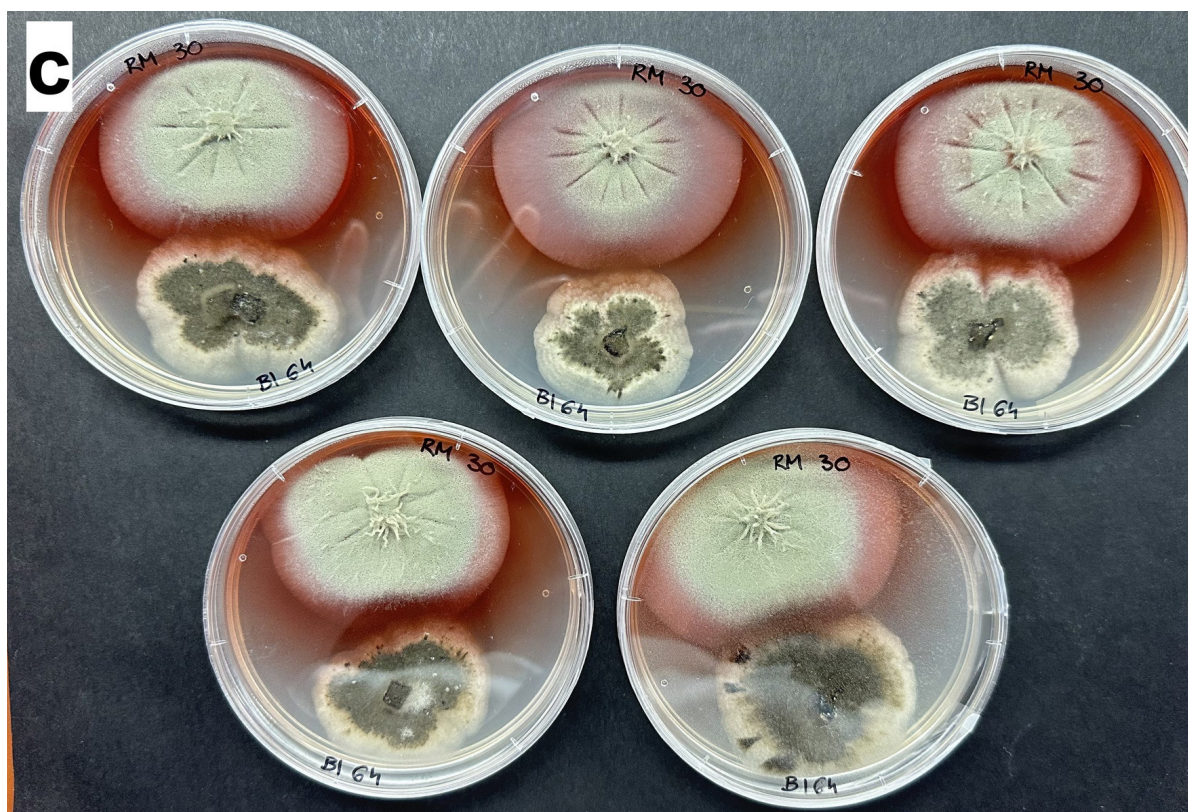


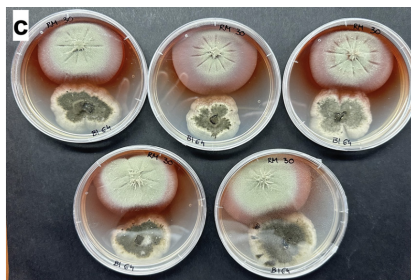
2026 Vol. 17 Št. 1

C S P P

Collectanea Studentium Physiologiae Plantarum



Zgodba iz naslovnice



Slika: Antagonistični testi z glivama *Boeremia exigua* in *Talaromyces amestolkiae*. Avtorji: Lana Černigoj, Nika Egger, Špela Matjašec, Matic Zorc.

Collectanea Studentium Physiologiae Plantarum
Zbornik študentov fiziologije rastlin

Izdajata: Katedra za botaniko in fiziologijo rastlin, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, UL

Glavna in odgovorna urednica: Marjana Regvar, marjana.regvar@bf.uni-lj.si

Tehnični urednik: Matevž Likar

Uredniški odbor:

Marjana Regvar

Matevž Likar

Katarina Vogel-Mikuš

Paula Pongrac

Jure Mravlje

Naslov uredništva:

Collectanea Studentium Physiologiae Plantarum,

Zbornik študentov fiziologije rastlin

Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana

Izdano: 2026

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

Raziskave so bile financiane s strani Javne agencije za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost RS (ARIS): raziskovaini program P1-0212 in projekti (J1-50014, J7-60126, L4-70176, N4-0346).

5 Uporaba potencialno antagonistične glive *Aureobasidium pullulans* proti izbranim glivnim patogenom oljke

Eva Kržišnik, Zala Rostohar, Brina Lucija Štruc, Anamarie Vodopivec, Ema Žagar

11 Uporaba potencialno antagonistične glive *Epicoccum nigrum* proti izbranim glivnim patogenom oljke

Hajsinger Nika, Kunej Jaka, Šubic Tinkara, Urh Živa

17 Antagonistični potencial glive *Talaromyces amestolkiae* proti izbranim patogenom oljke

Lana Černigoj, Nika Egger, Špela Matjašec, Matic Zorc

23 Uporaba potencialno antagonistične glive *Trichoderma* sp. proti izbranim patogenom oljke

Rok Berglez, Ana Kveder, Ivana Mušič Lap, Ana Ostrouška, Jerca Polak

30 Vpliv senescence na vsebnost pigmentov in izbranih ionov v listih navadne breze (*Betula pendula*)

Nika Egger, Nejc Govednik, Ana Ostrouška, Jerca Polak, Anastasija Štrbac

37 Vpliv senescence na vsebnost fotosinteznih pigmentov in izbranih ionov v listih divje češnje (*Prunus avium*)

Veronika Iglič, Kristina Kunovac, Tinkara Šubic, Živa Urh, Lara Vidmar

44 Vpliv senescence na vsebnost fotosinteznih pigmentov in izbranih ionov v listih ginka (*Ginkgo biloba*)

Artur Bonaca, Domen Alegro, Vasja Bahar, Špela Logar, Zala Pahovnik

50 The effect of senescence on the content of photosynthetic pigments and selected ions in the leaves of sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*)

Bahia Tiago, Guenue Lilou, Košir Lina, Kunej Jaka, Lisec Eva

57 Vpliv senescence na vsebnost fotosinteznih pigmentov in izbranih ionov v listih perzijske bukve ali parocije (*Parrotia persica*)

Nina Fon, Nika Geršak, Jerca Rihtaršič, Maša Šnajcer, Yining Isabell Ye

63 Vpliv delcev mikroplastike na rast in razvoj graha (*Pisum sativum*)

Aljaž Bratanič, Samo Colasanti Tekavec, Neža Janežič, Neja Konečnik, Luka Sajovic

70 Vpliv slanosti na rast in razvoj graha (*Pisum sativum*)

Alenka Červ, Nuša Jurkovič, Zala Klinar, Gaja Mrzelj, Neža Ručigaj

77 Vpliv suše na rast in razvoj graha (*Pisum sativum*)

Marta Dimkovska, Tine Muršec Pitamic, Nikola Leontić, Nejc Tomšič, Metka Vrečko

84 Vpliv delcev mikroplastike na rast in razvoj paradižnika (*Solanum lycopersicum*)

Biderman Sergeja, Gazvoda Suzana, Jazbec Špela, Klepec Vita, Mihelič Nika

91 Vpliv slanosti na rast in razvoj paradižnika (*Solanum lycopersicum*)

Tajda Bratec, Katja Cigoj, Mojca Erzin, Eva Seifried in Zala Svetec

97 Vpliv suše na rast in razvoj paradižnika (*Solanum lycopersicum*)

Jan Gale, Lana Rina Kastelic, Marko Kos, Gaj Kušar, Zala Puklavec, Jan Rom

Uporaba potencialno antagonistične glive *Aureobasidium pullulans* proti izbranim glivnim patogenom oljke

Eva Kržišnik, Zala Rostohar, Brina Lucija Štruc, Anamarie Vodopivec, Ema Žagar

Študij biotehnologije, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

- Namen raziskave je bil preučiti antagonistični potencial dveh sevov glive *Aureobasidium pullulans* (BI2 in RM31) proti izbranim glivnim patogenom oljke (*Biscogniauxia mediterranea*, *Boeremia exigua* in *Diaporthe cotoneastri*).
- Antagonistične interakcije smo ovrednotili z uporabo testa dvojnih kultur za spremljanje neposrednega vpliva antagonistov na rast patogenov ter s t.i. metodo »sendvičev« za ugotavljanje vpliva hlapnih organskih spojin na rast patogenih gliv.
- Rezultati so pokazali, da sta oba seva *A. pullulans* v testih dvojnih kultur statistično značilno zavirala rast vseh treh patogenov, pri čemer se je intenziteta zaviranja razlikovala glede na sev antagonista in čas inkubacije, medtem ko zaviralnega učinka hlapnih spojin nismo zaznali.
- Ugotovitve kažejo, da ima gliva *Aureobasidium pullulans* potencial za uporabo v biološkem varstvu oljk pred glivnimi boleznimi, zlasti kot antagonist, ki deluje preko neposrednih interakcij s patogeni.

Ključne besede: endofitske glive, antagonizem, dvojne kulture, hlapne organske spojine, fitopatologija

Uvod

Rastline v naravnem okolju nikoli niso same, živijo skupaj z raznolikimi skupnosti mikroorganizmov (bakterij, gliv, virusov, arhej in protistov), ki tvorijo njihov mikrobiom oziroma holobiont (Song s sod. 2020). Nekateri med temi mikroorganizmi imajo na rastlino pozitiven učinek, drugi so nevtralni, tretji pa ji lahko škodujejo oziroma povzročajo bolezni. Posebno mesto v tej združbi pa zavzemajo glivni endofiti, mikroorganizmi, ki živijo znotraj rastlinskih tkiv, ne da bi povzročali vidne simptome bolezni (Petrini 1991). Čeprav so skriti očem, lahko pomembno prispevajo k zdravju rastlin: izboljšujejo njihovo fiziološko stanje, povečujejo odpornost na sušo, temperaturne spremembe in bolezni ter vplivajo na njihovo rast (Baron in Rigobelo 2021). Vloga endofitov v naravnih združbah je zelo raznolika in pogosto še ne povsem pojasnjena, kar odpira veliko raziskovalnega prostora (Rodriguez s sod. 2009).

Ena izmed zanimivih lastnosti endofitov je njihova sposobnost antagonističnega delovanja proti rastlinskim patogenom. Mnoge endofitske glive lahko tekmujejo s patogeni za prostor in hranila, izločajo protimikrobne snovi ali vplivajo nanje s hlapnimi spojinami (Schulz in Boyle 2005). Ravno zaradi teh lastnosti so endofiti postali pomembni kandidati za razvoj bioloških sredstev za varstvo rastlin, kar je zelo pomembno v času, ko se v kmetijstvu prizadeva zmanjšati uporabo kemičnih pesticidov.

Oljka (*Olea europaea*) je ena najbolj prepoznavnih sredozemskih kulturnih rastlin z dolgo zgodovino gojenja in velikim gospodarskim pomenom. V zadnjih desetletjih pa se sooča z vedno več izzivi, med katerimi izstopajo glivne bolezni (Moral s sod. 2017). Več patogenih gliv, med drugim glive iz rodov *Alternaria*, *Biscogniauxia*, *Boeremia* in *Diaporthe*, lahko povzročajo odmiranje poganjkov, ožgana tkiva in splošno oslabitev rastline. *Biscogniauxia mediterranea* je najpogostejše povezana z ožigi in obsežnimi nekrozami lubja, ki lahko vodijo v sušenje vej, zlasti pri drevesih izpostavljenih sušnemu stresu (Gharbi s sod. 2020). *Boeremia exigua* povzroča značilne temne nekroze mladih poganjkov in listnih pecljev ter lahko bistveno oslabi rastlino (Quezada-D'Angelo s sod. 2024). *Diaporthe cotoneastri*, ki je znana po tem, da ne okužuje le ene rastlinske vrste, pa je sposobna povzročanja različnih oblik rakov, odmiranja poganjkov ter drugih tkivnih poškodb na številnih sadnih in gozdnih vrstah (Udayanga s sod. 2014). Po drugi strani med endofiti oljke izstopa gliva *Aureobasidium pullulans* – zelo prilagodljiva vrsta, ki jo pogosto najdemo na listih, plodovih, skorji in tudi v notranjih tkivih oljk (Andrews 1992; Bziuk s sod. 2025). Znana je po tem, da oblikuje prepleteno, nekoliko sluzasto kolonijo, ki sčasoma potemni zaradi tvorbe melanina. Prav ta lastnost ji pomaga bolje prenašati stres zaradi sevanja UV in sušne razmere, kar pojasni njeno izjemno razširjenost v sredozemskem okolju (Gostinčar s sod. 2011; Zalar s sod. 2008). *Aureobasidium pullulans* je bila že večkrat opisana kot učinkovit biokontrolni organizem, saj lahko zavira rast različnih gliv, npr. rodu *Botrytis*, *Penicillium* in *Alternaria*. To doseže z izločanjem protimikrobnih snovi, kompeticijo za prostor ter z izločanjem hlapnih organskih spojin (VOC), ki lahko zmanjšujejo rast patogenov ali celo preprečujejo sporulacijo (Mari s sod. 2012; Di Francesco s sod. 2015).

Z našo raziskavo smo želele preveriti, kako se dva endofitska seva vrste *Aureobasidium pullulans*, BI2 in RM31, odzivata na

izbrane glivne patogene oljke in ali potencialno zavirata njihovo rast. Ker se endofitski sevi iste vrste lahko razlikujejo v svojem antagonističnem potencialu, nas je zanimalo, kako posamezni sev *A. pullulans* vpliva na rast patogenov ter ali bi lahko takšni endofiti predstavljali osnovo za razvoj biokontrolnih strategij v oljkarstvu. Na podlagi pregleda znanstvene literature in predhodnih ugotovitev smo oblikovali naslednje hipoteze:

- *Aureobasidium pullulans* sev RM31 bo zaviral rast patogenih gliv *Biscogniauxia mediterranea*, *Boeremia exigua* in *Diaporthe cotoneastri* ob neposrednem stiku na plošči.
- *Aureobasidium pullulans* sev BI2 bo zaviral rast patogenih gliv *Biscogniauxia mediterranea*, *Boeremia exigua* in *Diaporthe cotoneastri* ob neposrednem stiku na plošči.
- *Aureobasidium pullulans* sev BI2 bo sproščal hlapne molekule, ki bodo zavirale rast patogenih gliv *Biscogniauxia mediterranea*, *Boeremia exigua* in *Diaporthe cotoneastri*.
- *Aureobasidium pullulans* sev RM31 bo sproščal hlapne molekule, ki bodo zavirale rast patogenih gliv *Biscogniauxia mediterranea*, *Boeremia exigua* in *Diaporthe cotoneastri*.

Materiali in metode

Izbrane glivne vrste

V poskusu smo uporabili predhodno izolirane glivne seve iz oljk, vzorčenih v koleksijskem nasadu v Poreču (Inštitut za kmetijstvo in turizem Poreč), na Hrvaškem. Kot potencialna antagonista sta bila uporabljena dva seva glive *Aureobasidium pullulans* (BI2, RM31). Antagonistični učinek teh sevov smo testirali na treh patogenih glivah vrste *Biscogniauxia mediterranea* (RM57), *Boeremia exigua* (BI64) in *Diaporthe cotoneastri* (BI23).

Vzgoja čistih enotedenskih kultur gliv

Ob gorilniku smo z zunanje roba micelija starejših gliv s sterilno spatulo izrezali koščke velikosti 5 × 5 mm ter jih precepili na sredino svežega 2 % gojišča PDA (krompirjev dekstrozni agar) tako, da je bil micelij usmerjen proti vrhu. Plošče smo označili, oblepili s parafilmom ter jih en teden inkubirali pri sobni temperaturi v temi. Po inkubaciji smo vse plošče pregledali, izločili okužene ter izbrali tiste z najboljšo rastjo micelija za nadaljnje postopke.

Antagonistični testi

Z metodo dvojnih kultur smo testirali neposredne medsebojne interakcije med glivami. Iz enotedenskih kultur obeh sevov antagonista smo v aseptičnih pogojih ob gorilniku s sterilno spatulo izrezali koščke aktivno rastočega micelija velikosti približno 5 × 5 mm. Košček antagonistične glive smo postavili na levo stran sveže plošče PDA (2 cm od roba), košček patogene glive pa na desno stran (2 cm od roba) iste plošče, v medsebojnem razmaku 5 cm. Vsi koščki so bili položeni na bok, tako da je bila gliva usmerjena pravokotno na gojišče, obrnjena proti vrhu petrijevke. Naredili smo tudi negativne kontrole za vse glive, tako da smo koščke patogene oziroma antagonistične glive prenesli na sveže gojišče PDA na enako stran plošče kot v dvojnih kulturah. Vse plošče smo ustrezno

označili, jih zatesnili s parafilmom in inkubirali pri enakih pogojih (sobna temperatura, v temi). Po inkubaciji smo plošče fotografirali na 7. in 14. dan, izločili okužene ter ovrednotili učinek antagonistične glive na rast patogenov.

Za določanje posredne interakcije med antagonističnimi in patogenimi glivami smo izvedli test hlapnih organskih snovi (angl. »volatile organic compounds«, VOC) oziroma t.i. »metodo sendvičev«. Ob gorilniku v aseptičnih pogojih smo patogenim glivam na enotedenskih ploščah dodali 5 ml sterilne fiziološke raztopine (0,9 % NaCl). Nato smo micelij in spore s spatulo Drigalski nežno postrgali z gojišča, nastalo suspenzijo pa prenesli v epruveto in vorteksirali. Na sredino svežih plošč PDA smo odpipetirali 10 µL suspenzije in počakali 15 minut, da se kapljica popolnoma posuši. Z roba aktivnega micelija enotedenskih kultur antagonističnih gliv smo s spatulo precepili koščke na sredino svežih plošč PDA. Za t.i. »sendvič test« smo vsako ploščo s patogeno glivo obrnili in jo postavili nad ploščo z antagonistično glivo tako, da sta se petrijevki stikali ter dobro zatesnili s parafilmom. Postopek smo izvedli za vse kombinacije patogen-antagonist. Naredili smo še negativne kontrole za patogene brez antagonista. Vse plošče so bile inkubirane pri istih pogojih (sobna temperatura, tema) in fotografirane po enem tednu.

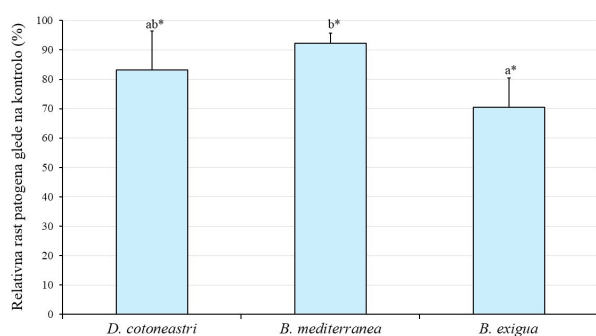
Statistična analiza in obdelava podatkov

Površino glivnega micelija smo določili iz fotografij posameznih plošč z uporabo programa ImageJ (Fiji). Nato smo podatke prenesli v Microsoft Excel, kjer smo izvedli analizo s pomočjo orodja XL Toolbox in pridobljene rezultate grafično prikazali v obliki stolpičnih diagramov. Na dobljenih podatkih smo uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA), ki ji je sledil Holm-Bonferronijev post-hoc test. Kot statistično značilno različne smo smatrali rezultate, kjer je bila p-vrednost < 0,05.

Rezultati

Učinek sevov *Aureobasidium pullulans* na rast izbranih glivnih patogenov v testih dvojne kulture

Iz Slike 1 je razvidno, da je bila rast vseh treh testiranih



Slika 1. Relativna rast različnih glivnih patogenov v dvojni kulturi z glivo *Aureobasidium pullulans* sev RM31 7 dni po inkubaciji. Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna deviacija (n = 10). Različne črke označujejo statistično značilne razlike v relativni rasti med patogeni (enosmerna ANOVA z Holm–Bonferronijevim post-hoc testom, $p < 0,05$), medtem ko zvezdica (*) označuje statistično značilno zaviranje posameznega patogena v primerjavi z ustrežno kontrolo (t-test, $p < 0,05$).

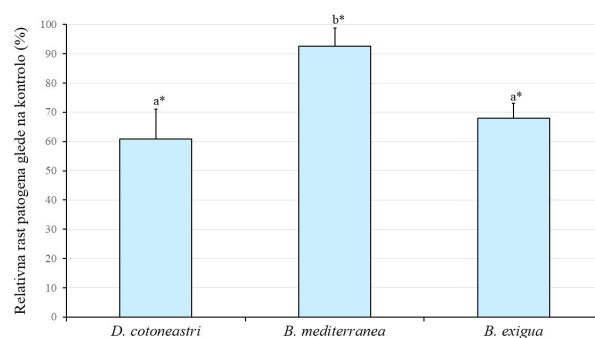
patogenov v dvojni kulturi s sevom *A. pullulans* RM31, po sedmih dneh inkubacije statistično značilno zavrta v primerjavi z ustreznimi kontrolami patogenov. Relativna rast *B. exigua* je bila statistično značilno najbolj zavrta (v povprečju 30 % glede na kontrolo), najmanj pa *B. mediterranea* (v povprečju le 10 % glede na kontrolo). Štirinajst dni po inkubaciji je bila rast glivnih patogenov prav tako statistično značilno zavrta v primerjavi z ustreznimi kontrolami, ker je razvidno na Sliki 2. Najbolj sta bili zavrti glivi *D. cotoneastri* (40 % glede na kontrolo) in *B. exigua* (približno 30 % glede na kontrolo), znova pa je bil najmanjši učinek na vrsto *B. mediterranea*, ki je bila zavrta manj kot 10 % glede na kontrolo.

Sedem dni po inkubaciji *B. exigua* in *D. cotoneastri* v dvojni kulturi s sevom BI2 potencialnega glivnega antagonista *A. pullulans* nista pokazali statistično značilnih razlik v rasti v primerjavi z ustreznimi kontrolama, kar je razvidno na Sliki 3. Nasprotno je bila rast *B. mediterranea* v prisotnosti seva BI2 statistično značilno zavrta (okoli 10 % glede na kontrolo). Po štirinajstih dneh pa je bila rast vseh treh testiranih patogenov statistično značilno zavrta v primerjavi z ustreznimi kontrolami patogenov (Slika 4). Najbolj sta bili zavrti glivi *D. cotoneastri* in *B. exigua* (obe približno 30 % glede na kontrolo), najmanjši učinek pa je bil na vrsto *B. mediterranea*, ki je bila zavrta manj kot 10 % glede na kontrolo.

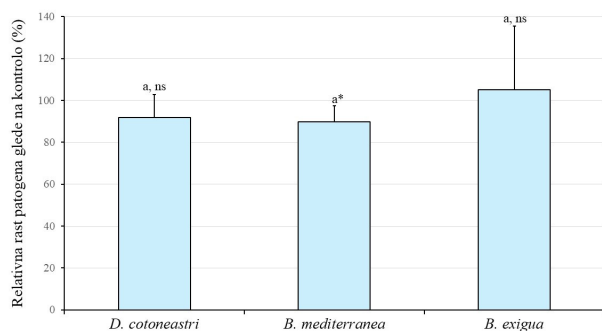
Preverili smo tudi razliko v učinku posameznega seva antagonista na glivne patogene, rezultati so razvidni v Tabeli 1. Po 7. dneh je bil pri *B. exigua* zaznan statistično značilen učinek, pri čemer je sev RM31 bolj zmanjšal rast patogena v primerjavi s sevom BI2. Pri *D. cotoneastri* in *B. mediterranea* po 7. dneh statistično značilnih razlik med sevoma nismo zaznali. Po 14. dneh inkubacije se je pri *D. cotoneastri* pokazala statistično značilna razlika v učinku, pri čemer je bil zaviralni učinek seva RM31 izrazitejši. Pri *B. mediterranea* in *B. exigua* po 14. dneh statistično značilnih razlik v učinkovitosti med sevoma nismo ugotovili.

Učinek sevov *Aureobasidium pullulans* na rast izbranih glivnih patogenov ob uporabi t.i. metode »sendvičev«

Na Sliki 5 so prikazani rezultati testa posrednih učinkov oz. izločanja hlapnih organskih snovi, t.i. metode »sendvičev«.



Slika 2. Relativna rast različnih glivnih patogenov v dvojni kulturi z glivo *Aureobasidium pullulans* sev RM31 14 dni po inkubaciji. Prikazane so povprečne vrednosti ± standardna deviacija (n = 7-10). Različne črke označujejo statistično značilne razlike v relativni rasti med patogeni (enosmerna ANOVA z Holm–Bonferronijevim post-hoc testom, $p < 0,05$), medtem ko zvezdica (*) označuje statistično značilno zaviranje posameznega patogena v primerjavi z ustrežno kontrolo (t-test, $p < 0,05$).



Slika 3. Relativna rast različnih glivnih patogenov v dvojni kulturi z glivo *Aureobasidium pullulans* sev BI2 7 dni po inokulaciji. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ standardna deviacija ($n = 9-10$). Različne črke označujejo statistično značilne razlike v relativni rasti med patogeni (enosmerna ANOVA z Holm–Bonferronijevim post-hoc testom, $p < 0,05$); zvezdica (*) označuje statistično značilno zaviranje posameznega patogena v primerjavi z ustrezno kontrolo (t-test, $p < 0,05$), ns pa pomeni, da razlik ni bilo ($p \geq 0,05$).

Opazimo lahko, da je gliva *D. cotoneastri* rastla bolje kot v kontroli ne glede na sev antagonista *A. pullulans* (v povprečju za približno 50 do 70 % bolje kot v kontroli), prav tako tudi *B. exigua* v kombinaciji s sevom RM31, medtem ko učinek seva BI2 na omenjeno glivo ni bil statistično značilen. Na Sliki 5 ni rezultatov za patogena *B. mediterranea*, saj ta ni rasel v nobeni petrijevki, najverjetneje zaradi napake v postopku izolacije spor in priprave inokuluma.

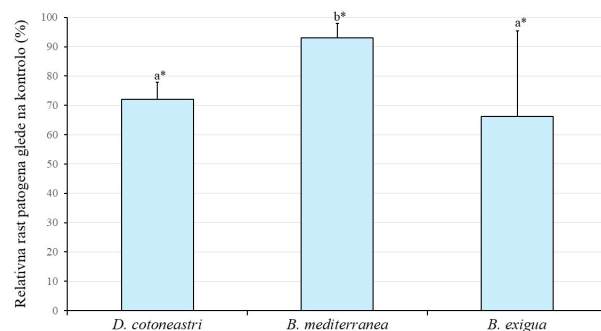
Diskusija

Rezultati raziskave, v kateri smo preučevali posredne in neposredne interakcije dveh sevov glive *Aureobasidium pullulans* na tri glivne patogene, so nam pokazali, da je antagonistični učinek odvisen predvsem od seva in časa od postavitve poskusa.

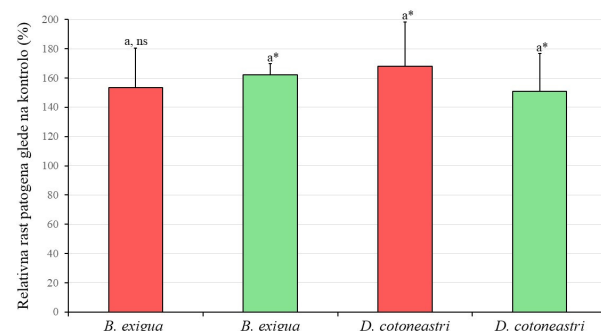
Prvo hipotezo smo na podlagi rezultatov testa dvojne kulture seva RM31 potrdili, kajti ta je po sedmih in štirinajstih dneh povzročil statistično značilno zaviranje rasti vseh treh testiranih patogenov v primerjavi s kontrolami. Posebej izrazito je bilo to zaviranje pri rasti patogena *B. exigua*, kar nam kaže na večjo občutljivost tega patogena na neposredne antagonistične mehanizme. Podobne antagonistične lastnosti vrste *A. pullulans* so bile že opisane v študijah, kjer je bila izpostavljena njena sposobnost zaviranja številnih fitopatogenih gliv, kot so *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* in *Rhizopus stolonifer* (Wachowska s sod. 2014). So pa do sedaj že opisali različne vplive *A. pullulans* na rastlinske patogene, in sicer kompeticijo za prostor in hranila, izločanje inhibitornih spojin, proizvodnja

Tabela 1. Prikaz razlik v učinkovitosti zaviranja različnih patogenov med sevoma *Aureobasidium pullulans* RM31 in BI2 7. in 14. dni po inokulaciji. Zvezdica (*) označuje statistično značilno razliko v učinku na posameznega patogena (t-test, $p < 0,05$), ns pa pomeni, da razlik ni bilo ($p \geq 0,05$).

	<i>D. cotoneastri</i>	<i>B. mediterranea</i>	<i>B. exigua</i>
Po 7. dneh	ns	ns	*
Po 14. dneh	*	ns	ns



Slika 4. Relativna rast različnih glivnih patogenov v dvojni kulturi z glivo *Aureobasidium pullulans* sev BI2 14 dni po inokulaciji. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ standardna deviacija ($n = 5-9$). Različne črke označujejo statistično značilne razlike v relativni rasti med patogeni (enosmerna ANOVA z Holm–Bonferronijevim post-hoc testom, $p < 0,05$), medtem ko zvezdica (*) označuje statistično značilno zaviranje posameznega patogena v primerjavi z ustrezno kontrolo (t-test, $p < 0,05$).



Slika 5. Relativna rast dveh glivnih patogenov v prisotnosti dveh sevov glive *Aureobasidium pullulans* (rdeča označuje interakcijo s sevom BI2, zelena pa s sevom RM31) 7 dni po inokulaciji. Uporabljen je bil antagonistični test posrednih interakcij preko hlapnih organskih spojin (VOC) z uporabe t.i. metode »sendvičev«. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ standardna deviacija ($n = 3-4$). Različne črke označujejo statistično značilne razlike med patogeni (enosmerna ANOVA z Holm–Bonferronijevim post-hoc testom, $p < 0,05$); zvezdica (*) označuje statistično značilno zaviranje posameznega patogena v primerjavi z ustrezno kontrolo (t-test, $p < 0,05$), ns pa pomeni, da razlik ni bilo ($p \geq 0,05$).

termostabilnih protiglivičnih spojin, hidrolitičnih encimov, hlapnih spojin in toksinov (Klein s sod. 2018). Drugo hipotezo smo na podlagi rezultatov dvojne kulture seva BI2 prav tako potrdili. Omenjeni sev je sicer v zgodnejši fazi inkubacije (7 dni) pokazal omejen antagonistični učinek, kajti statistično značilna je bila zavrta rast le pri patogenu *B. mediterranea*, medtem ko pri ostalih dveh teh razlik glede na kontrolo ni bilo. Po štirinajstih dneh je zaviralni učinek postal izrazit pri vseh treh patogenih, zaradi česar smo hipotezo potrdili. To kaže, da je antagonistični potencial seva BI2 časovno odvisen, kar bi lahko vplivalo na počasnejšo rast ali zakasnjeno izločanja inhibitornih spojin. Takšna časovna komponenta antagonizma je bila opažena tudi pri drugih sevih *A. pullulans*, kjer se učinkovitost prav tako povečuje z

daljšim trajanjem interakcije, kot je bilo prikazano tudi v našem poskusu (Iqbal s sod. 2023).

Če primerjamo še učinkovitost obeh uporabljenih sevov *A. pullulans*, lahko vidimo, da je sev RM31 po sedmih dneh bolj učinkovito zaviral rast patogena *B. exigua*, prav tako je bil izrazitejši tudi pri zaviranju rasti patogena *D. cotoneastri* po štirinajstih dneh. Pri zaviranju *B. mediterranea* ni bilo razlike. Ti rezultati nam potrjujejo, da imajo lahko nekateri sevi antagonistično delovanja izrazito za več različnih patogenov, kar je pomembno upoštevati tudi pri potencialni uporabi teh gliv pri zaščiti rastlin pred fitopatogenimi glivami. Različni sevi iste vrste lahko namreč izražajo različne mehanizme delovanja in stopnje učinkovitosti, kar pa lahko vidimo tudi v naših rezultatih (Di Francesco s sod. 2015). Gostinčar s sod. (2019) so v svoji študiji pokazali, da je *A. pullulans* generalist z visoko prilagodljivostjo in sposobnostjo preživetja v različnih okoljih brez genetskih znakov specializacije za različne habitate. To nakazuje na širok spekter mehanizmov, ki vplivajo na preživetje v različnih okoljih, hkrati pa mu omogočajo tudi različne interakcije z drugimi organizmi, med drugim patogeni, kar bi lahko vplivalo tudi na variabilen antagonističen potencial med sevi, kar smo ugotavljali tudi z našim poskusom.

Tretjo in četrto hipotezo pa smo na podlagi rezultatov metode »sendvičev«^{ovrgli}. Rezultati obeh sevov nam namreč kažejo, da hlapne organske spojine, ki jih le-ta proizvajata, nimajo zaviralnega učinka na rast testiranih patogenov. V nekaterih primerih je bila opažena celo statistično značilno povečana rast patogenov v primerjavi s kontrolami. To nam kaže, da hlapne organske spojine (VOC) teh sevov *A. pullulans* ne prispevajo k antagonizmu patogenih gliv, ampak lahko celo stimulirajo rast patogenov, kar je bilo že opisano v preteklih študijah nekaterih mikrobnih interakcij, kjer hlapne spojine delujejo kot rastni signali (Razo-Belmán s sod. 2023). So pa v nekaterih drugih študijah že dokazali, da določeni sevi *A. pullulans* lahko prispevajo k zaviranju rasti patogenov s hlapnimi organskimi spojinami. Di Francesco s sod. (2015) so to dokazali za seva *A. pullulans* L1 in L8.

Celoten poskus nam tako nakazuje, da je antagonistični učinek sevov *A. pullulans* predvsem posledica neposrednih interakcij v dvojni kulturi, medtem ko posrednih učinkov preko hlapnih spojin nismo mogli potrditi. To je lahko pomembna ugotovitev za njihovo potencialno uporabo v praksi, saj bi bila učinkovitost verjetno večja v okoljih, kjer je omogočen neposreden stik med antagonizmom in patogenom, na primer na sami površini rastlinskih tkiv, medtem ko vpliv preko hlapnih spojin ne bi bil učinkovit.

Zaključek

Z našo raziskavo smo ovrednotili antagonistični potencial dveh endofitskih sevov glive *Aureobasidium pullulans* proti izbranim glivnim patogenom oljke. Ugotovili smo, da sta oba seva v testih dvojnih kultur zavirala rast patogenov *Biscogniauxia mediterranea*, *Boeremia exigua* in *Diaporthe cotoneastri*, pri čemer so se med sevoma pokazale razlike v intenziteti in časovni dinamiki antagonističnega učinka.

Ugotovili smo, da je bil antagonistični učinek opažen le v pogojih neposrednih interakcij, kar kaže na pomembno vlogo teh mehanizmov, kot so kompeticija za prostor in hranila ter lokalno delovanje zaviralnih metabolitov. Nasprotno v testih temelječih na vplivu hlapnih organskih spojin, nismo zaznali zaviralnega učinka na rast patogenov, celo spodbujevalni,

kar nakazuje, da hlapne organske snovi pri preučevanih sevih *Aureobasidium pullulans* ne predstavljajo mehanizma antagonističnega delovanja.

Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko zaključimo, da ima gliva *Aureobasidium pullulans* izrazit antagonistični potencial proti izbranim glivnim patogenom oljke. Takšne raziskave prispevajo k boljšemu razumevanju interakcij med endofitskimi glivami in fitopatogeni ter poudarjajo pomen endofitov kot pomembnega sestavnega dela mikrobne združbe oljke.

