste *S. virgaurea* protitumorsko delovanje.

V rodu *Solidago* so ugotovili številne biološke aktivnosti;

1. Ekstrakti *S. virgaurea* vplivajo na receptorje, ki so pomembni pri posredovanju bolečine. Delujejo protibolečinsko (Sampson in sod., 2000).
2. Zlata rozga ima protibakterijsko aktivnost. Starks in sod. (2010) in Demir in sod. (2009) so ugotovili protibakterijsko aktivnost vrste *S. virgaurea* proti bakterijam *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter focalis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*. Morel in sod. (2006) so ugotovili protibakterijsko delovanje vrste *Solidago microglossa* proti bakterijam *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella setubal*, *Bacillus subtilis* in *Pseudomonas aeruginosa*, Mishra in sod. (2010) so ugotovili protibakterijsko aktivnost vrste *S. canadensis* proti bakterijam *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus foecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Salmonella typhi*.
3. Zlata rozga ima protiglivno delovanje. Zhang in sod. (cit. po. Zhang in sod., 2006) in Zhang in sod. (2009) so ugotovili protiglivno delovanje ekstraktov vrste *S. canadensis* proti glivam *Thanatephorus cucumeris*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Glanerella cingulata* in *Pythium ultimum*. *S. gigantea*, *S. canadensis* in *S. microglossa* delujejo tudi proti

človeku patogenim kvasovkam iz rodu *Candida* in nekaterim plesnim (Webster in sod., 2008; Morel in sod., 2006; Mishra in sod., 2010).

4. Ekstrakti vrste *S. virgaurea* imajo močno citotoksično aktivnost na različne vrste tumorskih celičnih linij kot so celice karcinoma prostate, karcinoma dojke, karcinoma pljuč in melanoma (Gross in sod., 2002). Najvišjo citotoksično aktivnost so ugotovili pri ekstraktih iz listov in cvetov, medtem ko je aktivnost v ekstraktih iz stebela precej nižja (Plohmann in sod., 1997). Sung in sod. (1999) so iz vrste *S. virgaurea* izolirali citotoksične snovi (α -tokoferol kinon, *trans*-fitol, 2-metoksibenzil-2,6-dimetoksibenzoat).
5. *S. virgaurea* deluje protivnetno, blaži krče (Sung in sod., 1999), ima hipotenzivni učinek in deluje pomirjevalno na živčni sistem (Lasserre in sod., 1983).
6. Ekstrakti vrst *S. virgaurea* in *S. canadensis* imajo antioksidativno aktivnost (Demir in sod., 2009; Apáti in sod., 2003).
7. Ekstrakti vrste *S. microglossa* ščitijo jetra, ki so poškodovana zaradi paracetamola (Sabir in sod., 2011).
8. Ekstrakti vrst *S. virgaurea* in *S. graminifolia* delujejo amebicidno (Derda in sod., 2009).
9. Ekstrakti vrste *S. canadensis* inhibirajo kalitev semen (Butcko in Jensen, 2002; Abhilasha in sod., 2008).

Večina testov biološke aktivnosti je narejenih *in vitro*. Za pripravo ekstraktov se uporabljajo predvsem nadzemni deli rastlin (cvetovi, listi in stebela). Največkrat se uporabljajo vodni, metanolni in etanolni ekstrakti, poleg njih pa tudi eterična olja, ki so se velikokrat izkazala za bolj učinkovita (npr. pri bakterijskih in glivnih testih) (Morel in sod., 2006; Xie in sod., 2010).

Iz vrst rodu *Solidago* so izolirali in identificirali številne spojine (Starks in sod., 2010; Apáti in sod., 2002; Johnson in sod., 2007), kljub temu pa večinoma ni znano katere spojine so odgovorne za določeno biološko aktivnost, saj je temu namenjenih precej manj raziskav.

2.4 ALELOPATIJA

Rice (1984, cit. po Rizvi in sod., 1992) definira alelopatijo kot vsak neposreden ali posreden, škodljiv ali koristen vpliv ene rastline (ali mikroorganizma) na drugo, preko proizvodnje kemičnih spojin, ki jih izloča v okolje. Spojine se sproščajo iz različnih rastlinskih delov z izpiranjem in izhlapevanjem ali kot ostanki razgradnje (Inderjit in sod., 2006). Večina teh biomolekul je sekundarnih metabolitov. Znane alelopatske snovi so fenolne kisline, flavonoidi in druge aromatske spojine, terpenoidi, steroidi, alkaloidi in

organski cianidi (Whittaker in Feeny, 1971). Koncentracija in lokacija v tkivih variira med posameznimi rastlinskimi vrstami, na razliko v koncentraciji pa vplivajo tudi sezonske spremembe in drugi biotski in abiotski okoljski pogoji (UV-žarki, prepojenost tal z vodo, prisotnost rastlinojedcev, prisotnost drugih rastlin) (Inderjit in Duke, 2003). Dekker in Meggitt (1983) menita, da se veliko alelopatskih snovi sprosti zlasti v zgodnjih fazah razvoja rastlin, ko rastline tekmujejo za svetlobo, hranila in vodo. Alelopatija velja za zelo pomemben mehanizem rastlinskih invazij (Callaway in sod., 2005; Inderjit in van der Putten, 2010). Alelopatske snovi invazivnih rastlin služijo kot obramba pred patogeni in rastlinojedci, zavirajo rast drugih rastlin ter vplivajo na talne organizme (Xie in sod., 2010).

Način delovanja alelopatskih snovi je lahko neposreden ali posreden. Pri posrednem načinu rastlina spreminja lastnosti zemlje, hranljivost tal, sestavo talnih združb in aktivnosti škodljivih oziroma koristnih organizmov, kot so mikroorganizmi, žuželke in gliste. Pri neposrednem načinu pa gre za vpliv alelopatskih snovi na rast in metabolizem (Rizvi in Rizvi, 1992).

Kot dokaz, da gre za alelopatijo, moramo upoštevati troje: (1) znake prizadete rastline, kot so zmanjšana kaljivost, rast ali razvoj; (2) prisotnost spojin ali organizmov (rastlin ali mikrobov) v bližini prizadete rastline, ki vsebujejo ali so sposobni producirati fitotoksične snovi; in (3) prisotnost fitotoksičnih snovi v rastlinskih izvlečkih ali v tleh v bližini prizadete rastline. Poleg tega moramo upoštevati, da posledice alelopatije morda niso vidne takoj in na tistem mestu, kjer je poškodba nastala. Znaki delovanja alelopatskih snovi se lahko pokažejo šele takrat, ko vzrok zanje več ni prisoten (Cheng, 1992).

Pri alelopatiji ločimo več zaporednih dogodkov (Cheng, 1992): (1) nastanek fitotoksičnih snovi; (2) prenos snovi iz organizma do tarčne rastline; in (3) izpostavljenost tarčne rastline zadostni količini kemičnih snovi ter dovolj časa, da pride do poškodbe. Ko kemična snov pride iz organizma v okolje, je izpostavljena številnim procesom (Cheng, 1992). V splošnem jih delimo na zadrževanje, preoblikovanje in transportni proces. Zaradi zadrževanja se upočasni premik snovi z ene lokacije na drugo preko medija kot so tla, voda in zrak. Transformacijski procesi (preoblikovanje) spremenijo obliko ali strukturo kemične snovi, kar vodi do delne spremembe (lahko v še bolj toksično obliko) ali popolne razgradnje molekule. Transportni proces pa vpliva na premike molekule v okolju. Na vsakega od procesov vpliva narava kemične snovi, prisotni organizmi, lastnosti tal in okoljski dejavniki. Alelopatske snovi so reaktivne spojine. Kako uspešen je njihov vpliv na druge organizme, je odvisno od interakcij z okoljem. Njihova topnost vpliva na mobilnost v talni vodi, njihov parni tlak na hlapljivost in njihova struktura na afiniteto do površine tal ter razgradnjo z mikroorganizmi (Cheng, 1992).

Zhang in sod. (2011) so na primeru invazivne vrste *S. canadensis* ugotovili, da se flavoni, fenoli in saponini, ki jih rastlina izloča, v tleh akumulirajo. Njihova koncentracija narašča z naraščanjem gostote in biomase zlate rozge. Te snovi so alelopatske in negativno vplivajo

na talne mikrobe. Callaway in Ridenour (2004) in Zhang in sod. (2009) pravijo, da je širjenje rastlin v novih habitatih uspešno zaradi alelopatskih snovi, ki jih izločajo in z njimi zavirajo tako okoliške rastline kot tudi talne patogene. Razlog je predvsem v tem, da so vrste, ki se niso razvijale v koevoluciji s kompetitorji, bolj dovzetne za nove fitokemikalije kot prilagojeni kompetitorji v naravnem okolju (Callaway in Aschehoug, 2000). Znano je tudi, da imajo vrste brez skupne evolucijske zgodovine močnejše alelopatske interakcije (Mallik in Pellissier, 2000). Abhilasha in sod. (2008) celo ugotavljajo, da invazivne rastline vlagajo manj v sekundarne metabolite, kar kaže na večjo dovzetnost domorodnih vrst za alelopatske substance. Tako rastline s sproščanjem alelopatskih snovi v okolje uravnavajo razporeditev, rast in razvoj ostalih rastlin.

Številne raziskave kažejo, da invazivne rastline s sproščanjem alelopatskih snovi spremenijo talne mikrobne združbe (Belnap in sod., 2005; Eppinga in sod., 2006). Spremenjena talna združba lahko pozitivno vpliva na tujerodne vrste in pospeši njihovo širjenje ali pa negativno vpliva na domorodne vrste, zaradi česar se lahko razširijo tujerodne vrste (Mangla in sod., 2008). Znano je namreč, da so različne mikrobne združbe vezane na različne rastlinske vrste (Bever, 1994). Talne mikrobne združbe imajo tako močan vpliv na rastlinske populacije (Burdon, 1993) in na uspešnost rastlinskih invazij (Callaway in sod., 2005).

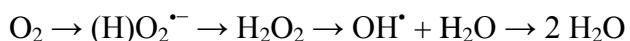
Okrog rastlinskih korenin se odvijajo dinamične interakcije. O pozitivni povratni zanki govorimo, ko rastlinske vrste akumulirajo v rizosferi mikrobo, ki so zanje koristni, npr. mikorizne glive in fiksatorje dušika (Bever in sod., 1997). O negativni povratni zanki pa govorimo, ko rastline v rizosferi akumulirajo patogene mikrobo, ki ustvarjajo za rastline škodljive pogoje (Bever, 1994). Te povratne zanke imajo močan selekcijski vpliv tako na rastline kot na mikrobo (van der Putten, 1997). Po raziskavah Klironomosa (2002) in Reinharta in sod. (2003) je povratna zanka med rastlinami in talno združbo nevtralna ali pozitivna v novem okolju in negativna v območju naravne razširjenosti. Invazivne rastlinske vrste pogosto kažejo v novem okolju pozitivno povratno zanko s talno združbo in imajo več koristi od interakcij z mikoriznimi glivami kot njihovi naravni kompetitorji (Klironomos, 2002; Reinhart in sod., 2003). Zhang in sod. (2007) so v primeru invazivne vrste *S. canadensis* ugotovili, da alelopatske snovi lahko celo škodujejo mikoriznim interakcijam domorodnih vrst.

Proučevanje alelopatije najpogosteje poteka v laboratorijih in na poljih, pod kontroliranimi pogoji. Najpogosteje opažena alelopatska aktivnost se izraža na zakasneni ali zavrti kaljivosti semen ter povečani ali zmanjšani rasti korenin in poganjkov. Butcko in Jensen (2002) in Abhilasha in sod. (2008) so ugotovili, da ekstrakti vrste *S. canadensis* inhibirajo kalitev semen in rast korenin testnih rastlin. Jakost inhibicije je sorazmerna s koncentracijo ekstrakta. Večina študij je osredotočena na zgodnje faze rasti, torej na čas visoke metabolne aktivnosti pa tudi velike dovzetnosti za številne okoljske dejavnike (Lovett in Ryuntyu, 1992).

2.5 OKSIDATIVNI STRES

Kisik je nujen za življenje rastlin. S pojavom oksidativnega metabolizma pa je prišlo tudi do pojava reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS, angl. Reactive oxygen species), ki nastajajo kot stranski produkt. ROS so reducirane oblike atmosferskega kisika. Med najpomembnejše sodijo superoksidni radikal ($O_2^{\cdot-}$), singletni kisik (1O_2), vodikov peroksid (H_2O_2) in hidroksilni radikal (HO^{\cdot}) (Mittler, 2002). ROS so pomemben odgovor rastlin tako na biotski kot abiotski stres. Njihova vloga je dvojna; poškodba celic in obenem njihova obramba. Prav zaradi tako različnih vlog, je natančna regulacija nivoja ROS v celicah izjemnega pomena (Dat in sod., 2000).

Redukcija O_2 do H_2O zagotavlja energijo, ki omogoča izjemno kompleksnost višjih organizmov. Vendar, če je ta redukcija nepopolna, pride do pojava ROS. Redukcija O_2 poteka v štirih stopnjah.