Literatura

- Andrews JH, 1992. Biological control of foliar pathogens by *Aureobasidium pullulans*. *Biocontrol Science and Technology* 2, 1:3–10.
- Baron NC, Rigobelo EC, 2021. Endophytic fungi: A review of their impact on plants, environmental significance, and potential applications. *Mycology* 12, 2:77–95.
- Bziuk N, Wassermann B, Bickel S, Omidvar R, Manica A, Berg G, 2025. *Aureobasidium pullulans*: a microbiome-based perspective from global biomes to edible plant tissues. *Frontiers in Plant Science* 16:1652366.
- Castro C, Pimentel C, Monteiro A, 2022. Biological control potential of *Aureobasidium pullulans* against plant pathogenic fungi. *Journal of Fungi* 8, 5: 451–465.
- Di Francesco A, Ugolini L, Lazzeri L, Mari M, 2015. Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* and their antifungal activity against postharvest pathogens. *Biological Control* 81:8–14.
- Gharbi Y, Ennouri K, Bouazizi E, Che M, Triki MA, 2020. First report of charcoal disease caused by *Biscogniauxia mediterranea* on *Olea europaea* in Tunisia. *Journal of Plant Pathology* 102:196.
- Gostinčar C, Lenassi M, Gunde-Cimerman N, Plemenitaš A, 2011. Fungal adaptation to extremely dry environments. *FEMS Microbiology Letters* 318:1–8.
- Gostinčar C, Turk M, Zajc J, Gunde-Cimerman N, 2019. Fifty *Aureobasidium pullulans* genomes reveal a recombining polyextremotolerant generalist. *Environmental Microbiology* 21, 10: 3638–3652.
- Iqbal M, Broberg A, Andreasson E, Stenberg JA, 2023. Biocontrol potential of beneficial fungus *Aureobasidium pullulans* against *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology* 113:1428–1438.
- Klein MN, Kupper KC, 2018. Biofilm production by *Aureobasidium pullulans* improves biocontrol against sour rot in citrus. *Food microbiology*, 69: 1–10.
- Mari M, Martini C, Spadoni A, Rouissi W, Bertolini P, 2012. Biocontrol of postharvest pathogens of fruit: *Aureobasidium pullulans* as a model system. *Biocontrol Science and Technology* 22, 6:589–601.
- Moral J, Agusti-Brisach C, Perez-Rodriguez M, Xavier C, Carmen Raya M, Rhouma A, Traperio A, 2017. Identification of fungal species associated with branch dieback of olive and resistance of table cultivars to *Neofusicoccum mediterraneum* and *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease* 101, 2:306–316.
- Petrini, O, 1991. *Fungal Endophytes of Tree Leaves*. V: Andrews JH, Hirano SS. (ur) *Microbial Ecology of Leaves*. Springer, New York, ZDA.
- Quezada-D'Angelo T, San Martin J, Ruiz B, Oyarzua P, Vargas M, Fischer S, Cortes P, Astete P, Moya-Elizondo E, 2024. Use of *Pseudomonas protegens* to Control Root Rot Disease Caused by *Boeremia exigua* var. *exigua* in Industrial Chicory (*Cichorium intybus* var. *sativum* Bisch.). *Plants* 13, 2:263.
- Rodriguez RJ, White JF, Arnold AE, Redman RS, 2009. Fungal endophytes: Diversity and functional roles. *New Phytologist* 182, 2:314–330.

-
16. Schulz B, Boyle C, 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research* 109, 6:661–686.
 17. Song C, Zhu F, Carrion VJ, Cordovez V, 2020. Beyond Plant Microbiome Composition: Exploiting Microbial Functions and Plant Traits via Integrated Approaches. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8:896.
 18. Udayanga D, Castlebury L, Rossman A, Chukeatirote E, Hyde K, 2014. Insights into the genus *Diaporthe*: phylogenetic species delimitation in the *D. eres* species complex. *Fungal Diversity* 67:203-229.
 19. Wachowska U, Głowacka K, 2014. Antagonistic interactions between *Aureobasidium pullulans* and *Fusarium culmorum*, a fungal pathogen of winter wheat. *BioControl* 59: 635–645.
 20. Razo-Belmán R, Ángeles-López YI, García-Ortega LF, León-Ramírez CG, Ortiz-Castellanos L, Yu H, Martínez-Soto D, 2023. Fungal volatile organic compounds: mechanisms involved in their sensing and dynamic communication with plants. *Frontiers in Plant Science* 14: 1257098.
 21. Zalar P, de Hoog GS, Schroers HJ, Frank JM, Gunde-Cimerman N, 2008. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Aureobasidium pullulans*. *Fungal Diversity* 24:71–97.

Uporaba potencialno antagonistične glive *Epicoccum nigrum* proti izbranim glivnim patogenom oljke

Hajsinger Nika, Kunej Jaka, Šubic Tinkara, Urh Živa

Študij biotehnologije, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

- Glivne bolezni povzročajo vedno več težav v oljčnih nasadih, saj vodijo do sušenja vej in slabšega pridelka. Ker je uporaba fungicidov omejena, se kot ena od možnosti zatiranja bolezni pojavlja biološko varstvo z endofitskimi glivami.
- V naši raziskavi smo preučevali dva endofitska seva glive *Epicoccum nigrum* (BI5 in BI58) in njun vpliv na rast treh patogenih gliv oljke: *Boeremia exigua*, *Diaporthe cotoneastri* in *Biscogniauxia mediterranea*.
- Na gojišču PDA smo pripravili dvojne kulture in po 7. in 14. dneh izmerili površino kolonij patogena. Izračunali smo delež rasti v primerjavi z ustrezno kontrolo brez antagonista.
- Rezultati so pokazali, da je bil odziv patogenov na prisotnost *E. nigrum* zelo različen. Pri obeh sevih smo najmočnejšo inhibicijo opazili pri vrsti *D. cotoneastri*, kjer se je po 14 dneh rast znižala na približno 65–75 % kontrolne rasti. Na *B. mediterranea* je bil učinek obeh sevov zelo blag, pri *B. exigua* pa je bila rast po 7 dneh v prisotnosti endofita celo značilno večja kot v čisti kulturi.
- Na podlagi rezultatov je razvidno, da ima *E. nigrum* potencial kot biokontrolni agens predvsem proti *D. cotoneastri*, pri drugih dveh patogenih pa je bil učinek šibek ali celo stimulativen, zato bi bila neselektivna uporaba takih sevov lahko tvegana.
-

Ključne besede: endofitske glive, patogene glive lesa, biološko varstvo, antagonizem, interakcije

Uvod

Oljka (*Olea europaea*) je zimzelena sredozemska rastlina, izjemno prilagojena sušnim razmeram in visokim temperaturam sredozemskega podnebja. Njeni kultivarji se na pomanjkanje vode prilagajajo anatomsko (z debelejšo kutikulo in epidermisom, gostejšim mezofilom, tršimi listi in manjšo vsebnostjo vode v tkivih) ter morfološko (z manjšimi listi, voskasto povrhnjico in dlačicami), kar zmanjšuje transpiracijo (Bacelar s sod. 2004). Deblo z večjo gostoto in širšimi prevodnimi žilami omogoča učinkovitejši transport vode, medtem ko plitev, a razvejan koreninski sistem črpa vodo iz večjih talnih volumnov (Portarena s sod. 2025; Hussain s sod. 2025).

Oljka pa predstavlja tudi dinamičen ekosistem, v katerem sobiva širok spekter mikroorganizmov. Poseben pomen imajo endofiti - mikroorganizmi, ki živijo znotraj rastlinskih tkiv, ne da bi pri tem povzročali škodo gostitelju. Prisotnost endofitov lahko rastlini prinaša številne koristi – od izboljšane odpornosti na vodni stres in patogene do spodbujanja njene rasti (Nicoletti s sod. 2020). Med njimi ima poseben pomen rod *Epicoccum*, predvsem vrsta *Epicoccum nigrum*, ki velja za askomicetno, saprofitno glivo s širokim gostiteljskim spektrom. Za to vrsto je značilna velika morfološka in fiziološka variabilnost. Na hranilnih ploščah *E. nigrum* tvori počasneje rastoče kolonije, ki so sprva svetlo rumene ali bele barve, nato pa postopoma prehajajo v intenzivno oranžno, rdečkasto ali temno rjavo do sivo zaradi tvorbe pigmentov. Površina kolonij je žametna do puhasta, robovi so nepravilni, spodnja stran pa močno pigmentirana, pogosto skoraj črna. Z dozorevanjem se na površini pojavijo temne pikčaste strukture – sporodohiji, kjer nastajajo konidiji (Christova in Slavov 2011). Ta vrsta je opisana tudi kot naravni antagonist pomembnih rastlinskih patogenov (Ogórek in Plaskowska 2011). Ravno zato so vrste rodu *Epicoccum* prepoznane kot potencialni biokontrolni agensi oljk, saj lahko s proizvodnjo sekundarnih protimikrobnih metabolitov in tekmovanjem za prostor ali hranila zavirajo razvoj pomembnih patogenov (Angilè s sod. 2025). Med antagonistične mehanizme delovanja *E. nigrum* prištevamo še zmanjšanje rasti, sporulacije in kalitve patogena, povzročanje morfoloških sprememb hif patogena, produkcijo hlapnih organskih spojin za zaviranje rasti in indukcijo obrambnih poti gostitelja (Poveda in Baptista 2021). Te antagonistične lastnosti ji dajejo možnost uporabe v biokontroli in tako potencialno nadomestilo kemičnim pesticidom.

V raziskavi smo opazovali morebiten antagonističen efekt dveh sevov *E. nigrum* proti trem patogenom oljk: *Biscogniauxia mediterranea*, *Boeremia exigua* in *Diaporthe cotoneastri*. *Biscogniauxia mediterranea* je askomicetna gliva in povzročitelj ogljene bolezn oljke ("charcoal disease" ali "charcoal canker"), razširjene predvsem v sredozemskih območjih z vročimi poletji in sušnimi obdobji. Stres zaradi pomanjkanja vode oslabi drevesa in omogoči aktivacijo latentno prisotnega patogena, ki najpogosteje vstopi v gostitelja skozi rane po obrezovanju. Bolezen prizadene deblo in liste oljke ter povzroča vzdolžne razpoke v deblu, luščenje skorje in ovenelost krošnje. V okuženem lesu se kasneje razvije značilna črna obarvana stroma, po kateri je bolezen dobila ime. Na hranilnih gojiščih PDA se barva kolonij med izolati razlikuje; sev, preučen v naši raziskavi, tvori bel do svetlo siv, hitro rastoč, homogen in laskasto puhast micelij (Gharbi s sod. 2020; Petrović s sod. 2024).

Boeremia exigua je kozmopolitska, oportunistična gliva, ki okužuje širok spekter gostiteljskih rastlin, med drugimi tudi oljko. Povzroča listne in stebelne nekroze, listne pege, gnitje ali propad rastlinskih delov in črno gnilobo korenin.

Na gojiščih PDA se lepo vidi pas mlajšega micelija, ki je sive do olivno rjave barve z žametno površino, ki ob staranju potemni in postane zrnat. Micelij na tem gojišču raste nekoliko počasneje in čez čas so opazni lobirani oz. valoviti robovi (Lan in Duan 2022).

Diaporthe cotoneastri je gliva iz kompleksnega rodu *Diaporthe*, ki vključuje številne endofite in patogene lesnatih rastlin.

Kot endofiti so poznani po proizvodnji encimov, sekundarnih metabolitov in antibiotikov z protimikrobnimi ali protirakovinimi učinki (Chen s sod. 2023). Pri oljki se ta rod pojavlja kot šibkejši patogen, pri čemer predstavniki navadno povzročajo rakaste spremembe. Simptomi vključujejo rdeče-rjave lise na skorji, razpoke v skorji, nekroze kambija, sušenje poganjkov in vdolbine na mestu okužbe (Ivič s sod. 2023). Na hranilnih gojiščih (PDA) micelij raste zmerno hitro. Sprva je bele do kremne barve s puhastim videzom, ki s staranjem postane sivkast (Gomes s sod. 2013). Pri našem sevu je bila opažena izrazita rast v koncentričnih krogih.

Študije so pokazale, da ima *E. nigrum* veliko genetsko raznolikost, kar se odraža v različnih stopnjah antagonistične učinkovitosti mehanizmov med sevi te vrste in zmožnostjo uporabe posameznega seva v biokontroli (Li s sod. 2022). Namen naše raziskave je bil eksperimentalno ovrednotiti antagonistične sposobnosti dveh sevov *E. nigrum* (BI5 in BI58) proti trem zgoraj opisanim patogenom ter prispevati k razumevanju njihovega biokontrolnega potenciala in mehanizmov delovanja. Biokontrola, ki temelji na uporabi vrste rodu *Epicoccum*, endofita in antagonista patogenov oljk, bi bila lahko hkrati uporabljena tudi proti drugim patogenom in zaščiti drugih gostiteljskih vrst (Angilè s sod. 2025).

Predvidevali smo, (1) da bosta oba preučevana seva *E. nigrum* (BI5 in BI58) imela antagonističen učinek proti izbranim patogenom oljk, (2) da se bo njuna učinkovitost razlikovala glede na posamezno vrsto patogen in (3) da bo zaviralni učinek sevov *E. nigrum* na rast patogenov oljke statistično značilen že po 7. dneh inkubacije.

Materiali in metode

Biološki material in izvor izolatov

V študiji smo uporabljali antagonistična seva *Epicoccum nigrum* BI5 in BI58. Kot tarčne patogene glive smo uporabili *Biscogniauxia mediterranea* sev RM57, *Boeremia exigua* sev BI64 in *Diaporthe cotoneastri* sev BI23. Vsi izolati izvirajo iz predhodno zbranih vzorcev z različnih sort oljke (*Olea europaea*) iz kolekcijskih nasadov Inštituta za kmetijstvo in turizem v Poreču.

Vzgoja čistih kultur gliv

Za vse poskuse smo pripravili sveže glivne kulture, tako da smo jih precepljali vsak teden na gojišče iz 2 % krompirjevo-dekstroznega agarja (PDA). Iz izvirne starejše kulture smo s spatulo izrezali 5 mm x 5 mm kvadratni izseček gojišča z micelijem in ga aseptično prenesli na sredino sveže plošče PDA, tako da je bil micelij obrnjen navzgor. Kulture gliv smo gojili en teden na sobni temperaturi v temi in jih nato uporabili v

nadaljnjih eksperimentih.

Antagonistični testi: neposredne interakcije

Za test neposrednih interakcij smo iz enotedenske kulture s sterilno spatulo izrezali izseček gojišča (5 mm × 5 mm) z micelijem. Za zagotovitev ponovljivega položaja inokulumov smo pripravili papirnato šablono: na listu smo obrisali obod 9 cm petrijevke in na premeru kroga označili dve referenčni točki, vsako 2 cm od roba petrijevke, med njima pa je bilo 5 cm. Med inokulacijo smo petrijevko z gojiščem položili na šablono. Izseček antagonista (BI5 ali BI58) smo aseptično namestili na levo stran svežega gojišča PDA, natančno nad levo referenčno točko, z micelijem obrnjenim navzgor; izseček patogena (RM57, BI64 ali BI23) pa smo enako namestili na desno stran, nad desno referenčno točko, tako da med izsečkoma na začetku ni bilo stika. Postopek smo ponovili za vse kombinacije antagonist–patogen. Izvedli smo tudi kontrole: pri kontroli antagonistov smo na levo stran plošče namestili le izseček antagonista, pri kontroli patogenov pa smo na desno stran plošče namestili le izseček posameznega patogena. Plošče smo inkubirali 14 dni pri sobni temperaturi v temi, rast pa ovrednotili po 7. in 14. dneh; ob vsakem tednu smo petrijevke fotografirali na temnem ozadju in posnetke analizirali v programu za obdelavo slik.

Statistična analiza in ovrednotenje podatkov

Fotografije kolonij smo analizirali v programu ImageJ (Fiji). Po umerjanju merila na premer petrijevke smo z določanjem obrisa kolonije izmerili površino micelija. Izmerjene vrednosti smo v programu MS Excelu zbrali in normalizirali na ustrezne kontrole; tako smo izračunali relativno rast, s čimer smo lahko neposredno ovrednotili morebiten učinek antagonista na rast patogena. Statistične analize (enosmerna ANOVA) smo izvedli v Excelu z dodatkom XL Toolbox.

Rezultati

Na Sliki 1 so prikazane kontrole tako patogenih sevov kot

antagonistov, po 7. in 14. dneh inkubacije. Slika 2 pa prikazuje rezultate rasti dvojnih kultur, po 7. in 14. dneh, iz katerih smo s pomočjo programa ImageJ pridobili vrednosti za površino kolonije v dvojni kulturi. Na osnovi rasti med površino kolonije v dvojni kulturi in površino ustrezne kontrolne kolonije smo nato izrazili relativne deleže rasti posameznih gliv.

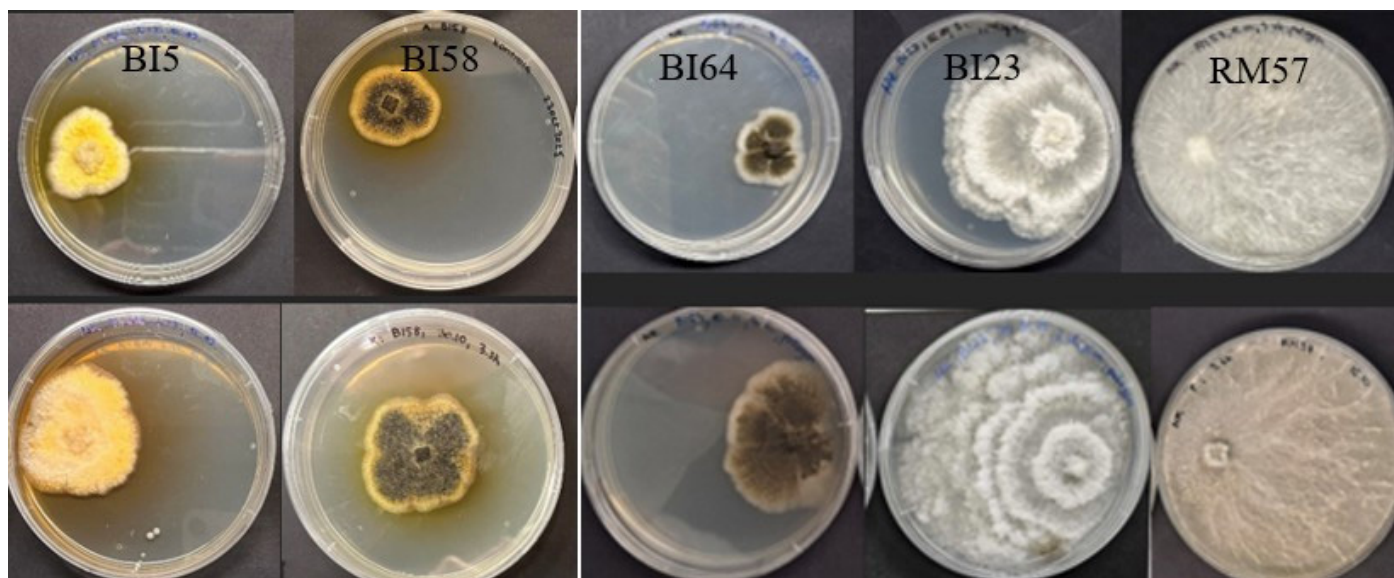
Po 7. dneh inkubacije je sev BI5 različno vplival na rast treh preučevanih patogenov oljke (Slika 3a). Relativna rast *B. exigua* je v prisotnosti seva BI5 presegla kontrolo. Rast kolonije v dvojni kulturi je bila za 48 % večja kot v čisti kulturi patogena. *D. cotoneastri* je v prisotnosti BI5 rasla počasneje (87 % kontrole), medtem ko je bila rast *B. mediterranea* praktično enaka kot pri kontroli, saj je v obeh prerastla celotno površino petrijevke. *B. exigua* je edina, katere rast se je značilno razlikovala od kontrole, medtem ko pri drugih dveh nismo opazili razlik.

Po 14. dneh je bila relativna rast *B. exigua* v prisotnosti BI5 praktično enaka kontroli, rast *D. cotoneastri* pa se je dodatno znižala na 66 % kontrole in je bila statistično značilno zavrta. *B. mediterranea* je bila po 14. dneh v prisotnosti BI5 le malo zavrta, dosegla je 94% velikosti kontrole. V primerjavi s kontrolo je bila po 14. dneh rast *D. cotoneastri* v prisotnosti BI5 torej značilno nižja (zavrta za 34 %), pri *B. mediterranea* je bila razlika minimalna (le 6 % zavrta), medtem ko rast glive *B. exigua* ni bila zavrta.

Če povzamemo, to kaže, da sev BI5 po daljšem času najmočnejše zavira rast *D. cotoneastri*, medtem ko na *B. mediterranea* vpliva zelo blago, rast *B. exigua* pa v zgodnji fazi celo spodbuja.

Podoben trend se je izkazal tudi pri drugem sevu antagonista (BI58). Relativna rast *B. exigua* v prisotnosti BI58 je bila v povprečju skoraj 50 % večja kot v kontroli, kar znova kaže na stimulacijo rasti v dvojni kulturi (Slika 3b). Po 7. dneh je bil delež rasti *D. cotoneastri* v prisotnosti seva BI58 najnižji (81% kontrole), vendar zaradi velike variabilnosti med ponovitvami razlika glede na kontrolo ni dosegla statistične značilnosti. Rast *B. mediterranea* pa je bila le blago, a statistično značilno zavrta (na 94 % kontrole).

Po 14. dneh v prisotnosti BI58 je bila zavrta le rast *D.*



Slika 1. Fotografije kontrolnih plošč oziroma čistih kultur gliv od leve proti desni: antagonistična seva *Epicoccum nigrum* (BI5) in (BI58) ter patogeni *Boeremia exigua* (BI64), *Diaporthe cotoneastri* (BI23) in *Biscogniauxia mediterranea* (RM57), vsi izolirani iz oljke (*Olea europaea*); zgornja vrstica prikazuje rast po 7. dneh inkubacije, spodnja pa po 14. dneh.



Slika 2. Antagonistični testi neposrednih interakcij na gojišču PDA: dvojne kulture sevov *Epicoccum nigrum* (BI5; leva polovica) in (BI58; desna polovica) s patogenimi glivami (od leve proti desni) *Boeremia exigua* (BI64), *Diaporthe cotoneastri* (BI23) in *Biscogniauxia mediterranea* (RM57) po 7. (zgornja polovica) in 14. dneh (spodnja polovica) inkubacije.

cotoneastri (na 75 % kontrole), medtem ko na glivi *B. exigua* in *B. mediterranea* sev BI58 ni imel vpliva, saj so velikosti kolonij ostale skoraj na ravni kontrole. To nakazuje, da je sev BI58 najmočnejše deloval prav na *D. cotoneastri*, pri preostalih dveh patogenih pa ni imel učinka.

Če primerjamo antagonista, sta oba preučevana seva *E. nigrum* v dvojnih kulturah najizraziteje zavirala rast *D. cotoneastri*, kjer se je relativna rast po 14. dneh znižala na 66 % (ob interakciji s sevom BI5) oziroma na 75 % (ob interakciji s sevom BI58) rasti kontrolnih kolonij. Vpliv na *B. mediterranea* je bil v obeh primerih le blag – pri sevu BI5 šele na 14. dan minimalno zavrtje, medtem ko je sev BI58 minimalno zavrl rast omenjene glive le na 7. dan, 14. dan pa ni bilo več razlike od kontrole. Nasprotno pa je bila rast *B. exigua* v prisotnosti obeh sevov zlasti po 7. dneh celo višja od kontrole, na 14. dan pa primerljiva kontroli. Ti rezultati kažejo na izrazito vrstno specifično antagonistično delovanje *E. nigrum* glede na

patogeno vrsto.

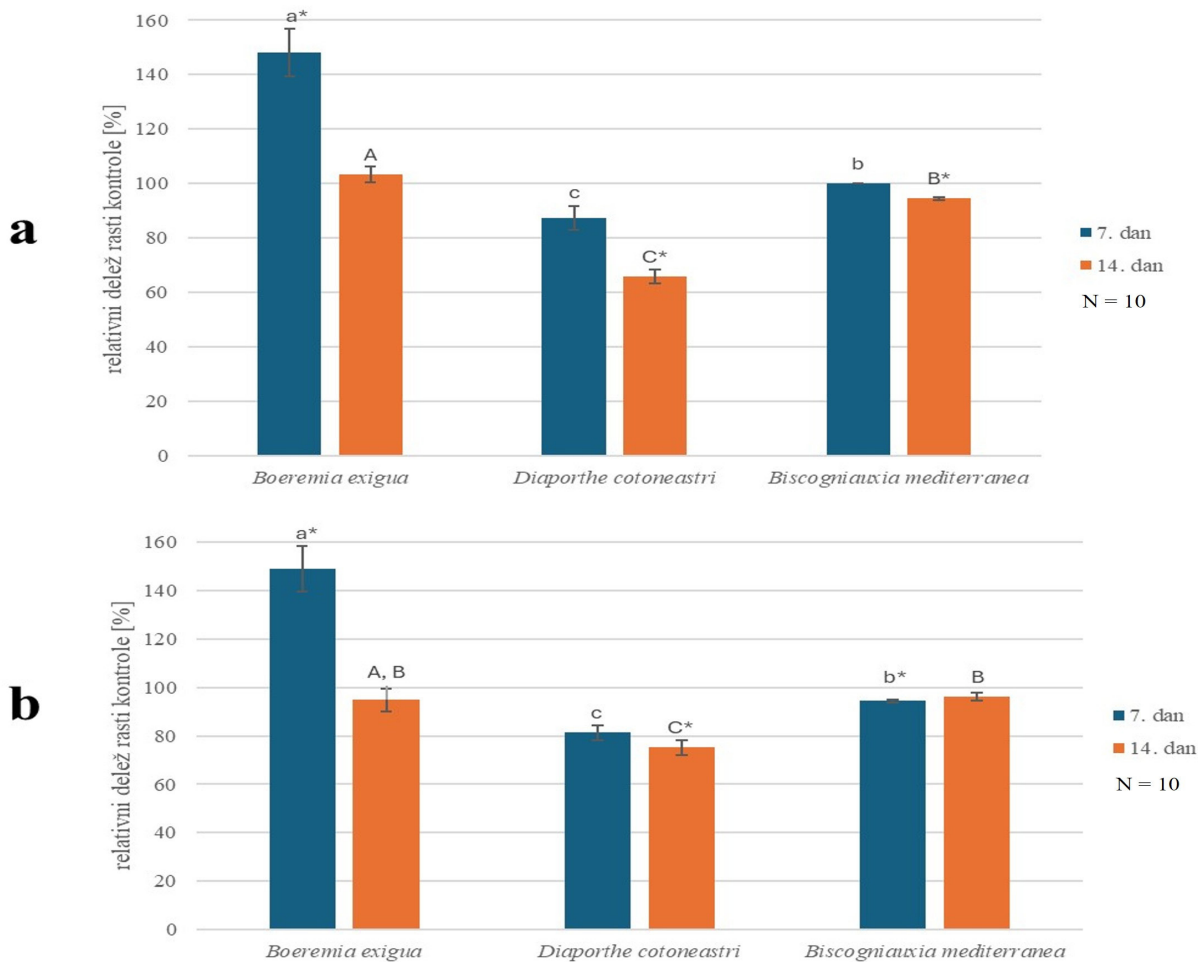
Za primerjavo uspešnosti obeh sevov *E. nigrum* pri zaviranju iste vrste patogena, smo za vsako patogeno vrsto in čas merjenja naredili primerjavo uspešnosti zaviranja sevov BI5 in BI58. V Tabeli 1 so predstavljene p-vrednosti tega testa. Pri *B. mediterranea* je bil po 7. dneh delež rasti v prisotnosti seva BI5 enak kontroli, saj je patogen v vseh ponovitvah prerastel celotno petrijevko, medtem ko je bil v prisotnosti seva BI58 nekoliko nižji (95 % kontrole). Zaradi zelo majhne variabilnosti je t-test pokazal statistično značilno razliko med sevoma ($p = 9,5 \times 10^{-8}$), vendar je razlika v rasti premajhna da bi nakazovala omejevanje rasti patogena. Iz tabele je razvidno, da se seva statistično pomembno razlikujeta le pri *D. cotoneastri* po 14. dneh inkubacije (ta razlika je označena z *), kjer je BI5 nekoliko bolj zaviralni kot BI58. Pri *B. exigua* in *B. mediterranea* p-vrednosti kažejo, da med sevoma ni statistično značilnih razlik v antagonističnem učinku.

Tabela 1. Prikaz p-vrednosti t-testa pri primerjavi vpliva sevov *E. nigrum* BI5 in BI58 na rast treh različnih patogenov oljke po 7. in 14. dneh inkubacije. * označuje statistično značilno razliko v zaviralnem učinku med različnima sevoma (t-test, $p < 0,05$).

	<i>Boeremia exigua</i>	<i>Diaporthe cotoneastri</i>	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>
Po 7. dneh	0,961	0,282	/
Po 14. dneh	0,129	0,030*	0,589

Diskusija

Rezultati naše raziskave potrjujejo, da lahko endofitska gliva *E. nigrum* deluje kot učinkovit, vendar zelo selektiven antagonist patogenih gliv oljke. Oba preučevana seva, BI5 in BI58, sta v dvojnih kulturah najizraziteje zmanjšala rast *D. cotoneastri*, učinek na *B. mediterranea* je bil minimalen, pri *B. exigua* pa smo v zgodnji fazi opazili celo stimulacijo rasti. Različna učinkovitost v antagonističnem delovanju proti različnim patogenom ni presenečenje, saj so v raziskavah že dokazali, da



Slika 3. Stolpci prikazujejo povprečni delež rasti kolonij patogenov *Boeremia exigua*, *Diaporthe cotoneastri* in *Biscogniauxia mediterranea* v dvojni kulturi z antagonistom *Epicoccum nigrum* sev BI5 (a) in sev BI58 (b) po 7. in 14. dneh inkubacije na gojišču PDA. Prikazana so povprečja $\pm$ standardne napake. Različne črke nad stolpci znotraj istega časa inkubacije označujejo skupine, ki se med seboj statistično značilno razlikujejo (enosmerna ANOVA, Bonferroni–Holm post-hoc test, $p < 0,05$). Zvezdica (*) ob črki pomeni, da se rast danega patogena v prisotnosti antagonista statistično značilno razlikuje od njegove kontrole (t-test $p < 0,05$).

je velika genetska raznolikost vrste *E. nigrum* razlog za različno uspešnost pri zaviranju rastlinskih patogenov (Li s sod. 2022). V splošnem lahko iz rezultatov povzamemo, da *E. nigrum* ni močno zaviral nobenega od treh preučevanih patogenov. Še vseeno pa je pomembno raziskovanje biokontrolnega potenciala rodu *Epicoccum*, prav zaradi endofitskih in antagonističnih lastnosti teh vrst. Dokazano je namreč bilo, da *E. nigrum* zelo dobro zavira rast patogenih vrst *Verticillium dahliae* in *Colletotrichum acutatum*, ki sta znana povzročitelja boleznih oljk. Glavni mehanizem inhibicije rasti je bila produkcija sekundarnih protimikrobnih metabolitov (Angilè s sod. 2025). Razlog za slabše zaviralno delovanje antagonista proti trem patogenom v naši raziskavi, bi bila lahko tudi večja odpornost naših patogenov na sekundarne metabolite *E. nigrum*. Za boljše razumevanje interakcij bi bilo tako smiselno spremljati tudi proizvodnjo sekundarnih metabolitov.

Pri *D. cotoneastri* je bil zaviralni učinek sevov *E. nigrum* najbolj jasen in iz vidika biološkega varstva tudi najbolj relevanten. Po 14. dneh je bila relativna rast kolonij v prisotnosti obeh sevov vidno zmanjšana, kljub temu, da po 7. dneh ta inhibicija še ni bila statistično značilna, opažena je bila le nekoliko slabša rast. To kaže, da je za razvoj učinkovitega antagonizma med *E. nigrum* in *D. cotoneastri* potreben daljši čas interakcije. Dokazano je namreč bilo, da je inhibicija patogena slabša, če

sta patogen in antagonist inokulirana istočasno (Kunova s sod. 2016). V tem primeru bi lahko našega antagonista nacepili nekaj dni prej, da bi ta čim bolj optimalno zrasel in izdelal sekundarne metabolite ter tako zaviralno deloval že po 7. dneh interakcije.

Povsem drugačen odnos smo opazili pri *B. exigua*. V prisotnosti obeh sevov *E. nigrum* je bila rast tega patogena po 7. dneh večja kot v kontrolni kulturi, po 14. dneh pa se je relativna rast znižala na raven kontrole. To opažanje je v skladu z znanjem o dvojnih kulturah, kjer so raziskovalci dokazali, da v začetnih fazah interakcije med patogenom in antagonistom, patogeni lahko začasno bolje rastejo, saj se antagonistični učinki in proizvodnja zaviralnih metabolitov vzpostavijo šele po določenem času in presnovnih prilagoditvah (Liu s sod. 2022). Glede na naše rezultate lahko zaključimo, da raziskovanih sevov *E. nigrum* ni smiselno uporabiti kot biokontrolno sredstvo proti *B. exigua*, saj bi lahko taka interakcija celo pospešila rast patogena v določenih pogojih, podobnih začetnemu stanju v našem eksperimentu.

Pri *B. mediterranea* so bile razlike v rasti med kontrolo in dvojnimi kulturami razmeroma majhne. Rezultati torej kažejo, da prisotnost *E. nigrum* na gojišču sama po sebi ni dovolj, da bi prišlo do izrazite inhibicije rasti. Za učinkovitejše biokontrolne strategije proti *B. mediterranea* je verjetno potrebna

kombinacija več različnih antagonistov. Dokazano je bilo, da lahko biokontrolni mehanizmi delujejo sinergistično in s tem povečajo zmožnost zaviranja patogenov v primerjavi z uporabo le enega antagonista (Maciag s sod. 2023).

Če primerjamo oba seva *E. nigrum* med seboj, se izkaže, da sta si po učinkovitosti inhibicijskega delovanja precej podobna. Pri *D. cotoneastri* je sev B15 sicer nekoliko učinkovitejši, saj je relativna rast po 14. dneh v njegovi prisotnosti nižja kot pri sevu B158, medtem ko pri *B. exigua* in *B. mediterranea* razlike med sevoma niso tako izrazite. Lahko sklepamo, da med sevoma B15 in B158 ni dovolj velike genske raznolikosti, ki bi vplivala na različno stopnjo zaviranja rasti posameznega patogena (Li s sod. 2022).

Pri interpretaciji moramo upoštevati tudi omejitve poskusa. Delali smo v poenostavljenem sistemu na gojišču PDA, brez vpliva gostiteljske rastline in drugih mikroorganizmov ter okoljskih dejavnikov, ki lahko v naravi pomembno spreminjajo potek interakcij. Poleg tega smo spremljali le površino kolonij, ne vemo pa kaj se dogaja s produkcijo sekundarnih metabolitov, kot so recimo VOC in protimikrobne snovi.

Zaključki

V dvojnih kulturah na gojišču PDA sta oba preučevana seva endofitske glive *E. nigrum* pokazala selektivni antagonistični učinek do patogenov oljke. Najmočnejši zaviralni učinek je bil opažen pri *D. cotoneastri*, kjer se je rast v prisotnosti obeh sevov po 14. dneh znižala na 65–75 % rasti kontrolnih kolonij. Pri *B. mediterranea* je bil učinek obeh sevov majhen ali ga ni bilo, pri *B. exigua* pa je bila rast v zgodnjih fazah celo stimulirana. Zato lahko prvo hipotezo o splošnem antagonističnem delovanju *E. nigrum* na vse izbrane patogene le delno potrdimo.

Razlike v delovanju med patogenimi vrstami so bile izrazite. Antagonistično delovanje *E. nigrum* je tako močno odvisno od kombinacije antagonist – patogen, saj so interakcije zelo specifične. Druga hipoteza, da se učinkovitost sevov *E. nigrum* razlikuje glede na patogeno vrsto, je tako potrjena, saj so razlike v zaviranju med patogeni veliko pomembnejše kot razlike med samima sevoma.

Tretja hipoteza, po kateri naj bi se morebiten zaviralni učinek sevov *E. nigrum* na rast patogenov pokazal že po 7. dneh inkubacije, ni bila potrjena. Pri *D. cotoneastri* razlike v rasti v primerjavi s kontrolo po 7. dneh še ni bilo, medtem ko je po 14. dneh prišlo do jasne in značilne inhibicije z obema sevoma. Pri *B. mediterranea* je bil učinek ves čas neizrazit, pri *B. exigua* pa smo po 7. dneh zaznali nasproten trend – spodbujanje rasti. Rezultati tako kažejo, da čas merjenja močno vpliva na oceno antagonističnega potenciala. Če bi gledali samo 7. dan, bi glavni zaviralni učinek na *D. cotoneastri* spregledali, saj se pomembnejši antagonistični učinki razvijejo šele po daljši interakciji (14 dni).

Kljub omejitvam poenostavljenega sistema rezultati kažejo, da imata preučevana seva *E. nigrum* potencial kot biokontrolna agensa predvsem proti *D. cotoneastri*, če interakciji damo dovolj časa, da se razvije. Hkrati pa moramo biti previdni, saj lahko isti sev pri drugih patogenih deluje zelo šibko ali celo stimulatивно.

Literatura

1. Bacelar EA, Correia CM, Moutinho-Pereira JM, Gonçalves BC, Lopes JI, Torres-Pereira JM, 2004. Sclerophylly and leaf anatomical traits

of five field-grown olive cultivars growing under drought conditions. *Tree physiology* 24:233-239.

2. Portarena S, Saurer M, Brugnoli E, Farinelli D, Cherubini P, 2025. Drought response strategies of Arbequina, Arbosana and Koroneiki olive cultivars revealed by ring growth, wood anatomy and $\delta^{13}C$ dynamics. *Frontiers in Plant Science* 16:1623127.
3. Hussain K, Fox JP, Rossi L, 2025. Root morphological and anatomical responses of olive tree cultivars 'Oliana' and 'Lecciana' under salinity stress. *Science Direct* 344:114108.
4. Nicoletti R, Di Vaio C, Cirillo C, 2020. Endophytic Fungi of Olive Tree. *Microorganisms* 8(9):1321.
5. Christova PK, Slavov SB, 2021. *Epicoccum nigrum*-isolation, characterization and potential for biological control of Botrytis cinerea. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 27(4):693-698.
6. Ogórek R, Plaskowska E, 2011. *Epicoccum nigrum* for biocontrol agents in vitro of plant fungal pathogens. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 76(4): 691-697.
7. Angilè F, Riolo M, Cacciola SO, Fanizzi FP, Santilli E, 2025. Evaluation of the Effects of *Epicoccum nigrum* on the Olive Fungal Pathogens *Verticillium dahliae* and *Colletotrichum acutatum* by 1H NMR-Based Metabolic Profiling. *Journal of Fungi* 11(2):129.
8. Poveda J, Baptista P, 2021. Filamentous fungi as biocontrol agents in olive (*Olea europaea* L.) diseases: Mycorrhizal and endophytic fungi. *Science Direct* 146:105672.
9. Gharbi Y, Ennouri K, Bouazizi E, Cheffi M, Triki MA, 2020. First report of charcoal disease caused by *Biscogniauxia mediterranea* on *Olea europaea* in Tunisia. *Journal of Plant Pathology* 102:961.
10. Petrović E, Godena S, Čosić J, Vrandečić K, 2024. Identification and Pathogenicity of *Biscogniauxia* and *Sordaria* Species Isolated from Olive Trees. *Horticulturae* 10:243.
11. Lan Y, Duan T, 2022. Characterization of *Boeremia exigua* causing stem necrotic lesions on Luobuma in northwest China. *Scientific Reports* 12:21609.
12. Chen J, Hu X, Bai Y, Liu H, Zhuang X, Guo J, Xiao J, 2023. *Diaporthe cotoneastri* and *Ilyonectria cyclaminicola* endophytes promote the growth, development, and accumulation of active components of *Epimedium koreanum* Nakai host plants in field experiments. *Annals of Microbiology* 73:29.
13. Ivić D, Petrović E, Godena S, 2023. Fungi associated with canker diseases on olive in Istria (Croatia). *Journal of Central European Agriculture* 24(2):470-475.
14. Gomes RR, Glienke C, Videira SIR, Lombard L, Groenewald JZ, Crous PW, 2013. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia* 31:1-41.
15. Li T, Im J, Lee J, 2022. Genetic Diversity of *Epicoccum nigrum* and its Effects on *Fusarium graminearum*. *Microbiology* 50:457-466.
16. Kunova A, Bonaldi M, Saracchi M, Pizzatti C, Chen X, Cortesi P, 2016. Selection of *Streptomyces* against soil borne fungal pathogens by a standardized dual culture assay and evaluation of their effects on seed germination and plant growth. *BMC Microbiology* 16:272.
17. Liu H, Hao D, Li Y, Wang X, Chen J, 2022. Approaches for the establishment of optimized co-culture system of multiple *Trichoderma* strains for culture metabolites highly effective in cucumber growth promotion. *Frontiers in Microbiology* 13:1020077.
18. Maciag T, Kozieł E, Rusin P, Otulak-Kozieł K, Jafra S, Czajkowski R, 2023. Microbial Consortia for Plant Protection against Diseases: More than the Sum of Its Parts. *International Journal of Molecular Sciences* 24(15):12227.

Antagonistični potencial glive *Talaromyces amestolkiae* proti izbranim patogenom oljke

Lana Černigoj, Nika Egger, Špela Matjašec, Matic Zorc

Študij biotehnologije, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

- Namen raziskave je bil ovrednotiti antagonističen potencial glive *Talaromyces amestolkiae* proti šestim glivnim patogenom oljke. Preverjali smo njen vpliv na rast patogenov z neposrednimi ter posrednimi testi preko hlapnih organskih spojin v pogojih in-vitro.
- Antagonistične učinke smo preučevali z metodo dvojnih kultur na gojišču in-vitro ter z t.i. metodo »sendvičev« za testiranje posrednih interakcij. Rast patogenih gliv smo spremljali v obdobju 7 do 14 dni.
- Gliva *T. amestolkiae* je izkazala selektiven antagonistični učinek. Pri testiranju posrednih interakcij je bila rast vseh šestih patogenov zmanjšana, z najbolj izrazitim zaviranjem pri glivi *Boeremia exigua* in vrstah iz rodu *Alternaria*. Pri neposrednih interakcijah je bil najizrazitejši in najbolj dosleden zaviralni učinek opažen pri *B. exigua*. Rezultati potrjujejo, da ima *T. amestolkiae* vrstno specifičen antagonistični potencial.

Ključne besede: inhibicija rasti, kokultivacija, VOC, biološka kontrola

Uvod

Oljka sodi med najpomembnejše oljne rastline v celotnem Sredozemlju. Ima velik prehranski, socialni, gospodarski, fitoterapevtski in ekološki pomen. Vse bolezni oljk povzročijo znaten padec pridelka in predstavljajo grožnjo za gojenje oljk. Glavne glivne bolezni oljk so: verticilijsko venenje, gniloba korenin, sajasta plesen, pavja pegavost, antraknoza, listne pegavosti oljk in dalmatokoza oljke (Kahkahi s sod. 2022). Glivne bolezni povzročajo znatno škodo gospodarsko pomembnih pridelkov po vsem svetu in s tem predstavljajo grožnjo svetovni prehranski varnosti. Te bolezni običajno zatiramo z uporabo kemikalij, ki imajo resne negativne posledice za zdravje ljudi in okoliških ekosistemov, zaradi česar se vedno bolj poslužujemo uporabe drugih načinov zatiranja bolezni, brez uporabe kemično sintetiziranih pesticidov. Iskanje okolju prijaznih alternativ je raziskovalce usmerilo k biološkemu nadzoru glivičnih bolezni z uporabo bioloških sredstev za nadzor (ang. »biological control agents« ali BCA), kot so antagonistične glive in drugi mikroorganizmi. Glivni antagonisti imajo pomembno vlogo pri nadzoru rastlinskih patogenov in bolezni ter se uporabljajo kot BCA po vsem svetu. Antagonistične glive vključujejo različne rodove gliv, ki učinkovito preprečujejo in zatirajo glivične bolezni na rastlinah (Adnan s sod. 2019; Thambugala s sod. 2020).

BCA rastlinskih bolezni so običajno glivični ali bakterijski sevi, izolirani iz filofsfe, endofsfe ali rizofsfe. Antagonisti lahko izražajo več neposrednih ali posrednih mehanizmov delovanja, ki sodelujejo pri biološkem nadzoru bolezni. Ti mehanizmi vključujejo: antibiozo (kjer antagonist proizvaja inhibitorni metabolit ali antibiotik), mikoparazitizem (kjer antagonist črpa nekatera ali vsa svoja hranila iz glivičnega gostitelja), inducirano odpornost (indukcija obrambnega odziva rastline proti rastlinskim patogenom) in pospeševanje rasti (BCA spodbujajo rast rastlin, medtem ko se učinki bolezni zmanjšujejo, tudi prek sinteze mikrobnih hormonov, kot sta indolacetna kislina in giberelinska kislina) (Deketelaere s sod. 2017; Heydari in Pessarakli 2010; Punja 1997; Singh 2014; Zhang s sod. 2014). Uporaba gliv kot BCA ima velik potencial, saj imajo glive sorazmerno visoko stopnjo razmnoževanja (spolno in nespolno), kratek generacijski čas, imajo zanemarljiv vpliv na netarčne organizme in so specifične za tarčo. Poleg tega lahko v odsotnosti gostitelja preživijo v okolju in svoj način življenja (iz npr. parazitizma) spremenijo v saprotrofizem, s čimer ostanejo žive in lahko delujejo skozi daljše časovno obdobje (Thambugala s sod. 2020). Uporaba enega ali več bioloških sredstev v kombinaciji s fizikalnimi in/ali kemičnimi metodami zatiranja se lahko šteje za koristno strategijo za doseganje boljše učinkovitosti proti rastlinskim boleznim. Za zatiranje več patogenov hkrati se lahko poslužujemo uporabe enega BCA s širokim spektrom delovanja ali pa več specifičnih. Navadno mešane kulture specifičnih BCA zagotavljajo boljši nadzor nad rastlinskimi boleznimi kot posamezni sevi (Freeman s sod. 2004; Guetsky s sod. 2001; Xu s sod. 2011).

V našem eksperimentu smo uporabili potencialno antagonistično glivo *Talaromyces amestolkiae*, ki je bila izolirana iz oljke in šest znanih patogenov oljke; *Biscogniauxia mediterranea*, *Boeremia exigua*, *Diaporthe cotoneastri*, *Alternaria alternata*, *Alternaria destruens* in *Alternaria infectoria*. Te glive so rastlinski patogeni in oportunistične glive, ki jih pogosto preučujemo zaradi njihove vloge v kmetijstvu in zdravju ljudi. *Talaromyces amestolkiae* je široko

razširjena plesen, ki jo najdemo v tleh, rastlinah, zraku in hrani, kar kaže na to, da ima saprofitski način življenja. V svojem življenjskem ciklu tvori kolonije, tipične za rod *Talaromyces* in proizvaja veliko število nespolnih spor. Znana je po proizvodnji rdečih pigmentov, ki so sekundarni metaboliti, zanimivi za biotehnologijo in živilsko proizvodnjo (Teng idr., 2022). Z raziskavo smo želeli ugotoviti kako naša potencialna antagonistična gliva *Talaromyces amestolkiae* vpliva na rast izbranih patogenih gliv, če ju gojimo v neposredni bližini in ali morda sprošča kakšne hlapne organske snovi (ang. »volatile organic compounds« ali VOC), ki zavirajo rast patogenih gliv. Predvidevali smo, da bo *Talaromyces amestolkiae* delovala antagonistično na vsaj eno izmed testiranih patogenov ob rasti v neposredni bližini, ter da bo sproščala VOC, ki bodo zavirali rast pri vsaj eni izmed testiranih patogenih gliv.

Materiali in metode

Eksperimentalni del poskusa je trajal štiri tedne. Prvi dan smo pripravili čiste kulture patogenih gliv in potencialnega antagonistnega organizma. Po enem tednu smo te čiste kulture uporabili za nastavitve antagonističnih testov z neposrednimi interakcijami med potencialnim antagonistom in tremi od šestih patogenih gliv. Drugi teden smo enako izvedli še za preostale tri patogene glive. Hkrati smo poslikali rast patogenih gliv, ki smo jih nastavili prvi teden pri testih z neposrednimi interakcijami, po enem tednu rasti. Tretji teden smo pripravili antagonistični test s posrednimi interakcijami med antagonistom in patogeno glivo ter poslikali rast preostalih patogenih gliv, ki smo jih nastavili prvi teden pri testih z neposrednimi interakcijami po enem tednu ter rast patogenih gliv, ki smo jih nastavili drugi teden po dveh tednih. V zadnjem, četrtem tednu, smo zbrali zadnje slike plošč antagonističnih testov z neposrednimi interakcijami po dveh tednih ter plošč testov s posrednimi interakcijami po enem tednu. Te slike smo uporabili za kasnejše vrednotenje rezultatov.

Vzgoja čistih kultur gliv

Za potencialno antagonistično glivo smo si izbrali glivo *Talaromyces amestolkiae* (RM30), patogene glive, ki smo jih uporabili pa so bile *Biscogniauxia mediterranea* (RM57), *Boeremia exigua* (BI64), *Diaporthe cotoneastri* (BI23), *Alternaria alternata* (RM26), *Alternaria destruens* (BI21) in *Alternaria infectoria* (BI46).

Sveže kulture gliv smo nacepili iz starih kultur gliv, ki smo jih dobili iz glivne banke Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete. Glive smo presajali na petrijevke z 2 % gojiščem PDA (krompirjev dekstrozni agar, angl. »potato dextrose agar«) z dodanim antibiotikom kloramfenikol v koncentraciji 50 mg/L, in sicer tako, da smo ob gorilniku s spatulo, ki smo jo predhodno namočili v etanol in prežarili, izrezali kvadratek stare glivne kulture in ga prenesli na sveže gojišče. Kvadratke smo izrezovali iz mejnega predela glivne kulture ob tem pa pazili, da si izrezani kvadrati niso bili preblizu. Kvadratke smo na sveže gojišče polagali tako, da je bila ploskev z micelijem obrnjena navzgor. Nato smo plošče ovili s parafilmom in jih gojili na sobni temperaturi v temi. Tako smo pripravili 8 petrijevk potencialno antagonistične glive RM30, in po 5 petrijevk patogenih gliv RM57, BI64 in BI23, in po 3 petrijevke patogenih gliv RM26, BI21 in BI46.

Antagonistični testi: neposredne interakcije

Na gojišče PDA smo nacepili našo potencialno antagonistično glivo in posamezno patogeno glivo iz predhodno pripravljenih čistih glivnih kultur, delo pa smo izvajali sterilno in ob gorilniku. Uporabljali smo spatule enakih dimenzij, zato da smo zagotovili uniformnost velikosti kosov micelija (5x5 mm). S spatulo smo izrezali kos micelija antagonistične glive in ga namestili tako, da je bil od roba petrijevke oddaljen 2 cm. Na drugo stran, 2 cm stran od roba petrijevke in 5 cm stran od kosa antagonistične glive, pa smo namestili kos posamezne patogene glive. Izrezani kosi z micelijem gliv so bili obrnjeni tako, da je bila ploskev z micelijem na zgornji strani kosa. Za vsako kombinacijo potencialno antagonistične glive s patogeno glivo smo pripravili po 10 plošč, prav tako pa smo za vsako glivo pripravili tudi po 6 plošč za pozitivno kontrolo, kjer smo košček svežega micelija postavili na isto mesto, kot pri eksperimentalnih ploščah, vendar v odsotnosti antagonistične glive. Plošče smo nato oblepili s parafilmom in jih gojili na sobni temperaturi v temi, nato pa smo jih po enem in po dveh tednih poslikali na pod lučjo na temni podlagi.

Antagonistični testi: posredne interakcije/ VOC (t.i. »sendviči«)

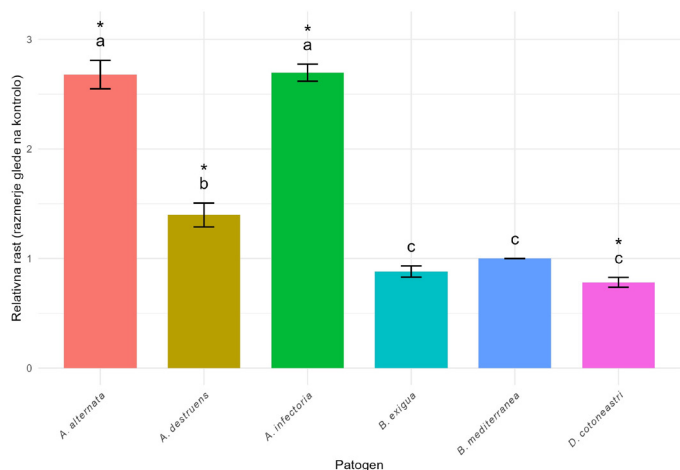
Za nastavljanje testov s t.i. »sendviči« smo pripravili sveže raztopine spor, tako da smo na gojišče s čisto kulturo antagonistično glivo oz. patogena odpipetirali 5 mL avtoklavirane fiziološke raztopine. Nato smo s hokejko razmazovali vodo po miceliju, dokler se ta ni večinsko raztopil, nato pa smo s pipeto cca. 1 mL raztopine prenesli v epico. Nato smo iz raztopin spor pripravili 28 plošč s potencialno antagonistično glivo in po 4 plošče s posamezno patogeno glivo. Pripravili smo tudi po 4 plošče za posamezno glivo za pozitivno kontrolo. Plošče, ki so vsebovale gojišče PDA, smo pripravljali tako, da smo na sredino plošče nanесли 10 μ L raztopine spor ter počakali da se ta posuši, nato pa smo

za vsako kombinacijo antagonista in patogena pripravili po 4 t.i. »sendviče«, in sicer tako da smo vzeli eno ploščo z antagonistično glivo in eno ploščo s patogeno glivo in ju postavili eno na drugo ter oblepili s parafilmom. Spodaj je bila plošča s potencialnim antagonistom, zgoraj pa plošča s patogenom, saj smo testirali, če potencialno antagonistična gliva sprošča kakšne VOC, ki zavirajo rast patogenih gliv. Plošče smo nato inkubirali pri sobni temperaturi v temi do naslednjega tedna, ko smo jih razdrli in poslikali pod lučjo na temni podlagi.

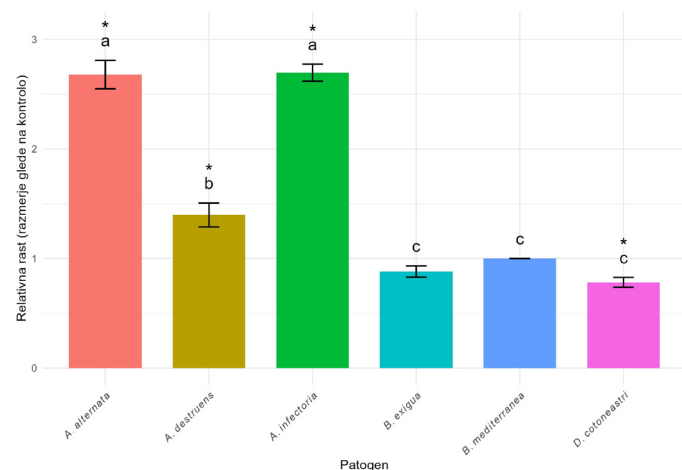
Statistična obdelava podatkov

Pred obdelavo podatkov smo kontaminirane plošče pri eksperimentalnem delu testa interakcij, pri katerih so kontaminacije razvidno vplivale na rast testiranih gliv, izločili iz nabora podatkov in se s tem izognili morebitnim odstopanjem v samih rezultatih.

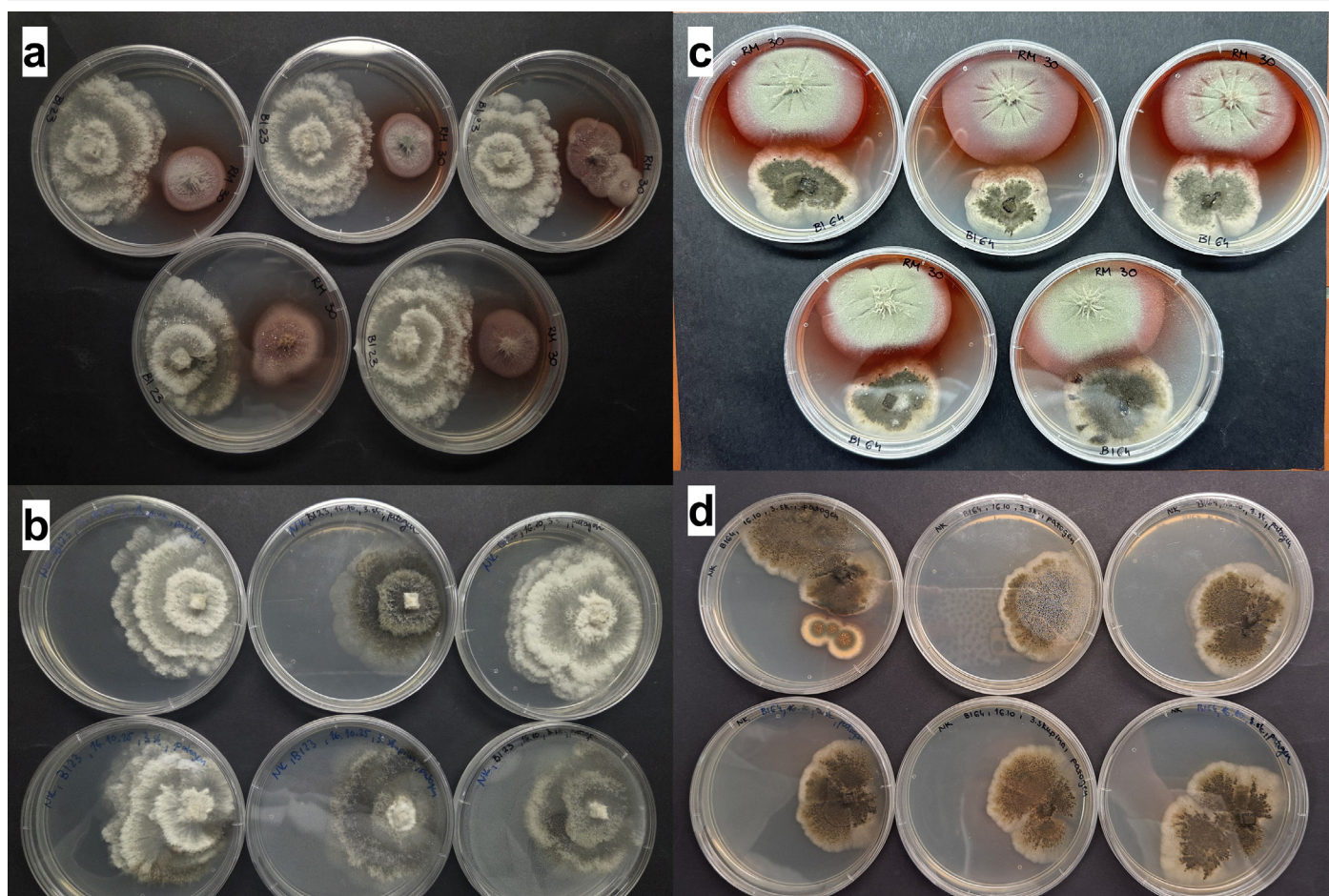
Po opravljenem eksperimentalnem delu smo pridobljene rezultate v obliki slik obdelali s pomočjo programa ImageJ. Program smo rekaliبرirali ter glede na premer petrijevke (90 mm; pixel apart ratio 1.0) merili posamezne kolonije oz. površino gliv. S pomočjo programa smo obkrožili posamezne kolonije ter jih izmerili in si posamezne rezultate zapisali v tabele. Izračunali smo povprečje rasti samega kontrolnega organizma ter v tabeli podali rezultate kot rast gliv po 7. dneh, rast po 14. dneh ter posamezen razrast (površino) izrazili kot odstotek povprečja kontrole. S pomočjo programa R smo statistično obdelali podatke in primerjali odnose patogenih gliv z antagonistično glivo. Izvedli smo t-teste na absolutnih površinah razrasti gliv in test enosmerne analize variance (ANOVA) na deležih rasti med različnimi patogeni (relativna rast glede na kontrolo). Izvedli pa smo tudi Tukeyev HSD post-hoc test, kjer smo parno primerjali možne statistične razlike med posameznimi skupinami. Kot statistično značilne smo smatrali rezultate pri vrednosti $p < 0,05$.



Slika 1. Relativna rast različnih patogenov v prisotnosti antagonista po 7. dneh glede na kontrole posameznega patogena. Stolpci predstavljajo relativno rast posamezne patogene glive s pripadajočimi standardnimi napakami ($n = 10$). Zvezdice (*) pomenijo statistično značilno različno rast glede na kontrolo posameznega patogena (t-test, $p < 0,05$), medtem ko različne črke pomenijo statistično značilne razlike v relativni rasti med posameznimi vrstami patogenov (enosmerna ANOVA, Tukeyev HSD post-hoc test, $p < 0,05$).



Slika 2. Relativna rast patogenov v prisotnosti antagonista po 14. dneh glede na kontrole posameznega patogena. Stolpci predstavljajo relativno rast posamezne patogene s pripadajočimi standardnimi napakami ($n = 10$). Zvezdice (*) pomenijo statistično značilno različno rast glede na kontrolo posameznega patogena (t-test, $p < 0,05$), medtem ko različne črke pomenijo statistično značilne razlike v relativni rasti med posameznimi vrstami patogenov (enosmerna ANOVA, Tukeyev HSD post-hoc test, $p < 0,05$).



Slika 3. Gliva *D. cotoneastri* po 7. dneh rasti v neposrednem stiku z *T. amestolkiae* (a) in njena kontrola (b); *B. exigua* po 14. dneh rasti v neposrednem stiku z *T. amestolkiae* (c) in njena kontrola (d).

Rezultati

Neposredne interakcije – dvojne kulture

Relativna rast patogenov v neposredni prisotnosti antagonistista je bila analizirana po 7. (Slika 1) in 14. dneh (Slika 2) in predstavlja razmerje med rastjo patogena v antagonističnem testu in ustrezno kontrolo.

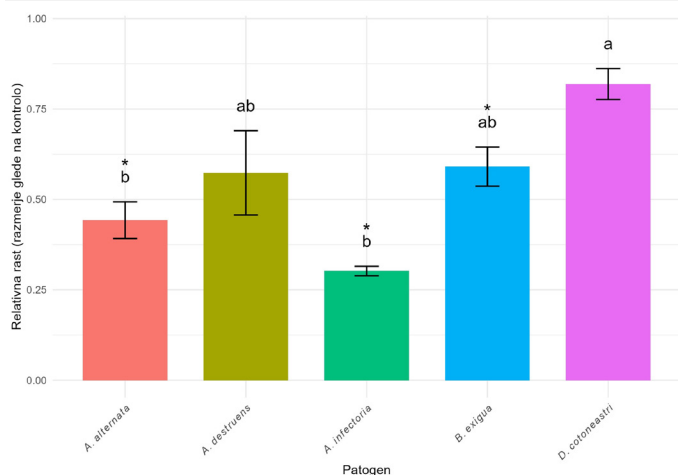
Po sedmih dneh so se patogene vrste statistično značilno razlikovale v relativni rasti kar kaže, da antagonist ne vpliva enako na rast vseh patogenov. Značilno zavrta je bila le rast glive *D. cotoneastri* (za približno 25 % glede na kontrolo). Glivi *B. mediterranea* in *B. exigua* sta rastli primerljivo kot v kontroli, medtem ko je bila rast vseh gliv iz rodu *Alternaria* celo pospešena glede na kontrole. Najbolj je bila spodbujena rast gliv *A. alternata* in *A. infectoria* (več kot 2,5x glede na posamezni kontroli), nekoliko manj (približno 1,5x glede na kontrolo) pa vrste *A. destruens*. Na Sliki 3 je možno opaziti antagonistični učinek neposredne prisotnosti glive *T. amestolkiae* na rast glive *D. cotoneastri* po 7. dneh rasti. Po 14. dneh inkubacije so razlike v relativni rasti patogenov ostale statistično značilne, vendar se je njihov odziv na antagonistista v primerjavi s 7. dnem spremenil, kar kaže na časovno spremenljiv zaviralni učinek. Najbolj občutljive na antagonistista so bile vrste *D. cotoneastri*, *A. destruens* in zlasti *B. exigua*, pri kateri je bila relativna rast najnižja (za približno 40 % nižja glede na kontrolo). Tudi po 14. dneh sta *A. alternata*

in *A. infectoria* izkazovali na spodbujeno rast, vendar v veliko manjši meri kot po 7. dneh rasti. Med njima je bila najbolj spodbujena in s tem najmanj zavrta rast vrste *A. alternata*, ki je izkazovala najvišjo relativno rast in s tem večjo toleranco oziroma prilagoditev na antagonistista. *B. mediterranea* ni bila zavrta, saj je bila rast primerljiva kontroli. Na Sliki 3 je možno opaziti antagonistični učinek neposredne prisotnosti glive *T. amestolkiae* na rast glive *B. exigua* po 14. dneh rasti. Ti rezultati potrjujejo, da je zaviralni učinek antagonistista ne le izrazito vrstno specifičen, temveč tudi časovno odvisen, kar ima pomembne implikacije za razumevanje dinamike interakcij med posameznimi glivami.

Posredne interakcije – t.i. metoda »sendvičev« (test VOC)

Analiza relativne rasti patogenov v posredni prisotnosti antagonistista je bila izvedena po 7. dneh inkubacije, rezultati pa so prikazani na Sliki 4.

Po sedmih dneh inkubacije so se patogeni statistično značilno razlikovali v relativni rasti, kar kaže na različno stopnjo občutljivosti posameznih vrst na posredno delovanje antagonistista. Najvišjo relativno rast je imela *D. cotoneastri*, kar nakazuje, da je bila na posredni zaviralni učinek antagonistista najmanj občutljiva. *A. destruens* in *B. exigua* sta izkazovali zmeren odziv, saj njuna rast ni bistveno odstopala niti od bolj odpornih niti od bolj občutljivih vrst. Najizrazitejše zaviranje rasti je bilo opaženo pri *A. infectoria* in *A. alternata*, kar kaže na večjo občutljivost teh vrst na posredni antagonistični



Slika 4. Relativna rast patogenov ob posrednem delovanju antagonista po 7 dneh (»sendvič test«). Stolpci predstavljajo relativno rast posamezne patogene glive s pripadajočimi standardnimi napakami ($n = 4$). Zvezdice (*) pomenijo statistično značilno različno rast glede na kontrolo posameznega patogena (t-test, $p < 0,05$), medtem ko različne črke pomenijo statistično značilne razlike v relativni rasti med posameznimi vrstami patogenov (enosmerna ANOVA, Tukeyev HSD post-hoc test, $p < 0,05$).

učinek, pri čemer je bila najbolj zavrta *A. infectoria* (približno 70 % glede na kontrolo).

Diskusija

Ob pregledu literature nismo zasledili nobene študije o vplivu *T. amestolkiae* na druge vrste gliv. Naša raziskava je torej prva o morebitnem antagonističnem delovanju *T. amestolkiae*. Naši podatki so pokazali različen obseg vplivov *T. amestolkiae* na patogene glive oljke.

Pri metodi »sendvičev« je bila pri vseh testiranih patogenih glivah opažena zmanjšana rast v primerjavi s kontrolami, razen pri *A. destruens* in *D. cotoneastri* (pri teh rezultati niso bili statistično značilni), kar kaže na občutljivost patogenov na hlapne organske spojine (VOC), ki jih proizvaja *T. amestolkiae*. Ker med organizmi ni bilo neposrednega fizičnega stika, je mogoče opažene zaviralne učinke pripisati izključno delovanju hlapnih metabolitov. Stopnja inhibicije se je razlikovala med vrstami: največji učinek je bil opažen pri *A. alternata* in *A. infectoria* (zavrti od 60 do skoraj 70 % glede na kontrolo), medtem vpliva na vrsti *D. cotoneastri* in *A. destruens* ni bilo, kljub trendu nekoliko slabše rasti glede na kontrolo. Znano je, da glive iz rodu *Talaromyces* lahko proizvajajo VOC, ki vplivajo na patogene glive. Te spojine, kot so na primer 3-oktanol in (E)-2-oktenal, kažejo močno protiglivično aktivnost, saj zavirajo rast micelija in kalitev spor patogenov (Li s sod. 2025). Rezultati testa kokultivacije na istem gojišču pa so bili bolj kompleksni za interpretacijo. Pri glivah *B. exigua* in *D. cotoneastri* se je rast v primerjavi s kontrolo po 14. dneh znižala, kar pomeni, da *Talaromyces* zaviralno vpliva na njihovo rast. Za to je možnih več razlogov, kot so na primer izločanje sekundarnih metabolitov, kot so antibiotiki ali encimi, ki omejujejo razvoj drugih patogenih gliv, kot tudi izločanje VOC (Manoch in Dethoup 2011).

Gliva *A. destruens* je po 7. dneh zrasla več kot v kontroli, po 14. dneh pa se je njena rast relativno zmanjšala, vendar se velikost

kolonij ni statistično razlikovala od kontrolnih, kar pomeni, da ob koncu poskusa ni bilo mogoče potrditi zaviralnega učinka antagonista. Začasna spodbuda rasti te vrste v prvih 7. dneh antagonističnega testa je pojav, ki je običajen pri glivnih interakcijah, kjer antagonisti počasi inducirajo sekundarne metabolite in njihovi učinki v zgodnjih fazah še niso znani. V študiji, kjer so raziskovali odziv patogene glive *Verticillium dahliae*, so ugotovili, da v zgodnji fazi (do 7. dneh) *Talaromyces purpureogenus* raste počasi in še ne proizvaja dovolj VOC (Li s sod. 2025). To lahko omogoči, da v našem primeru *A. destruens* hitreje kolonizira medij. V zgoraj omenjeni študiji so tudi pokazali, da VOC dosežejo antimikrobno raven šele po 10–14 dneh, kar se ujema z našimi rezultati (Li s sod. 2025). Zanimiv rezultat pa je bil tudi pri glivah *A. infectoria* in *A. alternata*. Pri teh dveh glivah se je rast v začetni fazi (po 7. dneh) znatno povečala. To kaže na to, da je kokultivacija s *Talaromyces* izboljšala njihovo rast. Vendar so bile tudi pri teh dveh glivah po 14. dneh inkubacije pogosto zaznane kontaminacije, kar zmanjšuje zanesljivost primerjave med testnimi in kontrolnimi gojišči v tej časovni točki, saj je bilo za statistične analize ustreznih manj gojišč, kar je rezultate naredilo manj reprezentativne.

Gliva *B. mediterranea* je hitro prerasla celotno gojišče tako pri testu kokultivacije kot pri kontroli. V tem primeru antagonist ni pokazal uporabnega zaviralnega učinka, kar nakazuje, da hitra rast, učinkovita raba hranil ali produkcija inhibitornih snovi patogenu omogočajo prevlado. Drugi raziskovalci so opazili podobne rezultate pri iskanju antagonista proti *B. mediterranea*. Ta je prehitro prerasla gojišče, kar je preprečilo možnost, da antagonist zraste in začne producirati zaviralne snovi. V tej študiji so kot enega od antagonistov uporabili glivo *A. alternaria*, katero smo mi obravnavali kot patogena in so odkrili, da ima antagonistični potencial in so tudi predlagali izvedbo nadaljnjih študij (Costa s sod. 2020).