V prvem koraku redukcije O_2 nastanejo relativno kratkožive ROS, ki slabo difundirajo; vodikov peroksil ($HO_2^{\cdot-}$) in superoksid ($O_2^{\cdot-}$). V naslednji stopnji nastane vodikov peroksid (H_2O_2), ki je dolgoživa molekula in lahko difundira stran od mesta nastanka. Kot zadnji v seriji redukcij nastane hidroksilni radikal (HO_2^{\cdot}) (Dat in sod., 2000). ROS so zelo reaktivne. Sposobne so oksidacije različnih celičnih sestavin in lahko povzročijo celično smrt. Smrt nastopi zaradi peroksidacije membranskih lipidov, oksidacije proteinov, inhibicije encimov in poškodb nukleinskih kislin. ROS nastajajo v kloroplastih med fotosintezo, v mitohondrijih med celičnim dihanjem in v mikrotelescih, kot so peroksisomi, med fotorespiracijo. V normalnih pogojih je produkcija ROS v celici relativno nizka. Številni stresorji, ki porušijo celično homeostazo, pa povzročijo porast ROS. Taki dejavniki so suša, slanost, ohladitev, toplotni šok, težke kovine, UV-sevanje, onesnaževalci zraka kot sta ozon in SO_2 , mehanski stres, pomanjkanje hranil, napad patogenov in močna svetloba (Mittler, 2002). Povečana produkcija ROS med stresom lahko predstavlja nevarnost za celico. ROS pa niso le škodljivi metabolni produkti. V nizkih koncentracijah so pomembne signalne molekule, ki aktivirajo obrambne poti, in tako služijo sistemski obrambi. S krepitvijo celičnih sten omejijo širjenje patogenov, lahko pa tudi direktno ubijejo patogene (Dat in sod., 2000).

ROS so normalno prisotne v vseh aerobnih celicah v ravnovesju z biokemičnimi antioksidanti. Ko se ravnovesje poruši, pride do oksidativnega stresa. Ta nastopi zaradi presežka ROS, pomanjkanja antioksidantov ali kombinacije obojega (Scandalios, 2000).

Za zmanjšanje škodljivih učinkov ROS imajo aerobni organizmi ne-encimsko in encimsko antioksidativno obrambo.

1. Ne-encimska obramba vključuje vitamine C in E, glutation, askorbat, tokoferole, flavonoide, alkaloidne in karotene.

2. Encimska obramba vključuje superoksid dismutaze, katalaze, peroksidaze (gvajakol peroksidaza, askorbat peroksidaza), reduktaze in druge encime oksidativnega metabolizma.

Glavno antioksidativno obrambo predstavljajo superoksid dismutaze (SOD), askorbat peroksidaze (A-POD) in katalaze (CAT). Kombinacija več antioksidantov deluje bolje kot vsak antioksidant zase (Apáti, 2003).

Superoksid dismutaze se nahajajo v različnih celičnih organelih, kot so kloroplasti, mitohondriji, peroksisomi in v citosolu. Katalizirajo redukcijo dveh O_2^- radikalov v H_2O_2 in O_2 . H_2O_2 nato odstranijo katalaze in peroksidaze. Katalaze se nahajajo v peroksisomih, glioksisomih in mitohondrijih. Odstranijo večino H_2O_2 , ki nastane med fotorespiracijo in celičnim dihanjem. Peroksidaze sodelujejo pri biosintezi lignina, razgradnji avksinov in pretvarjajo H_2O_2 v vodo. Uporabljajo različne donorje elektronov. Pri gvajakol peroksidazi je to gvajakol, pri askorbat peroksidazi, ki se nahaja v kloroplastih in citosolu, pa askorbat (Hegedüs in sod. 2001). Čeprav tako katalaze kot peroksidaze odstranjujejo H_2O_2 , obstaja med njimi pomembna razlika. Katalaze imajo nižjo afiniteto do H_2O_2 in tako odstranijo pretežni del H_2O_2 , ko je le ta prisoten v visokih koncentracijah. V nasprotju pa imajo peroksidaze visoko afiniteto do H_2O_2 , kar omogoča odstranjevanje H_2O_2 , prisotnega v nizkih koncentracijah (Dat in sod., 2000).

Antioksidativna kapaciteta organizma je odvisna od pogostosti stresnih rastnih razmer, ki povzročijo izbruh ROS, od vrste rastline in od njene razvojne stopnje. Kapaciteta listnih antioksidantov se spreminja tudi s fiziološko starostjo lista ter njegovo lego in s tem osvetljenostjo (Dat in sod., 2000).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

Vzorci treh vrst zlate rozge, rod *Solidago*, smo nabrali v Sloveniji. Vrsti *S. virgaurea* in *S. gigantea* smo nabrali v Kal Koritnici pri Bovcu, dne 24. 7. 2009, *S. canadensis* pa v Novih Jaršah v Ljubljani, dne 19. 8. 2009. Vzorce so nabrali in določili na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin. Rastline smo ločili na liste in korenine, jih liofilizirali, zmleli in do uporabe hranili v suhem in temnem prostoru pri sobni temperaturi.

3.2 PRIPRAVA EKSTRAKTOV

3.2.1 Vodni ekstrakti

Po 0,4 g liofiliziranega rastlinskega materiala smo ekstrahirali z 10 ml deionizirane vode. Uporabili smo 50 ml erlenmajerice, ki smo jih pokrili z aluminijasto folijo in oblepili s parafilmom. Ekstrakcija je potekala 24 ur na stresalniku pri 700 obratih/min in pri temperaturi 4 °C. Po končani ekstrakciji smo ekstrakte 30 min centrifugirali (centrifuga 5417 R, Eppendorf, Nemčija) pri 14000 obratih/min in pri temperaturi 4 °C. Supernatant smo previdno odpipetirali. Eno polovico supernatanta smo neposredno odpipetirali v sterilne plastične epice (2 ml), drugo polovico pa smo zaradi morebitnih okužb še prej prefiltrirali skozi filter (Millipore, Irska) z 0,22 µm velikimi porami. Tako smo dobili filtrirane in nefiltrirane vodne ekstrakte, ki smo jih do uporabe hranili pri temperaturi -20 °C.

3.2.2 Organski ekstrakti

Za pripravo organskih ekstraktov smo vzeli po 0,5 g liofiliziranih listov in 0,3 g liofiliziranih korenin posamezne vrste zlate rozge. Zaradi boljše ekstrakcije smo liste ekstrahirali v 15 ml topila, korenine pa v 10 ml topila. Uporabili smo tri vrste topila (100 % aceton, 96 % etanol in 100 % metanol) in tako dobili acetonske, etanolne in metanolne ekstrakte. Ekstrakcija je potekala v 50 ml erlenmajericah, pokritih z aluminijasto folijo in oblepljenih s parafilmom. Le te smo stresali 24 ur na stresalniku pri 175 obratih/min in pri temperaturi 37 °C. Ekstrakte smo nato prenučirali skozi filter in filtrate prelili v čiste erlenmajerice ter pustili, da topilo izhlapi. Posušene acetonske in metanolne ekstrakte smo raztopili v 1 ml 96 % etanola, etanolne pa v 1 ml 75 % etanola. Tako smo dobili 18 organskih ekstraktov. Do uporabe smo jih hranili pri 4 °C.

3.2.3 Ekstrakti za proteinske in encimske teste

3.2.3.1 Proteinski ekstrakti zlate rozge (*Solidago* sp.)

Uporabili smo po 30 mg liofiliziranih korenin in po 10 mg liofiliziranih listov. Material smo strli v hladni terilnici in dodali 2 ml 100 mM kalijevega fosfatnega pufra (pH 7), ki smo ga pripravili iz (61,5 ml) 100 mM K_2HPO_4 in (38,5 ml) 100 mM KH_2PO_4 . Ekstrakte smo nato 15 min centrifugirali (centifuga 5417 R, Eppendorf, Nemčija) pri 14000 obratih/min in pri temperaturi 4 °C. Supernatant smo odlili v nove epice in jih postavili na led. Isti dan smo določili vsebnost proteinov. Vrednosti so prikazane v Prilogi B.

3.2.3.2 Proteinski ekstrakti črne detelje (*Trifolium pratense*) in ovčje bilnice (*Festuca ovina*)

Po 20 semen črne detelje (*Trifolium pratense*) oz. ovčje bilnice (*Festuca ovina*) smo dali v male Petrijeve plošče z dvojnimi filter papirjem. Semena smo zalili s po 3 ml 0,6 % vodnega ekstrakta listov vrst *Solidago*, 4 % vodnega ekstrakta korenin vrst *Solidago* (priprava ekstraktov spodaj) in z destilirano vodo (kontrola). Za vsako vrsto in tretma smo pripravili po pet vzporednih bioloških ponovitev. Petrijevke smo dali v komoro (14 h svetlobe / 10 h teme, T v svetlobi 24 °C / T v temi 20 °C, vlaga v svetlobi 50 % / vlaga v temi 60 %) za en teden in po potrebi zalivali z destilirano vodo. Po sedmih dneh smo kalice ločili na korenine in poganjke ter jih shranili v epice, tako da je bila v vsaki epici približno enaka masa. Epice smo zamrznili v tekočem dušiku. Zamrznjen rastlinski material smo nato strli v hladni terilnici in ekstrahirali v 100 mM kalijevem fosfatnem pufri (pH 7), ki smo ga pripravili iz (61,5 ml) 100 mM K_2HPO_4 in (38,5 ml) 100 mM KH_2PO_4 (~ 50 mg materiala v 2 ml pufra). Ekstrakte smo 15 min centrifugirali (centifuga 5417 R, Eppendorf, Nemčija) pri 14000 obratih/min in pri temperaturi 4 °C. Supernatant smo odlili v nove epice in jih postavili na led. Še isti dan smo določili vsebnost proteinov in aktivnost antioksidativnih encimov.

Kalice črne detelje in ovčje bilnice, tretirane z ekstrakti *S. gigantea* in *S. virgaurea*, smo dobili od Aleksandre Stevanović, ki jih je pripravila v okviru svoje diplomske naloge. Kalice črne detelje in ovčje bilnice, tretirane z ekstrakti *S. canadensis*, smo po enakem protokolu, opisanem zgoraj, pripravili sami. 0,6 % ekstrakte listov in 4 % ekstrakte korenin smo uporabili zato, ker je pri teh koncentracijah vzklilo dovolj semen in smo tako imeli dovolj materiala za analizo.

Priprava vodnih ekstraktov vrst *Solidago* za tretiranje semen:

1. 0,6 % vodni ekstrakti listov: 0,06 g liofiliziranih listov smo ekstrahirali v 10 ml destilirane vode. Ekstrakcija je potekala 30 min na magnetnem mešalu. Ekstrakte smo nato prenučirali skozi filter.

2. 4 % vodni ekstrakti korenin: 0,4 g liofiliziranih korenin smo ekstrahirali v 10 ml destilirane vode. Ekstrakcija je potekala 30 min na magnetnem mešalu. Ekstrakte smo nato prenučirali skozi filter.

3.3 DOLOČANJE KONCENTRACIJE SUHE SNOVI V EKSTRAKTIH

Suho snov v ekstraktih smo določili s sušenjem 200 μ l ali 500 μ l (odvisno od razpoložljive količine) ekstrakta v predhodno stehtani in označeni mali stekleni Petrijevi plošči. Ekstrakte smo sušili v sušilniku 30 minut pri 105 °C. Po sušenju smo Petrijeve plošče ponovno stehtali. Iz razlike smo dobili neto vrednost suhe snovi v vzorcu ter nato preračunali koncentracijo suhe snovi v mg/ml.

3.4 DOLOČANJE BIOLOŠKE AKTIVNOSTI

3.4.1 Protibakterijska aktivnost

Protibakterijsko aktivnost smo testirali s standardnim difuzijskim testom. Kot testne seve smo uporabili po Gramu negativno bakterijsko vrsto *Escherichia coli* in po Gramu pozitivni vrsti *Bacillus subtilis* ter *Staphylococcus aureus*. Vsi sevi so v zbirki Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.

Tekoče gojišče za bakterije smo pripravili tako, da smo v 100 ml destilirane vode raztopili 2,5 g gojišča Luria Broth (Sigma, ZDA). Po 10 ml raztopine smo nalili v štiri 100 ml erlenmajerice in jih avtoklavirali. Ko so se ohladile, smo vanje sterilno nacepili zgoraj naštete bakterije. Četrta erlenmajerica je veljala kot kontrola. Vse štiri erlenmajerice smo preko noči stresali pri 150 obratih/min in pri temperaturi 37 °C. Naslednji dan smo določili število bakterij v prekončni kulturi. Po 1 ml gojišča smo sterilno prenesli v plastično kiveto in na dvožarkovnem spektrofotometru UV-1800 (Shimadzu, Japonska) izmerili optično gostoto pri 600 nm. Kot slepi poskus smo uporabili sterilno tekoče gojišče. Iz optične gostote in s pomočjo standardnih umeritvenih krivulj smo določili število bakterij. Nato smo izračunali volumen tekoče bakterijske kulture, da je bila končna koncentracija enaka 5×10^5 bakterijskih kolonij na 1 l gojišča.

Sledila je priprava agarja. V vsaki od treh 2-litrskih erlenmajeric smo v 1 l destilirane vode raztopili 25 g gojišča Luria Broth in 15 g tehničnega agarja. Erlenmajerice smo nato pokrili z aluminijasto folijo in jih avtoklavirali. Ko se je vroč medij ohladil na primerno temperaturo (~ 42 °C), smo vanj sterilno prenesli preračunane volumne tekočih bakterijskih kultur ter dobro premešali. Sledilo je razlivanje na Petrijeve plošče. Le te smo do uporabe hranili pri temperaturi 4 °C.

S sterilnim plutovrtom smo v vsaki plošči zvrtali do 4 luknje premera 1 cm. V vsako od njih smo dali po 100 μ l organskega ali vodnega ekstrakta treh različnih vrst *Solidago*. Kot

kontrolno smo uporabili deionizirano vodo za vodne ekstrakte, 96 % etanol za acetonske in metanolne ekstrakte ter 75 % etanol za etanolne ekstrakte. Petrijeve plošče z nastavljenim testom smo nato oblepili s parafilmom in inkubirali pri 37 °C. Po 24-urni inkubaciji smo odčitali polmere inhibicijskih con.

Z rastlinskimi ekstrakti, ki so imeli protibakterijsko aktivnost, smo poskus neodvisno ponovili trikrat.

3.4.2 Protiglivna aktivnost

Protiglivno aktivnost ekstraktov smo testirali na treh glivah; sivorumeni mraznici, *Armillaria mellea* (cl. *Ascomycetes*) in *Fusarium* sp. (cl. *Basidiomycetes*) iz debla *Mycota* ter *Phytophthora infestans* (cl. *Oomycetes*) iz debla *Oomycota*. Vse glive so v zbirki Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin Oddelka za biologijo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.

Za vrsti *Armillaria mellea* in *Fusarium* sp. smo pripravili gojišče iz krompirjevega dekstroznega agarja (PDA, angl. Potato Dextrose Agar) (glej poglavje 3.4.2.1). Za vrsto *Phytophthora infestans* smo pripravili α -rženo gojišče RYE (glej poglavje 3.4.2.1). Gojišča smo razlili na Petrijeve plošče. Do uporabe smo jih hranili pri temperaturi 4 °C.

Iz izhodne plošče z glivo smo s sterilno spatulo izrezali micelij (5 mm \times 5 mm) in ga sterilno prenesli na ustrezno gojišče v Petrijevi plošči. Položili smo ga na sredino plošče. Tako nacepljene plošče smo oblepili s parafilmom in jih inkubirali v temi pri sobni temperaturi.

Ko je gliva dovolj zrasla (~ 3 cm v premeru) smo nastavili protiglivni test. Avtoklavirane diske filtrirnega papirja s premerom 1,5 cm smo položili 1 mm od glivnega micelija. Na diske smo nanесли po 100 μ l organskega ali vodnega ekstrakta treh različnih vrst *Solidago*. Kot kontrolno smo uporabili deionizirano vodo za vodne ekstrakte, 96 % etanol za acetonske in metanolne ekstrakte ter 75 % etanol za etanolne ekstrakte. Testne plošče smo oblepili s parafilmom in jih inkubirali v temi pri sobni temperaturi ter opazovali rast glive. Protiglivne aktivnosti ni bilo, če je gliva nemoteno prerasla papirnate diske. Aktivnost je bila izražena takrat, ko se je rast glive ob disku upočasnila ali ustavila.

3.4.2.1 Priprava gojišč

1. Gojišče PDA

Sestavine:

- 39 g krompirjev dekstrozni agar (PDA, angl. Potato Dextrose Agar)
- 1000 ml destilirana voda

Destilirano vodo smo nalili v erlenmajerico in v njej raztopili krompirjev dekstrozni agar. Erlenmajerico smo nato pokrili z aluminijasto folijo in jo avtoklavirali. Po avtoklaviranju smo gojišče razlili na Petrijeve plošče. Le-te smo do uporabe hranili pri temperaturi 4 °C.

2. α -rženo gojišče RYE

Sestavine:

- 60 g nerazkuženo rženo seme
- 25 g saharoza
- 15 g tehnični agar
- 1000 ml destilirana voda

Nerazkuženo rženo seme smo dali v pladenj in ga prelili z destilirano vodo tako, da je bilo prekrito. Pladenj smo pokrili z aluminijasto folijo in pustili 24 ur pri sobni temperaturi. Po 24-ih urah smo odlili vodo in jo shranili. Namočeno seme smo dali v čašo in ga prelili z destilirano vodo tako, da je bil nivo vode 2,5 cm nad semenom. Vse skupaj smo na drobno zmleli v mešalniku. Zmleto seme smo 1 uro grel v vodni kopeli pri temperaturi 68 °C. Po končani kopeli smo ga stisnili skozi krpo in dodali vodo, v kateri smo namočili seme na začetku postopka. Raztopino smo 20 min avtoklavirali pri temperaturi 121 °C. Po avtoklaviranju smo dodali ostale natehtane sestavine gojišča in mešali na magnetnem mešalu. pH vrednost je bila ~ 5,6. Raztopino smo 12 min avtoklavirali pri temperaturi 121 °C in nato razlili v Petrijeve plošče. Le te smo do uporabe hranili pri temperaturi 4 °C.

3.5 VSEBNOST PROTEINOV

Količino proteinov v vzorcih smo določili na podlagi primerjave izmerjene absorpcije z umeritveno krivuljo za goveji serumski albumin (BSA, angl. Bovine Serum Albumin). Uporabili smo komplet za določanje proteinov BCA Protein Assay Kit (Pierce, ZDA).

Za umeritveno krivuljo smo pripravili serijo proteinskih standardov z različnimi koncentracijami govejega serumskega proteina (0, 0,025, 0,125, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5 in 2 mg/ml). Vsako koncentracijo smo pripravili v treh tehničnih ponovitvah. Pripravili smo mešanico reagentov iz kompleta za BCA test. Reagent A in reagent B smo zmešali v razmerju 50:1. Testne mešanice smo pripravili v epicah iz standardov in mešanice reagentov A in B v razmerju 1:20 ter jih nato 30 min inkubirali v vodni kopeli pri temperaturi 37 °C. Po končani inkubaciji smo vzorce dali na led in jih ohladili na sobno temperaturo. Z dvožarkovnim spektrofotometrom (Shimadzu, Japonska) smo pri 562 nm izmerili absorpcijo vzorcev. Meritve smo opravili v 10-ih minutah po zaključeni inkubaciji. Za referenčni vzorec smo uporabili destilirano vodo. Na podlagi absorpcij in znanih koncentracij BSA smo določili umeritveno krivuljo (Priloga A).

Na enak način smo izmerili vsebnost proteinov v ekstraktih zlate rozge (Priloga B) in v kalicah, ki smo jih pripravili po postopku, opisanem v poglavju 3.2.3.

3.6 ANTIOKSIDATIVNI ENCIMI

3.6.1 Gvajakol peroksidaza

Encimsko aktivnost gvajakol peroksidaze (G-POD) smo določili spektrofotometrično z merjenjem naraščanja absorpcije pri 470 nm, ki je bila posledica polimerizacije gvajakola v tetragvajakol. Uporabili smo PVC-kivete za enkratno uporabo.

Dnevno svež reagenčni pufer smo pripravili iz 39,6 ml 50 mM kalijevega fosfatnega pufera (pH 7), 0,4 ml gvajakola in 31,2 μ l 10 mM H₂O₂. Raztopino smo dobro premešali. Zaradi občutljivosti H₂O₂ na svetlobo smo stekleničko zavili v aluminijasto folijo. Reagenčni pufer smo do uporabe pustili pri sobni temperaturi.

Testno mešanico smo pripravili v kiveti iz 900 μ l reagenčnega pufera in 100 μ l ekstrakta črne detelje ali ovčje bilnice (glej poglavje 3.2.3.2). Mešanico smo na hitro premešali s pipeto ter izmerili absorpcijo. Meritev je potekala 1 min s 5-sekundnimi intervali. Na dobljeni krivulji smo določili najbolj linearen del in izmerili spremembo absorpcije v minuti. Zaradi razlik v aktivnosti G-POD med posameznimi vzorci ni bilo mogoče povsod določiti istega časovnega intervala, kar bi bilo najbolj optimalno.

$$\text{Izračun encimske aktivnosti: } EA = \frac{\Delta A/\text{min}}{\varepsilon \times l}$$

ΔA = sprememba absorpcije

l = debelina kivete = 1 cm

ε = ekstinkcijski koeficient tetragvajakola pri 470 nm = 26,6/mM \times cm

Encimsko aktivnost (EA) smo preračunali glede na maso proteinov (m) v vzorcu in dobili specifično encimsko aktivnost (SEA).

$$SEA = \frac{EA}{m}$$

SEA ekstraktov črne detelje ali ovčje bilnice, tretirane z ekstrakti treh vrst zlate rozge, smo delili s SEA kontrole (črna detelja ali ovčja bilnica tretirana z vodo) in izračunali relativno specifično encimsko aktivnost (rSEA), ki smo jo izrazili v odstotkih.

$$rSEA = \frac{SEA}{SEA(\text{kontrola})} \times 100 (\%)$$

3.6.2 Askorbat peroksidaza

Encimsko aktivnost askorbat peroksidaze (A-POD) smo določili spektrofotometrično z merjenjem padanja absorpcije pri 290 nm, ki je bila posledica oksidacije askorbata. Uporabili smo UV-PVC kivete za enkratno uporabo.

Dnevno svež reagenčni pufer smo pripravili iz 39,6 ml 50 mM kalijevega fosfatnega pufera (pH 7), 0,4 ml 0,5 mM Na-askorbata in 31,2 μ l 10 mM H₂O₂. Raztopino smo dobro premešali. Zaradi občutljivosti H₂O₂ na svetlobo smo stekleničko zavili v aluminijasto folijo. Reagenčni pufer smo do uporabe pustili pri sobni temperaturi.

Testno mešanico smo pripravili v kiveti iz 900 μ l reagenčnega pufera in 100 μ l ekstrakta črne detelje ali ovčje bilnice (glej poglavje 3.2.3.2). Mešanico smo na hitro premešali s pipeto in izmerili absorpcijo. Meritev je potekala 1 min s 5-sekundnimi intervali. Na dobljeni krivulji smo določili najbolj linearen del in izmerili spremembo absorpcije v minuti. Zaradi razlik v aktivnosti A-POD med posameznimi vzorci ni bilo mogoče povsod določiti istega časovnega intervala, kar bi bilo najbolj optimalno.

$$\text{Izračun encimske aktivnosti: } EA = \frac{\Delta A / \text{min}}{\epsilon \times l}$$

ΔA = sprememba absorpcije

l = debelina kivete = 1 cm

ϵ = ekstinkcijski koeficient askorbata pri 290 nm = 2,8/mM \times cm

Encimsko aktivnost (EA) smo preračunali glede na maso proteinov (m) v vzorcu in dobili specifično encimsko aktivnost (SEA).

$$SEA = \frac{EA}{m}$$

SEA ekstraktov črne detelje ali ovčje bilnice, tretirane z ekstrakti treh vrst zlate rozge, smo delili s SEA kontrole (črna detelja ali ovčja bilnica tretirana z vodo) in izračunali relativno specifično encimsko aktivnost (rSEA), ki smo jo izrazili v odstotkih.

$$rSEA = \frac{SEA}{SEA(\text{kontrola})} \times 100 (\%)$$

3.6.3 Katalaza

Encimsko aktivnost katalaze (CAT) smo določili spektrofotometrično z merjenjem padanja absorpcije pri 240 nm zaradi razgradnje H₂O₂. Uporabili smo UV-PVC kivete za enkratno uporabo.

Dnevno svež reagenčni pufer smo pripravili iz 39,97 ml 50 mM kalijevega fosfatnega pufera (pH 7) in 31,2 μ l 10 mM H₂O₂. Raztopino smo dobro premešali. Zaradi občutljivosti H₂O₂ na svetlobo smo stekleničko zavili v aluminijasto folijo. Reagenčni pufer smo do uporabe pustili pri sobni temperaturi.

Testno mešanico smo pripravili v kiveti iz 950 μ l reagenčnega pufera in 50 μ l ekstrakta črne detelje ali ovčje bilnice (glej poglavje 3.2.3.2). Mešanico smo na hitro premešali s pipeto in izmerili absorpcijo. Meritev je potekala 1 min s 5-sekundnimi intervali. Na

dobljeni krivulji smo določili najbolj linearen del in izmerili spremembo absorpcije v minuti. Zaradi razlik v aktivnosti CAT med posameznimi vzorci ni bilo mogoče povsod določiti istega časovnega intervala, kar bi bilo najbolj optimalno.

$$\text{Izračun encimske aktivnosti: } EA = \frac{\Delta A/\text{min}}{\epsilon \times l}$$

ΔA = sprememba absorpcije

l = debelina kivete = 1 cm

ϵ = ekstinkcijski koeficient H_2O_2 pri 240 nm = 40/mM \times cm

Encimsko aktivnost (EA) smo preračunali glede na maso proteinov (m) v vzorcu in dobili specifično encimsko aktivnost (SEA).

$$SEA = \frac{EA}{m}$$

SEA ekstraktov črne detelje ali ovčje bilnice, tretirane z ekstrakti treh vrst zlate rozge, smo delili s SEA kontrole (črna detelja ali ovčja bilnica tretirana z vodo) in izračunali relativno specifično encimsko aktivnost (rSEA), ki smo jo izrazili v odstotkih.

$$rSEA = \frac{SEA}{SEA(\text{kontrola})} \times 100 (\%)$$

3.7 STATISTIČNA ANALIZA

Za obdelavo podatkov smo uporabili računalniška programa Microsoft Excel in GraphPad Prism. Iz podatkov smo izračunali povprečno vrednost in standardno deviacijo. Natančnejši opis statistične analize je vključen v poglavje Rezultati ob posameznih slikah in preglednicah.

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE KONCENTRACIJE SUHE SNOVI V EKSTRAKTIH

Preglednica 1 prikazuje koncentracijo suhe snovi v posameznih ekstraktih zlate rozge. Organski ekstrakti so imeli v povprečju večjo koncentracijo suhe snovi v primerjavi z vodnimi ekstrakti. Največje koncentracije suhe snovi smo določili v etanolnih in metanolnih ekstraktih.

Preglednica 1: Koncentracija suhe snovi v ekstraktih.