Najizrazitejši in najbolj dosleden antagonistični učinek je bil opažen pri kombinaciji *T. amestolkiae* in *B. exigua*. Rast patogena je bila močno zmanjšana, medtem ko rast antagonista ni bila prizadeta, kar kaže na učinkovit zaviralni mehanizem. Takšen vzorec najverjetneje vključuje antibiozo, torej izločanje zaviralnih sekundarnih metabolitov, ter hkrati uspešno kompeticijo za prostor in hranila v korist antagonista. Ti rezultati potrjujejo velik potencial *T. amestolkiae* kot biokontrolnega agensa proti *B. exigua*. Pri *D. cotoneastri* je bilo zaznano obojestransko zaviranje rasti, kar kaže na medsebojno kompeticijo. Kljub temu rezultati kažejo na delni antagonistični potencial, ki bi bil v določenih pogojih lahko relevanten. Skupno rezultati potrjujejo, da je antagonistični potencial *T. amestolkiae* selektiven, izrazito odvisen od vrste patogena. Pri interpretaciji dobljenih rezultatov je treba upoštevati določene metodološke omejitve, ki lahko vplivajo na zanesljivost podatkov, kot so bile okužbe kontrolnih gliv sevov rodu *Alternaria*, kar je zmanjšalo število podatkov, ki smo jih upoštevali pri statistični analizi. Poleg tega vse kontrole niso bile vzpostavljene istočasno kot antagonistični testi, kar bi lahko povzročilo razlike v rasti zaradi časovnih in okoljskih variacij, ne pa izključno kot posledico medglivnih interakcij. Posledično je treba opažena odstopanja v rasti interpretirati previdno, saj jih ni mogoče v celoti pripisati vplivu druge glive v testu.

Zaključki

Biološki nadzor z antagonističnimi glivami predstavlja obetavno alternativo, saj temelji na različnih mehanizmih, kot so fizično omejevanje rasti, izločanje zaviralnih metabolitov ter delovanju hlapnih organskih spojin. V tej raziskavi smo ovrednotili antagonistični potencial glive *T. amestolkiae* proti več gospodarsko pomembnim patogenom oljke v pogojih neposrednih in posrednih interakcij.

Naši rezultati potrjujejo hipotezo, da ima *T. amestolkiae* merljiv antagonistični potencial proti izbranim glivnim patogenom oljk, pri čemer so učinki vrstno in interakcijsko odvisni od patogena. Pri posrednih interakcijah brez fizičnih stikov je bila pri večini patogenov zaznana zmanjšana rast, kar potrjuje našo hipotezo ter vlogo rastno zaviralnih hlapnih organskih spojin, kjer so največjo občutljivost izkazale *B. exigua* ter *A. alternata* in *A. infectoria*.

Pri neposrednih interakcijah se je pokazalo, da antagonistični potencial ni enoten, temveč temelji na različnih oblikah medsebojnih odnosov med glivami. Razlike v odzivih posameznih patogenov kažejo na vlogo specifičnih zaviralnih mehanizmov in kompetitivnih procesov, kar potrjuje, da je učinkovitost antagonista pogojena z biološkimi značilnostmi tarčne vrste. Pri teh testih sta bili po 14. dneh uspešno zavrti le glivi *B. exigua* in *D. cotonaestri*.

Rezultati potrjujejo hipotezo obstoja selektivnega antagonističnega učinka *T. amestolkiae*, ki je močno odvisen od vrste tarčne patogene glive. Za potrditev opaženih učinkov bi bilo smiselno izvesti dodatne študije, ki bi vključevale večje število sevov, standardizirane kontrole in različne pogoje inkubacije, kar bi nam pomagalo natančneje ovrednotiti selektivni antagonistični potencial *T. amestolkiae*.

Literatura

- Adnan M, Islam W, Shabbir A, Khan KA, Ghramh HA, Huang Z, Chen HYH, Lu G, 2019. Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus. *Microbial Pathogenesis* 129:7-18.
- Costa D, Tavares R M, Baptista P, Lino-Neto T, 2020. Cork Oak Endophytic Fungi as Potential Biocontrol Agents against *Biscogniauxia mediterranea* and *Diplodia corticola*. *Journal of Fungi*, 6(4): 287.
- Deketelaere S, Tyvaert L, França SC, Höfte M, 2017. Desirable traits of a good biocontrol agent against *Verticillium* wilt. *Frontiers in Microbiology* 8:1186.
- Freeman S, Minz D, Kolesnik I, Barbul O, Zveibil A, Maymon M, Nitzani Y, Kirshner B, Rav-David D, Bilu A, Dag A, Shafir S, Elad Y, 2004. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. *European Journal of Plant Pathology* 110:361-370.
- Guetsky R, Shtienberg D, Elad Y, Dinoor A, 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology* 91(7):621-627.
- Heydari A, Pessarakli M, 2010. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences* 10(4):273-290.
- Kahkahi RE, Moustaine M, Zouhair R, 2022. Symptomology of major fungal diseases on olive and its management. *Austin Journal of Environmental Toxicology* 8(1):1043.
- Li P, Zhang Y, Feng H, Zhou J, Zhao L, Zhu H, Wei F, Feng Z, 2025. Antifungal volatile organic compounds from *Talaromyces purpureogenus* CEF642N: insights from one strain many compounds (OSMAC) strategy for controlling *Verticillium dahliae* in cotton. *Journal of Fungi* 11(5):332.
- Manoch L, Dethoup T, 2011. A potential use of *Talaromyces* species as biological agents against plant pathogenic fungi. *Thai Journal of Agricultural Science* 44(2):81-91.
- Punja ZK, 1997. Comparative efficacy of bacteria, fungi, and yeasts as biological control agents for diseases of vegetable crops. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19(3):315-323.
- Singh HB, 2014. Management of plant pathogens with microorganisms. *Proceedings of the 80(2):443-454*.
- Teng L, Chen S, Hu Z, Chen J, Liu H, Zhang T, 2022. Molecular characterization and transcriptomic analysis of a novel polymycovirus in the fungus *Talaromyces amestolkiae*. *Frontiers in Microbiology* 13:1008409.
- Thambugala KM, Daranagama DA, Phillips AJL, Kannangara SD, Promputtha I, 2020. Fungi vs. fungi in biocontrol: an overview of fungal antagonists applied against fungal plant pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10:604923.
- Xu XM, Jeffries P, Pautasso M, Jeger MJ, 2011. Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathology* 101(9):1024-1031.
- Zhang Q, Zhang J, Yang L, Zhang L, Jiang D, Chen W, Li G, 2014. Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. *Biological Control* 72:98-108.

Uporaba potencialno antagonistične glive *Trichoderma* sp. proti izbranim patogenom oljke

Rok Berglez, Ana Kveder, Ivana Mušič Lap, Ana Ostrouška, Jerca Polak

Študij biotehnologije, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

- Oljka (*Olea europaea*) je sredozemska rastlina, ki se v naravi srečuje s številnimi škodljivci. Zaradi izjemnega gospodarskega, kulturnega in okoljskega pomena je bil namen naše raziskave ugotoviti antagonistični vpliv glive *Trichoderma* sp. proti šestim patogenim glivam (*Biscogniauxia mediterranea*, *Boeremia exigua*, *Diaporthe cotoneastri*, *Alternaria alternata*, *Alternaria destruens*, *Alternaria infectoria*), izoliranim iz oljk v Poreču.
- V prvem delu raziskave smo s testi sogojenja antagonista in patogenov na istih ploščah ugotavljali potencialni zaviralni učinek. Drugi del raziskave je obsegal ugotavljanje vpliva hlapnih komponent glive *Trichoderma* sp. na rast patogenih gliv z metodo t.i. »sendvič testov«.
- Rezultati so pokazali, da je imela gliva *Trichoderma* sp. izrazit antagonistični učinek predvsem pri testih neposrednih interakcij, kjer je bila najmočnejše zavrtja rast *Biscogniauxia mediterranea* (do 74 %), sledile so *Alternaria infectoria*, *Diaporthe cotoneastri* in *Alternaria alternata*, medtem ko sta bili *Boeremia exigua* in *Alternaria destruens* zavrti le šibko ali pa učinka ni bilo. Pri testih posrednih interakcij s hlapnimi komponentami je bila statistično značilna inhibicija zaznana le pri vrsti *Alternaria alternata*.
- Zaključimo lahko, da ima izolat *Trichoderma* sp. potencial za biološko varstvo oljk predvsem preko neposrednih antagonističnih interakcij, saj so hlapne organske spojine pokazale slabšo sposobnost zaviranja rasti patogenih gliv.

Ključne besede: patogene glive, protiglivo učinkovanje, antagonistični test, test neposrednih interakcij, test posrednih interakcij

Uvod

Skozi zgodovino so ljudje vzpostavili tesen odnos s številnimi rastlinskimi vrstami, med katerimi izstopa oljka (*Olea europaea*) zaradi svojih prehranskih in zdravilnih lastnosti (Elhrech s sod. 2024). Danes ima oljka za človeka tudi velik kulturni, gospodarski, verski in simbolni pomen, kar dodatno spodbuja prizadevanja za njeno ohranjanje in zaščito. Raziskave so pokazale, da imajo izvlečki oljke sposobnost zaviranja mikrobne rasti, vnetnih in rakavih obolenj, kar oljki daje dodatno vrednost ne le v živilstvu, temveč tudi v zdravstvu (Elhrech s sod. 2024).

Oljka v naravi uspeva predvsem v Sredozemlju, na Bližnjem vzhodu in v delih severne Afrike (Elhrech s sod. 2024). V Sloveniji je oljkarstvo osredotočeno predvsem na obalnem območju, kjer prevladuje sredozemsko podnebje, primerno za njeno rast in razvoj. Med mikroorganizmi, ki napadajo oljko, so bakterije, kamor spadata predvsem *Pseudomonas savastanoi* (Montes-Osuna in Mercado-Blanco 2020) in *Xylella fastidiosa* (Sicard s sod. 2018), in glive kot so *Spilocaea oleagina*, *Colletotrichum* spp. (Web Garden Centre, 2024) in *Verticillium dahliae* (van Dyk s sod. 2021). Ti patogeni povzročajo nabor različnih simptomov, ki obsegajo gnitje plodov, sušenje in odpadanje listov, tumorske odebelitve vej ali celo propadanje celotne rastline (Web Garden Centre, 2024). Danes oljke proti omenjenim patogenom zaščitimo z uporabo dezinficiranega sadilnega materiala, fungicidov, baktericidov, pravočasnim obrezovanjem okuženih predelov oljke, uporabo bolj tolerantnih vrst oljk (Web Garden Centre, 2024), zatiranjem prenašalcev (Morelli s sod. 2021) in z uporabo biokontrolnih organizmov (Montes-Osuna in Mercado-Blanco 2020). Glive rodu *Trichoderma* sp. veljajo za mikrobne biokontrolne agense, ki rastlinam omogočajo odpornost na bolezni, zaščito pred patogeni in izboljšano rast, kar se kaže tudi v boljšem razraščanju korenin in listov ter povečanju pridelka (Marra s sod. 2020). Glavno vlogo pri zaščiti rastlin pred patogenimi mikroorganizmi imajo sekundarni metaboliti, ki jih pri glivah rodu *Trichoderma* sp. delimo v tri skupine: 1) hlapni antibiotiki, 2) vodotopne komponente in 3) linearni oligopeptidi. Poleg tega lahko sokultivacija gliv rodu *Trichoderma* sp. skupaj z rastlinami spodbudi izražanje rastlinskih genov, ki služijo obrambi pred patogeni, kar tej glivi daje še dodaten pomen v biokontroli (Vinale s sod. 2012).

Ker okužbe s patogenimi mikroorganizmi prizadenejo oljke in njihov pridelek, je iskanje antagonističnih mikroorganizmov ključnega pomena za zaščito oljk (Poveda in Baptista 2021). Zaradi obrambnih mehanizmov gliv iz rodu *Trichoderma* sp. in koristi, ki jih zagotavlja sokultivacija z oljkami, nam prihodnost obeta množično in cenovno ugodno proizvodnjo njihovih sekundarnih metabolitov, zaradi hitrega in enostavnega gojenja te glive. Z oblikovanjem različnih fitofarmaceutskih sredstev na podlagi teh učinkovin lahko potencialno znatno zmanjšamo problem zatiranja oljk s strani patogenih mikroorganizmov (Vinale s sod. 2012).

V raziskavi smo preučevali potencialni antagonistični vpliv izolata glive *Trichoderma* sp. iz oljke proti šestim različnim patogenim glivam (*Biscogniauxia mediterranea*, *Boeremia exigua*, *Diaporthe cotoneastri*, *Alternaria alternata*, *Alternaria destruens*, *Alternaria infectoria*) izoliranim iz oljk v Poreču. Predpostavili smo, da bo *Trichoderma* sp. zavirala rast vseh patogenih gliv preko neposrednih interakcij dvojnih kultur in preko posrednih interakcij s hlapnimi komponentami.

Predvidevali smo tudi, da bo antagonistični test neposrednih interakcij bolj zaviral rast patogena kot preko hlapnih komponent.

Material in metode

Celoten eksperiment je trajal 5 tednov. V tem času smo izvedli antagonistične teste neposrednih interakcij z uporabo dvojne kulture ter antagonistične teste posrednih interakcij preko sinteze hlapnih organskih snovi oziroma teste VOC (»volatile organic compounds«).

Glive

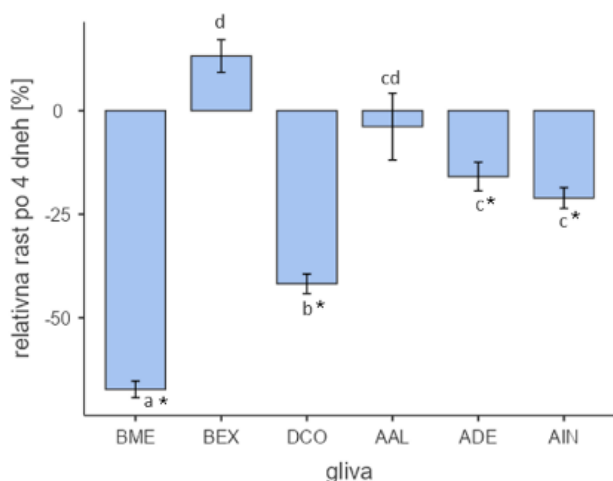
V poskusih smo uporabili potencialno antagonistično glivo *Trichoderma* sp. (izolat RM45) - TRI in patogene glive *Biscogniauxia mediterranea* (izolat RM57; -BME), *Boeremia exigua* (izolat BI64; -BEX), *Diaporthe cotoneastri* (izolat BI23; -DCO), *Alternaria alternata* (izolat RM26; -AAL), *Alternaria destruens* (izolat BI21; -ADE) ter *Alternaria infectoria* (izolat BI46; -AIN). Vse uporabljene glive so bile izolirane iz različnih sort oljke (*Olea europaea*) v kolekcijskih nasadih v Poreču na Hrvaškem leta 2024. Pred uporabo v antagonističnih testih so bile vzgojene v enotedenskih čistih kulturah na 2 % gojiščih PDA (krompirjev dekstrozni agar) z antibiotikom, ki smo jih inkubirali v temi pri sobni temperaturi in zračni vlagi. Plošče PDA so bile pripravljene iz že pripravljene mešanice za tekoče hranilno gojišče PDB, agarja in destilirane vode.

Antagonistični testi neposrednih interakcij

V drugem tednu smo izvedli prvi del testa med glivo TRI ter patogeni BME, BEX in DCO. Za vsak antagonistični test smo izrezali košček obeh gliv velikosti 6 × 6 mm iz čiste kulture in ga postavili na sveže gojišče PDA (pripravljeno v petrijevkah premera 9 cm), tako da je bilo med izsečkoma 5 cm prostora, oba izsečka pa sta bila od roba petrijevke oddaljena 2 cm. Pri kontrolnih ploščah smo na gojišče PDA inokulirali posamezne izsečke uporabljenih gliv. Inkubacija je potekala v temi pri sobni temperaturi in zračni vlagi. Za vsako patogeno glivo smo izvedli 10 ponovitev testa in 6 negativnih kontrol. Po enakem postopku smo v tretjem tednu izvedli še drugi del testa med glivo TRI ter patogeni AAL, ADE in AIN. Rezultate neposrednih testov smo ovrednotili (fotografirali) po 4 in 7 dneh.

Antagonistični testi posrednih interakcij – test VOC

V četrtem tednu poskusa smo izvedli t.i. »sendvič teste« med glivo TRI in vsemi šestimi patogeni (BME, BEX, DCO, AAL, ADE, AIN). Iz patogenih gliv smo pripravili suspenzijo spor tako, da smo na gojišče z enotedensko kulturo glive dodali 5 mL sterilne fiziološke raztopine (0,9 % NaCl) in s stekleno spatulo Drigalski razbili micelij z drgnjenjem po površini micelija približno 1 minuto. Suspenzijo spor smo odpipetirali v mikrocentrifugirko, stresli na mešalniku in na sredino sveže plošče PDA s pipeto nakapljali 10 µL suspenzije. Pokrito petrijevko smo pustili na pultu 15-20 minut, da se je kapljica posušila. Na sredino druge sveže plošče PDA smo postavili iz čiste kulture izrezan košček micelija glive TRI velikosti 6 × 6 mm, zavrgli pokrov petrijevke in nanjo položili petrijevko z naneseo suspenzijo spor patogena brez pokrova, tako da sta bili gojišči obrnjeni eno proti drugemu, ter »sendvič petrijevk« zatesnili s parafilmom. Inkubacija je potekala en teden v temi pri sobni temperaturi in zračni vlagi. Za vsako patogeno glivo smo izvedli 4 ponovitve



Slika 1. Relativna rast, merjena preko površin kultur gliv *Biscogniauxia mediterranea* (BME), *Boeremia exigua* (BEX), *Diaporthe cotoneastri* (DCO), *Alternaria alternata* (AAL), *Alternaria destruens* (ADE) in *Alternaria infectoria* (AIN), s pripadajočimi standardnimi odkloni ($n = 10$) v odstotkih glede na kontrole posamezne glive po 4. dnevu inkubacije z glivo *Trichoderma* sp. za antagonistični test neposrednih interakcij. Statistične razlike med glivami so označene s črkami (enosmerna ANOVA, Games-Howell post-hoc test, $p \leq 0,05$), statistično značilne razlike v rasti med kontrolno skupino in glivo v antagonističnem testu pa so označene z zvezdico (*) (Welchov t-test, $p \leq 0,05$).

testa in 5 kontrol.

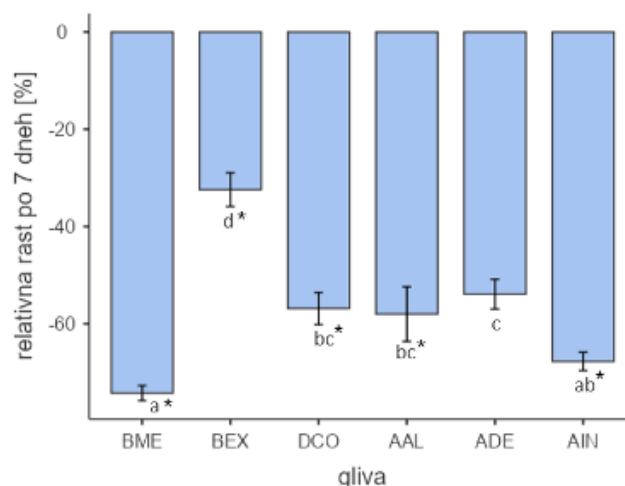
Obdelava podatkov in statistična analiza

Glivno rast smo pri antagonističnih testih neposrednih interakcij in posrednih interakcij ovrednotili z merjenjem površine glivne kolonije v programu ImageJ (Schneider s sod. 2012), pri čemer smo upoštevali, da je bil premer petrijevke 9 cm. Površino smo izmerili tako, da smo glivno kolonijo na sliki čim natančneje obkrožili s kurzorjem. Odstotek rasti smo izražali glede na povprečno glivno rast kontrol posamezne glive. Če je bila katera od plošč kontaminirana, je pri obdelavi podatkov nismo upoštevali. Za statistično analizo pridobljenih podatkov in prikaz rezultatov na grafih smo uporabili program Jamovi verzije 2.6 (The jamovi Project 2024). Z njim smo izračunali povprečja, standardne odklone in izvedli enosmerno ANOVA test ter Games-Howell post-hoc test v primeru nehomogenih varianc ali pa Tukey post-hoc test, ki predvideva homogene variance za preverjanje izrazitosti učinka antagonističnega delovanja *Trichoderma* sp. med patogeni. Učinek zaviranja rasti posameznega patogena glede na njegovo kontrolo smo preverili z Welchovim t-testom.

Rezultati

Antagonistični testi neposrednih interakcij

Trichoderma sp. je v antagonističnem testu neposrednih interakcij po 4. dnevu inkubacije zavirala rast patogenih gliv *B. mediterranea*, *D. cotoneastri*, *A. destruens* in *A. infectoria*. Najbolj je bila zavirana rast *B. mediterranea*, pri kateri je bila



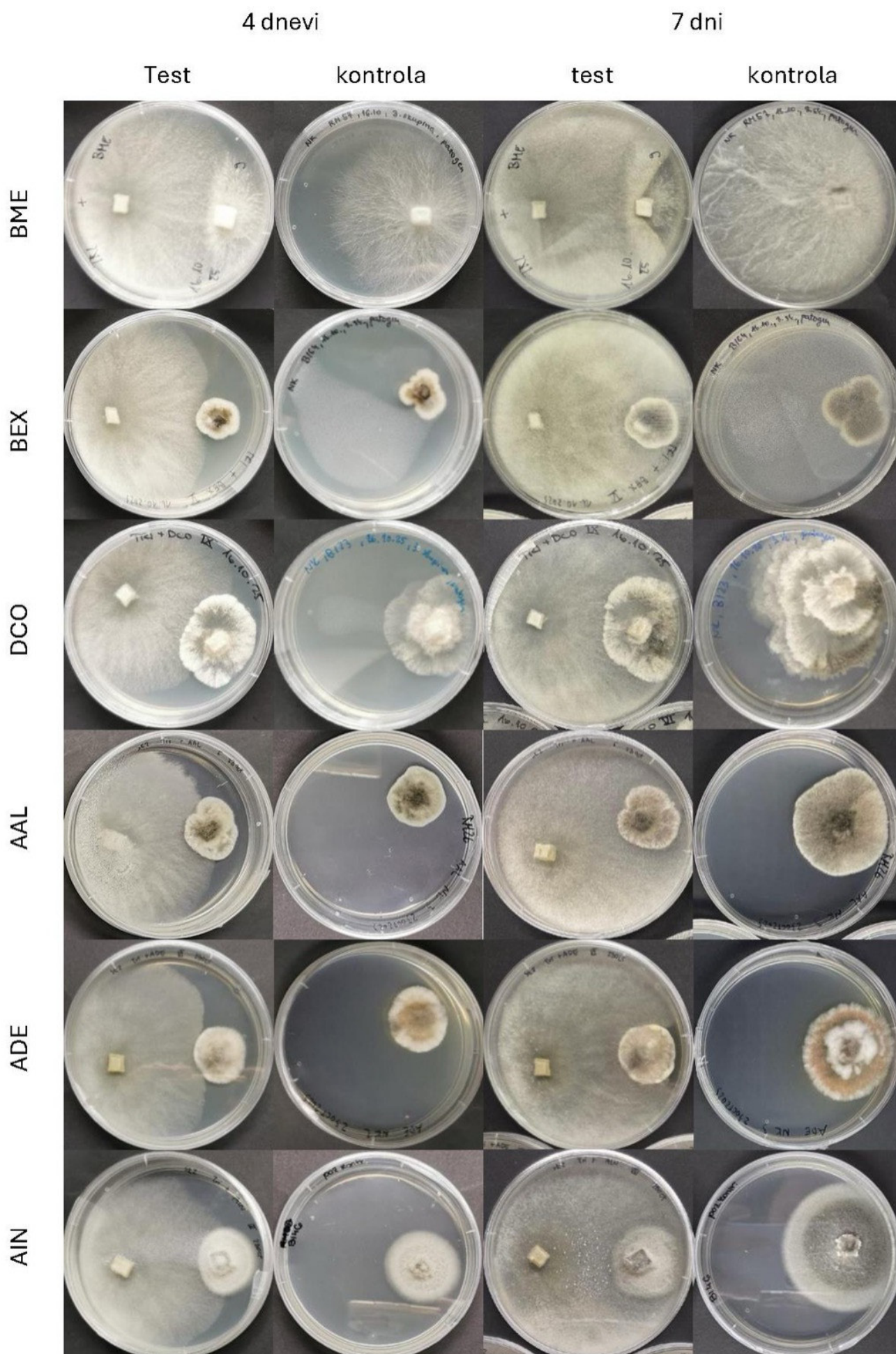
Slika 2. Relativna rast, merjena kot površina kultur gliv *Biscogniauxia mediterranea* (BME), *Boeremia exigua* (BEX), *Diaporthe cotoneastri* (DCO), *Alternaria alternata* (AAL), *Alternaria destruens* (ADE) in *Alternaria infectoria* (AIN) s pripadajočimi standardnimi odkloni ($n = 10$), izražena v odstotkih glede na kontrole posamezne glive po 7 dneh inkubacije z glivo *Trichoderma* sp. Statistične razlike med posameznimi glivami so označene s črkami (enosmerna ANOVA, Games-Howell post-hoc test, $p \leq 0,05$), statistično značilne razlike v rasti med kontrolno skupino in glivo v antagonističnem testu pa so označene z zvezdico (*) (Welchov t-test, $p \leq 0,05$).

rast patogena v primerjavi s kontrolo nižja za 67 % (Slika 1). Nekoliko manj je bila zavirana rast *D. cotoneastri*, ki je bila v primerjavi s kontrolo znižana za 42 %. Najmanj pa je bila zavirana rast gliv *A. destruens* (16 %) in *A. infectoria* (21 %). Rast gliv *A. alternata* in *B. exigua* po 4. dnevu inkubacije ni bila statistično različna od pripadajočih kontrol.

Po 7. dnevu inkubacije je bila v primerjavi s kontrolami statistično značilno zavirana rast vseh patogenih gliv, razen glive *A. destruens* (Slika 2). *Trichoderma* sp. je imela najmanjši vpliv na rast *B. exigua*, ki je bila v primerjavi s kontrolo zavirana za 32 %. Najbolj sta bili zavrti glivi *B. mediterranea* (za 74 %) in *A. infectoria* (za 68 %), medtem ko je bila relativna rast gliv *D. cotoneastri* in *A. alternata* manjša za slabih 60 %. Na Sliki 3 so razvidni rezultati antagonističnih testov neposrednih interakcij. Rast gliv *B. mediterranea*, *B. exigua*, *D. cotoneastri*, *A. alternata* in *A. infectoria* je zavirana. Po 7. dnevu lahko opazimo zmanjšanje polmera patogenih gliv na strani, obrnjeni proti *Trichoderma* sp.

Antagonistični testi posrednih interakcij – test VOC

Rezultati antagonističnih testov posrednih interakcij so prikazani na Sliki 4. Gliva *B. mediterranea* je bila iz analize rezultatov izključena, ker rast ni bila vidna niti na kontroli, kar pomeni, da smo imeli težavo z inokulacijo glive na ploščo. Med patogenimi glivami so bile prisotne statistično značilne razlike v relativni rasti, vendar sta se od svojih pripadajočih kontrol razlikovali le *A. alternata* in *D. cotoneastri*. Relativna rast glive *A. alternata* je bila glede na kontrolo zmanjšana za 26 %, relativna rast glive *D. cotoneastri* pa se je glede na kontrolo povečala za 24 %.



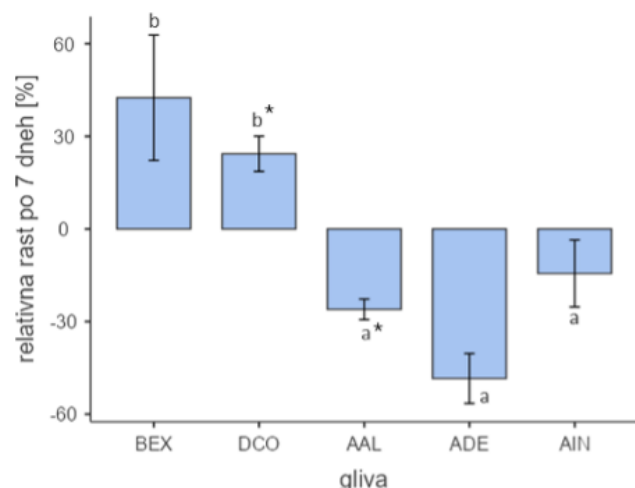
Slika 3. Glive *Biscogniauxia mediterranea* (BME), *Boeremia exigua* (BEX), *Diaporthe cotoneastri* (DCO), *Alternaria alternata* (AAL), *Alternaria destruens* (ADE), *Alternaria infectoria* (AIN) v izvedbi antagonističnega testa neposrednih reakcij z glivo *Trichoderma* sp. in pripadajoče kontrole po 4. in 7. dnevu inkubacije.

Diskusija

Weindling je leta 1932 prvič predlagal, da bi se glive rodu *Trichoderma* lahko uporabljale kot biokontrola rastlinskih bolezni zaradi njihovega antagonističnega učinka (Shafique s sod. 2019). Danes so glive rodu *Trichoderma* ene najpogostejše uporabljenih v biokontroli (Harman s sod. 2004). Uporabljajo se zaradi dobre sposobnosti kompeticije za hranila in prostor, mikoparazitizma, antibiotične, produkcije hlapnih (VOC) in nehlapnih komponent, ki zavirajo rast rastlinskih patogenov, ter sekundarnih metabolitov, ki razgrajujejo celično steno patogenov (López-López s sod. 2022; Sarfraz s sod. 2018). V hortikulturi jih uporabljajo predvsem zaradi sposobnosti kolonizacije rizosfere (Harman s sod. 2004). Glive rodu *Trichoderma* lahko spodbujajo rast rastlin, izboljšujejo koreninski sistem in površino listov ter pomagajo rastlini pri obrambi pred patogeni. Njihovi bioaktivni metaboliti dokazano pospešujejo rast in razvoj mladih oljk ter povečujejo izražanje rastlinskih genov, odgovornih za obrambo oljke pred patogeni (Marra s sod. 2020). So sekundarni oportunistični patogeni, ki kolonizirajo površino koreninskega sistema. Rastlini lahko pomagajo s povečanjem dostopnosti hranil v tleh, pospešijo rast, povečajo odpornost na bolezni in količino pridelka (Harman s sod. 2004). Nekateri izolati lahko kolonizirajo tudi nadzemne dele rastline, kot so listi in les, kjer rastlini pomagajo podobno kot v rizosferi (Mohammedi s sod. 2022; Rao s sod. 2015; Yangui s sod. 2020). Najpogostejše uporabljene vrste gliv *Trichoderma*, ki uspešno zavirajo rast drugih gliv, so *T. viride*, *T. harzianum* in *T. lignorum*. Različni izolati imajo lahko različno učinkovitost inhibicije, kar pripisujejo predvsem različnim hitrostim rasti in stopnjam izražanja hidrolitičnih encimov (López-López s sod. 2022). Zaradi različnih genotipov med patogeni se priporoča uporaba več vrst gliv *Trichoderma* za zaviranje določenega patogena (Yangui s sod. 2020). Zaradi razlik v delovanju med vrstami in celo izolati iste vrste je težko primerjati naše rezultate z dosedanjimi študijami, saj naš izolat ni bil okarakteriziran do nivoja vrste.

V našem eksperimentu smo preverjali, ali lahko izolat *Trichoderma* sp. zavira rast izbranih patogenov, izoliranih iz oljke: *Biscogniauxia mediterranea* (*B. mediterranea*), *Boeremia exigua* (*B. exigua*), *Diaporthe cotoneastri* (*D. cotoneastri*), *Alternaria alternata* (*A. alternata*), *Alternaria destruens* (*A. destruens*) in *Alternaria infectoria* (*A. infectoria*).

B. mediterranea (Index Fungorum ID 439307) spada med oportunistične patogene, ki preidejo iz endofitskega v parazitski način rasti, ko je gostitelj izpostavljen stresnim pogojem, predvsem ob pomanjkanju vode v tkivih (npr. po požarih) (Anselmi in Mazzaglia, 2005; Karami s sod. 2018). Največ se jo preučuje kot patogena hrasta (*Quercus ilex* L.), pri katerem povzroča pooglenitev (Karami s sod. 2018; Kavosi s sod. 2018). Različne vrste iz rodu *Trichoderma* so različno uspešno zavirale rast *B. mediterranea* v pogojih in vitro in in vivo. Najuspešnejše pri testih neposrednih interakcij so bile *T. harzianum*, ki so zavirale rast *B. mediterranea* med 74 in 100



Slika 4. Relativna rast, merjena kot površina kultur gliv *Boeremia exigua* (BEX), *Diaporthe cotoneastri* (DCO), *Alternaria alternata* (AAL), *Alternaria destruens* (ADE) in *Alternaria infectoria* (AIN) s pripadajočimi standardnimi odkloni (n = 3), izražena v odstotkih glede na kontrole posamezne glive po 7 dneh inkubacije »sendvičev petrijevsk« z glivo *Trichoderma* sp. Statistične razlike med posameznimi glivami so označene s črkami (enosmerna ANOVA, Games-Howell post-hoc test, $p \leq 0,05$), statistično značilne razlike v rasti med kontrolno skupino in glivo v antagonističnem testu pa so označene s zvezdico (*) (Welchov t-test, $p \leq 0,05$).

% (Yangui s sod. 2020), *Trichoderma viride* z inhibicijo okoli 67 %, *T. atroviride* z inhibicijo približno 68 % (Karami s sod. 2018; Kavosi s sod. 2018) in *T. koningii* z inhibicijo 70 % (Kavosi s sod. 2018). Te ugotovitve se skladajo z našimi rezultati, ki kažejo izrazito inhibicijo z neposredno interakcijo po 4. in 7. dnevu (67 % in 74 %).

B. exigua (Index Fungorum ID 515624), znana tudi kot *Phoma exigua* Desm. (*P. exigua*), ni neposredno povezana z resnimi boleznimi oljk, je pa pogost patogen cikorie (Quezada-D'Angelo s sod. 2024), stročnic, kot je fižol mungo (Zhang s sod. 2025), in tobaka (Xu s sod. 2025). *B. exigua* lahko proizvaja bioaktivne spojine, ki zavirajo rast drugih mikroorganizmov. Tako lahko deluje kot patogen in kot antagonist ter ščiti npr. veliki jesen (*Fraxinus excelsior*) pred drugimi patogeni (Kosawang s sod. 2018). Proti okužbi z *B. exigua* na *Hibiscus sabdariffa* L. so uspešno uporabili *T. viride*, ki je pri testu neposredne interakcije zavrla rast za 72 %, pri testu posredne interakcije pa za 69 % (Eslaminejad Parizi s sod. 2012). V našem primeru *B. exigua* nismo uspeli zavreti pri testu posredne in neposredne interakcije po 4. dnevu, medtem ko je po 7. dnevu prišlo do zmanjšanja rasti v primerjavi s kontrolo (32 % inhibicija) v testu neposredne interakcije, vendar je bila ta še vedno precej manjša od vrednosti iz literature. To je verjetno posledica dejstva, da naš izolat *Trichoderma* sp. ni bil vrsta *T. viride*. Število raziskav antagonizma med tema dvema glivama je omejeno, zato je težko trditi, da bi lahko *Trichoderma* res imela antagonistični učinek na *B. exigua*.