Vrsta <i>Solidago</i>	Vrsta ekstrakta		Koncentracija suhe snovi (mg/ml)
<i>S. virgaurea</i>	Listni ekstrakt	Acetonski ekstrakt	25,5
		Etanolni ekstrakt	43,5
		Metanolni ekstrakt	26,0
		Vodni ekstrakt	11,4
	Koreninski ekstrakt	Acetonski ekstrakt	8,8
		Etanolni ekstrakt	33,4
		Metanolni ekstrakt	14,8
		Vodni ekstrakt	14,2
<i>S. canadensis</i>	Listni ekstrakt	Acetonski ekstrakt	26,0
		Etanolni ekstrakt	54,0
		Metanolni ekstrakt	68,5
		Vodni ekstrakt	13,8
	Koreninski ekstrakt	Acetonski ekstrakt	10,2
		Etanolni ekstrakt	19,0
		Metanolni ekstrakt	23,8
		Vodni ekstrakt	13,0
<i>S. gigantea</i>	Listni ekstrakt	Acetonski ekstrakt	44,0
		Etanolni ekstrakt	76,0
		Metanolni ekstrakt	38,0
		Vodni ekstrakt	11,0
	Koreninski ekstrakt	Acetonski ekstrakt	19,8
		Etanolni ekstrakt	33,0
		Metanolni ekstrakt	22,8
		Vodni ekstrakt	13,4

4.2 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST

Preglednica 2 in Preglednica 3 prikazujeta rezultate testa protibakterijske aktivnosti ekstraktov vrst *Solidago*. Pri organskih ekstraktih je protibakterijsko aktivnost proti po Gramu negativni bakteriji *Escherichia coli* kazal le 1 od 54 ekstraktov in sicer metanolni ekstrakt korenin *S.canadensis*. Protibakterijska aktivnost je bila bolj izražena proti po Gramu pozitivnima bakterijama *Staphylococcus aureus* (5 ekstraktov) in *Bacillus subtilis* (10 ekstraktov). Največje cone inhibicije smo izmerili pri vrsti *Bacillus subtilis*.

V primerjavi z listnimi ekstrakti so imeli koreninski večjo aktivnost. Od vseh treh preučevanih vrst *Solidago* je imela največjo protibakterijsko aktivnost *S. gigantea*. Tako listni kot koreninski ekstrakti *S. virgaurea* pa niso kazali protibakterijske aktivnosti.

Pri vodnih ekstraktih nismo opazili protibakterijske aktivnosti.

Kontrole niso delovale protibakterijsko.

Preglednica 2: Protibakterijska aktivnost listnih ekstraktov. Prikazana je povprečna vrednost treh meritev (\pm standardna deviacija).

Vrsta <i>Solidago</i>	Vrsta bakterije	Listni ekstrakt	Cona inhibicije (mm)*
<i>S. virgaurea</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Acetonski ekstrakt	-
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	-
		Vodni ekstrakt	-
	<i>Escherichia coli</i>	Acetonski ekstrakt	-
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	-
		Vodni ekstrakt	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Acetonski ekstrakt	-
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	-
		Vodni ekstrakt	-
<i>S. canadensis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Acetonski ekstrakt	$2,7 \pm 0,6$
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	-
		Vodni ekstrakt	-
	<i>Escherichia coli</i>	Acetonski ekstrakt	-
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	-
		Vodni ekstrakt	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Acetonski ekstrakt	-
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	-
		Vodni ekstrakt	-
<i>S. gigantea</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Acetonski ekstrakt	$7,3 \pm 1,2$
		Etanolni ekstrakt	$4,3 \pm 0,6$
		Metanolni ekstrakt	$5,3 \pm 0,6$
		Vodni ekstrakt	-
	<i>Escherichia coli</i>	Acetonski ekstrakt	-
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	-
		Vodni ekstrakt	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Acetonski ekstrakt	$3,0 \pm 0,0$
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	$1,7 \pm 0,6$
		Vodni ekstrakt	-

* - = ni aktivnosti

Preglednica 3: Protibakterijska aktivnost koreninskih ekstraktov. Prikazana je povprečna vrednost treh meritev (\pm standardna deviacija).

Vrsta <i>Solidago</i>	Vrsta bakterije	Koreninski ekstrakt	Cona inhibicije (mm)*
<i>S. virgaurea</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Acetonski ekstrakt	-
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	-
		Vodni ekstrakt	-
	<i>Escherichia coli</i>	Acetonski ekstrakt	-
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	-
		Vodni ekstrakt	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Acetonski ekstrakt	-
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	-
		Vodni ekstrakt	-
<i>S. canadensis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Acetonski ekstrakt	2,0 \pm 0,0
		Etanolni ekstrakt	1,0 \pm 1,2
		Metanolni ekstrakt	2,7 \pm 1,2
		Vodni ekstrakt	-
	<i>Escherichia coli</i>	Acetonski ekstrakt	-
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	1,0 \pm 0,0
		Vodni ekstrakt	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Acetonski ekstrakt	-
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	2,3 \pm 1,5
		Vodni ekstrakt	-
<i>S. gigantea</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Acetonski ekstrakt	8,0 \pm 0,0
		Etanolni ekstrakt	5,7 \pm 0,6
		Metanolni ekstrakt	8,7 \pm 0,6
		Vodni ekstrakt	-
	<i>Escherichia coli</i>	Acetonski ekstrakt	-
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	-
		Vodni ekstrakt	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Acetonski ekstrakt	4,0 \pm 1,7
		Etanolni ekstrakt	2,0 \pm 0,0
		Metanolni ekstrakt	-
		Vodni ekstrakt	-

* - = ni aktivnosti

4.3 PROTIGLIVNA AKIVNOST

Protiglivna aktivnost organskih ekstraktov je bila šibka, medtem ko vodni ekstrakti niso imeli protiglivne aktivnosti.

Listni organski ekstrakti so delovali protiglivno le proti vrsti *Armillaria mellea*. Pri *S. virgaurea* je bil to acetonski ekstrakt, pri *S. canadensis* metanolni ekstrakt, pri *S. gigantea* pa oba, acetonski in metanolni (Preglednica 4).

Koreninski organski ekstrakti so imeli pogosteje izraženo protiglivno aktivnost kot listni. Vse vrste rodu *Solidago* so imele protiglivno aktivnost proti vrsti *Fusarium* sp., vrsta *S. gigantea* pa je delovala protiglivno tudi proti vrsti *Armillaria mellea* (Preglednica 5).

Nobeden od ekstraktov ni zaviral rasti vrste *Phytophthora infestans*.

Kontrole niso delovale protiglivno.

Preglednica 4: Protiglivna aktivnost listnih ekstraktov.

Vrsta <i>Solidago</i>	Vrsta glive	Listni ekstrakt	Protiglivna aktivnost*
<i>S. virgaurea</i>	<i>Armillaria mellea</i>	Acetonski ekstrakt	+
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	-
		Vodni ekstrakt	-
	<i>Fusarium sp.</i>	Acetonski ekstrakt	-
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	-
		Vodni ekstrakt	-
	<i>Phytophthora infestans</i>	Acetonski ekstrakt	-
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	-
		Vodni ekstrakt	-
<i>S. canadensis</i>	<i>Armillaria mellea</i>	Acetonski ekstrakt	-
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	+
		Vodni ekstrakt	-
	<i>Fusarium sp.</i>	Acetonski ekstrakt	-
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	-
		Vodni ekstrakt	-
	<i>Phytophthora infestans</i>	Acetonski ekstrakt	-
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	-
		Vodni ekstrakt	-
<i>S. gigantea</i>	<i>Armillaria mellea</i>	Acetonski ekstrakt	+
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	+
		Vodni ekstrakt	-
	<i>Fusarium sp.</i>	Acetonski ekstrakt	-
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	-
		Vodni ekstrakt	-
	<i>Phytophthora infestans</i>	Acetonski ekstrakt	-
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	-
		Vodni ekstrakt	-

* - = ni aktivnosti

+ = šibka aktivnost

Preglednica 5: Protiglivna aktivnost koreninskih ekstraktov.

Vrsta <i>Solidago</i>	Vrsta glive	Koreninski ekstrakt	Protiglivna aktivnost*
<i>S. virgaurea</i>	<i>Armillaria mellea</i>	Acetonski ekstrakt	-
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	-
		Vodni ekstrakt	-
	<i>Fusarium sp.</i>	Acetonski ekstrakt	+
		Etanolni ekstrakt	+
		Metanolni ekstrakt	+
		Vodni ekstrakt	-
	<i>Phytophthora infestans</i>	Acetonski ekstrakt	-
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	-
		Vodni ekstrakt	-
<i>S. canadensis</i>	<i>Armillaria mellea</i>	Acetonski ekstrakt	-
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	-
		Vodni ekstrakt	-
	<i>Fusarium sp.</i>	Acetonski ekstrakt	+
		Etanolni ekstrakt	+
		Metanolni ekstrakt	+
		Vodni ekstrakt	-
	<i>Phytophthora infestans</i>	Acetonski ekstrakt	-
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	-
		Vodni ekstrakt	-
<i>S. gigantea</i>	<i>Armillaria mellea</i>	Acetonski ekstrakt	+
		Etanolni ekstrakt	+
		Metanolni ekstrakt	+
		Vodni ekstrakt	-
	<i>Fusarium sp.</i>	Acetonski ekstrakt	+
		Etanolni ekstrakt	+
		Metanolni ekstrakt	+
		Vodni ekstrakt	-
	<i>Phytophthora infestans</i>	Acetonski ekstrakt	-
		Etanolni ekstrakt	-
		Metanolni ekstrakt	-
		Vodni ekstrakt	-

* - = ni aktivnosti

+ = šibka aktivnost

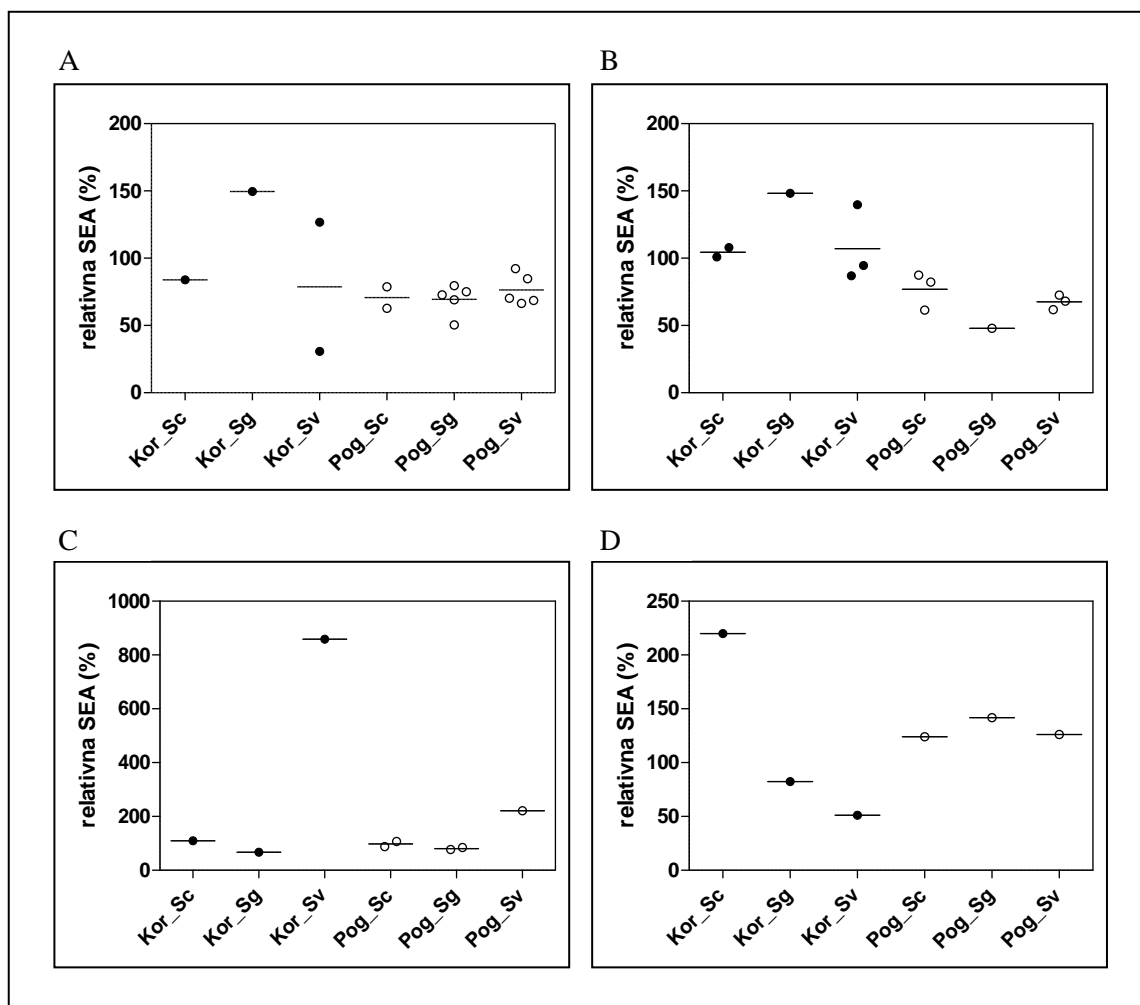
4.4 OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres smo ocenili preko aktivnosti izbranih antioksidativnih encimov v kalicah dveh rastlinskih vrst, črne detelje (*Trifolium pratense*) in ovčje bilnice (*Festuca ovina*). Specifična encimska aktivnost kontrolnih kalic, ki smo jih zalili z destilirano vodo, je predstavljala vrednost 100 %, s katero smo primerjali vzorce kalic, ki smo jih tretirali z različnimi ekstrakti zlate rozge.

4.4.1 Gvajakol peroksidaza

V koreninah detelje smo povišano relativno SEA G-POD izmerili po tretiranju s koreninskimi in listnimi ekstrakti *S. gigantea*. V poganjkih detelje je bila aktivnost G-POD nižja od kontrole.

Pri bilnici smo povišano aktivnost encimov izmerili v koreninah, tretiranih z koreninskim ekstraktom korenin *S. virgaurea* in listnim ekstraktom *S. canadensis*. Listni ekstrakti vseh treh vrst *Solidago* so povzročili povišano aktivnost G-POD.



Slika 4: Relativna specifična encimska aktivnost gvajakol peroksidaze

Slika A prikazuje relativno SEA v koreninah detelje (•, oznaka Kor_) in poganjkih detelje (◦, oznaka Pog_) tretiranih s koreninskim ekstraktom vrst *S. canadensis* (_Sc), *S. gigantea* (_Sg) in *S. virgaurea* (_Sv).

Slika B prikazuje relativno SEA v koreninah detelje (•, oznaka Kor_) in poganjkih detelje (◦, oznaka Pog_) tretiranih z listnim ekstraktom vrst *S. canadensis* (_Sc), *S. gigantea* (_Sg) in *S. virgaurea* (_Sv).

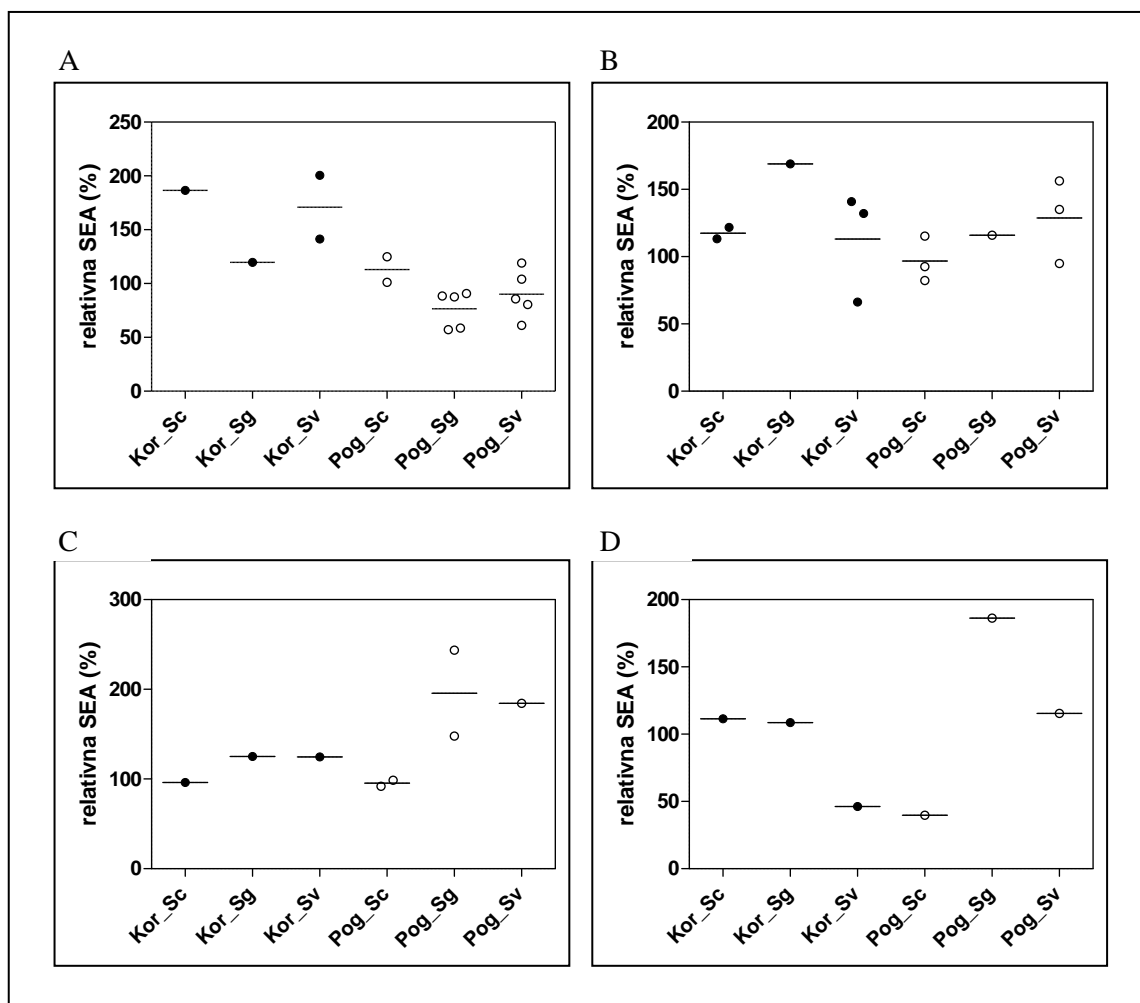
Slika C prikazuje relativno SEA v koreninah bilnice (•, oznaka Kor_) in poganjkih bilnice (◦, oznaka Pog_) tretiranih s koreninskim ekstraktom vrst *S. canadensis* (_Sc), *S. gigantea* (_Sg) in *S. virgaurea* (_Sv).

Slika D prikazuje relativno SEA v koreninah bilnice (•, oznaka Kor_) in poganjkih bilnice (◦, oznaka Pog_) tretiranih z listnim ekstraktom vrst *S. canadensis* (_Sc), *S. gigantea* (_Sg) in *S. virgaurea* (_Sv).

Prikazane so vrednosti posameznega poskusa, označene s kroglcem in povprečne vrednosti vseh poskusov, označene s črtico.

4.4.2 Askorbat peroksidaza

V kalicah črne detelje in ovčje bilnice smo v večini vzorcev izmerili povišano relativno SEA A-POD. Aktivnost je bila višja od kontrole ali primerljiva s kontrolo. Nizko aktivnost A-POD smo izmerili le v koreninah bilnice, tretirane z listnim ekstraktom *S. virgaurea* in poganjkih bilnice, tretirane z listnim ekstraktom *S. canadensis*.



Slika 5: Relativna specifična encimska aktivnost askorbat peroksidaze

Slika A prikazuje relativno SEA v koreninah detelje (•, oznaka Kor_) in poganjkih detelje (◦, oznaka Pog_) tretiranih s koreninskim ekstraktom vrst *S. canadensis* (_Sc), *S. gigantea* (_Sg) in *S. virgaurea* (_Sv).

Slika B prikazuje relativno SEA v koreninah detelje (•, oznaka Kor_) in poganjkih detelje (◦, oznaka Pog_) tretiranih z listnim ekstraktom vrst *S. canadensis* (_Sc), *S. gigantea* (_Sg) in *S. virgaurea* (_Sv).

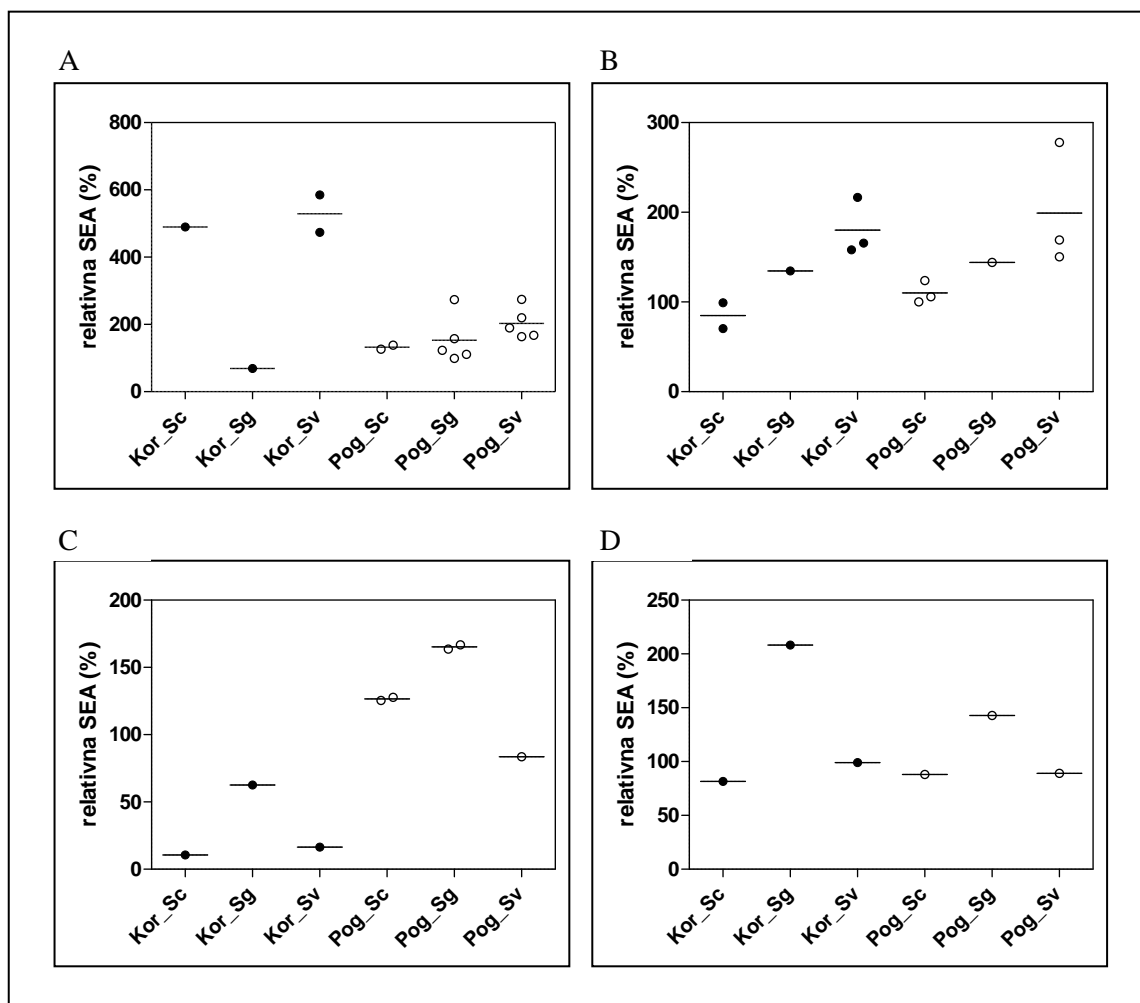
Slika C prikazuje relativno SEA v koreninah bilnice (•, oznaka Kor_) in poganjkih bilnice (◦, oznaka Pog_) tretiranih s koreninskim ekstraktom vrst *S. canadensis* (_Sc), *S. gigantea* (_Sg) in *S. virgaurea* (_Sv).

Slika D prikazuje relativno SEA v koreninah bilnice (•, oznaka Kor_) in poganjkih bilnice (◦, oznaka Pog_) tretiranih z listnim ekstraktom vrst *S. canadensis* (_Sc), *S. gigantea* (_Sg) in *S. virgaurea* (_Sv).

Prikazane so vrednosti posameznega poskusa, označene s krogcem in povprečne vrednosti vseh poskusov, označene s črtico.

4.4.3 Katalaza

Povišane relativne specifične encimske aktivnosti CAT smo izmerili zlasti pri detelji, kjer so bile aktivnosti v glavnem višje od kontrole. Najvišje aktivnosti smo izmerili pri koreninah detelje, tretiranih s koreninskimi ekstrakti. Pri bilnici je bila aktivnost CAT nižja. Povišane vrednosti smo izmerili v poganjkih in koreninah bilnice, tretirane z ekstraktom *S. gigantea*. Izrazito nizke aktivnosti smo izmerili v koreninah bilnice, tretirane s koreninskimi ekstrakti.



Slika 6: Relativna specifična encimska aktivnost katalaze

Slika A prikazuje relativno SEA v koreninah detelje (•, oznaka Kor_) in poganjkih detelje (◦, oznaka Pog_) tretiranih s koreninskim ekstraktom vrst *S. canadensis* (_Sc), *S. gigantea* (_Sg) in *S. virgaurea* (_Sv).

Slika B prikazuje relativno SEA v koreninah detelje (•, oznaka Kor_) in poganjkih detelje (◦, oznaka Pog_) tretiranih z listnim ekstraktom vrst *S. canadensis* (_Sc), *S. gigantea* (_Sg) in *S. virgaurea* (_Sv).

Slika C prikazuje relativno SEA v koreninah bilnice (•, oznaka Kor_) in poganjkih bilnice (◦, oznaka Pog_) tretiranih s koreninskim ekstraktom vrst *S. canadensis* (_Sc), *S. gigantea* (_Sg) in *S. virgaurea* (_Sv).

Slika D prikazuje relativno SEA v koreninah bilnice (•, oznaka Kor_) in poganjkih bilnice (◦, oznaka Pog_) tretiranih z listnim ekstraktom vrst *S. canadensis* (_Sc), *S. gigantea* (_Sg) in *S. virgaurea* (_Sv).

Prikazane so vrednosti posameznega poskusa, označene s krogcem in povprečne vrednosti vseh poskusov, označene s črtico.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Za testiranje biološke aktivnosti zlate rozge smo kot testne organizme uporabili bakterije, glive in rastline. Pripravili smo različne ekstrakte glede na vrsto uporabljenega topila in tako omogočili ekstrakcijo snovi z različno polarnostjo. Alkoholni ekstrakti zagotavljajo bolj celostno ekstrakcijo in vključujejo tudi manj polarne spojine. Če alkoholni ekstrakti kažejo biološko aktivnost, vodni pa ne, lahko sklepamo, da so aktivne komponente manj polarne spojine (Webster in sod., 2008). Če pa alkoholni ekstrakti kažejo biološko aktivnost in vodni prav tako, menijo Webster in sod. (2008), da so aktivne komponente bolj polarne spojine. Vendar se moramo zavedati, da je aktivnih spojin več in so lahko ene bolj polarne, druge pa manj. Ker ne vemo razmerja med njimi, so za interpretacijo rezultatov tako potrebne dodatne analize.

Pri testiranju protibakterijske aktivnosti smo ugotovili, da so imeli protibakterijski učinek le organski ekstrakti, predvsem koreninski. Vodni ekstrakti niso kazali protibakterijske aktivnosti. Na podlagi tega sklepamo, da so snovi s protimikrobno aktivnostjo v zlati rozgi manj polarne. Ugotovili smo, da ekstrakti zlate rozge inhibirajo rast po Gramu pozitivnih bakterij *B. subtilis* in *S. aureus*. Na po Gramu negativno bakterijo *E. coli* ekstrakti niso delovali v smislu inhibicije rasti. Izjema je bil metanolni ekstrakt korenin *S. canadensis*, kjer smo izmerili 1 mm veliko cono inhibicije (Preglednica 3). Da je aktivnost ekstraktov bolj učinkovita proti po Gramu pozitivnim bakterijam v primerjavi s po Gramu negativnimi bakterijami, so ugotovili tudi Demir in sod. (2009). Prav tako Ríos in Recio (2005) navajata, da so po Gramu pozitivne bakterije bolj občutljivi mikrobi. Nasprotno pa so Morel in sod. (2006) ugotovili šibko delovanje metanolnih ekstraktov *S. microglossa* tudi proti nekaterim po Gramu negativnim bakterijam. Hkrati so ugotovili, da imajo eterična olja močnejšo protibakterijsko aktivnost.