D. cotoneastri (Index Fungorum ID 800697), prej imenovana tudi *Phomopsis cotoneastri* Punith. je tako kot *B. mediterranea* oportunistični patogen (Anselmi in Mazzaglia, 2005). Glive rodu *Diaporthe* lahko delujejo tudi kot antagonisti drugih

patogenih gliv, kot je *Fusarium* (Alsubaie s sod. 2024). Rast različnih gliv rodov *Diaporthe* ali *Phomopsis* je bila zavrtja z različnimi glivami rodu *Trichoderma*. *T. harzianum* je uspešno inhibirala rast *Phomopsis carposchiza* in *Diaporthe padi*, ki okužujeta navadni divji kostanj (Pastirčáková, 2019) ter *Phomopsis perseae* (86 % inhibicija) in *Diaporthe* sp. (78 % inhibicija) ob uporabi izolata *T. harzianum* TRJAL25, ki okužujeta plod avokada (López-López s sod. 2022). Različni izolati *Trichoderma* so pokazali tudi aktivnost proti glivi *Phomopsis vexans* in omejevali njeno rast (Malik s sod. 2024). *D. cotoneastri* je bila v našem primeru zavrtja po 4. in 7. dnevu testa neposrednih interakcij (42 in 57 %), pri testu posrednih interakcij pa ta gliva ni bila zavrtja. To bi lahko kazalo, da je za zaviranje *D. cotoneastri* potrebna neposredna interakcija med glivama in ne zgolj prisotnost hlapnih metabolitov v okolju. Pri testu posrednih interakcij je *D. cotoneastri* celo bolje rasla ob prisotnosti glive *Trichoderma* sp. kot pri kontroli. Glive iz rodu *Trichoderma* dokazano zavirajo rast in širjenje gliv iz rodu *Alternaria* (Mohammedi s sod. 2022), ki na rastlinah povzročajo bolezen pegavost listov (Rao s sod. 2015). Veliko raziskav o antagonizmu proti glivam *Alternaria* je usmerjenih na vrsto *A. solani*, ki okužuje paradižnik in krompir. Proti njej so uspešno delovale *T. hamatum* (Sarfráz s sod. 2018), *T. atroviride* in *T. asperellum* (Mohammedi s sod. 2022). Z izolatom *T. asperellum* iz jabolane so v testu neposrednih interakcij uspeli zavreti rast glive *Alternaria* sp. za 50 % po 2. dnevu in 93 % po 6. dnevu (Matas-Baca s sod. 2022). Proti različnim izolatom *A. alternata* (Index Fungorum ID 119834) so potrdili delovanje različnih gliv rodu *Trichoderma*. *T. harzianum* je zavirala rast *A. alternata* za 67 % (Pandey 2010) in 63-77 % (Kayim s sod. 2018), *T. viride* za 67 % (Pandey 2010), *T. koningiopsis* IC-10 izolat za 70 % (Ferreira s sod. 2020) in *T. afroharzianum* TRI07 izolat za 66 % (Philip s sod. 2024). *T. viride* se lahko uporabi tudi za izboljšanje imunskega odziva rastline na *A. alternata* v stročnicah, kar kaže, da *Trichoderma* posredno pomaga rastlini (Rao s sod. 2015). Poleg patogenosti lahko *A. alternata* deluje tudi kot antagonist drugih patogenov hrasta, kot je *B. mediterranea* (Costa s sod. 2020). Iz literaturnih podatkov je razvidno, da je večina gliv rodu *Trichoderma* zavirala *A. alternata* okoli 63-70 %, kar je nekoliko več od naših vrednosti, ki kažejo 58 % inhibicije po 7. dnevu pri antagonističnem testu neposrednih interakcij, medtem ko pri neposredni interakciji po 4. dnevu in pri posredni inhibiciji ni bilo signifikantne razlike rasti glede na kontrolo (Ferreira in sod. 2020; Kayim in sod. 2018; Pandey 2010; Philip in sod. 2024). Za razliko od *A. alternata*, kjer je bilo opravljenih veliko raziskav antagonizma s *Trichoderma*, za *A. destruens* (Index Fungorum ID 444642) in *A. infectoria* (Index Fungorum ID 103987) nismo našli raziskav, ki bi neposredno opisovale antagonizem proti temu patogenoma v kombinaciji z glivami rodu *Trichoderma*. V našem eksperimentu smo pokazali uspešno zaviranje *A. destruens* (16 % po 4. dnevu testa neposrednih interakcij) in *A. infectoria* (21 % po 4. dnevu in 68 % po 7. dnevu testa neposrednih interakcij). Obstaja možnost, da sta bili ti glivi raziskovani, vendar nista bili poimenovani z vrstnimi imeni. Zato bi lahko nekatere raziskave, ki kažejo uspešnost delovanja *Trichoderma* proti *Alternaria* sp., prišle do podobnih zaključkov kot mi, vendar jih ne moremo uporabiti za primerjavo z našimi rezultati.

Antagonistični testi neposrednih interakcij so pokazali višje stopnje inhibicije kot testi posrednih interakcij, kar je skladno z ugotovitvami v literaturi (Karami s sod. 2018; Kavosi s sod.

2018). Predvidevamo, da je to posledica dejstva, da so vrste iz rodu *Trichoderma* zelo hitro rastoče, medtem ko njihovi izločeni metaboliti niso tako učinkoviti. Antagonističnih testov z *B. mediterranea* ne moremo primerjati s testi posrednih interakcij, ker zaradi neuspešne priprave suspenzije spor teh rezultatov nismo pridobili.

Zaključki

Ob snovanju poskusa smo najprej predpostavili, da bo *Trichoderma* sp. delovala kot antagonist vseh izbranih patogenih gliv prek neposrednih in posrednih interakcij. Druga hipoteza je predvidevala, da bo rast patogenih gliv bolj zavrtja v testih neposrednih interakcij kot v testih posrednih interakcij. Ugotovili smo, da se učinkovitost zaviranja v testih neposrednih in posrednih interakcij razlikuje. *Trichoderma* sp. je tako v testih neposrednih interakcij zavrla večino izbranih patogenov, ne pa vseh – inhibicija rasti pri glivi *A. destruens* ni bila potrjena. Učinkovitost zaviranja rasti patogenih gliv v testih posrednih interakcij je bila manjša – zavrtja je bila le gliva *A. alternata*, pri glivi *D. cotoneastri* pa se je rast celo povečala. Na podlagi teh rezultatov smo zaključili, da je prva hipoteza ovržena – predvideli smo antagonistično delovanje *Trichoderma* sp. na vse patogene v obeh izvedbah testa, česar rezultati ne podpirajo. Druga hipoteza pa je potrjena, saj rezultati izkazujejo bolj izrazit učinek zaviranja za več izbranih patogenih gliv v antagonističnih testih neposrednih interakcij.

Literatura

- Alsubaie M, Al-Askar AA, Olyan Al-Otibi F, Maniah K, Alkathiri A, Taha Yassin M, 2024. Exploring the efficacy of endophytic *Diaporthe caatingaensis* as a biocontrol agent targeting *Fusarium* strains afflicting coffee plants in Saudi Arabia. *Journal of King Saud University - Science* 36(9):103396.
- Anselmi N Mazzaglia A, 2005. Antagonistic agents of holm oak (*Quercus ilex* L.) in the Setif region (North-East of Algeria). *Integrated Protection in Oak Forests IOBC/WPRS Bulletin* 28:93–99.
- Costa D, Tavares RM, Baptista P, Lino-Neto T, 2020. Cork Oak Endophytic Fungi as Potential Biocontrol Agents against *Biscogniauxia mediterranea* and *Diplodia corticola*. *Journal of Fungi* 6(4):287.
- Elhrech H, Aguerd O, el Kourchi C, Gallo M, Naviglio D, Chamkhi I, Bouyahya A, 2024. Comprehensive Review of *Olea europaea*: A Holistic Exploration into Its Botanical Marvels, Phytochemical Riches, Therapeutic Potentials, and Safety Profile. *Biomolecules* 14(6):722.
- Eslaminejad Parizi T, Ansari M, Elaminejad T, 2012. Evaluation of the potential of *Trichoderma viride* in the control of fungal pathogens of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in vitro. *Microbial Pathogenesis* 52(4):201–205.
- Ferreira FV, Herrmann-Andrade AM, Calabrese CD, Bello F, Vázquez D, Musumeci MA, 2020. Effectiveness of *Trichoderma* strains isolated from the rhizosphere of citrus tree to control *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Penicillium digitatum* A21 resistant to pyrimethanil in post-harvest oranges (Citrus sinensis L. (Osbeck)). *Journal of Applied Microbiology* 129(3):712–727.
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M, 2004a. *Trichoderma* species — opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2(1):43–56.
- Index Fungorum. Names Record ID 439307. <https://www.indexfungorum.org/names/namesrecord.asp?RecordID=439307> (15. dec. 2025)
- Index Fungorum. Names Record ID 515624. <http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=515624>

- (15. dec. 2025)
10. Index Fungorum. Names Record ID 800697. <https://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=800697> (15. dec. 2025)
 11. Index Fungorum. Names Record ID 119834. <https://www.indexfungorum.org/names/namesrecord.asp?RecordID=119834> (15. dec. 2025)
 12. Index Fungorum. Names Record ID 444642. <https://www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=444642> (15. dec. 2025)
 13. Index Fungorum. Names Record ID 103987. <https://www.indexfungorum.org/names/namesrecord.asp?RecordID=103987> (15. dec. 2025)
 14. Karami J, Kavosi MR, Babanezhad M, Kiapasha K, 2018. Integrated management of the charcoal disease by silviculture, chemical and biological methods in forest parks. *Journal of Sustainable Forestry* 37(5):429–444.
 15. Kavosi MR, Yavarian R, Mohammadzadeh A, Karami J, 2018. The effect of biological compounds and fungicides to combat *Biscogniauxia mediterranea* causal agent of “Charcoal Disease” in vitro. *Forest Research and Development* 3(4):343–360.
 16. Montes-Osuna N, Mercado-Blanco J, 2020. *Verticillium* Wilt of Olive and Its Control: What Did We Learn during the Last Decade? *Plants* 9(6):735.
 17. Kayim M, Yones AM, Endes A, 2018. Biocontrol of *Alternaria alternata* Causing Leaf Spot Disease on Faba Bean (*Vicia faba* L.) Using Some *Trichoderma* harzianum Isolates Under In vitro Condition. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi* 22(2):169–178.
 18. Kosawang C, Amby DB, Bussaban B, McKinney LV, Xu J, Kjær ED, Collinge DB, Nielsen LR, 2018. Fungal communities associated with species of *Fraxinus* tolerant to ash dieback, and their potential for biological control. *Fungal Biology* 122(2–3):110–120.
 19. López-López ME, Del-Toro-Sánchez CL, Gutiérrez-Lomelí M, Ochoa-Ascencio S, Aguilar-López JA, Robles-García MA, Plascencia-Jatomea M, Bernal-Mercado AT, Martínez-Cruz O, Ávila-Novoa MG, González-Gómez JP, Guerrero-Medina PJ, 2022. Isolation and Characterization of *Trichoderma* spp. for Antagonistic Activity against Avocado (*Persea americana* Mill) Fruit Pathogens. *Horticulturae* 8(8):714.
 20. Malik MA, Ahmad N, Bhat MY, 2024. The green shield: *Trichoderma*'s role in sustainable agriculture against soil-borne fungal threats. *Current Research in Microbial Sciences* 7:100313.
 21. Marra R, Coppola M, Pironti A, Grasso F, Lombardi N, d'Errico G, Sicari A, Bolletti Censi S, Woo SL, Rao R, Vinale F, 2020. The Application of *Trichoderma* Strains or Metabolites Alters the Olive Leaf Metabolome and the Expression of Defense-Related Genes. *Journal of Fungi* 6(4):369.
 22. Matas-Baca MÁ, Urías García C, Pérez-Álvarez S, Flores-Córdova MA, Escobedo-Bonilla CM, Magallanes-Tapia MA, Sánchez Chávez E, 2022. Morphological and molecular characterization of a new autochthonous *Trichoderma* sp. isolate and its biocontrol efficacy against *Alternaria* sp. *Saudi Journal of Biological Sciences* 29(4):2620–2625.
 23. Mohammedi A, Trachi S, Ayad D, Messgo-Moumene S, Bouregghda H, Bouznad Z, 2022. Antagonistic potential of *Trichoderma* spp. evaluated under in vitro and in vivo conditions against *Alternaria* spp. responsible for early blight of tomato in Algeria. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* 28(4):626–635.
 24. Pandey A, 2010. Antagonism of Two *Trichoderma* Species Against *Alternaria alternata* on *Capsicum frutescens*. *Journal of Experimental Sciences* 1(5):18-19.
 25. Pastirčáková K, 2019. In vitro interactions between *Trichoderma harzianum* and pathogenic fungi damaging horse-chestnut (*Aesculus hippocastanum*) leaves and fruits. *Biological Letters* 54(1):21–35.
 26. Philip B, Behiry SI, Salem MZM, Amer MA, El-Samra IA, Abdelkhalek A, Heflish A, 2024. *Trichoderma afroharzianum* TRI07 metabolites inhibit *Alternaria alternata* growth and induce tomato defense-related enzymes. *Scientific Reports* 14(1):1874.
 27. Poveda J, Baptista P, 2021. Filamentous fungi as biocontrol agents in olive (*Olea europaea* L.) diseases: Mycorrhizal and endophytic fungi. *Crop Protection* 146:105672.
 28. Quezada-D'Angelo T, San Martín J, Ruiz B, Oyarzúa P, Vargas M, Fischer S, Cortés P, Astete P, Moya-Elizondo E, 2024. Use of *Pseudomonas* protegens to Control Root Rot Disease Caused by *Boeremia exigua* var. *exigua* in Industrial Chicory (*Cichorium intybus* var. *sativum* Bisch.). *Plants* 13(2):263.
 29. Rao G, Nageswara N, Neelapu NRR, Surekha C, 2015. Induction of plant systemic resistance in legumes *Cajanus cajan*, *Vignaradiata*, *Vigna mungo* against plant pathogens *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata* - a *Trichoderma viride* mediated reprogramming of plant defense mechanism. *International Journal of Recent Scientific Research* 6:4270–4280.
 30. Sarfraz M, Khan SA, Moosa A, Farzand A, Ishaq U, Naeem I, Khan WA, 2018. Promising Antifungal Potential of Selective Botanical Extracts, Fungicides and *Trichoderma* Isolates Against *Alternaria solani*. *Cercetari Agronomice in Moldova* 51(1):65-74.
 31. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW, 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7):671–675.
 32. Shafique S, Shafique S, Javed A, Akhtar N, Bibi S, 2019. Analysis of Antagonistic Potential of Secondary Metabolites and Organic Fractions of *Trichoderma* Species against *Alternaria alternata*. *Biocontrol Science* 24(2):81–88.
 33. Sicard A, Zeilinger AR, Vanhove M, Schartel, TE, Beal DJ, Daugherty MP, Almeida RPP, 2018. *Xylella fastidiosa*: Insights into an Emerging Plant Pathogen. *Annual Review of Phytopathology* 56(1):181–202.
 34. The jamovi project, 2024. Version 2.6. <https://www.jamovi.org> (19. dec. 2025)
 35. van Dyk M, Spies CFJ, Mostert L, Halleen F, 2021. Survey of Trunk Pathogens in South African Olive Nurseries. *Plant Disease* 105(6):1630–1639.
 36. Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Ruocco M, Woo S, Lorito M, 2012. *Trichoderma* Secondary Metabolites that Affect Plant Metabolism. *Natural Product Communications* 7(11):1545-1550.
 37. Web Garden Centre, 2024. Common olive tree diseases and how to prevent them. <https://webgardencentre.com/blogs/webgardencentre-blog/common-olive-tree-diseases-and-how-to-prevent-them-2024> (19. dec. 2025)
 38. Xu T, Ma P, Xu R, Hsiang T, Huang J, Zheng L, Fang Y, Li Y, 2025. First report of *Boeremia exigua* causing leaf spot of tobacco (*Nicotiana tabacum*) in China. *Australasian Plant Pathology* 54(3):437–440.
 39. Yangui I, Boutiti M, Mohamed L, Ben J, Jamaâ B, Vannini A, Vettrano AM, Messaoud C, 2020. *Trichoderma* biocontrol of *Biscogniauxia mediterranea*: variation in responses among genetically diverse isolates. *Integrated Protection in Oak Forests IOBC/WPRS Bulletin* 152:154–157.
 40. Zhang P, Zhang W, Wang S, Zhang H, Zhu M, Wu D, Sun Y, Zhang H, 2025. Crude toxin production and chemical control of *Boeremia exigua*. *Scientific Reports* 15(1):11009.

Vpliv senescence na vsebnost pigmentov in izbranih ionov v listih navadne breze (*Betula pendula*)

Nika Egger, Nejc Govednik, Ana Ostrouška, Jerca Polak, Anastasija Štrbac

Študij biotehnologije, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

- Namen raziskave je bil določiti vsebnost fotosinteznih pigmentov (klorofila a in b ter karotenoidov), antocianov, izbranih ionov (kloridnih, kalijevih, kalcijevih in amonijevih) in skupno prevodnost v listih navadne breze (*Betula pendula*) tekom različnih rastnih obdobj. S spremljanjem sprememb v vsebnosti pigmentov in ionov smo želeli oceniti vpliv senescence na fiziološko stanje listov ter na procese, povezane s staranjem rastlinskega tkiva.
- Listne vzorce, zbrane v šestih različnih mesecih (od maja do oktobra), smo homogenizirali, nato pa del vzorcev ekstrahirali z destilirano vodo za analizo ionske sestave, prevodnosti in vsebnosti antocianov, drugi del pa z metanolom za določanje koncentracije fotosinteznih pigmentov. Vsebnost pigmentov smo določili spektrofotometrično, koncentracije ionov v listih in prevodnost pa z uporabo Vernierjevih senzorjev.
- Vsebnost klorofila a in karotenoidov je tekom rastne sezone upadala, medtem ko so vsebnosti antocianov bile dinamične z vrhovi poleti in jeseni. Klorofil a je ostal stabilen do konca poletja, nato pa je začel jeseni močno upadati, klorofil b pa se ni značilno spreminjal, zato se je razmerje med njima zmanjšalo. Med ioni je kalij postopno upadal, amonij je po začetnem padcu ostal stabilen, kalcij je nihal, klorid pa je ostal nespremenjen; Celokupna prevodnost listov je do začetka jeseni naraščala, nato močno upadla. Skupaj ti rezultati kažejo na usklajene fiziološke prilagoditve listov navadne breze med rastjo in senescenco.

Ključne besede: staranje, klorofil, antociani, karotenoidi, ionska sestava, sezonski vpliv

Uvod

Navadna breza (*Betula pendula*) je listopadno drevo, prepoznavno po značilnem belem lubju s sivo-črnimi razpokami ter krošnji s trikotnimi, rahlo srčastimi listi. Drevo običajno zraste od 15 do 25 metrov v višino in je znano po nezahtevnosti glede rastnih razmer (Kou s sod. 2023). Je pionirska vrsta, zato jo najdemo predvsem na odprtih in motenih rastiščih, kjer hitro naseljuje območja po naravnih ali antropogenih motnjah. Naravno je razširjena po Evropi in delu Azije, v Sloveniji pa je pomembna za območje steljnikov v Beli krajini. Listi so poleti zeleni, jeseni pa se obarvajo v zlato-rumene odtenke (Biotopi Zalog 2026).

Senescenca je v listih funkcionalno opisana kot prehod iz asimilacije hranil v njihovo remobilizacijo v skladiščna tkiva, kot so stebela in korenine (Guo s sod. 2021). Rastline tako zagotovijo recikliranje hranil, pridobljenih med asimilacijo, kar poveča reproduktivni uspeh v stresnih okoljih (Domínguez in Cejudo 2021). Iz listov se pogosto transportirajo številni mineralni elementi, predvsem dušik, fosfor, kalij, žveplo in magnezij, medtem ko so nekateri drugi elementi, kot sta kalcij in mangan, praviloma manj mobilni (Maillard s sod. 2015). Najbolj opazen znak mobilizacije snovi je sprememba barve listja ob razgradnji klorofila, pri čemer v ospredje pridejo karotenoidi, ki listju dajejo rumeno-oranžno barvo. Razgradnja klorofila preprečuje fototoksičnost, ki lahko nastane med razgradnjo fotosistemov oziroma klorofil-vezanih proteinskih kompleksov. Poleg tega ti kompleksi predstavljajo pomemben rezervoar dušika, katerega mobilizacija je nujna, saj dušik predstavlja omejitveni faktor rasti (Hörtensteiner in Kräutler 2011).

Po razgradnji klorofila in tilakoidnih membran se kloroplasti pred celično smrtjo preoblikujejo v gerontoplaste, v katerih so lokalizirani karotenoidi. Čeprav se razgradijo svetlobni žetveni kompleksi, na katere so karotenoidi vezani, ti zaradi svoje hidrofobnosti niso mobilni v floemu in se zato večinoma ne razgrajujejo. Majhen delež karotenoidov se kljub temu oksidira in nato mobilizira v obliki apokarotenoidov (Dhami in Cazzonelli 2020).

Stresorji, kot so infekcije s patogeni, poškodbe tkiv, suša ali pomanjkanje mineralov, lahko predčasno sprožijo staranje listov z zvišanjem nivojev reaktivnih kisikovih spojin (ROS). Kot odziv na tak stres rastline lahko sintetizirajo antociane, ki poleg tega, da barvajo liste rdeče ali vijolično, delujejo tudi kot antioksidanti, s čimer zmanjšajo raven prostih radikalov (Li in Ahammed 2023). Poleg pigmentov se med senescenco spreminja tudi koncentracija ionov, katerih dinamika je močno odvisna od rastnih pogojev. Breze na apnenčastih tleh so na primer pokazale povsem drugačno ionsko sestavo listja kot tiste z obalnih območij (Kalliola s sod. 2021). Namen naše raziskave je bil preučiti sezonske spremembe v vsebnosti fotosinteznih pigmentov in izbranih ionov v listnem tkivu navadne breze ter tako bolje razumeti dinamiko transporta snovi med senescenco. Predpostavili smo naslednje:

- Vsebnost kalcijevih in kloridnih ionov bo ostala relativno stabilna, medtem ko se bo vsebnost kalijevih in amonijevih ionov tekom rastne dobe zmanjšala.
- Vsebnost antocianov bo nizka, a se bo jeseni zvišala.
- Vsebnost klorofila se bo tekom rastne dobe zmanjšala.
- Razmerje med klorofilom a in b se bo zmanjšalo.
- Vsebnost karotenoidov bo večinoma stabilna skozi sezono z manjšim upadom jeseni.

Materiali in metode

Predpriprava rastlinskega materiala

Uporabili smo šest vzorcev listov navadne breze (*B. pendula*), označenih kot B1–B6. Vzorci so bili nabrani v šestih terminih: B1 dvajsetega maja, B2 dvajsetega junija, B3 enaindvajsetega julija, B4 dvajsetega avgusta, B5 devetnajstega septembra in B6 dvajsetega oktobra 2025. Posušene liste smo strli v terilnici s tekočim dušikom in dodatkom kremenčevega peska do finega prahu.

Priprava vodnih izvlečkov in meritve ionov, prevodnosti ter antocianov

Za pripravo vodnih izvlečkov smo zatehtali 2 g finega prahu v frutke, dodali 50 mL zakisane ddH₂O (pH = 5) in stresali 1 h pri 25 °C in 160 rpm. Tako pripravljen izvleček smo filtrirali pod znižanim tlakom in bistre vodne izvlečke prenesli v označene centrifugirke. Iz vsakega vzorca smo pripravili tri tehnične ponovitve, ki smo jih petkrat redčili (4 mL izvornega izvlečka in 16 mL zakisane ddH₂O).

Od posamezne tehnične ponovitve smo odvzeli 2 mL za merjenje antocianov na spektrofotometru (po protokolu, povzetem po Teng s sod. 2020), preostalih 18 mL pa uporabili za meritve prevodnosti in vsebnosti amonijevih, kloridnih, kalijevih ter kalcijevih ionov z Vernierjevimi senzorji (Go Direct ©), umerjenimi za posamezen ion oz. prevodnost, v programu Vernier Graphical Analysis na tabličnih računalnikih (Apple iPad). Podatke pri posamezni meritvi smo zajemali 1 min oz. nekaj sekund v primeru prevodnosti. Vrednosti, izmerjene s senzorji, smo dobili v enotah mg/L oz. $\mu\text{S}/\text{cm}$ v primeru prevodnosti. Vsebnost antocianov v vzorcih smo določili po metodi Teng s sod. (2020). Pri rezultatih za prevodnost smo upoštevali le redčitveni faktor.

Priprava metanolnih izvlečkov in meritve fotosinteznih pigmentov

Za vsak posamezen vzorec homogeniziranih liofiliziranih listov smo v treh tehničnih ponovitvah zatehtali 0,05 g strtega prahu in mu dodali 20 mL 100 % metanola, ohlajenega na 4 °C. Vzorce smo vorteksirali in 45 min inkubirali v temi pri sobni temperaturi ter jih vsakih 5 min premešali. Metanolne izvlečke smo nato filtrirali skozi filter papir, 10 mL filtrata prenesli v centrifugirke in centrifugirali 3 min pri 2500 rpm. Vsebnost fotosinteznih pigmentov v vzorcih smo določili po metodi Lichtenthaler (1987). Iz vsakega vzorca smo 2 mL supernatanta prenesli v mikrocentrifugirke ter izmerili absorbanco pri 665 nm (klorofil a), 652 nm (klorofil b) in 470 nm (karotenoidi) na spektrofotometru. Kot slepi vzorec smo uporabili 100 % metanol.

Za izračun koncentracij pigmentov v mg/mL smo uporabili naslednje enačbe iz Lichtenthaler (1987).

Obdelava podatkov in statistična analiza

Podatke meritev smo zbrali in uredili v preglednicah programa Microsoft Excel (Microsoft Corporation 2026). Statistično analizo smo izvedli v programu jamovi (The jamovi project 2024). Za obdelavo podatkov smo uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA) in Tukeyjev post-hoc test ob predpostavki homogenosti varianc. Analize smo izvedli za posamezne

sklope podatkov ($n = 3$), pri čemer smo kot statistično značilne upoštevali razlike pri $p < 0,05$. Rezultate smo grafično prikazali s stolpičnimi diagrami, kjer so prikazana povprečja, standardni odkloni in statistično značilne razlike med vzorci, označene z različnimi črkami.

Rezultati

Vsebnost ionov, antocianov in prevodnost

Največja vsebnost amonijevih ionov (NH_4^+) v vodnih izvlečkih listov navadne breze je bila izmerjena maja (0,03 mg/g suhe mase), nato je upadla in se do konca meritev v oktobru ni več spreminjala. Najnižja vrednost je bila izmerjena oktobra in je znašala 0,003 mg/g suhe mase (Slika 1a).

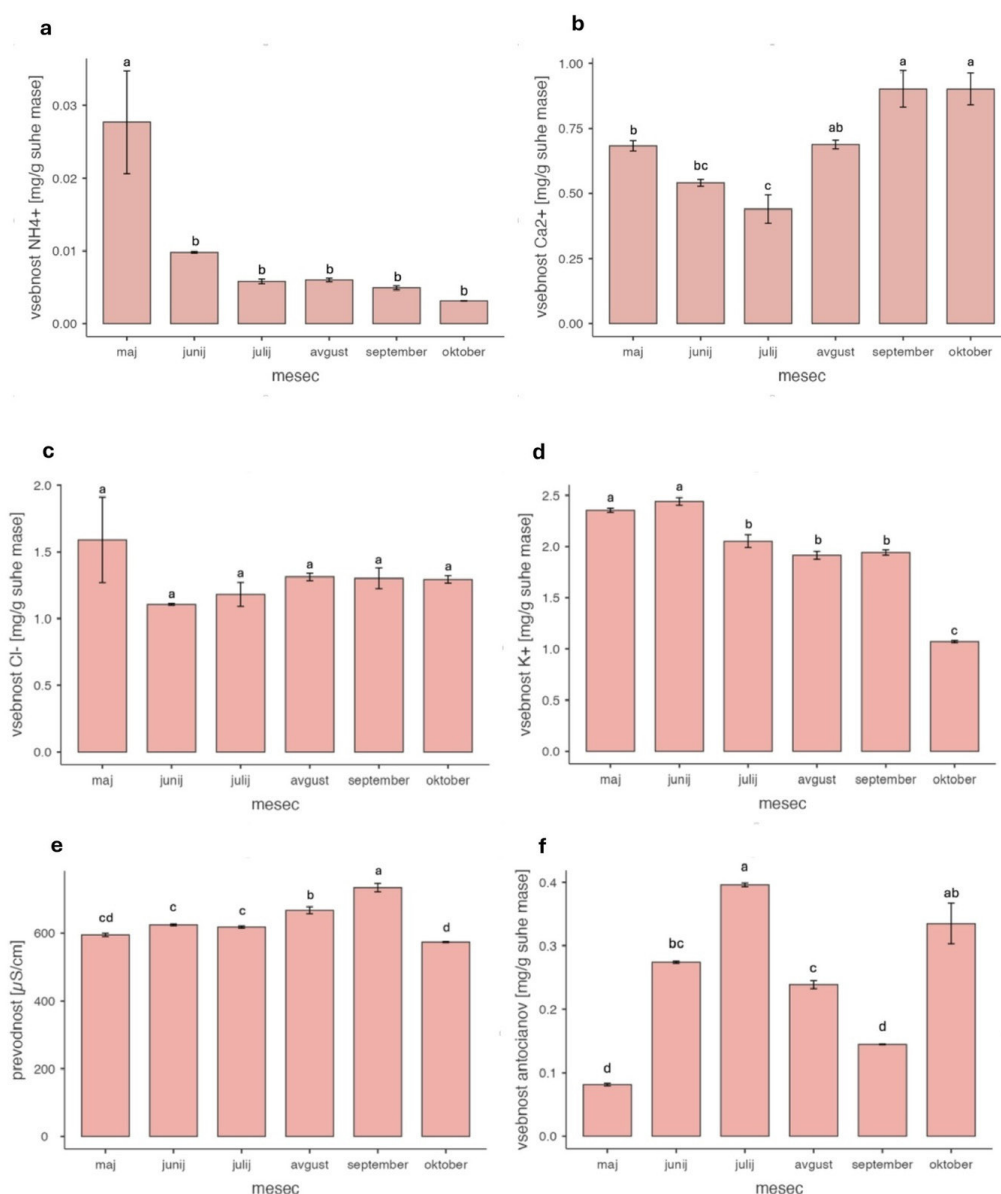
Meritve so pokazale, da je vsebnost kalcijevih ionov (Ca^{2+}) v

izvlečkih upadala od maja do julija, kjer smo zabeležili najnižjo vrednost, 0,44 mg/g suhe mase. Nato je ponovno naraščala do najvišje izmerjene vrednosti (0,90 mg/g suhe mase) v septembru, kjer se je ustalila (Slika 1b).

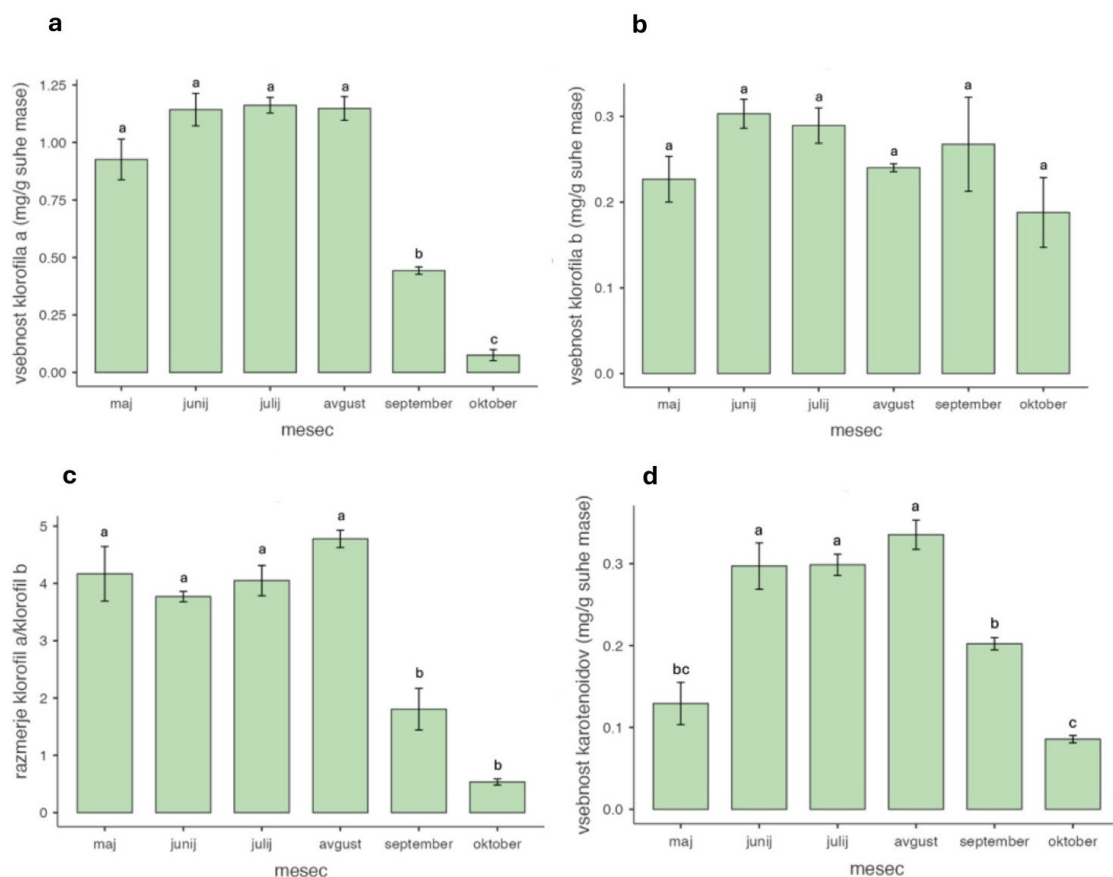
Skozi opazovano obdobje nismo opazili razlik v vsebnosti kloridnih ionov (Cl^-) v izvlečkih. Vrednosti so nihale med 1,11 mg/g suhe mase (izmerjeno junija) in 1,59 mg/g suhe mase (izmerjeno maja), kar je prikazano na Sliki 1c.

Vsebnost kalijevih ionov (K^+) v izvlečkih je skozi opazovano obdobje počasi upadala. Znižanja smo opazili na prehodu iz junija v julij ter iz septembra v oktober. Najvišja zabeležena vrednost je bila v juniju, in sicer 2,44 mg/g suhe mase, najnižja pa v oktobru, 1,07 mg/g suhe mase (Slika 1d).

Iz meritev smo ugotovili tudi, da se prevodnost izvlečkov od maja do julija ni spreminjala. Nato smo opazili njen porast do septembra, kjer smo zabeležili najvišjo vrednost, 735 μS /



Slika 1. Rezultati meritev vodnih izvlečkov listov navadne breze (*B. pendula*) v različnih obdobjih rastle sezone, in sicer: a) vsebnosti amonijevih ionov (NH_4^+); b) vsebnosti kalcijevih ionov (Ca^{2+}); c) vsebnosti kloridnih ionov (Cl^-); d) vsebnosti kalijevih ionov (K^+); e) povprečna prevodnost izvlečkov, izražena v $\mu\text{S}/\text{cm}$; f) vsebnosti antocianov. Vsi grafi prikazujejo povprečne vrednosti s pripadajočimi standardnimi odkloni ($n=3$). Statistično značilne razlike med posameznimi meseci so označene s črkami (enosmerna ANOVA, Tukeyjev post-hoc test, $p < 0,05$).



Slika 2. Rezultati meritev metanolnih izvlečkov listov navadne breze (*B. pendula*) v različnih obdobjih rastle sezone, in sicer: a) vsebnosti klorofila a; b) vsebnosti klorofila b; c) razmerje med klorofilom a in klorofilom b; d) vsebnosti karotenoidov. Vsi grafi prikazujejo povprečne vrednosti s pripadajočimi standardnimi odkloni ($n = 3$). Statistično značilne razlike med posameznimi meseci so označene s črkami (enosmerna ANOVA, Tukeyjev post-hoc test, $p < 0,05$).

cm, zatem pa strm upad v oktobru na najnižjo zabeleženo vrednost, 573 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (Slika 1e).

Kot je razvidno iz Slike 1f, je vsebnost antocianov v izvlečkih skozi opazovano obdobje vseskozi nihala. Iz najnižje vrednosti maja (0,08 mg/g suhe mase) je naraščala do najvišje izmerjene vrednosti julija (0,40 mg/g suhe mase), nato je upadala do septembra (0,15 mg/g suhe mase) in ponovno narasla do oktobra (0,34 mg/g suhe mase), ko je bila primerljiva julijski vrednosti.

Vsebnost fotosinteznih pigmentov

Vsebnost klorofila a v metanolnih izvlečkih listov navadne breze se od maja do avgusta ni spreminjala, najvišjo vrednost je dosegla julija, in sicer 1,16 mg/g suhe mase. Septembra je vsebnost močno upadla, oktobra pa se je dodatno zmanjšala na 0,08 mg/g suhe mase (Slika 2a).

Na Sliki 2b je razvidno, da se vsebnost klorofila b v izvlečkih skozi rastno sezono ni bistveno spreminjala, nihala je od 0,30 mg/g suhe mase junija do 0,12 mg/g suhe mase oktobra. Razmerje med obema klorofiloma je ostalo nespremenjeno do konca poletja, medtem ko je konec septembra znatno upadlo. Največje razmerje je bilo opaženo avgusta (4,78), najnižje pa oktobra (0,54) (Slika 2c).

Rezultati merjenja vsebnosti karotenoidov v izvlečkih so prikazani na Sliki 2d. Vsebnost karotenoidov v izvlečkih je iz maja v junij precej narasla (za skoraj 3x), nato ostala relativno

nespremenjena do avgusta z najvišjo vrednostjo 0,34 mg/g suhe mase in se postopno znižala v jesenskih mesecih. Najnižjo vrednost, 0,09 mg/g suhe mase, je dosegla oktobra.

Diskusija

Amonij

Koncentracije amonijevih ionov (NH_4^+) so bile najvišje maja, sledil je hiter upad junija, nato pa stabilne ravni do oktobra. Ta vzorec odraža močno povezavo med razpoložljivostjo dušika in rastjo listavcev, kot je breza, v zgodnji sezoni. Spomladi na novo razvijajoči se listi delujejo kot močni ponori dušika (Taiz s sod. 2015). Visoke začetne ravni NH_4^+ podpirajo hitro sintezo beljakovin in proizvodnjo aminokislin med rastjo in razvojem listov ter kopičenjem klorofila pri brezi. To prehodno kopičenje pomaga pri osmotski prilagoditvi in asimilaciji dušika, preden se stopnja fotosinteze poveča (Kalliola s sod. 2021). Hiter padec po maju odraža pretvorbo NH_4^+ v manj strupene oblike, kot je glutamin, skupaj z redčenjem zaradi rasti biomase in zgodnjo translokacijo. Do junija, ko listi dozori in se ravnovesje C/N stabilizira, se presežek NH_4^+ zmanjša na minimum, da se prepreči toksičnost (Riipi s sod. 2002). Pri brezi, ki je prilagojena na hranilno relativno revna tla, sta učinkovita uporaba dušika in hitra asimilacija še posebej pomembni lastnosti, ki podpirata hitro zgodnjo

rast, hkrati pa zmanjšujeta izgube (Näsholm s sod. 1998). Odsotnost sprememb v koncentraciji NH_4^+ od junija do oktobra kaže, da po začetni fazi rasti ostanejo ravni amonija v listih strogo regulirane in relativno nizke, s čimer smo potrdili tudi našo hipotezo. Ta stabilnost verjetno odraža ravnovesje med nadaljnjo asimilacijo, omejenim shranjevanjem anorganskega dušika in notranjim recikliranjem dušika. Posledično sezone spremembe skupnega dušika v listih morda niso neposredno odražene v nihanjih koncentracij NH_4^+ (Aerts 1996).

Kalcij

Koncentracije kalcijevih ionov (Ca^{2+}) v listih navadne breze so pokazale nepričakovan vzorec, z upadom od maja do julija, ki mu je sledilo povečanje od julija do septembra in nato stabilizacija. Ta trend odstopa od pogosto poročanega neprekinjenega kopičenja Ca^{2+} v listih listopadnih dreves, saj je kalcij v floemu večinoma nemobilen. V običajnih pogojih se koncentracije Ca^{2+} med rastno sezono povečajo zaradi nenehnega transporta v ksilem, ki ga poganja transpiracija (White 2003). Ena možna razlaga za zmanjšanje koncentracije Ca^{2+} med majem in julijem je učinek redčenja, povezan s hitrim širjenjem listov. Med zgodnjim razvojem se biomasa in površina brezovih listov znatno povečata, kar lahko preseže hitrost uvoza kalcija in vodi do začasnega zmanjšanja koncentracije, kljub nadaljnjemu privzemu. Ta učinek je še posebej opazen pri hitro rastočih vrstah, kot je breza (Marschner in Marschner 2012). K opaženemu vzorcu so morda prispevali tudi okoljski dejavniki. Spremembe v vlažnosti tal in padavinah lahko močno vplivajo na transport kalcija, saj je premikanje Ca^{2+} v poganjek tesno povezano s transpiracijskim tokom. Obdobja manjše razpoložljivosti vode v zgodnjem poletju bi lahko omejila absorpcijo kalcija, kar bi povzročilo navidezni upad, medtem ko bi več vlažnosti pozneje v sezoni lahko olajšalo povečan transport in kopičenje (McLaughlin in Wimmer 1999). Poleg tega bi lahko razlike v starosti listov ali položaju vzorčenja znotraj krošnje povzročile variabilnost v koncentracijah kalcija, saj starejši listi običajno vsebujejo višje ravni Ca^{2+} zaradi dolgotrajnega kopičenja. Omeniti velja, da smo za analize dobili liste, za katere nismo imeli podatkov o njihovi starosti, mestu nabiranja in vremenskih pogojih v času nabiranja. Nadaljnje povečanje koncentracij Ca^{2+} od julija do septembra je bolj skladno s pričakovanji, a postavljene hipoteze vseeno nismo uspeli potrditi. Stabilizacija koncentracij, opažena med septembrom in oktobrom, kaže, da je kopičenje kalcija doseglo plato, kar lahko odraža zmanjšano stopnjo transpiracije in začetek fizioloških sprememb, povezanih s senescenco (White 2003).

Klor

V nasprotju z izrazito sezonsko dinamiko, opaženo pri drugih ionih, se koncentracije kloridnih ionov (Cl^-) v brezovih listih med meseci niso razlikovale, kar kaže na relativno stabilno vsebnost skozi celotno rastno sezono. Kloridni ion služi predvsem kot protiion za ravnovesje naboja v vakuolah in osmotsko regulacijo, ne pa kot hranilo, bistveno za rast, zato breze med staranjem ohranjajo konstantno količino Cl^- v listih brez močne translokacije (Kalliola s sod. 2021). Čeprav velja za mobilni element, je običajno potreben le v majhnih količinah in se pogosto pasivno absorbira iz talne raztopine skupaj z vodo, namesto da bi bil strogo reguliran z aktivnimi presnovnimi procesi. Posledično njegova koncentracija v listnih

tkivih bolj neposredno odraža zunanjo razpoložljivost kot notranje fiziološke potrebe (Marschner in Marschner 2012; Taiz s sod. 2015). Opažen vzorec koncentracije kloridnih ionov med meseci se torej ujema z našimi napovedmi.

Kalij

Kalij je mobilni element, ki je v zgodnjih fazah razvoja listov prisoten v relativno visokih koncentracijah zaradi funkcij pri osmotski regulaciji, aktivaciji encimov in regulaciji odpiranja listnih rež, kar podpira hitro rast in visoko fotosintezno aktivnost, zlasti na začetku rastne sezone (Marschner in Marschner 2012; Taiz s sod. 2015). Naši rezultati so pokazali zmanjševanje koncentracije kalijevih ionov od maja do oktobra, kar se ujema z našo napovedjo. Visoke začetne ravni spomladi so posledica mobilizacije shranjenega kalija iz lesnih tkiv za zadovoljevanje visokih potreb po transpiraciji in fotosintezi. To kopičenje v listih sovpađa z najvišjo presnovno aktivnostjo, kjer kalij olajša aktivacijo encimov in odpiranje listnih rež pri naraščajočih temperaturah (Kalliola s sod. 2021). Koncentracija kalijevih ionov v listih se skozi mesece postopoma zmanjšuje zaradi ponovne translokacije v korenine, lubje in razvijajoče se popke (Riipi s sod. 2002). Pri brezi je resorpcija hranil ključna prilagoditvena strategija, ki drevesom omogoča ohranjanje esencialnih elementov, preden listi odpadejo. Kalij je med hranili, ki se najlažje translocirajo, in njegov umik iz listov se lahko začne že veliko pred vidnimi znaki senescence (Aerts 1996; Killingbeck 1996). Študije na brezi so pokazale znatno sezonsko prerazporeditev kalija, pri čemer se koncentracije v listju zmanjšujejo, kar odraža notranje procese recikliranja, ki podpirajo shranjevanje in prihodnjo rast (Uri s sod. 2002).

Prevodnost

Sezonski vzorec prevodnosti listov kaže stalno naraščanje od maja do septembra, ki mu sledi izrazit upad oktobra. Postopno naraščanje prevodnosti med rastno sezono verjetno odraža postopno kopičenje topnih ionov, ki ga poganja aktivna absorpcija in transpiracijski tok (Uri s sod. 2002). Po podatkih iz literature prevodnost brezovih listov pogosto sledi vzorcu stalnega naraščanja od maja do septembra, preden oktobra močno pade, kar se ujema z našimi rezultati in odraža fiziološke prilagoditve sezonskim znakom (Sellin s sod. 2015). Oster upad prevodnosti, opažen oktobra, se tesno ujema z začetkom senescence brezovih listov (Aerts 1996; Killingbeck 1996). Obseg opaženega upada kaže, da so procesi ponovne translokacije zelo učinkoviti, kar je skladno s strategijo breze kot relativno varčne vrste glede hranil, kljub njeni hitri rasti. Poleg ponovne premestitve lahko k zmanjšani prevodnosti dodatno prispevajo strukturne in fiziološke spremembe med senescenco. Razgradnja membrane in povečana prepustnost lahko olajšata izpiranje preostalih ionov, zlasti v jesenskih padavinskih razmerah (Taiz s sod. 2015). Ta kombinacija aktivnega odvzema hranil in pasivne izgube ionov verjetno pojasnjuje nenaden padec prevodnosti med septembrom in oktobrom.

Antociani

Sinteza antocianov je predvsem odvisna od okoljskih dejavnikov, kot sta intenziteta svetlobe in temperatura (Li s sod. 2023). Antociani običajno naraščajo jeseni, ko temperature padejo in pride do razgradnje klorofila. V skladu

s tem smo predpostavili, da bo vsebnost antocianov večino rastne sezone nizka, z zvišanjem šele v jesenskih mesecih. Rezultati so to hipotezo le delno potrdili. Oktobrski porast je bil pričakovan in skladen z jesenskim znižanjem temperatur ter razgradnjo klorofila, presenetljiv pa je bil višek v juliju, ki verjetno kaže na to, da so bili antociani aktivno vključeni v zatiranje fotooksidativnega stresa, ki nastane ob višjih intenzitetah svetlobe poleti. Podoben rezultat so pri brezah na Finskem opazili tudi Zuccarini s sod. (2025), vendar v višjih legah z nižjimi temperaturami. Koncentracije antocianov so bile dinamične tudi izven vrhov. Upad koncentracij antocianov v vmesnem obdobju med obema vrhovoma je verjetno posledica zmanjšane oksidativnega stresa v razmeroma ugodnih poletnih razmerah z zmernimi temperaturami in manj ekstremnim sevanjem. V tem obdobju morda zadoščajo drugi antioksidativni mehanizmi, sinteza antocianov pa se ustrezno zmanjša. Presenetljiva je bila tudi ugotovitev, da so bile koncentracije antocianov relativno visoke in primerljive z vrednostmi karotenoidov ter klorofila b, kar je prav tako nenavadno, saj listi vizualno niso kazali rdečih ali vijoličnih odtenkov. To bi lahko pojasnili z maskirnim učinkom klorofila in drugih pigmentov.

Klorofil a in b

Iz rezultatov lahko razberemo, da je statistično značilen upad prisoten le pri klorofilu a, katerega vsebnost je bila od maja do avgusta sicer precej stabilna. Nenadne spremembe v koncentraciji klorofila a so se pojavile šele septembra in oktobra. Takšen potek sprememb je skladen z ugotovitvami prejšnjih raziskav, ki kažejo, da lahko vsebnost klorofila a pri nekaterih lesnih vrstah (kot so *B. pendula*, *A. platanoide* in *P. padus*) ostaja visoka skoraj skozi celotno jesensko obdobje in začne izraziteje upadati šele 5–10 dni pred odpadanjem listov, medtem ko se pri drugih vrstah (na primer *S. aucuparia*) klorofil a razgrajuje postopneje skozi celotno jesen, vendar se hitrost razgradnje vseeno poveča tik pred abscizijo listov (Matilla s sod. 2018). Na ta način rastline podaljšajo delovanje fotosinteznega aparata in hkrati zmanjšajo izgube dušika, ko bi zgodnja zmrzal lahko poškodovala listne celice še pred popolno remobilizacijo hranil (Fracheboud s sod. 2009). Nasprotno klorofil b ni pokazal statistično značilnih razlik tekom celotne rastne sezone, kar kaže na to, da njegova vsebnost tekom sezone ni nihala. Klorofil b se med senescenco razgrajuje po t. i. feoforbidni oksigenazni poti, pri kateri razgradnja klorofila b poteka posredno, saj se mora ta najprej pretvoriti v klorofil a (Hörtensteiner in Kräutler 2011). Posledično razmerje med klorofiloma a in b ostaja razmeroma stabilno skozi večji del rastne dobe in zgodnje faze senescence. Šele ob začetku intenzivnejše razgradnje fotosinteznega aparata se začne hitrejša razgradnja obeh pigmentov, predvsem klorofila a, s čimer bi pričakovali upad v obeh pigmentih (Matilla s sod. 2018). Naši rezultati zato predstavljajo odstopanje, saj se koncentracija klorofila b ne zmanjšuje. Morda bi bila potrebna večja količina vzorcev za zaznavo sprememb, saj je bil odklon podatkov pri klorofilu b precej večji, sploh v zadnjih dveh mesecih, kar je posledično zmanjšalo zanesljivost podatkov, kljub nakazanemu padajočemu trendu. Razmerje med obema klorofiloma se je tekom rastne dobe kljub temu zmanjšalo zaradi upada vsebnosti klorofila a v jesenskih mesecih, kar potrjuje našo hipotezo.

Karotenoidi

Karotenoidi absorbirajo svetlobno energijo v valovnem območju med 450 in 550 nm, kjer je absorpcija klorofilov šibkejša, in jo s prenosom energije posredujejo molekulam klorofila, s čimer razširijo spektralno območje svetlobe, ki je na voljo za fotosintezo (Sun s sod. 2022). Njihova raven zato poleti, ko je intenziteta svetlobe najvišja, ostaja stabilna, kar potrjujejo tudi naši rezultati. Ker karotenoidi razpadajo počasneje kot klorofili, se listi obarvajo v rumeno-oranžne odtenke. Ta trend je razviden tudi iz naših podatkov z upadajočimi vsebnostmi od avgusta do oktobra, s čimer potrjujemo zadnjo hipotezo. Sprememba ni tako izrazita kot pri klorofilu a, saj karotenoidi delujejo kot antioksidanti in preprečujejo nastanek ROS med razgradnjo fotosistemov, poleg tega pa niso mobilni v prevodnem tkivu zaradi svoje hidrofobnosti (Keskitalo s sod. 2005; Dhami in Cazzonelli 2020).

Zaključki

Sezonska dinamika pigmentov in izbranih ionov v listih navadne breze je pokazala značilne fiziološke prilagoditve med rastno dobo in senescenco. Koncentracija klorofila a je ostala stabilna do poznega poletja, nato pa se je jeseni izrazito zmanjšala, medtem ko klorofil b ni pokazal statistično značilnih sprememb, kar predstavlja odstopanje od pričakovanih vzorcev razgradnje. Karotenoidi so ostajali stabilni poleti in se postopno zmanjševali proti jeseni, kar odraža njihovo zaščitno vlogo in počasnejšo razgradnjo. Dinamika antocianov je bila kompleksna, z vrhovi poleti in jeseni, kar nakazuje njihovo vlogo pri zaščiti pred fotooksidativnim stresom. Med ioni je kalij kazal stalno upadanje zaradi učinkovite translokacije, medtem ko so koncentracije amonija po začetnem padcu ostale stabilne, kar odraža strogo regulacijo dušika. Kalcij je izkazoval netipičen vzorec, verjetno zaradi kombinacije učinka redčenja, okoljskih dejavnikov in variabilnosti vzorčenja, medtem ko je klor ostal stabilen skozi celotno sezono. Prevodnost listov se je povečevala do septembra in nato močno upadla, kar odraža intenzivno translokacijo hranil in začetek senescence. Skupaj naši rezultati poudarjajo usklajeno delovanje fizioloških procesov, povezanih z optimizacijo fotosinteze, zaščito pred stresom in učinkovitim recikliranjem hranil v listih navadne breze skozi sezono.

Literatura

1. Aerts R, 1996. Nutrient resorption from senescing leaves of perennials: are there general patterns? *Journal of Ecology* 84:597–604.
2. Biotopi Zalog, 2026. Navadna breza. <https://biotopizalog.si/navadna-breza> (14. mar. 2026)
3. Dhami N, Cazzonelli CI, 2020. Environmental impacts on carotenoid metabolism in leaves. *Plant Growth Regulation* 92(3):455–477.
4. Domínguez F, Cejudo FJ, 2021. Chloroplast dismantling in leaf senescence. *Journal of Experimental Botany* 72(16):5905–5918.
5. Fracheboud Y, Luquez V, Björkén L, Sjödin A, Tuominen H, Jansson S, 2009. The control of autumn senescence in European aspen. *Plant Physiology* 149(4):1982–1991.
6. Guo Y, Ren G, Zhang K, Li Z, Miao Y, Guo H, 2021. Leaf senescence: progression, regulation, and application. *Molecular Horticulture* 1(1):5.
7. Hörtensteiner S, Kräutler B, 2011. Chlorophyll breakdown in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics* 1807(8):977–988.
8. Kalliola R, Saarinen T, Tanski N, 2021. Seasonal variations of foliar element distributions of silver birch in different habitats. *Silva*

- Fennica 55.
9. Keskitalo J, Bergquist G, Gardeström P, Jansson S, 2005. A cellular timetable of autumn senescence. *Plant Physiology* 139(4):1635–1648.
 10. Killingbeck KT, 1996. Nutrients in senesced leaves: keys to the search for potential resorption and resorption proficiency. *Ecology* 77:1716–1727.
 11. Kou J, Yan D, Qin B, Zhou Q, Liu C, Zhang L, 2023. Physiological response mechanism of European birch (*Betula pendula* Roth) to PEG-induced drought stress and hydration. *Frontiers in Plant Science* 14:1226456.
 12. Li Z, Ahammed GJ, 2023. Hormonal regulation of anthocyanin biosynthesis for improved stress tolerance in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 201:107835.
 13. Lichtenthaler HK, 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148:350–382.
 14. Maillard A, Diquélou S, Billard V, Laîné P, Garnica M, Prudent M, Garcia-Mina JM, Yvin JC, Ourry A, 2015. Leaf mineral nutrient remobilization during leaf senescence and modulation by nutrient deficiency. *Frontiers in Plant Science* 6:317.
 15. Marschner H, Marschner P, 2012. Marschner's mineral nutrition of higher plants third edition. Academic Press.
 16. Mattila H, Valev D, Havurinne V, Khorobrykh S, Virtanen O, Antinluoma M, Mishra KB, Tyystjärvi E, 2018. Degradation of chlorophyll and synthesis of flavonols during autumn senescence – the story told by individual leaves. *AoB Plants* 10(3):ply028.
 17. McLaughlin SB, Wimmer R, 1999. Calcium physiology and terrestrial ecosystem processes. *New Phytologist* 142:373–417.
 18. Microsoft Corporation, 2026. Microsoft Excel (verzija 2604). <https://www.microsoft.com/en-us/microsoft-365/excel> (3. maj 2026)
 19. Näsholm T, Ekblad A, Nordin A, Giesler R, Högberg M, Högberg P, 1998. Boreal forest plants take up organic nitrogen. *Nature* 392:914–916.
 20. Riipi M, Ossipov V, Lempa K, Haukioja E, Koricheva J, Ossipova S, Pihlaja K, 2002. Seasonal changes in birch leaf chemistry: are there trade-offs between leaf growth and accumulation of phenolics? *Oecologia* 130:380–390.
 21. Sellin A, Rosenvald K, Öunapuu-Pikas E, Tullus A, Ostonen I, Löhmus K, 2015. Elevated air humidity affects hydraulic traits and tree size but not biomass allocation in young silver birches (*Betula pendula*). *Frontiers in Plant Science* 6.
 22. Sun T, Rao S, Zhou X, Li L, 2022. Plant carotenoids: recent advances and future perspectives. *Molecular Horticulture* 2(1):3.
 23. Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy AS, 2015. *Plant physiology and development*. Sinauer Associates.
 24. Teng Z, Jiang X, He F, Bai W, 2020. Qualitative and quantitative methods to evaluate anthocyanins. *eFood* 1(5):339–346.
 25. The jamovi project, 2024. Verzija 2.6. <https://www.jamovi.org> (25. mar. 2026)
 26. Uri V, Tullus H, Löhmus K, 2002. Biomass production and nutrient accumulation in short-rotation grey alder (*Alnus incana* (L.) Moench) plantation on abandoned agricultural land. *Forest Ecology and Management* 161:169–179.
 27. White PJ, 2003. Calcium in plants. *Annals of Botany* 92:487–511.
 28. Zuccarini P, Gehrmann F, Balzarolo M, 2025. Autumn phenology of mountain birch at the sub-arctic treeline in comparison with silver birch in the cold and mild temperate zone. *Trees* 39:14.

Vpliv senescence na vsebnost fotosinteznih pigmentov in izbranih ionov v listih divje češnje (*Prunus avium*)

Veronika Iglič, Kristina Kunovac, Tinkara Šubic, Živa Urh, Lara Vidmar

Študij biotehnologije, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

- V naši raziskavi smo se osredotočili na preučevanje senescence listov divje češnje (*Prunus avium*), v šestih časovnih točkah rasti, ter opazovali spremembe, povezane z vsebnostjo fotosinteznih pigmentov in ionsko sestavo ter celokupno prevodnostjo med staranjem listov te rastlinske vrste.
- Analizo smo izvedli na listih divje češnje, ki so bili vzorčeni enkrat mesečno od maja do oktobra. Liofilizirane liste smo homogenizirali in iz njih pripravili vodne izvlečke, v katerih smo določali koncentracije ionov (NH_4^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+} in prevodnost) z uporabo senzorskega sistema. Iz istih izvlečkov smo nato spektrofotometrično določili vsebnost antocianov. Poleg tega smo iz suhega materiala z metanolno ekstrakcijo določili vsebnost asimilacijskih pigmentov (klorofil a, klorofil b in karotenoidi). Dobljene rezultate smo statistično obdelali z enosmerno analizo variance (ANOVA) in ustreznimi post-hoc testi ($p \leq 0,05$).
- Rezultati so pokazali, da se med staranjem listov vsebnost fotosinteznih pigmentov zmanjšuje, medtem ko je vsebnost antocianov dosegla vrh že pred koncem rastne sezone in sicer v avgustu. Vsebnost amonijevih ionov se je med staranjem zmanjšala, vsebnost kloridnih in kalcijevih ionov pa je med staranjem ostajala približno konstantna. Iz rezultatov celokupne prevodnosti lahko zaključimo, da je ta tekom senescence nihala.

Ključne besede: staranje, klorofil, karotenoidi, antociani, ionska sestava, prevodnost

Uvod

Divja češnja (*Prunus avium*) je srednje veliko, hitro rastoče in razmeroma kratkoživo listopadno drevo, ki jo uvrščamo v rod *Prunus*. Je med prvimi drevesnimi vrstami, ki zacvetijo spomladi, pri čemer opazimo značilne bele cvetove. Vrsta najbolje uspeva na globokih, rahlih, rodovitnih in vlažnih tleh. Ima pomembno okrasno in gospodarsko vrednost, saj njen trd in rdeče rjav les sodi med najkakovostnejše v lesni industriji. Udomačeno obliko divje češnje poznamo pod imenom domača češnja (Welk s sod. 2016). Ker je divja češnja listopadna rastlina pri njej opazimo senescenco oziroma staranje listov, ki predstavlja njihovo končno fazo razvoja. Gre za kompleksen, genetsko reguliran proces, pri katerem prihaja do postopne razgradnje celičnih struktur in prenosa hranil. Listom se tekom senescence spremeni njihova vloga, tako, da to niso več organi asimilacije zalog hranil, ampak postanejo organi iz katerih se hranila remobilizirajo (Guo s sod. 2021; Lim s sod. 2007). Pri rastlinah, vključno z rodом *Prunus*, je senescenca tesno povezana s spremembami v fotosinteznem aparatu, predvsem v vsebnosti fotosinteznih pigmentov, ter z aktivacijo zaščitnih mehanizmov pred oksidativnim stresom (Sedigheh s sod. 2011). Fotosintezna aktivnost listov rodu *Prunus* ni konstantna, temveč je odvisna od njihove razvojne faze. Največjo učinkovitost dosežejo listi v fazi polne zrelosti, ko so anatomsko in funkcionalno najbolj razviti, medtem ko se med senescenco fotosinteza postopno zmanjšuje. Ta upad je povezan z zmanjšano prevodnostjo listnih rež, spremembami v mezofilu ter z zmanjšano učinkovitostjo fotosistema II, kar vodi v zmanjšano sposobnost asimilacije ogljika (Ai s sod. 2026). Ena ključnih in najbolj opaznih značilnosti senescence je razgradnja klorofila. Med senescenco se količina klorofila v listih rodu *Prunus* izrazito zmanjša, njegova razgradnja pa poteka po natančno regulirani encimski poti, pri kateri nastajajo nefluorescentni, brezbarvni, klorofilni kataboliti (NCCs). Z zmanjšanjem klorofila list izgublja zeleno barvo, pri čemer postanejo bolj vidni karotenoidi, ki so prisotni že prej in tako prevzamejo vlogo dominantnih pigmentov, dokler tudi sami postopno ne razpadejo. Povečano razmerje med karotenoidi in klorofilom je značilen pokazatelj stresa in napredovanja senescence (Erhart s sod. 2016). Med staranjem se v listih poveča tudi vsebnost antocianov, ki se na novo sintetizirajo predvsem v epidermisu listov rodu *Prunus*. Epidermalno lokalizirani antociani delujejo kot optični filter, ki zmanjšuje vdor svetlobe v notranjost lista in s tem ščiti fotosintezni aparat pred prekomerno svetlobno energijo. Hkrati imajo tudi pomembno antioksidativno vlogo, saj nevtralizirajo reaktivne kisikove spojine in zmanjšujejo fotooksidativni stres. Njihova prisotnost je še posebej izrazita v senescentnih listih, kjer je fotosintezni aparat že oslavljen, zato antociani omogočajo bolj nadzorovan potek staranja in preprečujejo dodatne poškodbe celic (Lo Piccolo s sod. 2018). Pri vrstah tega rodu imajo antociani pomembno zaščitno vlogo, ki ni odvisna le od njihove količine, temveč tudi od njihove prostorske razporeditve v listu. Ti pigmenti se lahko kopičijo v epidermisu ali mezofilu, pri čemer je njihova funkcija najučinkovitejša, kadar so lokalizirani v bližini mest nastanka reaktivnih kisikovih spojin (Kytridis s sod. 2006). Raziskave kažejo, da genotip predstavnikov rodu *Prunus* določa flavonoidno biosintetsko pot, kar posledično vpliva na količino in sestavo antocianov v listih. Razlike med genotipi se tako odražajo v intenziteti obarvanosti listov ter v sposobnosti rastlin za odziv na stresne razmere, kar dodatno

potrjuje pomembno vlogo antocianov v senescenci (Yang s sod. 2024). Na potek senescence pomembno vplivajo tudi številni okoljski dejavniki. Pri vrsti *Prunus domestica* L. visoke temperature pospešujejo senescenco semenskih zasnov kar vodi v hitrejšo staranje reproduktivnih tkiv in slabšo reproduktivno sposobnost rastline (Đorđević s sod. 2024). Poleg sprememb v pigmentih, se med senescenco pojavijo tudi razlike v vsebnosti in transportu anorganskih ionov. Posamezni ioni so različno mobilni po floemu in imajo zato različno stopnjo remobilizacije ob stresnih razmerah (Maillard s sod. 2015). Amonij (NH_4^+) je v višjih koncentracijah strupen za rastline, zato rastlina njegovo kopičenje omejuje na starejša ali manj aktivna tkiva, kar predstavlja zaščitni mehanizem za mlajše dele rastline (Sousa s sod. 2021). Kalcij je pomembna signalna molekula in ima strukturno vlogo v celičnih stenah in membranah, vendar je slabo mobilen po floemu. S staranjem listov se slabo remobilizira v mlajša tkiva, njegova koncentracija pa ravno zaradi slabe mobilnosti in zaradi sestavnega dela sten ostaja dokaj konstantna (Maillard s sod. 2015). Kalij je esencialen element, ki sodeluje pri osmoregulaciji, transportu asimilatov in encimski aktivnosti ter se zaradi svoje visoke mobilnosti učinkovito prerazporeja znotraj rastline (Zöhr s sod. 2014). V starejših listih je njegova koncentracija nizka, saj se transportira v mlade dele rastline ob staranju in stresnih razmerah (Maillard s sod. 2015). Kloridni ioni so ključni za delovanje fotosistema II, skrbijo za elektrostatski potencial, osmoregulacijo in so kofaktorji nekaterih encimov. V rastlini so ti ioni mobilni in se lahko transportirajo in remobilizirajo, vendar se zaradi svoje vloge v osmoregulaciji in fotosintezi pogosto tudi zadržujejo oziroma akumulirajo v listnih tkivih (Colmenero-Flores s sod. 2019). Dokazano je, da se med senescenco zaradi razgradnje klorofila in fotosinteznih proteinov, poveča koncentracija ionov v rastlinskih izvlečkih (Rolny s sod. 2011). Električna prevodnost rastlinskih izvlečkov je neposredno odvisna od koncentracije raztopljenih ionov, saj povečano iztekanje elektrolitov iz celic vodi do višje prevodnosti raztopine (Bajji s sod. 2002). Z našo raziskavo smo želeli ugotoviti, kako se tekom šestih različnih časovnih točk staranja oz. senescence listov divje češnje, spreminja vsebnost fotosinteznih pigmentov (klorofila in karotenoidov), zaščitnih pigmentov (antocianov), izbranih ionov (amonijevih, kloridnih, kalijevih in kalcijevih ionov) ter celokupna prevodnost. Glede na prebrano literaturo smo predpostavili naslednje hipoteze:

- Vsebnost fotosinteznih pigmentov (klorofilov in karotenoidov) se bo s staranjem listov zmanjšala.
- Vsebnost antocianov se bo s staranjem listov zvišala.
- Vsebnost amonijevih ionov se bo s staranjem listov zvišala.
- Vsebnost kloridnih in kalijevih ionov se s staranjem listov ne bo bistveno spremenila.
- Celokupna prevodnost se bo s staranjem listov povečala.

Material in metode

Priprava rastlinskega materiala

Predhodno liofilizirane liste divje češnje (*Prunus avium*), nabrane enkrat mesečno približno istega dne, v obdobju od maja do oktobra 2025, z istega drevesa v okolici Biotehniške fakultete UL, smo najprej homogenizirali v terilnici s tekočim dušikom do čim bolj finega in homogenega prahu.

Priprava vodnih izvlečkov

Za pripravo vodnih izvlečkov smo zatehtali 2 g homogeniziranega materiala, preostanek pa smo shranili za nadaljnje meritve pigmentov. Zatehtanemu suhemu rastlinskemu materialu, iz šestih časovnih točk, smo dodali 50 mL zakisane destilirane vode (pH 5). Tako smo v "frutkih" (stekleničkah s pokrovčkom) pripravili 6 vzorcev, ki smo jih potem stresali 1 uro pri sobni temperaturi (25°C) in 160 rpm. Zaradi visoke gostote izvlečka smo po stresanju vzorce dodatno centrifugirali, da so se večji delci posedli, nato pa supernatant filtrirali pod nizkim tlakom, da smo odstranili še manjše nečistoče in dobili bister izvleček za nadaljnje analize.

Meritve ionov

Pripravljenih 6 bistrih izvlečkov smo naprej 5-krat redčili, tako da smo dosegli končni volumen 20 mL. Redčili smo tako, da smo 4 mL izvornega izvlečka dodali 16 mL destilirane vode in vzorce vorteksirali. Za vsak posamezen izvleček oz. za eno časovno točko smo naredili 3 ponovitve redčitve, kar je skupaj predstavljalo 18 vzorcev. Meritve ionov smo izvedli z Vernierjevimi senzorji (Go Direct ©), ki smo jih povezali s tabličnimi računalniki (Apple iPad) s programom Graphical Analysis, kjer je bil specifičen senzor namenjen merjenju določenih ionov. Uporabili smo senzorje za prevodnost, amonijev ion (NH_4^+), kloridne ione (Cl^-), kalijeve ione (K^+) in kalcijeve ione (Ca^{2+}). Pred vsako meritvijo smo vzorce vorteksirali 5 sekund in nato počakali, da se odstranijo zračni mehurčki, ki bi lahko vplivali na vrednosti. Vsaka meritev je trajala 1 minuto. Po vsaki meritvi smo senzorje sprali z destilirano vodo in osušili. Iz grafov smo pridobili povprečja, ki smo jih uporabili za nadaljnjo statistično analizo. Meritve z nestabilnim signalom smo ponovili. Pridobljene vrednosti so bile v ppm (oz. mg/L), nato pa smo glede na začetne ekstrakcije in redčitve vrednosti izrazili v mg/g suhe mase listov.

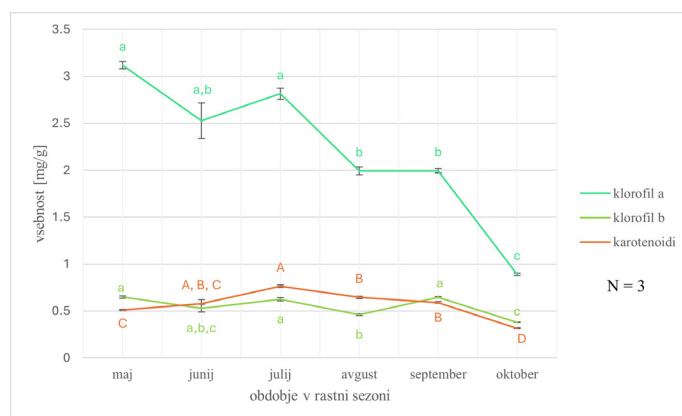
Meritve antocianov

Predhodno pripravljene izvlečke smo 5-krat redčili, tako da smo 300 μL izvlečka dopolnili z 1200 μL destilirane vode. Kot pri meritvah ionov smo naredili 3 tehnične ponovitve za vsak posamezen izvleček. Redčene vzorce smo prenesli v 2 mL mikrocentrifugirke, nato pa izmerili njihovo absorbanco pri 520 nm s spektrofotometrom, kot je to opisano v članku Teng s sod. (2020). Na podlagi izmerjenih absorbc smo izračunali koncentracije antocianov, rezultate pa izrazili kot mg antocianov na gram suhe mase lista (mg/g suhe mase). Določanje vsebnosti asimilacijskih pigmentov Vsebnost asimilacijskih pigmentov smo določili po metodi Lichtenthaler (1987). Iz predhodno pridobljenih homogeniziranih liofiliziranih listov smo zatehtali 50 mg homogeniziranega prahu, kateremu smo dodali 20 mL 100% ohlajenega metanola (4 °C). Tudi pri tej analizi smo pripravili 3 tehnične ponovitve. Vzorce smo dobro premešali in vorteksirali, nato pa jih inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi (25 °C) v temi, da smo preprečili razpad pigmentov. Med inkubacijo smo vzorce vsakih 5 minut večkrat premešali. Po inkubaciji smo izvlečke prefiltrirali z filter papirjem v epruvete, ki smo jih dali centrifugirati na 3 minute pri 2500 rpm. 2 mL supernatanta smo odpipetirali v mikrocentrifugirke in izmerili absorbanco pri 665 nm, 652 nm in 470 nm, ki ustrezajo absorpcijskim maksimumom klorofila a,

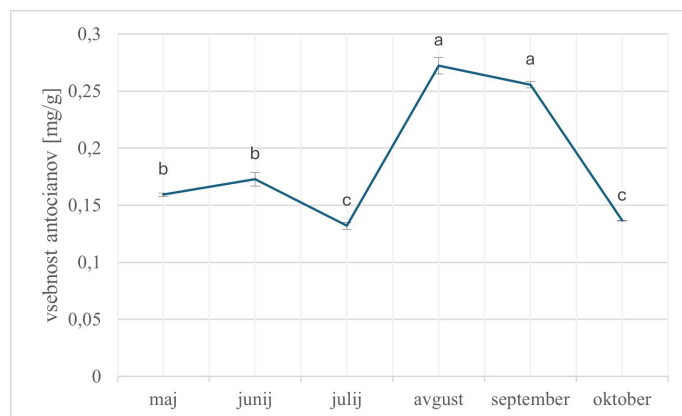
klorofila b in karotenoidov. Izmerjene vrednosti absorbc smo uporabili za določanje koncentracij posameznih pigmentov v različnih fazah razvoja po formulah Lichtenthalerja in Buschmanna (2001). Dobljene koncentracije, izražene v mg/mL, smo nato preračunali v mg/g mase lista.