Največje cone inhibicije smo izmerili pri *B. subtilis* (Preglednica 2 in Preglednica 3). Proti tej bakteriji so zaviralno delovali vsi organski ekstrakti *S. gigantea*, tako listni kot koreninski, ter vsi koreninski organski ekstrakti ter acetonski listni ekstrakt *S. canadensis*. Od koreninskih ekstraktov so bili v glavnem metanolni tisti, ki so povzročili največje cone inhibicije pri posameznih bakterijah, pri listnih ekstraktih so to bili acetonski. Etanolni ekstrakti so imeli najnižjo aktivnost. V nasprotju z našimi rezultati sta Thiem in Goslinska (2002), ki sta testirala biološko aktivnost ekstraktov *S. virgaurea*, večjo protimikrobno aktivnost izmerila pri etanolnih ekstraktih v primerjavi z metanolnimi.

Opazili smo tudi medvrstne razlike v rodu *Solidago*. Največjo protibakterijsko aktivnost je pokazala vrsta *S. gigantea*, nižjo *S. canadensis*, medtem ko ekstrakti *S. virgaurea* niso imeli protibakterijske aktivnosti. V nasprotju z našimi rezultati so Thiem in Goslinska (2002) in Demir in sod. (2009) ugotovili, da ima tudi *S. virgaurea* protimikrobno aktivnost

tako proti po Gramu pozitivnim kot po Gramu negativnim bakterijam in da je aktivnost zmerna. Protibakterijsko aktivnost so med drugimi določili tudi pri enakih testnih bakterijah kot smo jih uporabili mi. Rezultati pri testiranju protimikrobnega učinka med različnimi raziskavami se lahko precej razlikujejo med seboj. Razlog je tudi v metodi testiranja, saj za testiranje protibakterijske in protiglivne učinkovitosti ni standardizirane metode, kar predstavlja težavo pri primerjanju izsledkov med različnimi raziskavami. Lahko pa iz rezultatov naše raziskave, kjer smo z isto metodo primerjali tri vrste zaključimo, da je protimikrobna aktivnost invazivnih vrst rodu *Solidago* lahko eden od razlogov bolj uspešnega razširjanja teh dveh vrst v primerjavi z nativno vrsto *S. virgaurea*, ki ni imela protibakterijske aktivnosti.

Za testiranje protiglivne aktivnosti smo izbrali tri glive, ki pripadajo različnim razredom. Protiglivno delovanje ekstraktov smo zaznali proti *Armillaria mellea* in *Fusarium* sp., ki sodita v deblo *Mycota*, *Phytophthora infestans* iz debela *Oomycota* pa se je izkazala kot neobčutljiva. *Phytophthora infestans* je zelo nežna, svetla gliva in je bila na ploščah slabo vidna. Poleg tega je bila njena rast zelo počasna (več tednov). Kot taka se je izkazala neprimerna za tovrstne teste. Gliva po disku iz filtrirnega papirja ni rasla niti v primeru kontrole. Iz tega sklepamo, da papir predstavlja oviro za rast.

Vodni ekstrakti zlate rozge niso pokazali protiglivnega delovanja. Pri organskih ekstraktih so se kot bolj učinkoviti izkazali koreninski ekstrakti (Preglednica 5). Protiglivna aktivnost listnih ekstraktov je bila slabša (Preglednica 4). Pomembno je poudariti, da je bila vsa protiglivna aktivnost zaznana le kot šibka aktivnost. To pomeni, da je ekstrakt, ki je bil nanesen na disk iz filtrirnega papirja, zaviral rast glive le v taki meri, da je ta rasla slabše, kar se je videlo kot konkavna rast okoli diska. Močne protiglivne aktivnosti z jasnimi conami inhibicije ni bilo. Kot najbolj učinkovita se je izkazala vrsta *S. gigantea*. O visoki protiglivni aktivnosti *S. gigantea* proti mnogim glivnim izolatam poročajo Webster in sod. (2008). *S. canadensis* in *S. virgaurea* sta imeli podobno, a slabšo aktivnost. Zanimivo je, da so listni ekstrakti delovali le proti *Armillaria mellea* in sicer metanolni in acetonski ekstrakti. Vsi organski koreninski ekstrakti so imeli protiglivno aktivnost proti vrsti *Fusarium* sp., proti *Armillaria mellea* pa le ekstrakti *S. gigantea*. Webster in sod. (2008) so ugotovili, da imajo tudi vodni ekstrakti *S. gigantea* veliko protiglivno aktivnost, vendar pri *Fusarium solani* niso zaznali protiglivne aktivnosti, kar se ujema z našimi rezultati.

Zhang in sod. (2009) poročajo, da invazivna vrsta *S. canadensis* zavira rast talnih patogenov, kar prispeva k njeni invazivnosti. Na podlagi naših rezultatov tega ne moremo trditi, saj nismo zaznali posebno močnega delovanja *S. canadensis* na bakterije in glive. Vendar, če primerjamo posamezne vrste zlate rozge med seboj, vidimo, da smo najmanjšo aktivnost zaznali pri naši domorodni vrsti in več pri tujerodnih, invazivnih vrstah, še posebej pri *S. gigantea*, ki je pokazala največjo aktivnost. Zaradi tega obstaja možnost, da protiglivna in protibakterijska aktivnost *S. canadensis* in *S. gigantea* pripomore k njuni invazivnosti. To lahko povežemo z rezultati raziskave Webra (1998), ki je ugotovil, da je

bilo v prejšnjem stoletju v Evropi večje naraščanje novih lokacij v primeru *S. gigantea* in manjše v primeru *S. canadensis*. Vendar za uspešnost rastlinskih invazij obstajajo še druge hipoteze, kot je na primer odsotnost naravnih nasprotnikov, boljša izraba hranil ali alelopatija, zanemariti pa ne smemo niti medvrstnih razlik. Tako Ellenberg (1982, cit. po Weber, 1998) trdi, da ima *S. gigantea* dolge korenike, ki enostavno fragmentirajo in se ukoreninijo, medtem ko ima *S. canadensis* krajše korenike, kar omejuje hitrost njenega širjenja. Poleg tega se moramo zavedati, da so v naravnem okolju drugačne razmere in da na sproščene snovi iz rastline vplivajo številni procesi, kar vpliva na reaktivnost fitokemičnih spojin in njihovo koncentracijo (Cheng, 1992).

Ekstrakti, ki smo jih uporabili za testiranje biološke aktivnosti, niso bili enako koncentrirani. Za organske listne ekstrakte smo uporabili po 0,5 g liofiliziranih listov, za pripravo organskih koreninskih ekstraktov pa smo uporabili po 0,3 g liofiliziranih korenin. Za tako maso smo se odločili zaradi pomanjkanja materiala (korenin). Ekstrakcija je potekala pri približno enakih pogojih (0,5 g v 15 ml topila, 0,3 g v 10 ml topila), na koncu pa smo tako listne kot koreninske ekstrakte raztopili v 1 ml. Posušene acetonske in metanolne ekstrakte smo raztopili v 1 ml 96 % etanola, etanolne ekstrakte (ki smo jih ekstrahirali v 96 % etanolu) pa v 1 ml 75 % etanola (glej poglavje 3.2.2). Ves ekstrahiran material se v etanolu po vsej verjetnosti ni raztopil, saj je topnost odvisna od polarosti (dielektrične konstante) topila. Prav zato bi lahko testirali biološko aktivnost ekstraktov pripravljenih z različnimi topili (acetone, metanol, etanol), brez sušenja in ponovnega raztapljanja v etanolu (kot smo to storili mi) in tako ugotovili ali raztapljanje v etanolu vpliva na izgubo biološke aktivnosti. Vodne ekstrakte smo pripravili iz 0,4 g liofiliziranega materiala. Za to koncentracijo smo se odločili na podlagi raziskav Skupine za fiziologijo rastlin, saj so pri tej koncentraciji izmerili očitno inhibicijo kaljivosti semen. Najbolj optimalno bi bilo, če bi za vse ekstrakte uporabili enako maso rastlinskega materiala, saj bi bili rezultati tako bolj primerljivi.

Na razlike med rezultati posameznih študij vpliva način ekstrakcije, poleg tega pa tudi klimatske razmere, sezona in čas nabiranja rastlin. Kvantiteta in kvaliteta aktivnih komponent je namreč odvisna od ravnih pogojev, koncentracija snovi v določenih delih rastline pa se med različnimi ravnimi cikli in posameznimi sezonami razlikuje (Webster in sod., 2008). Pomemben vpliv imajo tudi pogoji in čas hranjenja rastlinskega materiala (Webster in sod., 2008). Mi smo rastlinski material nabrali v naravi, zato se moramo zavedati, da rastline niso rasle v popolnoma enakih pogojih, kljub temu, da so bile posamezne rastline določene vrste zaradi vegetativne rasti večinoma kloni. To lahko vpliva na vsebnost sekundarnih metabolitov in drugih spojin, ki jih rastline izdelujejo v obrambne namene, in s tem na naše rezultate. Kljub temu pa smo s tem, ko smo rastline nabrali v naravi, izmerili dejansko stanje v naravi. Kot menita Dekker in Meggitt (1983) se veliko alelopatičnih snovi sprosti v zgodnjih fazah razvoja rastlin, ker si tako rastline poskušajo zagotoviti boljše pogoje za rast. Mi smo rastline nabrali kasneje, v času cvetenja, kar je lahko razlog za manjši vpliv na testne organizme (bakterije, glive in rastline). Prav zaradi

tega bi bilo zanimivo raziskati biološko aktivnost rastlin v različnih razvojnih fazah. Tako bi ugotovili ali in koliko čas nabiranja in s tem razvojna faza rastlin vpliva na biološko aktivnost.

Kemične snovi, ki vplivajo na druge organizme so navadno sekundarni metaboliti. Številni sekundarni metaboliti so skoncentrirani v koreninah rastlin (Whittaker in Feeny, 1971). Z izločanjem živih ali z razpadom mrtvih korenin se te snovi sproščajo v tla. V tla pridejo tudi z izpiranjem rastočih in razpadajočih nadzemnih delov rastlin (Whittaker in Feeny, 1971). Naši rezultati se ujemajo s to trditvijo, saj smo ugotovili večjo protibakterijsko in protiglivno aktivnost pri koreninskih ekstraktih. Pri tem je potrebno upoštevati, da so bili koreninski ekstrakti manj koncentrirani kot listni, ker so bili pripravljene iz manjše izhodne mase. Da bi ugotovili, katere snovi v zlati rozgi so tiste, ki imajo biološko aktivnost, bi bile potrebne dodatne analize sekundarnih metabolitov. Zlasti zanimiva bi bila primerjava sestave različnih ekstraktov iz različnih vrst zlate rozge. V naravi so v interakcije med rastlinami in mikrobi vključeni tudi številni biokemični procesi (Callaway in sod., 2005). Prav zaradi tega s samo analizo ne bi mogli zagotovo vedeti, katere in predvsem kakšne so spojine z biološko aktivnostjo, saj se po tem, ko se sprostijo iz matične rastline, lahko še močno preoblikujejo.

Oksidativni stres v kalichah testnih rastlin smo ocenili z merjenjem aktivnosti treh antioksidativnih encimov, saj imajo antioksidanti pomembno vlogo v boju proti stresom iz okolja (McCune in Johns, 2007). Alelopatija je tako eden od mnogih stresov, s katerimi se morajo rastline spopasti v njihovem okolju (Lovett in Ryuntyu, 1992). Odziv na druge stresne dejavnike, kot je invazija virusov ali stres zaradi težkih kovin je podoben (Bassi in sod., 1986; Wierzbicka, 1987, cit. po Lovett in Ryuntyu, 1992). Kot testni vrsti smo uporabili enokaličnico ovčjo bilnico (*Festuca ovina*) in dvokaličnico črno deteljo (*Trifolium pratense*). S koreninskimi in listnimi ekstrakti treh vrst *Solidago* smo tretirali njihova kaleča semena. Za testiranje oksidativnega stresa smo uporabili kalice, tretirane s tako koncentracijo, pri kateri je vzkliko dovolj semen za testiranje, niso pa vzklikla vsa semena, tako, da je bil viden alelopatički vpliv. To so bile kalice, tretirane s 4 % koreninskimi ekstrakti in kalice, tretirane z 0,6 % listnimi ekstrakti. Kalice smo še dodatno ločili na korenine in poganjke. S tem smo hoteli ugotoviti, ali se antioksidativna aktivnost razlikuje med posameznimi deli rastline že v fazi kalice. Pri sami analizi pa se je izkazalo, da je materiala zelo malo zaradi niske biomase rastlin. Posebej problematična je bila bilnica, kjer smo imeli zato večinoma le po en vzorec (Slika 4, Slika 5 in Slika 6). Zaradi tega rezultati niso zanesljivi. Za boljše in zanesljive rezultate bi morali tretirati več semen, da bi imeli več materiala ali meriti encimsko aktivnost v celotnih kalichah, ne da jih delimo na korenine in poganjke. Če pogledamo rezultate, kjer imamo povprečja več ponovitev, opazimo sledeče; pri G-POD so vrednosti relativne specifične encimske aktivnosti primerljive kontroli ali nižje od kontrole (Slika 4), pri A-POD so primerljive kontroli ali višje od kontrole (Slika 5), pri CAT pa so te vrednosti večinoma višje od kontrole (Slika 6). Razlik med vplivi posameznih vrst zlate rozge na vsebnost antioksidativnih encimov v

kalicah nismo ugotovili. Ker imajo rastline poleg encimske antioksidativne obrambe tudi ne-encimsko obrambo, bi bilo zanimivo izmeriti vsebnost tudi teh snovi. Tako bi dobili boljši pogled na oksidativno stanje v kalicah.

Najbolj pogosti antioksidanti, ki se pojavljajo v zdravilnih rastlinah so fenoli (Apáti in sod., 2003; Ríos in Recio, 2005). Apáti in sod. (2002) pravijo, da imajo flavonoidi pomembno antioksidativno vlogo tudi v rodu *Solidago*. Poleg tega imajo alelopatsko vlogo, pozitivno aktivnost pri nekaterih uroloških boleznih in protimikrobno aktivnost (Strack, 1997; Schiller in sod., cit. po Apáti in sod, 2002; Ríos in Recio, 2005). Iz zlate rozge so izolirali številne fenolne snovi (Apáti in sod., 2002; Apáti in sod., 2003). Lapornik in sod. (2005) trdijo, da metanolni in etanolni ekstrakti vsebujejo večje količine fenolnih spojin kot vodni ekstrakti. Metanol je celo malo boljše topilo za izolacijo fenolnih snovi od etanola, vendar razlike niso velike. Na podlagi tega lahko sklepamo, da smo z organskimi topili ekstrahirali več fenolnih spojin, kar je morda vplivalo na biološko aktivnost. Apáti in sod. (2002) ugotavljajo, da je za vsebnost fenolnih spojin v alkoholnih ekstraktih pomembna predvsem polarnost topila, medtem ko je vsebnost fenolnih spojin v vodnih ekstraktih odvisna od temperature in trajanja ekstrakcije. Tako obstaja možnost, da zaradi neprimerne temperature ali časa ekstrahiranja nismo izmerili ustrezne biološke aktivnosti vodnih ekstraktov.

5.2 SKLEPI

Protibakterijsko aktivnost smo ugotovili le pri tujerodnih vrstah *S. canadensis* in *S. gigantea*. Domorodna vrsta *S. virgaurea* protibakterijske aktivnosti ni imela. Največjo aktivnost je imela *S. gigantea*. Protibakterijska aktivnost je bila izražena predvsem proti po Gramu pozitivnima bakterijama.

Protiglivna aktivnost ekstraktov je bila šibka. Protiglivna aktivnost domorodne vrste *S. virgaurea* in tujerodne vrste *S. canadensis* je bila podobna, medtem ko je imela tujerodna vrsta *S. gigantea* največjo aktivnost.

Protibakterijsko in protiglivno aktivnost so pokazali le organski ekstrakti, zato sklepamo, da so biološko aktivne snovi v zlati rozgi manj polarne snovi.

Razlik med vplivi ekstraktov posameznih vrst *Solidago* na aktivnost antioksidativnih encimov v kalicah testnih rastlin nismo ugotovili.

POVZETEK

V Sloveniji uspevajo tri vrste zlate rozge (*Solidago* L.); domorodna navadna zlata rozga (*S. virgaurea*) in tujerodni kanadska zlata rozga (*S. canadensis*) ter orjaška zlata rozga (*S. gigantea*) (Wraber, 2007). Slednji sodita med najhujše invazivke v Sloveniji. Vse vrste se že stoletja uporabljajo v ljudski medicini in o njihovih bioloških aktivnostih poročajo številni raziskovalci. V diplomski nalogi smo hoteli ugotoviti ali se biološka aktivnost med posameznimi vrstami zlate rozge, ki uspevajo v Sloveniji, razlikuje.

Rastline smo ločili na korenine in liste, katere smo liofilizirali in zmleli. Iz njih smo pripravili vodne in organske (acetonske, etanolne in metanolne) ekstrakte. S tem smo omogočili izolacijo snovi z različno polarnostjo.

Naredili smo protibakterijske in protiglivne teste ter izmerili vsebnost antioksidativnih encimov v kalicah, ki smo jih tretirali z vodnimi ekstrakti različnih vrst zlate rozge. Protibakterijsko aktivnost ekstraktov smo testirali z difuzijsko metodo v agarju z luknjami. Aktivnost smo testirali proti bakterijam *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* in *Staphylococcus aureus*. Protiglivno aktivnost ekstraktov smo testirali z difuzijsko metodo v agarju z diski. Aktivnost smo testirali proti glivam *Armillaria mellea*, *Fusarium* sp. in *Phytophthora infestans*. Oksidativni stres v kalicah smo ocenili preko aktivnosti treh antioksidativnih encimov; asorbat peroksidaze, gvajakol peroksidaze in katalaze. Testni rastlini sta bili enokaličnica ovčja bilnica (*Festuca ovina*) in dvokaličnica črna detelja (*Trifolium pratense*).

Ugotovili smo, da imata tujerodni vrsti protibakterijsko aktivnost, medtem ko je pri domorodni vrsti nismo zaznali. Protibakterijska aktivnost je bila izražena proti po Gramu pozitivnima bakterijama, predvsem proti *Bacillus subtilis*. Največjo protibakterijsko aktivnost je pokazala orjaška zlata rozga. Protibakterijsko aktivnost so imeli le organski ekstrakti.

Protiglivna aktivnost ekstraktov je bila šibka. Aktivnost tujerodne kanadske zlate rozge in domorodne navadne zlate rozge je bila primerljiva, kot najbolj učinkovita pa se je izkazala orjaška zlata rozga. Protiglivno aktivnost so imeli le organski ekstrakti. Koreninski ekstrakti so bili bolj učinkoviti proti vrsti *Fusarium* sp., listni pa proti *Armillaria mellea*. Na *Phytophthora infestans* ekstrakti niso delovali v smislu inhibicije rasti.

Koreninski ekstrakti so imeli večjo protibakterijsko in protiglivno aktivnost kot listni, zato sklepamo, da so biološko aktivne snovi skoncentrirane v koreninah.

Glede na to, da vodni ekstrakti niso imeli ne protibakterijske ne protiglivne aktivnosti, predvidevamo, da so biološko aktivne snovi v zlati rozgi manj polarne narave.

Razlik med vplivi posameznih vrst zlate rozge na aktivnost antioksidativnih encimov v kalicah nismo ugotovili.

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: 993-1001
- Apáti P., Szentmihályi K., Balázs A., Baumann D., Hamburger M., Kristó T.Sz., Szöke É., Kéry Á. 2002. HPLC Analysis of the Flavonoids in Pharmaceutical Preparations from Canadian Goldenrod (*Solidago canadensis*). *Chromatographia Supplement*, 56: 65-68
- Apáti P., Szentmihályi K., Kristó S.T., Papp I., Vinkler P., Szoke É., Kéry Á. 2003. Herbal remedies of *Solidago*-correlation of phytochemical characteristics and anioxidative properties. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analaaaysis*, 32: 1045-1053
- Apáti P.G. 2003. Antioxidant constituents in *Solidago canadensis* L. and its traditional phytopharmaceuticals. Budapest, Semmelweis University, Department of Pharmacognosy
- Bais H.P., Vepachedu R., Gilroy S., Callaway R.M., Vivanco J.M. 2003. Allelopathy and exotic plants: from genes to invasion. *Science*, 301: 1377-1380
- Baker H.G. 1974. The evolution of weeds. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 5:1-24
- Belnap J., Phillips S.L., Sherrod S.K., Moldenke A. 2005. Soil biota can change after exotic plant invasion: does this affect ecosystem processes? *Ecology*, 86: 3007-3017
- Bever J.D. 1994. Feedback between plants and their soil communities in an old field community. *Ecology*, 75: 1965-1977
- Bever J.D., Westover K.M., Antonovics J. 1997. Incorporating the soil community into plant population dynamics: the utility of the feedback aproach. *Journal of ecology*, 85: 561-573
- Bravničar D., Jogan N., Knapič V., Veenvliet J.K., Ogorelec B., Skoberne P., Tavzes B., Bačič T., Frajman B., Veenvliet P. 2009. Tujerodne vrste v Sloveniji. Zbornik s posveta. Grahovo, Zavod Symbiosis: 85 str.
- Burdon J.J. 1993. The structure of pathogen populations in natural plant communities. *Annual review phytopathology*, 31: 305-348
- Butcko V.M., Jensen R.J. 2002. Evidence of tissue-specific allelopathic activity in *Euthamia graminifolia* and *Solidago canadensis* (Asteraceae). *The American Midland Naturalist*, 184: 253-262

- Callaway R.M., Aschehoug E.T. 2000. Invasive plants versus their new and old neighbors: a mechanism for exotic invasion. *Science*, 290: 521-523
- Callaway R.M., Hierro J.L., Thorpe A.S. 2005. Evolutionary trajectories in plant and soil microbial communities: *Centaurea* invasions and the geographic mosaic of coevolution. V: *Species invasions: insights into ecology, evolution and biogeography*. Sax D.F., Stachowicz J.J., Gaines S.D. (eds.). Sunderland, Sinauer Associates: 341-363
- Callaway R.M., Ridenour W.M., 2004. Novel weapons: invasive success and the evolution of increased competitive ability. *Frontiers in ecology and the environment*, 2: 436-443
- Chapuis-Lardy L., Vanderhoeven S., Dassonville N., Koutika L.-S., Meerts P. 2006. Effect of the exotic invasive plant *Solidago gigantea* on soil phosphorus status. *Biology and Fertility of Soils*, 42, 481-489
- Cheng H.H. 1992. A conceptual framework for assessing allelochemicals in the soil environment. V: *Allelopathy: Basic and applied aspects*. Rizvi S.J.H., Rizvi V. (eds.). London, Chapman & Hall: 21-29
- Chevallier A. 1998. Enciklopedija zdravilnih rastlin. Ljubljana, DZS: 335 str.
- Cowan M.M. 1999. Plant product as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 546-582
- Crozier A., B. Jaganath I., N. Clifford M. 2006. Phenols, polyphenols and tannins: an overview. V: *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. Crozier A., Clifford M.N., Ashihara H. (eds.). Blackwell: 1-46
- D' Antonio C, Vitousek P. 1992. Biological invasions by exotic grasses, the grass/fire cycle, and global change. *Annual review of ecology and systematics*, 23, 63-87
- Daneshgar P., Jose S. 2009. Mechanisms of plant invasion: a review. V: *Invasive plants and forest ecosystems*. Kohli R.K., Jose S., Singh H.P., Batish D.R. (eds.). Boca Raton, London, New York, CRC Press, Taylor & Francis Group: 11-27
- Dat J., Vandenabeele S., Vranová E., Van Montagu M., Inzé D., Van Breusegem F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and molecular life sciences*, 75: 779-795
- Dekker J., Meggitt W.F. 1983. Interference between velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medic.) and soybean (*Glycine max* L. Merr.). I. Growth. *Weed Research*, 23: 91-101

- Demir H., Acik L., Bali E.B., Koc L.Y., Kaynak G. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of *Solidago virgaurea* extracts. *African Journal of Biotechnology*, 8, 2: 274-279
- Derda M., Hadaś E., Thiem B. 2009. Plant extracts as natural amoebicidal agents. *Parasitol Res*, 104: 705-708
- Digest R. 2007. *Naravna zdravila*. Ljubljana, Mladinska knjiga: 319 str.
- Eppinga M.B., Rietkerk M., Dekker S.C., De Ruiter P.C., van der Putten W.H. 2006. Accumulation of local pathogens: a new hypothesis to explain exotic plant invasions. *Oikos*, 114: 168-176
- Gross S.C., Goodarzi G., Watabe M., Bandyopadhyay S., Pai S.K., Watabe K. 2002. Antineoplastic Activity of *Solidago virgaurea* on Prostatic Tumor Cells in an SCID Mouse Model. *Nutrition and Cancer*, 43: 76-81
- Grünwald J., Jänicke C. 2006. *Zelena lekarna*. Ljubljana, Mladinska knjiga: 414 str.
- Hamilton J.G., Holzapfel C., Mahall B.E. 1999. Coexistence and interference between a native perennial grass and non-native annual grasses in California. *Oecologia*, 121: 518-526
- Hegedüs A., Erdei S., Horváth G. 2001. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant science*, 160: 1085-1093
- 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
- Inderjit, Callaway R.M., Vivanco J.M. 2006. Can plant biochemistry contribute to understanding of invasion ecology? *Trends in Plant Science*, 11: 574-580
- Inderjit, Duke S.O. 2003. Ecophysiological aspects of allelopathy. *Planta*, 217: 529-539
- Inderjit, van der Putten W.H. 2010. Impacts of soil microbial communities on exotic plant invasions. *Trends in Ecology and Evolution*, 25: 512-519
- Jakobs G., Weber E., Edwards P.J. 2004. Introduced plants of the invasive *Solidago gigantea* (Asteraceae) are larger and grow denser than conspecifics in the native range. *Diversity and Distributions*. 10: 11-19
- Johnson R.H., Hull-Sandres H.M., Meyer G.A. 2007. Comparison of foliar terpenes between native and invasive *Solidago gigantea*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35: 821-830