Statistična analiza

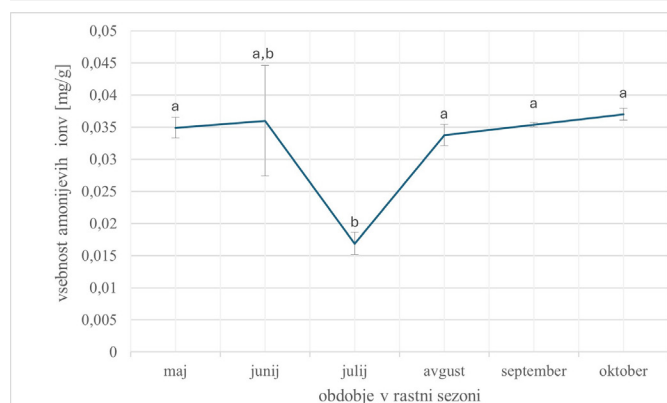
Statistična analiza je bila izvedena v programu Microsoft Excel z uporabo vključka XL Toolbox. Za primerjavo med skupinami izmerjenih absorbc metanolnih in vodnih izvlečkov smo uporabili enosmerno analizo variance (One-way ANOVA). Rezultate smo šteli za statistično značilne pri vrednosti $p \leq 0,05$. V primerih, ko je analiza variance pokazala statistično značilne razlike, smo izvedli še Bonferroni-Holm post-hoc test. Na koncu smo v programu Microsoft Excel pripravili tudi grafični prikaz podatkov.



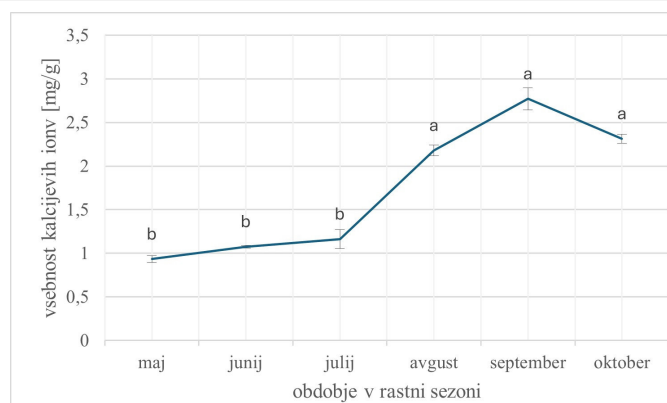
Slika 1. Povprečne vsebnosti fotosinteznih pigmentov (klorofil a, klorofil b in karotenoidov), izražene v mg na g suhe mase lista, v različnih obdobjih rastle sezone češnje (*Prunus avium*). Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ standardna napaka ($n = 3$). Različne črke označujejo statistično značilne razlike v vsebnosti posameznega pigmenta (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test, $p \leq 0,05$).



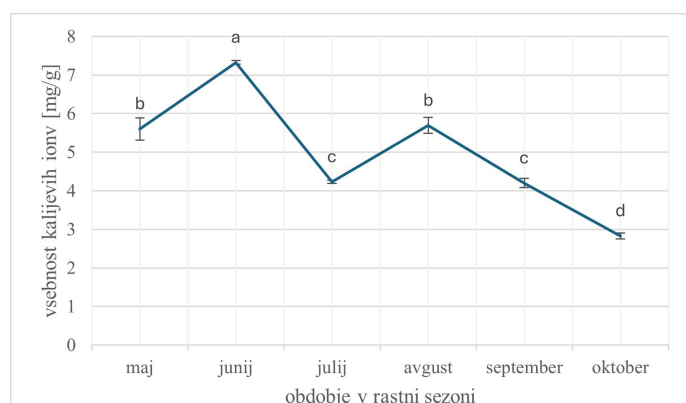
Slika 2. Povprečne vsebnosti antocianov, izražene v mg na g suhe mase lista, v različnih obdobjih rastle sezone češnje (*Prunus avium*). Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ standardna napaka ($n = 3$). Različne črke označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post hoc test, $p \leq 0,05$).



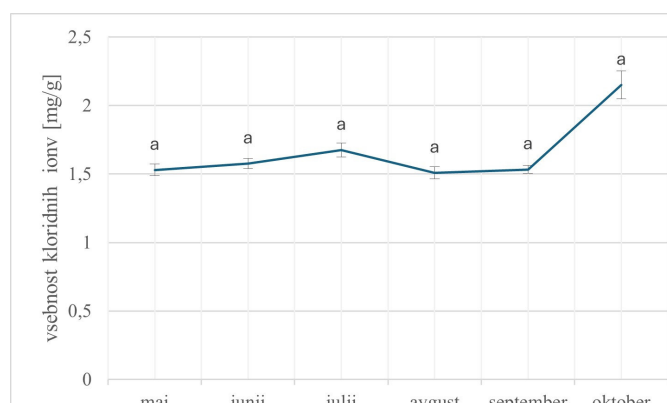
Slika 3. Povprečne vsebnosti amonijevih ionov, izražene v mg na g suhe mase lista, v različnih obdobjih rastne sezone češnje (*Prunus avium*). Prikazane so povprečne vrednosti +/- standardna napaka (n = 3). Različne črke označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post hoc test, $p \leq 0,05$).



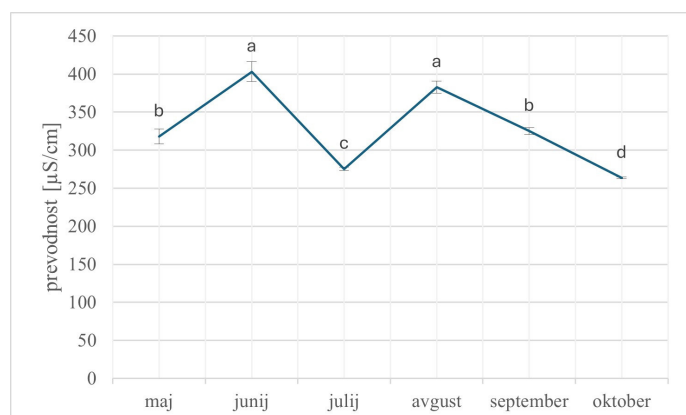
Slika 4. Povprečne vsebnosti kalcijevih ionov, izražene v mg na g suhe mase lista, v različnih obdobjih rastne sezone češnje (*Prunus avium*). Prikazane so povprečne vrednosti +/- standardna napaka (n = 3). Različne črke označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post hoc test, $p \leq 0,05$).



Slika 5. Povprečne vsebnosti kalijevih ionov, izražene v mg na g suhe mase lista, v različnih obdobjih rastne sezone češnje (*Prunus avium*). Prikazane so povprečne vrednosti +/- standardna napaka (n = 3). Različne črke označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post hoc test, $p \leq 0,05$).



Slika 6. Povprečne vsebnosti kloridnih ionov, izražene v mg na g suhe mase lista, v različnih obdobjih rastne sezone češnje (*Prunus avium*). Prikazane so povprečne vrednosti +/- standardna napaka (n = 3). Različne črke označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post hoc test, $p \leq 0,05$).



Slika 7. Povprečne vrednosti prevodnosti, izražene v mikrosimensih na centimeter, v različnih obdobjih rastne sezone češnje (*Prunus avium*). Prikazane so povprečne vrednosti +/- standardna napaka (n = 3). Različne črke označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post hoc test, $p \leq 0,05$).

Rezultati

Vsebnost pigmentov

Z napredovanjem senescence se vsebnost klorofila na splošno zmanjšuje. Na Sliki 1 je pri klorofilu a opazen izrazito padajoč trend. Najvišja vsebnost je bila izmerjena od maja do julija (med 3,12 mg/g in 2,81 mg/g), najnižja pa konec oktobra (0,89 mg/g). Vsebnost klorofila b (Slika 1) je med rastno sezono nihala, vendar je opazen podoben, a manj izrazit trend kot pri klorofilu a. Najvišje vrednosti so bile izmerjene maja (0,65 mg/g), julija (0,62 mg/g) in septembra (0,65 mg/g), medtem ko je oktobra prišlo do upada (na 0,38 mg/g). Vsebnost karotenoidov (Slika 1) pa je sprva nekoliko naraščala do julija, nato pa se je začela zmanjševati. Najvišja vrednost je bila izmerjena julija (0,76 mg/g), najnižja pa oktobra (0,31 mg/g). Na Sliki 2 je razvidno, da je bila vsebnost antocianov od maja do junija dokaj konstantna (med 0,16 mg/g in 0,17 mg/g), julija je upadla (na 0,13 mg/g), avgusta pa močno narasla (na 0,27 mg/g). Po avgustu je ponovno sledilo zmanjšanje do oktobra

(0,14 mg/g).

Vsebnost ionov in prevodnost

Vsebnost amonijevih ionov (Slika 3) je bila skozi večji del rastne sezone približno enaka. Od maja do junija ter od avgusta do oktobra so se vrednosti gibale okoli 0,035 mg/g, z izrazitim, statistično značilnim upadom v juliju (na 0,017 mg/g).

Meritve so pokazale, da se je vsebnost kalijevih ionov v listih češnje skozi sezono na splošno zmanjševala, medtem ko se je vsebnost kalcijevih in kloridnih ionov večinoma povečevala. Na Sliki 4 se opazi, da je vsebnost kalcijevih ionov od maja do septembra naraščala, oktobra pa je trend kazal na zmanjšanje, a razlike niso bile statistično značilne od septembra. Najvišja vsebnost kalcijevih ionov je bila tako izmerjena septembra (2,8 mg/g), najnižja pa maja (0,9 mg/g). Vsebnost kalijevih ionov (Slika 5) je bila maja in avgusta podobna, junija pa se je povečala, julija močno upadla, po manjšem porastu avgusta pa je do oktobra ponovno upadala. Najvišja vsebnost kalijevih ionov je bila izmerjena junija (7,3 mg/g), najnižja pa oktobra (2,8 mg/g). Vsebnost kloridnih ionov (Slika 6) je bila skozi celotno sezono približno konstantna in je znašala med 1,5 mg/g in 2,2 mg/g.

Na Sliki 7 pri prevodnosti ni opazen enoten trend, temveč nihanje med posameznimi meseci. Vrednosti so od maja do junija naraščale, julija upadle, avgusta ponovno narasle, nato pa do oktobra padale, najvišja prevodnost je bila izmerjena junija (403 $\mu\text{S}/\text{cm}$), najnižja pa na konec sezone, torej oktobra (263 $\mu\text{S}/\text{cm}$).

Diskusija

V našem eksperimentu smo v listih divje češnje tekom šestih mesecev (od maja do oktobra) z uporabo različnih metod spremljali vsebnost fotosinteznih pigmentov, antocianov, izbranih ionov in celokupno prevodnost. Iz rezultatov vidimo, da se je vsebnost fotosinteznih pigmentov (klorofilov in karotenoidov) s staranjem listov zmanjšala. Vsebnosti vseh pigmentov so bile konec oktobra (klorofil a 0,89 mg/g, klorofil b 0,38 mg/g, karotenoidi 0,31 mg/g) bistveno nižje kot maja (klorofil a 3,12 mg/g, klorofil b 0,65 mg/g, karotenoidi 0,51 mg/g). To je v skladu z opažanji ontogenetskih sprememb pri *Prunus cerasifera*, kjer je senescenca privedla do razgradnje pigmentov (Lo Piccolo s sod. 2018). Kljub temu smo pri vseh treh pigmentih zaznali manjše nepričakovano povišanje vrednosti v juliju in povišanje vrednosti klorofila b v septembru. Rahlo povečanje v juliju bi lahko odražalo, da so bili listi v tej fazi še v funkcionalni fazi, ko je fotosintezna kapaciteta največja in je posledično vsebnost pigmentov visoka (Ai s sod. 2026). Rezultati raziskave Ai s sod. (2026) so pokazali, da so pri sorti sladke češnje 'Tieton' v funkcionalni fazi listov fotosintezni parametri najvišji, nato pa se začnejo postopoma zmanjševati. Vmesno povečanje klorofila b v septembru ne sovпада z rezultati drugih raziskovalcev. Mattila s sod. (2018) so pri vrsti *Prunus padus* pokazali, da med jesenskim senescenčnim procesom klorofil pri posameznih listih ostane večino časa stabilen in šele v zadnji fazi pride do hitre razgradnje pigmenta – tako za klorofila a kot b.

Iz rezultatov antocianov vidimo, da se vsebnost antocianov s staranjem listov ni zvezno povečevala, temveč je od maja (0,16 mg/g) do julija (0,13 mg/g) upadla, nato do avgusta in septembra narasla (do 0,27 mg/g) in do oktobra ponovno

upadla (0,14 mg/g). Naraščanje antocianov v poletnem obdobju, ko je svetlobna obremenitev zelo visoka, je skladno z raziskavo Lo Piccolo s sod. (2018), kjer so pokazali, da so se antociani ob svetlobnem in temperaturnem stresu na novo sintetizirali, predvsem v povrhnjici. Ko listi vstopijo v napredno senescenco, se antociani postopoma razgradijo (Lisandru s sod. 2018).

Iz vsebnost amonijevih ionov (NH_4^+) v rezultatih lahko opazimo, da se ta s staranjem listov ni zvišala. Poleg tega smo v juliju zaznali izrazit padec na 0,02 mg/g, kar predstavlja največji negativni odklon v celotnem časovnem obdobju. Padec vsebnosti amonijevih ionov v juliju bi lahko odražal obdobje intenzivne asimilacije dušika, ko se amonijevi ioni hitro vgrajujejo v aminokisline prek sistema glutaminsintetaza / glutamat sintaza. Kasnejše ponovno naraščanje pa bi lahko bilo povezano z napredovanjem senescence, saj med staranjem listov prihaja do razgradnje kloroplastov in beljakovin (predvsem Rubisco), pri čemer se sproščajo amonijevi ioni kot produkt deaminacije aminokislin (Masdaux-Daubresse s sod. 2010). V poznejšem delu sezone smo zaznali trend zvišanja (a razlike niso bile statistično značilne), kar je delno primerljivo z opažanji Rolny s sod. (2011), ki so pri ječmenu pokazali, da se med napredujočo senescenco koncentracija amonijevih ionov v listih izrazito poveča.

Vsebnost kloridnih ionov je bila skozi sezono razmeroma stabilna, kar je skladno z njihovo esencialno vlogo pri osmoregulaciji, vzdrževanju turgorja in delovanju fotosistema II, zaradi katerih rastlina aktivno vzdržuje določeno raven kloridnih ionov v listnih tkivih (Colmenero-Flores s sod. 2019). Maillard s sod. (2015) so v analizi remobilizacije mineralov pri različnih rastlinskih vrstah ugotovili, da kloridni ioni niso pokazali statistično značilne remobilizacije med senescenco, kar je skladno z razmeroma stabilnimi vrednostmi v našem poskusu. V nasprotju s tem se je vsebnost kalcijevih ionov skozi sezono postopno povečevala, kar je v skladu z njihovo omejeno mobilnostjo v floemu. Kalcij se namreč prenaša predvsem po ksilemu s transpiracijskim tokom, zato se z napredovanjem senescence kopiči v listih in se ne prerazporeja učinkovito v trajne dele rastline. Maillard s sod. (2015) navajajo, da je kalcij med makroelementi najslabše remobiliziran med senescenco, pri čemer njegova učinkovitost remobilizacije pri večini vrst ne preseže 20 %, kar se odraža v kopičenju kalcija v listnih tkivih. Podobno omejeno mobilnost kalcija je pri jesenski senescenci listov bukev (*Fagus sylvatica*) opisal tudi Tyler (2005), kjer je ugotovil, da se kalcij zadržuje v listnem tkivu, medtem ko se mobilnejši elementi, kot sta dušik in kalij, učinkovito prerazporedijo v trajna skladiščna tkiva.

Vrednosti celokupne električne prevodnosti so s staranjem listov nihale brez enotnega trenda do vključno avgusta, nato pa je bil opažen izrazito padajoč trend. Ker je električna prevodnost odvisna od skupne koncentracije raztopljenih ionov (Rolny s sod. 2011), opažena nihanja verjetno odražajo spremembe v skupni ionski sestavi listnega tkiva. Trend celokupne električne prevodnosti je bil podoben trendu vsebnosti kalija, kar nakazuje, da je kalij verjetno pomembno prispeval k opaženi ionski dinamiki listnega tkiva. Vsebnost kalijevih ionov, ki so bili med merjenimi ioni zastopani v najvišjih koncentracijah, je pokazala nelinearen trend, z izrazitim porastom junija (7,3 mg/g), ki bi ga lahko pojasnili z intenzivno fotosintezno aktivnostjo in povečanim privzemom hranil iz tal v tem obdobju (Zörb s sod. 2014). Julija je sledil

izrazit upad, ki bi ga lahko pripisali povečani porabi kalija med razvojem plodov ter remobilizaciji asimilatov v razmnoževalne organe, kar zmanjša njegovo koncentracijo v listih (Maillard s sod. 2015). Ponoven porast avgusta bi lahko bil posledica povečanja privzema kalija iz tal. Do oktobra je sledilo postopno upadanje do najnižje vrednosti (2,8 mg/g), kar odraža učinkovito remobilizacijo kalija iz starajočih se listov v trajne dele rastline (Maillard s sod. 2015). Ta proces verjetno prispeva k zmanjšanju električne prevodnosti v pozni sezoni. Kljub pričakovanim učinkom senescence, kot je povečano iztekanje elektrolitov (Rolny s sod. 2011), tega v naši raziskavi nismo zaznali, kar verjetno nakazuje, da je vpliv remobilizacije ionov prevladal nad učinkom membranske degradacije.

Zaključek

V naši raziskavi smo spremljali senescenco listov divje češnje (*Prunus avium*) ter opazovali kaj se pri tem dogaja z vsebnostjo fotosinteznih pigmentov in ionskim ravnovesjem ter celokupno prevodnostjo. Z napredovanjem sezone smo zaznali izrazit upad fotosinteznih pigmentov, kar potrjuje postopno razgradnjo kloroplastov kot enega ključnih znakov staranja listov. Hkrati so antociani dosegli vrh že pred koncem rastne sezone, kar kaže, da njihova sinteza ni zgolj posledica senescence, temveč je odvisna tudi od okoljskih dejavnikov, zlasti svetlobnih razmer in temperature. Posebno pozornost smo namenili spremembam v mobilnosti mineralnih elementov. Amonijevi ioni tekom raziskave niso naraščali, kar je lahko posledica aktivne ponovne asimilacije amonija v rastlini, njegove pretvorbe v druge dušikove spojine ter remobilizacije dušika med senescenco listov. Vsebnost kloridnih ionov je ostajala razmeroma stabilna, medtem ko se je vsebnost kalcijevih ionov postopno povečevala, kar bi lahko bila posledica njihove omejene floemske mobilnosti. Kalij je kazal izrazito nelinearno dinamiko z junijskim zmanjšanjem, avgustovskim zvišanjem in jesenskim upadom, kar odraža kompleksno ravnoesje med privzemom, porabo in remobilizacijo v času razvoja in senescence. Skladno s tem so nihanja celokupne električne prevodnosti odražala celostno ionsko dinamiko listnega tkiva, ki je posledica tako strukturnih sprememb zaradi napredovanja senescence kot tudi aktivne remobilizacije mobilnih ionov, pri čemer je imel kalij verjetno ključno vlogo.

Ti rezultati kažejo, da je senescenca funkcionalno usmerjen proces, katerega namen ni zgolj razgradnja, temveč tudi učinkovita remobilizacija virov v rastlini. S tem je bila hipoteza o zmanjšanju fotosinteznih pigmentov potrjena, hipoteze o naraščanju amonijevih ionov, antocianov in celokupne električne prevodnosti niso bile potrjene, hipoteza o stabilnosti kloridnih in kalcijevih ionov pa je bila le delno potrjena. Iz naše raziskave je razvidno, da senescenca ne poteka enotno znotraj vseh rastlin pač pa na njen potek, poleg zunanjih dejavnikov, pomembno vpliva ravno rastlinska vrsta. Ti zaključki predstavljajo osnovo za nadaljnje raziskave, usmerjene v boljše razumevanje mehanizmov staranja listov in remobilizacijo hranil, v različnih rastlinskih vrstah in podrobnejšo primerjavo za boljše razumevanje tega procesa.

Literatura

1. Ai JY, Cai F, Chen Y, He ML, Luo C, Zhang QJ, 2026. Characteristics of photosynthetic function in different leaf ages of 'Tieton' sweet cherry in a greenhouse. *Photosynthetica* 64:36–42.
2. Bajji M, Kinet JM, Lutts S, 2002. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation* 36:61–70.
3. Colmenero-Flores JM, Franco-Navarro JD, Cubero-Font P, Peinado-Torrubia P, Rosales MA, 2019. Chloride as a beneficial macronutrient in higher plants: new roles and regulation. *International Journal of Molecular Sciences* 20:4686.
4. Đorđević M, Cerović R, Meland M, Akšić MF, 2024. The effect of different temperatures on the viability and senescence of plum ovules (*Prunus domestica* L.). *Plants* 13:1359.
5. Erhart T, Mittelberger C, Vergeiner C, Scherzer G, Holzner B, Robatscher P, Oberhuber M, Kräutler B, 2016. Chlorophyll catabolites in senescent leaves of the plum tree (*Prunus domestica*). *Chemistry & Biodiversity* 13:1441–1453.
6. Guo Y, Ren G, Zhang K, Li Z, Miao Y, Guo H, 2021. Leaf senescence: progression, regulation, and application. *Molecular Horticulture* 1:1–25.
7. Kytridis VP, Manetas Y, 2006. Mesophyll versus epidermal anthocyanins as potential in vivo antioxidants: evidence linking the putative antioxidant role to the proximity of oxy-radical source. *Journal of Experimental Botany* 57:2203–2210.
8. Lichtenthaler HK, 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148:350–382.
9. Lichtenthaler HK, Buschmann C, 2001. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* F4.3.1–F4.3.8.
10. Lim PO, Kim HJ, Gil Nam H, 2007. Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology* 58:115–136.
11. Lisandru TT, Bunea A, Füstös A, Dumitraş A, Bunea CI, Dan VS, Gál E, Mitre V, 2018. Chromatographic analysis of carotenoids and anthocyanins in sweet cherry autumn leaves used in ornamental landscapes. *Studia UBB Chemia* 63:143–155.
12. Lo Piccolo E, Landi M, Pellegrini E, Agati G, Giordano C, Giordani T, Lorenzini G, Malorgio F, Massai R, Nali C, Rallo G, Remorini D, Vernieri P, Guidi L, 2018. Multiple consequences induced by epidermally-located anthocyanins in young, mature and senescent leaves of *Prunus*. *Frontiers in Plant Science* 9:917.
13. Maillard A, Diquélou S, Billard V, Laîné P, Garnica M, Prudent M, Garcia-Mina JM, Yvin JC, Ourry A, 2015. Leaf mineral nutrient remobilization during leaf senescence and modulation by nutrient deficiency. *Frontiers in Plant Science* 6:317.
14. Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A, 2010. Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* 105:1141–1157.
15. Mattila H, Valev D, Havurinne V, Khorobrykh S, Virtanen O, Antinluoma M, Mishra KB, Tyystjärvi E, 2018. Degradation of chlorophyll and synthesis of flavonols during autumn senescence – the story told by individual leaves. *AoB PLANTS* 10:101028.
16. OpenAI. (2026). ChatGPT (25. april). [jezikovno urejanje besedila] <https://chat.openai.com/>
17. Rolny N, Costa L, Carrión C, Guamet JJ, 2011. Is the electrolyte leakage assay an unequivocal test of membrane deterioration during leaf senescence? *Plant Physiology and Biochemistry* 49:1220–1227.
18. Sedigheh HG, Mortazavian M, Norouzi D, Atyabi M, Akbarzadeh A, Hasanpoor K, Ghorbani M, 2011. Oxidative stress and leaf senescence. *BMC Research Notes* 4:477.
19. Sousa RT, Paiva ALS, Carvalho FEL, Alencar VTCB, Silveira JAG, 2021. Ammonium overaccumulation in senescent leaves as a novel exclusion mechanism to avoid toxicity in photosynthetically active rice leaves. *Environmental and Experimental Botany* 186:104457.
20. Teng Z, Jiang X, He F, Bai W, 2020. Qualitative and quantitative methods to evaluate anthocyanins. *eFood* 1:339–346.
21. Tyler G, 2005. Changes in the concentrations of major, minor and rare-earth elements during leaf senescence and decomposition in

- a *Fagus sylvatica* forest. *Forest Ecology and Management* 206:167–177.
22. Welk E, de Rigo D, Caudullo G, 2016. *Prunus avium* in Europe: distribution, habitat, usage and threats. *European Atlas of Forest Tree Species* 1:140–141.
23. Yang C, Sun N, Qin X, Liu Y, Sui M, Zhang Y, Hu Y, Mao Y, Shen X, 2024. Analysis of flavonoid metabolism of compounds in succulent fruits and leaves of three different colors of Rosaceae. *Scientific Reports* 14:4933.
24. Zörb C, Senbayram M, Peiter E, 2014. Potassium in agriculture – status and perspectives. *Journal of Plant Physiology* 171:656–669.

Vpliv senescence na vsebnost fotosinteznih pigmentov in izbranih ionov v listih ginka (*Ginkgo biloba*)

Artur Bonaca, Domen Alegro, Vasja Bahar, Špela Logar, Zala Pahovnik

Študij biotehnologije, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

- Poskus je bil izveden z namenom analize vpliva senescence (staranje listov) na vsebnost fotosinteznih pigmentov ter izbranih ionov v listih ginka (*Ginkgo biloba*) tekom rastne sezone
- Vsebnost fotosinteznih pigmentov smo določili s pripravo metanolnih izvlečkov liofiliziranih in strtih listov zbranih enkrat na mesec med majem in oktobrom, njihovo količino pa smo merili s spektrofotometrično analizo absorbance. Vzorce antocianov in ionov smo pridobili z vodnim ekstraktom suhih listov, vsebnost antocianov smo izmerili spektrofotometrično, koncentracijo ionov pa z Vernierjevimi senzorji.
- Vsebnost klorofila a in b je bila najvišja poleti, v septembru in oktobru pa je občutno upadla. Karotenoidi in antociani so sledili podobnemu vzorcu z viškom v avgustu. Vrednost antocianov v septembru se statistično ni razlikovala od vrednosti v oktobru ali maju, preostale vrednosti pa so bile statistično različne med seboj. Koncentracija vseh merjenih ionov je bila najvišja maja in je postopno padala do oktobra.
- Rezultati potrjujejo, da senescenca pri ginku poteka postopno in je najbolj izražena v jesenskih mesecih. Razgradnja klorofilov in upad ionskih koncentracij sta torej zanesljiva pokazatelja napredovanja senescence.

Ključne besede: klorofil, klor, kalcij, kalij, amonij, prevodnost

Uvod

Višje rastline se skozi svojo življenjsko dobo vidno spreminjajo. Skozi leto in celotni rastni čas opazimo vidne in stalne pojave, kot je sprememba barve listov ter odpadanje listov. To so znaki senescence (staranja), avtolitičnega procesa, ki je odvisen od genske regulacije same rastline ter vpliva okolja (Zhang s sod. 2021 a). Proces se začne z remobilizacijo hranil iz starih listov v druge organe in se konča z odpadanjem listov (Doan s sod. 2024).

Najbolj vidna znaka rastlinske senescence sta razgradnja klorofila ter izguba fotosintezne aktivnosti na račun razpadanja kloroplastov (Yang s sod. 2013). Med senescenco se klorofil in kasneje karotenoidi zaradi nižjih temperatur, krajših dni ter povečanja stresa rastline začnejo razgrajevati. V listu tako ostanejo druga asimilacijska barvila kot so karotenoidi ter sekundarni metaboliti kot so flavonoidi in antociani (Doan s sod. 2024). Razmerje med klorofili in karotenoidi se tekom jeseni premakne v prid karotenoidov, kar se sklada z barvno spremembo listov samih, ki so jo pri ginku (*Ginkgo biloba*) potrdile tudi predhodne študije (Li s sod. 2020; Yang s sod. 2013).

Na senescenco poleg pigmentov vpliva tudi vsebnost specifičnih ionov v rastlini. Pomanjkanje dušika vodi v zgodnjo senescenco, medtem ko akumulacija NH_4^+ njen nastop pospešuje zaradi toksičnosti amonijaka (Jian s sod. 2018; Wen s sod. 2020). Iz spreminjanja koncentracije ionov lahko sklepamo o raznih metaboličnih procesih v rastlini — upad kalcija lahko nakazuje razgradnjo celičnega matriksa, upad amonijevih ionov pa govori o uspešni reciklaciji dušika oziroma transportu iona iz listov v druge organe (Lee s sod. 2003; Zhang s sod. 2021 a). Nihanje vsebnosti ionov se tako izkaže za zanesljiv pokazatelj procesov senescence v rastlini.

Namen poskusa je bil analizirati vsebnost fotosinteznih pigmentov in izbranih ionov v listih *Ginkgo biloba* tekom celotne rastne sezone od maja do oktobra. Postavili smo dve hipotezi: vsebnost klorofila v listih ginka se bo začela manjšati v jesenskih mesecih, medtem ko bo nivo karotenoidov in flavonoidov ostal približno enak, brez večjih nihanj; koncentracije ionov bodo tekom senescence upadale, kar bo odražalo postopno remobilizacijo hranil in razgradnjo celičnih struktur.

Materiali in metode

Rastlinski material

Za raziskavo vpliva senescence smo uporabili liofilizirane liste ginka (*Ginkgo biloba*). Vzorčenje listov je potekalo enkrat mesečno, v obdobju od maja do oktobra, z namenom ugotavljanja razlik v vsebnosti pigmentov in izbranih ionov tekom različnih faz senescence. Liofilizirane liste smo pred nadaljnjo analizo ročno strli in homogenizirali v fin prah, da bi zagotovili čim večjo homogenost in reprezentativnost vzorcev.

Priprava vodnih izvlečkov

Za določanje vsebnosti izbranih ionov in antocianov smo pripravili vodne izvlečke. V steklene posodice smo zatehtali 1 g strtega liofiliziranega rastlinskega materiala in mu dodali 50 mL zakisane destilirane vode (ddH_2O) s pH 5. Mešanico smo stresali 1 uro pri sobni temperaturi (25 °C) s hitrostjo 160

obratov na minuto (rpm). Po končanem stresanju smo vzorce filtrirali pod znižanim tlakom. Dobljene filtrate smo prenesli v ustrezno označene falkone.

Priprava metanolnih izvlečkov in določanje fotosinteznih pigmentov

Za določanje vsebnosti fotosinteznih pigmentov (klorofila a, klorofila b in karotenoidov) smo pripravili metanolne izvlečke po metodi, ki jo opisuje (Lichtenthaler 1987). V epruveto smo zatehtali 50 mg strtega prahu liofiliziranih listov in dodali 20 mL 100-odstotnega ohlajenega metanola (s temperaturo 4 °C). Mešanico smo dobro premešali, vorteksirali in inkubirali od 30 do 60 minut pri sobni temperaturi v temi, pri čemer smo vzorce vmes večkrat premešali. Ekstrakt smo nato prefiltrirali skozi filter papir, ga razdelili v centrifugirke (po dobrih 5 mL) in centrifugirali 3 minute pri 4200 rpm. Supernatant (2 mL) smo prenesli v mikrocentrifugirko in spektrofotometrično izmerili absorbanco pri valovnih dolžinah 665 nm, 652 nm in 470 nm.

Določanje vsebnosti antocianov

Vsebnost antocianov smo določali spektrofotometrično iz predhodno pripravljenih vodnih izvlečkov po metodi, ki jo opisujejo (Teng s sod. 2020). Vzorce smo 5-kratno redčili, tako da smo v 2 mL mikrocentrifugirke odpipetirali 300 μL izvlečka in mu dodali 1200 μL ddH_2O . Za vsak vzorec smo pripravili po tri biološke ponovitve. Absorbanco vzorcev smo izmerili pri valovni dolžini 520 nm. Koncentracijo antocianov smo izračunali po naslednji formuli in jo izrazili kot ekvivalente cianidin-3-glukozida: $C \text{ (mg/L)} = (A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000) / (\epsilon \times l)$. Pri izračunu smo uporabili molekulsko maso (MW) cianidin-3-glukozida, ki znaša 449,2 g/mol, in njegov molarni ekstinkcijski koeficient (ϵ), ki je 26.900 L/mol·cm. Faktor redčitve (DF) je bil 5, dolžina optične poti standardne kivete (l) pa 1 cm. Končne rezultate smo izrazili v miligramih na gram suhe mase lista (mg/g).

Meritve izbranih ionov in prevodnosti

Meritve izbranih ionov in prevodnosti vodnih izvlečkov smo izvedli s pomočjo Vernierjevih senzorjev (Go Direct®). Merili smo celokupno prevodnost, koncentracijo amonijaka (NH_4^+), kloridnih (Cl^-), kalijevih (K^+) in kalcijevih ionov (Ca^{2+}). Vodne izvlečke smo pred meritvami 5-kratno redčili, pri čemer smo 4 mL izvornega vzorca zmešali s 16 mL ddH_2O , da smo dosegli zahtevan končni volumen vsaj 20 mL. Za vsak izvleček smo meritev izvedli v treh ponovitvah. S pomočjo tabličnega računalnika smo spremljali oba kanala (parameter in potencial). Posamezna meritev vzorca je zaradi nihanja meritev trajala 1 minuto, upoštevali pa smo povprečno izmerjeno vrednost. Med menjavo vzorcev smo senzorje vselej temeljito sprali z ddH_2O in jih obrisali.

Obdelava in statistična analiza podatkov

Za obdelavo surovih podatkov in ugotavljanje statistično značilnih razlik v vsebnosti merjenih parametrov smo uporabili program MS Excel z dodatkom XL-toolbox. Statistično pomembnost razlik smo preverjali z enosmerno analizo variance (one-way ANOVA, $p < 0,05$), za naknadne primerjave med skupinami pa smo uporabili Holm-Sidakov post-hoc test.

Rezultati

Fotosintezni pigmenti

Na Sliki 1 lahko opazimo, da je bila vsebnost klorofila a med majem, julijem in avgustom dokaj primerljiva in je znašala okoli 3 mg/g z izjemo junija, ko je bila nekoliko nižja in sicer približno 2 mg/g. V septembru in oktobru se je vsebnost klorofila a bistveno zmanjšala in sicer za več kot 3x glede na poletne mesece in je znašala med 0,72 in 0,85 mg/g. Vsebnost klorofila b se je statistično razlikovala v juniju in avgustu, kjer je bila najnižja v juniju, približno 0,49 mg/g in najvišja v avgustu okoli 1,53 mg/g. Vrednosti v preostalih mesecih so ostale med tema dvema ekstremoma in se od niju niso statistično razlikovale. Podoben vzorec je opazen tudi pri karotenoidih, katerih vsebnost je dosegla višek v avgustu okoli 0,15 mg/g, najnižje vrednosti karotenoidov, so bile pa zabeležene v juniju in juliju, med 0,03 in 0,05 mg/g. Iz Slike 1 je razvidno, da med analiziranimi fotosintezni pigmenti prevladuje klorofil a, ki v vseh obravnavanih mesecih dosega najvišje koncentracije. Sledi mu klorofil b z nižjimi vrednostmi, medtem ko so koncentracije karotenoidov najnižje.

Antociani

Vsebnost antocianov v listih se je skozi rastno sezono spreminjala (Slika 2). Najnižja vsebnost antocianov je bila izmerjena junija in je znašala približno 0,046 mg/g suhe mase. Nato se je vsebnost začela povečevati ter avgusta dosegla najvišjo vrednost, približno 0,128 mg/g suhe mase. V septembru se je vsebnost nekoliko zmanjšala na približno 0,092 mg/g suhe mase, v oktobru pa je ostala relativno podobna in je znašala približno 0,099 mg/g suhe mase. Rezultati kažejo, da se je vsebnost antocianov proti koncu poletja in v jesenskem obdobju povečala.