- Kalemba D., Marschall H., Bradesi P. 2001. Constituents of essential oil of *Solidago gigantea* Ait. (giant goldenrod). *Flavour and Fragrance Journal*, 16: 19-26
- Keane R.M., Crawley M.J. 2002. Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in Ecology and Evolution*, 17, 4: 164-170
- Klironomos J.N. 2002. Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. *Nature*, 417: 67-70
- Lasserre B., Kaiser R., Chanh P.H., Ifansyah N., Gleye J., Moulis C. 1983. Effects on rats of aqueous extracts of plants used in folk medicine as antihypertensive agents. *Naturwissenschaften*, 70, 2: 95-96
- Lee C.E. 2002. Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology and Evolution*, 17: 386-391
- Levine J., D'Antonio C.M. 1999. Elton revisited: a review of evidence linking diversity and invasibility. *Oikos*, 87: 15-26
- Lovett J., Ryuntyu M. 1992. Allelopathy: broadening the context. V: *Allelopathy: Basic and applied aspects*. Rizvi S.J.H., Rizvi V. (eds.). London, Chapman & Hall: 11-19
- Lu T., Vargas D., Franzblau S.G., Fischer N.H. 1995. Diterpenes from *Solidago rugosa*. *Phytochemistry*, 38, 2: 452-456
- Mack R.N., Simberloff D., Lonsdale W.M., Evans H., Clout M., Bazzaz F.A. 2000. Biotic invasions: Causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological applications*, 10: 689-710
- Mallik A.U., Pellissier S.D. 2000. Effects of *Vaccinium myrtillus* on spruce regeneration: tasting the notion of coevolutionary significance of allelopathy. *Journal of chemical ecology*, 26: 2197-2209
- Mangla S., Inderjit, Callaway R. M. 2008. Exotic invasive plant accumulates native soil pathogens which inhibit native plants. *Journal of ecology*, 96: 58-67
- McCune L.M., Johns T. 2007. Antioxidant activity relates to plant part, life form and growing condition in some diabetes remedies. *Journal of ethnopharmacology*, 112: 461-469
- Meyer A., Schmid B. 1999. Experimental demography of rhizome populations of establishing clones of *Solidago altissima*. *Journal of Ecology*, 87: 42-54
- Mishra D., Joshi S., Bisht G., Pilkhwal S. 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of *Solidago canadensis* Linn. root essential oil. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 1: 187-190

- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7, 9: 405-410
- Morel A.F., Dias G.O., Porto C., Simionatto E., Stuker C.Z., Dalcol I.I. 2006. Antimicrobial activity of extractives of *Solidago microglossa*. *Fitoterapia*, 77: 453-455
- Moron D., Lenda M., Skorka P., Szentgyorgyi H., Settele J., Woyciechowski M. 2009. Wild pollinator communities are negatively affected by invasion of alien goldenrods in grassland landscapes. *Biological Conservation*, 142, 7: 1322-1332
- Petauer T. 1993. *Leksikon rastlinskih bogastev*. 1. izdaja. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 216 str.
- Plohmann B., Bader G., Hiller K., Franz G. 1997. Immunomodulatory and antitumoral effects of triterpenoid saponins. *Pharmazie*, 52: 953-957
- Reinhart K.O., Packer A., Van der Putten W.H., Clay K. 2003. Plant-soil biota interactions and spatial distribution of black cherry in its native and invasive ranges. *Ecology Letters*, 6: 1046-1050
- Reznicek G., Freiler M., Schander M., Schmidt U. 1996. Determination of content and the composition of the main saponins from *Solidago gigantea* AIT. using high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A*, 755: 133-137
- Ríos J.L., Recio M.C. 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 80-84
- Rizvi S.J.H., Haque H., Singh V.K., Rizvi V. 1992. A discipline called allelopathy. V: *Allelopathy: Basic and applied aspects*. Rizvi S.J.H., Rizvi V. (eds.). London, Chapman & Hall: 1-10
- Rizvi S.J.H., Rizvi V. 1992. *Allelopathy: Basic and applied aspects*. London, Chapman & Hall: XX, 480 str.
- Rizvi S.J.H., Rizvi V. 1992. Exploration of allelochemicals in improving crop productivity. V: *Allelopathy: Basic and applied aspects*. Rizvi S.J.H., Rizvi V. (eds.). London, Chapman & Hall: 443-472
- Sabir S.M., Ahmad S.D., Hamid A., Khan M.Q., Athayde M.L., Santos D.B., Boligon A.A., Rocha J.B.T. 2011. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds. *Food Chemistry* (article in press)
- Sampson J. H., Phillipson J. D., Bowery N. G., O'Neill M. J., Houston J. G., Lewis J. A. 2000. Ethnomedicinally selected plants as sources of potential analgesic

- compounds: indication of in vitro biological activity in receptor binding assays. *Phytotherapy Research*, 14: 24-29
- Scandalios J.G. 2002. The rise of ROS. *Trends in biochemical science*, 27, 9: 483-486
- Sparg S.G., Light M.E., van Staden J. 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94: 219-243
- Starks C.M., Williams R.B., Goering M.G., O'Neil-Johnson M., Norman V.L., Hu J.F., Garo E., Hough G.W., Rice S.M., Eldridge G.R. 2010. Antibacterial clerodane diterpenes from Goldenrod (*Solidago virgaurea*). *Phytochemistry*, 71: 104-109
- Stockwell C.A., Hendry A.P., Kinnison M.T. 2003. Contemporary evolution meets conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 94-101
- Strack D. 1997. Phenolic metabolism. In: Dey, P.M., Harborne, J.B. (eds.), *Plant Biochemistry*. Academic Press, New York: 387-437
- Strgulc Krajšek S. 2009a. Kanadska zlata rozga *Solidago canadensis*. V: *Tujerodne vrste: informativni listi izbranih invazivnih vrst*. Jogan N. (ur.). Grahovo, Zavod Symbiosis: 45-47
- Strgulc Krajšek S. 2009b. Orjaška zlata rozga *Solidago gigantea*. V: *Tujerodne vrste: informativni listi izbranih invazivnih vrst*. Jogan N. (ur.). Grahovo, Zavod Symbiosis: 48-50
- Sung J.H., Lee J.O., Son J.K., Park N.S., Kim M.R., Kim J.G., Moon D.C. 1999. Cytotoxic constituents from *Solidago virga-aurea* var. *gigantea* MIQ. *Arch Pharm Res*, 22: 633-637
- Thiem B., Goslinska O. 2002. Antimicrobial activity of *Solidago virgaurea* L. from *in vitro* cultures. *Fitoterapia*, 73: 514-516
- Van der Putten W.H. 1997. Plant-soil feedback as a selective force. *Trends in ecology and evolution*, 12: 169-170
- Veenvliet J.K., Veenvliet P., Bačič T., Frajman B., Jogan N., Lešnik M., Kebe L. 2009. *Tujerodne vrste. Priročnik za naravovarstvenike*. Grahovo, Zavod Symbiosis: 47 str.
- Weaver J.E., Clements F.E. 1929. *Plant ecology*. New York, McGraw-Hill Book Company: 520 str.
- Weber E. 1998. The dynamics of plant invasions: a case study of three exotic goldenrod species (*Solidago* L.) in Europe. *Journal of Biogeography*, 25, 1: 147-154

- Weber E. 2001. Current and potential range of three exotic goldenrods (*Solidago*) in Europe. *Conservation Biology*, 15, 1: 122-128
- Webster D., Taschereau P., Belland R.J., Sand C., Rennie R.P. 2008. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 115: 140-146
- Whittaker R.H., Feeny P.P. 1971. Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science*, 171: 757-770
- Wilcove D.S., Rothstein D., Dubow J., Phillips A., Losos E. 1998. Quantifying threats to imperiled species in the United States, *BioScience*, 48, 8, 607
- Wink M., Twardowski T. 1992. Allelochemical properties of alkaloids. Effects on plants, bacteria and protein biosynthesis. V: *Allelopathy: Basic and applied aspects*. Rizvi S.J.H., Rizvi V. (eds.). London, Chapman & Hall: 129-149
- Witt H. C. D. de. 1978. *Rastlinski svet*. 2, *Semenovke* 2. Ljubljana, Mladinska knjiga: 378 str.
- Wraber T. 2007. *Asteraceae* [Compositae subfam. *Asteroideae*] – nebinovke. V: *Mala flora Slovenije*. Ključ za določanje praprotnic in semenk. 4. dopolnjena in spremenjena izdaja. Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Podobnik A., Turk B., Vreš B., Ravnik V., Frajman B., Strgulc Krajšek S., Trčak B., Bačič T., Fischer M.A., Eler K., Surina B. (ur.). Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 633-687.
- Xie L.J., Zeng R.S., Bi H.H., Song Y.Y., Wang L., Su., Y.J., Chen M., Chen S., Liu Y.H. 2010. Allelochemical mediated invasion of exotic plants in China. *Allelopathy Journal*, 25: 31-50
- Yang R.Y., Mei L.X., Tang J.J., Chen X. 2007. Allelopathic effects of invasive *Solidago canadensis* L. on germination, root growth of native Chinese plants. *Allelopathy Journal*, 19: 241-248
- Zhang C.B., Wang J., Qian B.Y., Li W.H. 2009. Effects of the invader *Solidago canadensis* on soil properties. *Applied Soil Ecology*, 43: 163-169
- Zhang Q., Yao L.J., Yang X.Y., Tang J.J., Chen X. 2007. Potential allelopathic effects of an invasive species *Solidago canadensis* on the mycorrhizae of native plant species. *Allelopathy Journal*, 20: 71-78
- Zhang S., Jin Y., Tang J., Chen X. 2009. The invasive plant *Solidago canadensis* L. suppresses local soil pathogens through allelopathy. *Applied soil ecology*, 41, 2: 215-222

Konda D. Biološka aktivnost ekstraktov zlate rozge (*Solidago* spp.).

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2012

Zhang S., Zhu W., Wang B., Tang J., Chen X. 2011. Secondary metabolites from the invasive *Solidago canadensis* L. accumulation in soil and contribution to inhibition of soil pathogen *Pythium ultimum*. *Applied Soil Ecology*, 48: 280-286

ZAHVALA

Hvala mentorici doc. dr. Jasni Dolenc Koce za strokovno vodenje, pomoč in podporo.

Hvala somentorici asist. dr. Sabini Anžlovar za naklonjen čas, potrpežljivost in vso pomoč pri praktični izvedbi naloge.

Hvala prof. dr. Kristini Sepčič in doc. dr. Katarini Vogel Mikuš za skrben pregled diplomskega dela.

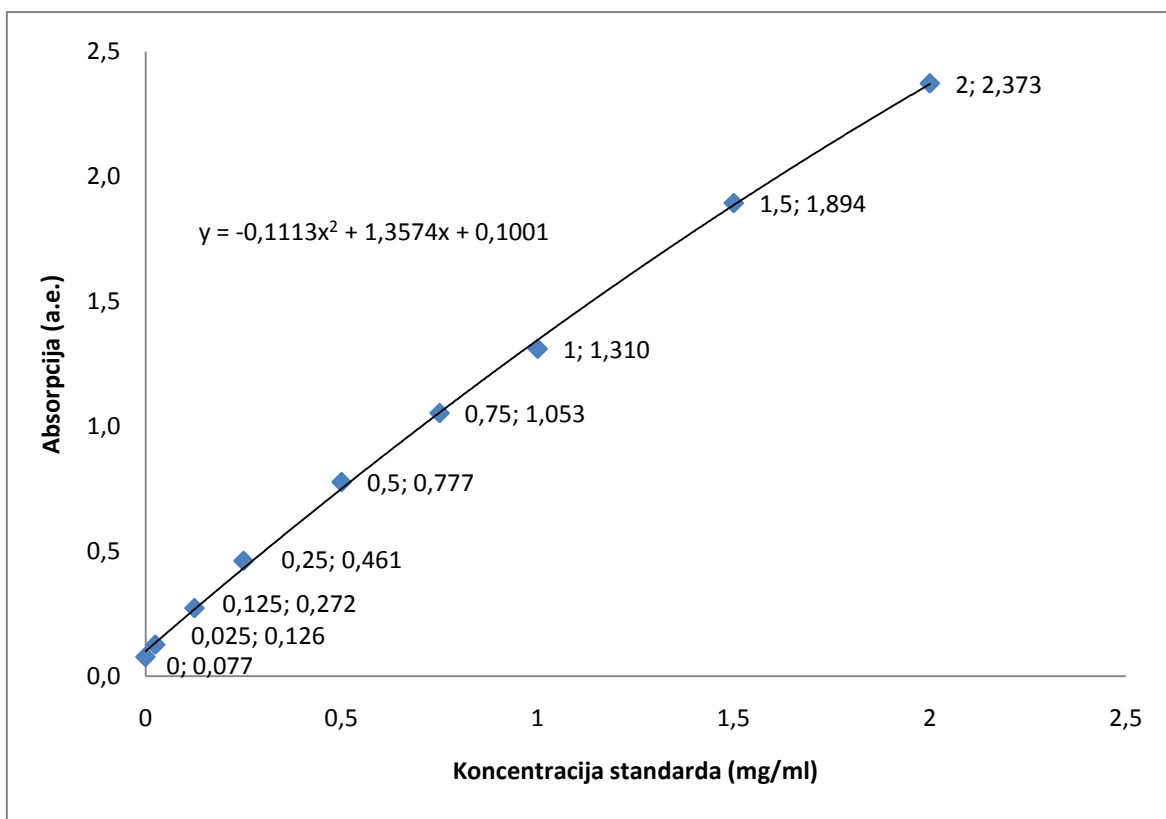
Hvala staršem, ki so mi omogočili študij.

Hvala vsem, ki ste kakorkoli prispevali pri nastajanju diplomske naloge.

PRILOGE

Priloga A

Umeritvena krivulja za določanje koncentracije proteinov v vzorcu



Priloga B

Koncentracije proteinov v listih in koreninah različnih vrst *Solidago*

V tabeli so prikazane povprečne vrednosti od 15 do 25 meritev (razlike v številu meritev so zaradi omejenih količin materiala) \pm standardna deviacija. Vrednosti predstavljajo koncentracije proteinov v 30 mg rastlinskega materiala.

Vrsta <i>Solidago</i>	LISTI Koncentracija proteinov (mg/ml)	KORENINE Koncentracija proteinov (mg/ml)
<i>S. virgaurea</i>	7,52 \pm 0,51	1,51 \pm 0,17
<i>S. canadensis</i>	7,03 \pm 0,36	2,14 \pm 0,42
<i>S. gigantea</i>	7,72 \pm 0,44	2,03 \pm 0,47