Kloridni ioni (Cl^-)

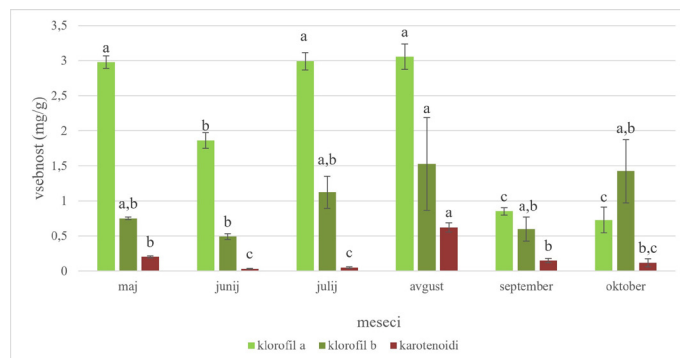
Vsebnost kloridnih ionov je bila od maja do avgusta razmeroma stabilna (Slika 3). Maja je znašala približno 4,39 mg/g suhe mase, junija 4,09 mg/g, julija 3,16 mg/g, avgusta pa ponovno narasla na približno 4,24 mg/g suhe mase. V septembru se je vsebnost zmanjšala na približno 2,98 mg/g suhe mase, najnižja vrednost pa je bila izmerjena oktobra, ko je znašala približno 2,24 mg/g suhe mase. Rezultati nakazujejo postopno zmanjševanje vsebnosti kloridnih ionov proti koncu rastne sezone.

Kalijeve ioni (K^+)

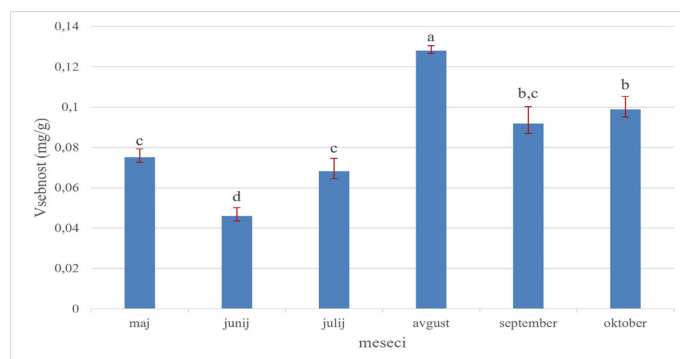
Vsebnost kalijevih ionov se je skozi rastno sezono izrazito zmanjševala (Slika 4). Najvišja vsebnost je bila izmerjena maja in je znašala približno 2,63 mg/g suhe mase. Junija se je zmanjšala na približno 1,22 mg/g suhe mase, julija pa ponovno nekoliko povečala na približno 1,75 mg/g suhe mase. Avgusta je vsebnost ponovno upadla na približno 1,13 mg/g suhe mase, v septembru in oktobru pa dosegla najnižje vrednosti, približno 0,35 mg/g oziroma 0,26 mg/g suhe mase. Rezultati kažejo izrazit upad vsebnosti kalijevih ionov proti koncu rastne sezone.

Kalcijevi ioni (Ca^{2+})

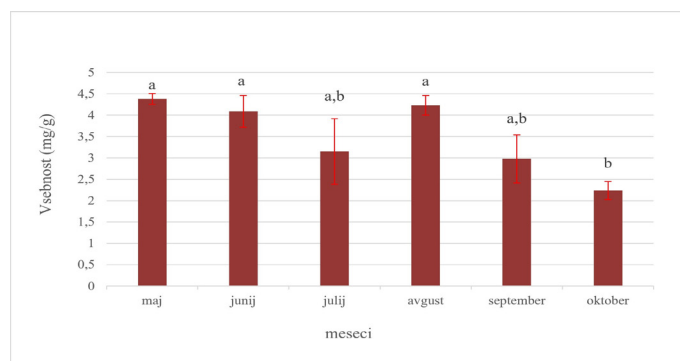
Vsebnost kalcijevih ionov je bila najvišja maja, ko je znašala



Slika 1. Povprečna vsebnost fotosintezni pigmentov (klorofil a, klorofil b in karotenoidi) v mg/g ter standardnih odklonov (SD, N=3) v odvisnosti od meseca vzorčenja. S črkami a,b,c so označene statistične pomembne razlike v vsebnosti posameznega fotosinteznega pigmenta (enosmerna ANOVA, $p < 0,05$, Holm-Sidak post hoc test).

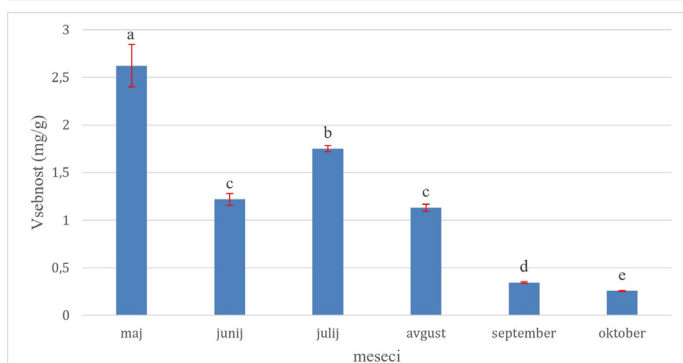


Slika 2. Povprečna vsebnost antocianov (mg/g suhe mase) glede na mesec vzorčenja. Navpične daljice predstavljajo standardni odklon (SD, N = 3). Različne črke označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, $p < 0,05$, Holm-Sidak post hoc test).

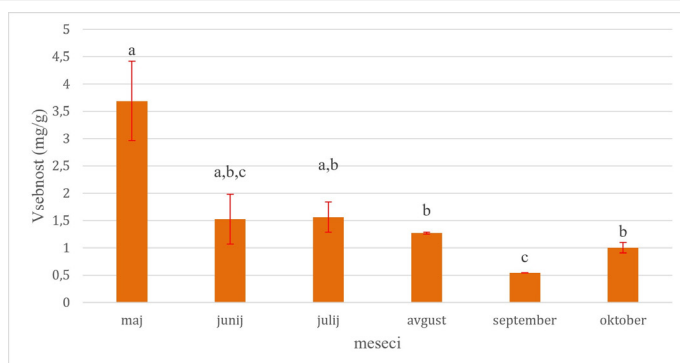


Slika 3. Povprečna vsebnost kloridnih ionov (Cl^-) v mg/g suhe mase glede na mesec vzorčenja. Navpične daljice predstavljajo standardni odklon (SD, N = 3). Različne črke označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, $p < 0,05$, Holm-Sidak post hoc test).

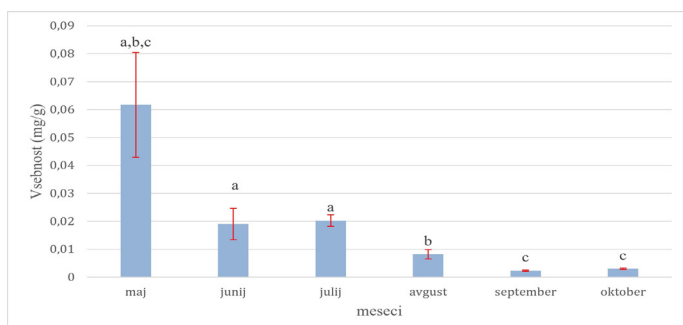
približno 3,69 mg/g suhe mase (Slika 5). Junija in julija se je zmanjšala na približno 1,53 mg/g oziroma 1,57 mg/g suhe mase, avgusta pa na približno 1,27 mg/g suhe mase. Najnižja vrednost je bila izmerjena septembra in je znašala približno 0,54 mg/g suhe mase, oktobra pa se je vsebnost ponovno nekoliko povečala na približno 1,01 mg/g suhe mase.



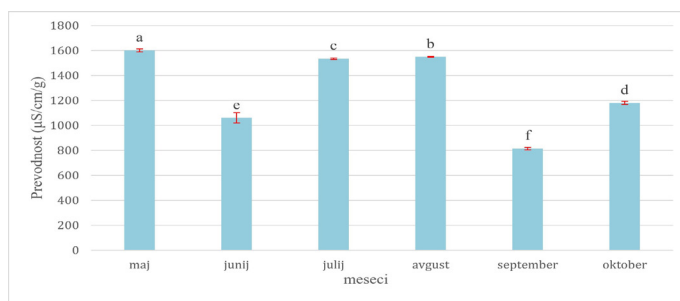
Slika 4. Povprečna vsebnost kalijevih ionov (K^+) v mg/g suhe mase glede na mesec vzorčenja. Navpične daljice predstavljajo standardni odklon (SD, N = 3). Različne črke označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, $p < 0,05$, Holm–Sidak post hoc test).



Slika 5. Povprečna vsebnost kalcijevih ionov (Ca^{2+}) v mg/g suhe mase glede na mesec vzorčenja. Navpične daljice predstavljajo standardni odklon (SD, N = 3). Različne črke označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, $p < 0,05$, Holm–Sidak post hoc test).



Slika 6. Povprečna vsebnost amonijevih ionov (NH_4^+) v mg/g suhe mase glede na mesec vzorčenja. Navpične daljice predstavljajo standardni odklon (SD, N = 3). Različne črke označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, $p < 0,05$, Holm–Sidak post hoc test).



Slika 7. Povprečne vrednosti celokupne prevodnosti glede na mesec vzorčenja. Navpične daljice predstavljajo standardni odklon (SD, N = 3). Različne črke označujejo statistično značilne razlike (enosmerna ANOVA, $p < 0,05$, Holm–Sidak post hoc test).

Amonijevi ioni (NH_4^+)

Vsebnost amonijevih ionov se je skozi rastno sezono postopno zmanjševala (Slika 6). Maja je znašala približno 0,062 mg/g suhe mase, junija pa se je zmanjšala na približno 0,019 mg/g suhe mase. Julija je bila vsebnost podobna in je znašala približno 0,021 mg/g suhe mase, avgusta pa se je ponovno zmanjšala na približno 0,008 mg/g suhe mase. Najnižje vrednosti so bile izmerjene septembra in oktobra, ko je vsebnost znašala približno 0,003 mg/g oziroma 0,003 mg/g suhe mase. Rezultati kažejo izrazit upad vsebnosti amonijevih ionov proti koncu rastne sezone.

Celokupna prevodnost

Meritve celokupne prevodnosti so pokazale spreminjanje vrednosti skozi rastno sezono (Slika 7). Najvišja prevodnost je bila izmerjena maja in je znašala približno 1601,80, junija pa se je zmanjšala na približno 1061,00. Julija in avgusta sta bili vrednosti ponovno višji in sta znašali približno 1535,20 oziroma 1549,40. Najnižja prevodnost je bila izmerjena septembra, ko je znašala približno 814,80, oktobra pa se je ponovno povečala na približno 1180,40.

Diskusija

Vsebnost fotosinteznih pigmentov

Rezultati naše raziskave kažejo določena odstopanja od pričakovanih sezonskih trendov fotosinteznih pigmentov v listih ginka (*Ginkgo biloba*). Na podlagi literature bi pričakovali postopno zmanjševanje koncentracij klorofilov a in b ob prehodu iz poletja v jesen, kar je povezano s procesom senescence listov. Študije poročajo, da koncentracije obeh klorofilov dosežejo maksimum v poletnih mesecih, nato pa postopno upadajo proti koncu vegetacijske sezone (Zhang s sod. 2021 b).

V naših rezultatih je pri klorofilu a opazen nepričakovan padec koncentracije v juniju, ki mu sledi ponoven porast v juliju in avgustu. Takšen trend ni v skladu z uveljavljenimi sezonskimi vzorci, zato ga je smiselno pripisati variabilnosti vzorčenja. Verjetno so bili analizirani listi v tem obdobju fiziološko manj reprezentativni (npr. delno poškodovani, različno osvetljeni ali različno stari), kar je vplivalo na izmerjene vrednosti. Kljub temu pa je v septembru in oktobru zaznan upad koncentracije klorofila a skladen s pričakovanji, saj se klorofil med senescenco razgrajuje, pri čemer se klorofil a razgrajuje hitreje kot klorofil b (Lee s sod. 2003).

Pri klorofilu b so bile koncentracije v večini časovnih točk primerljive, kar podpira ugotovitve iz literature, da je klorofil b stabilnejši in se razgrajuje počasneje kot klorofil a (Lee s sod. 2003), saj je vezan na svetlobno-žetvene komplekse fotosistemov (Horie s sod. 2009). Posledično se razmerje klorofil a/b med senescenco zmanjšuje (Lee s sod. 2003). Karotenoidi v naši raziskavi ne kažejo izrazitega sezonskega upadanja v prehodu iz poletnega v jesensko obdobje, saj so rezultati precej variabilni. V literaturi je opisano, da se med senescenco klorofil razgrajuje hitreje, kar vodi do zmanjšanja njegove koncentracije in s tem do večje relativne vsebnosti karotenoidov v listih (Jurčević Šangut in Šamec 2024). Zaradi tega karotenoidi v jesenskem obdobju prispevajo k značilnemu rumenemu obarvanju listov ginka. Kljub temu so bile v naši raziskavi najnižje vrednosti karotenoidov zabeležene v juniju in juliju, najvišje pa v avgustu, kar ne kaže jasnega sezonskega trenda, temveč nakazuje na možno variabilnost vzorčenja, eksperimentalne omejitve, ali pa kakovost pripravljenega vzorca. Pri ekstrakciji pigmentov smo liste mehansko drobili v terilnici, da bi omogočili učinkovito sproščanje pigmentov iz rastlinskega tkiva. Možno je, da postopek homogenizacije pri posameznih vzorcih ni bil izveden dovolj temeljito, zaradi česar sproščanje karotenoidov ni bilo popolno. Posledično bi lahko prišlo do podcenitve njihove koncentracije in večje variabilnosti rezultatov, kar lahko pojasni odsotnost pričakovanega sezonskega vzorca.

Posebej izstopa pojav maksimalnih koncentracij vseh analiziranih pigmentov v avgustu, kar ni v skladu s pričakovanim sezonskim upadanjem. Ta rezultat je najverjetneje posledica metodoloških dejavnikov, zlasti neenakomerne homogenizacije rastlinskega materiala. Ker je bila priprava vzorcev izvedena ročno in s strani več izvajalcev, obstaja možnost vpliva na kakovost pripravljenega vzorca in posledično spektrofotometrične meritve ter rezultate.

Vsebnost antocianov

Antociani so vodotopni flavonoidni pigmenti, ki se kopičijo v vakuolah in opravljajo ključne funkcije, kot so zaščita pred UV-sevanjem, fotoinhibicijo in oksidativnim stresom (Gould 2004; Kitao s sod. 2024). Naši rezultati kažejo kompleksno sezonsko dinamiko, ki jo lahko pojasnimo s fiziološkimi procesi v ginku in vplivom okolja.

Zabeležen vrh v avgustu se sklada z ugotovitvami, da se vsebnost flavonoidov v listih ginka pogosto poveča v poletnem obdobju (Cheng s sod. 2012). Biosintezo antocianov uravnavajo ključni encimi, kot sta fenilalanin amonijak liaza (PAL) in halkon sintaza (CHS), katerih aktivnost je močno odvisna od svetlobne intenzitete in temperature (Wang s sod. 2015; Cheng s sod. 2012). Povišana koncentracija v tem obdobju verjetno služi kot fotozaščitni mehanizem pred močnim poletnim sončnim obsevanjem, pri čemer zmanjšujejo obremenitev fotosinteznega aparata (Gould 2004; Kitao s sod. 2024). Zelo nizka vsebnost antocianov v juniju bi lahko bila posledica visokih temperatur, saj optimalna temperatura za aktivnost encimov PAL in CHS ter biosintezo flavonoidov znaša 16–25 °C, pri temperaturah nad 25 °C pa biosinteza flavonoidov v listih ginka upade (Cheng s sod. 2012). Raziskave kažejo, da lahko stresni pogoji (npr. suša ali temperaturna nihanja) bodisi stimulirajo ali inhibirajo produkcijo pigmentov, odvisno od intenzitete in trajanja stresa (Wang s sod. 2015).

Čeprav se je vsebnost po avgustu nekoliko znižala, so vrednosti

v septembru in oktobru ostale višje kot v začetku sezone.

To je skladno s procesom senescence listov, kjer se klorofili razgrajujejo, hkrati pa se lahko poveča sinteza zaščitnih flavonoidov in antocianov (Kitao s sod. 2024). V obdobju senescence antociani delujejo kot antioksidanti in fotozaščitna sredstva, ki ščitijo senescentne celice pred fotooksidacijo, kar rastlini omogoča učinkovito remobilizacijo in shranjevanje hranil (npr. dušika) nazaj v trajne organe pred odpadanjem listov (Kitao s sod. 2024).

Vsebnost ionov

Opazovani trendi potrjujejo razlike v mobilnosti. Kalij (K^+) in klorid (Cl^-) sta izjemno mobilna; K^+ ima ključno vlogo pri osmotski regulaciji, njegov progresiven upad pa nakazuje na to, da je eden iz prvih elementov, ki se začnejo remobilizirati (Sardans in Peñuelas 2021). Zanimiva je dinamika kalcija (Ca^{2+}), ki velja za slabo mobilnega, saj je strukturno vezan v pektatni matriks celičnih sten, a smo vseeno zabeležili padec koncentracije (White in Broadley 2003; Ferguson 1984). To znižanje v ekstraktu lahko pripišemo postopni razgradnji celičnega matriksa. Statistično značilen vrh K^+ v juliju in relativno visoke vrednosti Cl^- v avgustu sovpadajo z anomalijami v meritvah fotosinteznih pigmentov, kjer je bil v avgustu prav tako zabeležen nepričakovan vrh klorofilov. To potrjuje tezo o vzorčenju fiziološko manj reprezentativnih, verjetno pozneje razvitih ali bolje osvetljenih listov v tem obdobju.

Upad amonijevih ionov (NH_4^+) odraža dinamiko metabolizma dušika. NH_4^+ je kritičen intermediat pri razgradnji amino kislin, pridobljenih iz kloroplastnih proteinov (Havé s sod. 2017). Vrednost amonijevih ionov v maju je relativno visoka in morda odstopa zaradi eksperimentalne napake ali specifičnosti takratnega vzorčenja. Dejstvo, da so koncentracije v septembru in oktobru skoraj ničelne, ni le posledica izčrpanja virov, temveč dokaz izjemno učinkovitega in aktivnega transporta dušika iz listov v steblo (Lee s sod. 2003; Zhang s sod. 2021 b). Ginko se izkaže kot visoko učinkovita vrsta pri recikliranju dušika, kar je ključna prilagoditvena strategija za njegovo preživetje.

Zmanjšanje celokupne prevodnosti je posledica upada metabolne aktivnosti in degradacije fotosinteznega aparata (Marschner 2012). Izmerjeni trendi so tako skladen fiziološki indikator progresivne senescence, ki rastlini omogoča minimizacijo izgube virov ob odpadu listja (Rolny s sod. 2011).

Zaključki

Na podlagi rezultatov sklepamo, da se sestava listov *Ginkgo biloba* močno spreminja skozi rastno sezono, okoljski dejavniki pa so močni gonilniki sprememb.

Analiza fotosinteznih pigmentov je pokazala, da klorofil a predstavlja največji delež barvil, kar je pričakovano za pigment s ključno vlogo v fotosintezi. Najvišje vsebnosti so bile zaznane v prvih štirih mesecih, z izjemo junija, kjer se je pojavila nekoliko nizka vsebnost. Podobnemu vzorcu sledi klorofil b, vendar z nižjo absolutno vrednostjo. Karotenoidi so dosegli svoj višek v avgustu in med vsemi pigmenti imeli najnižjo koncentracijo.

Vsebnost antocianov se je dinamično spreminjala, najnižjo vrednost je dosegla v juniju, najvišjo pa v avgustu, nato pa se spustila na stabilno, a vseeno visoko, vrednost za september

in oktober. To nakazuje na antioksidativno in zaščitno vlogo antocianov v rastlinskih listih.

Analiza vsebnosti ionov je pokazala trend upadanja količine ionov proti koncu sezone. Nivo kloridnih ionov je ostal stabilen do avgusta, nato pa v oktobru začel padati. Kalijevi ioni so pokazali najizrazitejši upad v juniju. Kalcijevi ioni so po začetnem maksimumu začeli upadati, z izrazitim minimumom v septembru, amonijevi ioni so sledili podobnemu vzorcu, vendar v septembru dosegli skoraj ničelno vrednost, najverjetneje kot posledica zmanjšane presnovne aktivnosti. Meritve celokupne prevodnosti so pokazale najvišjo prevodnost v maju, najnižjo pa v septembru, kar sovпада z nižjo vsebnostjo posameznih ionov.

Povzetek vseh rezultatov jasno kaže da listi *Ginkgo biloba* doživljajo prehod iz faze visoke fotosintezne aktivnosti v fazo staranja oz. senescence, kar se izraža v manjšanju vsebnosti določenih fotosinteznih pigmentov ter ionov. Kljub staranju pa nekatera barvila ter ioni ostanejo, kar nakazuje na njihovo strukturno vlogo. Vsebnost pigmentov in ionov je tako močno odvisna od sezone ter fizioloških dejavnikov.

Literatura

- Cheng S, Xu F, Li L, Cheng H, Zhang W, 2012. Seasonal Pattern of Flavonoid Content and Related Enzyme Activities in Leaves of *Ginkgo biloba* L. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40(1): 98–106.
- Doan PPT, Vuong HH, Kim J, 2024. Genetic Foundation of Leaf Senescence: Insights from Natural and Cultivated Plant Diversity. *Plants (Basel)*. 13(23):3405. <https://doi.org/10.3390/plants13233405>
- Ferguson IB, 1984. Calcium in plant senescence and fruit ripening. *Plant, Cell & Environment* 7:477-489.
- Gould KS, 2004. Nature's Swiss Army Knife: The Diverse Protective Roles of Anthocyanins in Leaves. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2004, 5: 314–320.
- Havé M, Marmagne A, Chardon F, Masclaux-Daubresse C, 2017. Nitrogen remobilization during leaf senescence: lessons from *Arabidopsis* to crops. *Journal of Experimental Botany*, 68(10): 2513–2529.
- Horie Y, Ito H, Kusaba M, Tanaka R, Tanaka A, 2009. Participation of chlorophyll b reductase in the initial step of the degradation of light-harvesting chlorophyll a/b-protein complexes in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 284:17449-17456.
- Jian S, Liao Q, Song H, Liu Q, Lepo JE, Guan C, Zhang J, Ismail AM, Zhang Z, 2018. NRT1.1-Related NH_4^{+} Toxicity Is Associated with a Disturbed Balance between NH_4^{+} Uptake and Assimilation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 178(4):1473-1488. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00410>
- Jurčević Šangut I, Šamec D, 2024. Seasonal Variation of Polyphenols and Pigments in Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) Leaves: Focus on 3',8"-Biflavones. *Plants* 13(21):3044.
- Kitao M, Yazaki K, Tobita H, Agathokleous E, Kishimoto J, Takabayashi A, Tanaka R, 2024. Anthocyanins act as a sugar-buffer and an alternative electron sink in response to starch depletion during leaf senescence: a case study on a typical anthocyanic tree species, *Acer japonicum*. *Journal of Experimental Botany*, 75, 11: 3521–3541.
- Lee DW, O'Keefe J, Holbrook NM, Feild TS, 2003. Pigment dynamics and autumn leaf senescence in a New England deciduous forest, eastern USA. *Ecological Research* 18:677-694.
- Li W, Wang L, He Z, Lu Z, Cui J, Xu N, Jin B, Wang L, 2020. Physiological and Transcriptomic Changes During Autumn Coloration and Senescence in *Ginkgo biloba* Leaves. *Horticultural Plant Journal*, 6(6): 396–408.
- Marschner P, 2012. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London.
- Rolny N. s sod. 2011. Is the electrolyte leakage assay an unequivocal test of membrane deterioration during leaf senescence? *Plant Physiology and Biochemistry* 49:1220-1227.
- Sardans J, Peñuelas J, 2021. Potassium control of plant functions: ecological and agricultural implications. *Plants* 10(2):419.
- Wang G, Cao F, Wang G, El-Kassaby YA, 2015. Role of Temperature and Soil Moisture Conditions on Flavonoid Production and Biosynthesis-Related Genes in *Ginkgo biloba* Leaves. *Natural Products Chemistry & Research*, 3(1): 162.
- Wen B, Xiao W, Mu Q, Li D, Chen X, Wu H, Li L, Peng F, 2020. How does nitrate regulate plant senescence? *Plant Physiology and Biochemistry*, 157: 60-69. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.08.041>
- White PJ, Broadley M, 2003. Calcium in plants. *Annals of Botany* 92:487-511.
- Yang XS, Chen GX, Yuan ZY, 2013. Photosynthetic decline in Ginkgo leaves during natural senescence. *Pakistan Journal of Botany*, 45(5): 1537–1540.
- Zhang H, Yu P, Song M, Li D, Sheng Q, Cao F, Zhu Z, 2021 b. Leaf Color Changes and Photosynthetic Characteristics of Five Superior Late-deciduous *Ginkgo biloba* Cultivars. *HortScience* 56(11):1416-1422.
- Zhang YM, Guo P, Xia X, Guo H, Li Z, 2021 a. Multiple Layers of Regulation on Leaf Senescence: New Advances and Perspectives. *Front Plant Sci*, 12, 1-16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.788996>
- Lichtenthaler HK, 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148: 350–382.
- Teng Z, Chen J, Li X, s sod., 2020. Comparative analysis of anthocyanin compositions in *Ginkgo biloba* leaves from different periods and regions. *Food Science and Technology*, 40(2): 358–365.

The effect of senescence on the content of photosynthetic pigments and selected ions in the leaves of sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*)

Bahia Tiago, Guenue Lilou, Košir Lina, Kunej Jaka, Lisec Eva

Študij biotehnologije, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

- Leaf senescence is a genetically regulated process associated with the degradation of cellular structures and the remobilization of nutrients. This study investigated the effects of senescence on the content of photosynthetic pigments and selected ions in the leaves of *Acer pseudoplatanus* leaves across the growing season.
- Leaf samples were collected monthly from May to October and analyzed for chlorophyll a, chlorophyll b, carotenoids, anthocyanins, and key ions including ammonium, potassium, calcium, and overall conductivity.
- Our results revealed significant seasonal variation in ion content, with ammonium, potassium, and conductivity peaking in late summer, suggesting increased metabolic activity and early nutrient redistribution. In contrast, calcium accumulated progressively toward autumn, reflecting its limited mobility and association with transpiration-driven transport.
- These findings indicate that senescence involves coordinated biochemical and ionic changes rather than a simple decline in physiological activity. The results highlight August as a transitional phase between active metabolism and the onset of senescence. Overall, this study provides insight into the complex interactions between pigment degradation and ion dynamics during natural leaf senescence and emphasizes the importance of considering both internal and environmental factors in future research.

Ključne besede: Seasonal dynamics, chlorophyll degradation, carotenoid stability, nitrogen metabolism, anthocyanin content, calcium accumulation

Introduction

Sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) is a large deciduous tree in the family Sapindaceae, native to central and southern Europe and western Asia. The plant can grow up to 20 to 30 meters in height, its leaves are three- to five-lobed with the width of around 7,5 to 15 cm, dark green and smooth on the upper surface with a greenish-white shade beneath (OSU 2026). The leaves carry typical photosynthetic pigments chlorophylls a, b and carotenoids thus having a similar pigment makeup to other temperate-maples (Fulgosi et al. 2012).

During autumn maple leaves change color from green to yellow-green to yellow and at the end dingy brown before they fall off (Breen 2026, Fulgosi et al. 2012). The changes of leaf color and ion composition are associated with senescence, and we investigated the effects of senescence on the pigment composition and selected ion content in leaves.

Plant senescence is viewed as an internally programmed cellular degeneration which ultimately leads to organ death. The process occurs in various plant tissues and serves many purposes (Nooden et al. 2006) but is mostly visibly expressed in leaves. Deciduous plants have an annual leaf lifespan highly connected to and synchronized with the seasons (Ferrante and Carillo 2025), with the senescence occurring in the autumn, characterized by chlorophyll degradation and nutrient remobilization (Pei et al. 2024). Senescence itself is modulated by internal, genetically driven changes and by external factors such as environmental triggers like unfavorable seasonal conditions, which promote resource allocation and, thus enhance plant survival (Pei et al. 2024).

Within chloroplasts, chlorophylls a and b and carotenoids function together in photosystems, where chlorophyll a serves as the only primary pigment involved in photochemical reactions. In contrast chlorophyll b and carotenoids act as accessory pigments that broaden the spectrum of light absorption. Moreover, carotenoids are viewed as the line of defence against singlet oxygen toxicity (Ramel et al. 2012), which makes them very important in quenching reactive oxygen species throughout senescence. Chlorophyll b often declines before chlorophyll a, thereby increasing the a/b ratio. Subsequently chlorophyll a content also decreases, lowering the total chlorophyll a and b content by 60-90%. Carotenoids decline more slowly, which gives leaves their yellow color in the absence of green pigments. Anthocyanin levels in sycamore maple are generally low, and their concentration doesn't change much throughout senescence (Fulgosi et al. 2012).

Plants are exposed to various types of stress during growth and development. One of the most common stressors is related to nutritional stress. Nitrogen is an essential nutrient that plants absorb. It is an important component of plant proteins, nucleic acids, chlorophyll, enzymes, alkaloids, and plant hormones. Nitrate (NO_3^-) is the main form of nitrogen that plants absorb most easily. It promotes nutrient transport and assimilation and enables adaptation to the environment. Its deficiency leads to reduced photosynthetic efficiency, inhibiting root growth, and ageing of plant organs. In the absence of nitrate, chlorophyll content and leaf numbers are lower, indicating an early-senescence phenotype (Wen et al. 2020). Plants absorb nitrogen through roots in the form of nitrate, ammonium, available amino acids and organic sources (Liu and Wiren 2017). Ammonium is an important inorganic

nitrogen source for plants. Plant cells absorb it via ammonium transporters in the plasma membrane and distribute it into intracellular compartments such as chloroplasts, mitochondria, and vacuoles. Ammonium is also produced by plant cells during normal metabolism, and ammonium transporters enable its transfer from intracellular sites of production to sites of use (Howitt and Udvardi 2000). After entering the plant, ammonium is incorporated into amino acids (e.g., glutamine and glutamate), from which proteins and other nitrogen compounds are then formed (Zayed et al. 2020). It is beneficial to plants in lower concentrations, but at higher concentrations it becomes toxic and inhibits growth (Esteban et al. 2016). Calcium is a key element for plant growth, as it is required to maintain the stability of the cell wall and membrane, and to serve as a secondary messenger in developmental processes. Cell wall rigidity is established by cross-linking negatively charged carboxyl groups. Low calcium content weakens the cell wall, which is particularly important during pollen formation and the expansion of growing root tips (Thor 2019). Calcium (Ca^{2+}) moves within the plant mainly through the xylem, and its transport is closely associated with the transpiration stream. After entering root cells, Ca^{2+} is transported into xylem vessels, where it passively moves with water toward the above-ground parts of the plant. Because calcium is poorly mobile in the phloem, it cannot be efficiently redistributed from older to younger tissues. As a result, its supply to individual organs depends mainly on the intensity of transpiration in those tissues. Organs with high transpiration (e.g., older leaves) accumulate more calcium, whereas young leaves, meristems, and fruits are often less supplied due to lower transpiration (White and Broadley 2003). Changes in cytosolic Ca^{2+} concentration act as signaling impulses that enable plants to perceive and respond to various abiotic and biotic factors, such as drought, salinity, temperature stress, and pathogen attack. These calcium signals are spatially and temporally precisely regulated and trigger complex signalling pathways that lead to adaptive responses in plants (Thor 2019).

Potassium is one of the main mineral nutrients that plants need for proper growth and function. In plant cells, it is present as a K^+ ion, which is highly mobile and can rapidly move between different parts of the plant depending on its needs. Potassium plays an important role in plant adaptation to stress conditions such as drought, high temperatures, and oxidative stress. Adequate potassium improves plant resistance, stability of cellular structures, and photosynthetic efficiency. Because of these functions, potassium significantly affects plant growth, development, and yield (Sardans and Peñuelas 2021). It also plays an important role in regulating osmotic pressure in cells, opening and closing stomata, and nutrient transport. As the main cation in cytoplasm and vacuole, it helps maintain water balance and turgor pressure. It also affects the activity of enzymes involved in nitrogen metabolism, such as nitrate reductase, as well as those involved in amino acid and protein synthesis (Xu et al. 2020). Previous studies on *Acer pseudoplatanus* provide more important insight into biochemical and ionic changes during leaf senescence. Senescence in sycamore maple is characterized by a coordinated decline in chlorophylls, carotenoids and soluble sugars, reflecting the progressive loss of photosynthetic capacity and metabolic activity. At the

same time, significant changes in ion composition occur, with potassium levels decreasing and sodium levels increasing as senescence progresses, likely due to reduced membrane integrity and increased ion leakage (Moore 1965). At the cellular level, senescence is accompanied by extensive degradation of chloroplast structure, including the near-complete loss of chloroplast DNA, which is closely associated with the dismantling of the photosynthetic apparatus and nutrient remobilization (Fulgosi et al. 2012). Comparable patterns have been observed in other maple species, in which chlorophyll content declines sharply in senescent tissues. At the same time, carotenoids persist longer, contributing to the characteristic yellow coloration of autumn leaves (Macioszek et al. 2025).

This research aimed to investigate, how seasonal progression influences photosynthetic pigments and selected ion content in sycamore maple leaves, to better understand the physiological mechanisms associated with leaf ageing. Based on previous findings, we hypothesize that leaf senescence in *Acer pseudoplatanus* will be associated with: a) a significant decline in photosynthetic pigments (chlorophyll a, chlorophyll b), with slower decrease in carotenoids; b) a decrease in mobile nutrients such as potassium due to remobilization and increased membrane permeability; c) changes in nitrogen-related ions reflecting nutrient redistribution; d) an increase in less mobile or passively accumulated ions (like Ca^{2+}), due to phloem mobility.

Materials and methods

Plant material

Leaves of *Acer pseudoplatanus* were obtained on the following dates: 20 May, 20 June, 20 July, 21 August, 19 September and 20 October. After collection, leaf samples were freeze-dried and stored in the dark until analysis.

Aqueous extracts for ions and anthocyanins

Leaf samples were first ground into a fine powder in a mortar using liquid nitrogen and quartz sand. An aliquot (1 g) of homogenized leaf material was transferred to Falcon tubes, and 50 mL of acidified ddH₂O (pH 5) was added. The samples were shaken at 25 °C and 200 rpm for 1 h. The extracts were then filtered under reduced pressure and transferred to labeled tubes.

Methanol extracts for photosynthetic pigments

Approximately 50 mg of crushed freeze-dried leaf powder was mixed with 20 mL of 100% cooled methanol (4 °C). The mixture was vortexed and incubated for 45 min at room temperature in the dark, with intermittent mixing. Extracts were filtered through filter paper into measuring cylinders, then divided into two centrifuge tubes and centrifuged at 4200 rpm for 3 min. The supernatant (2 mL) was transferred to microcentrifuge tubes for further analysis.

Ions measurements

Aqueous extracts were diluted fivefold (4 mL extract + 16 mL ddH₂O) and three replicates were prepared for each extract (total of 18 measurements). Ion concentrations were

measured using Go Direct® Vernier sensors according to the manufacturer's instructions. The following parameters were measured: conductivity, ammonium (NH_4^+), potassium (K^+), and calcium (Ca^{2+}). Each measurement lasted 1 min, and the mean value was recorded. Between measurements, the sensors were thoroughly rinsed with ddH₂O and gently wiped to prevent cross-contamination.

Anthocyanin measurements

Anthocyanin content was estimated spectrophotometrically. Aqueous extracts were diluted fivefold (300 µL extract + 1200 µL ddH₂O) in 2 mL microcentrifuge tube, and three replicates per extract were prepared. Absorbance was measured at 520 nm, and anthocyanin concentrations were calculated using the molecular weight of cyanidin-3-glucoside (449.2 g/mol), molar absorptivity (26,900 L/mol×cm), dilution factor and a 1 cm path length. Results were expressed as mg/g dry leaf mass (Teng et al. 2020).

Measurements of photosynthetic pigments

The concentrations of chlorophyll a, chlorophyll b, and carotenoids were determined spectrophotometrically using methanol extracts prepared from freeze-dried leaves, following the method of Lichtenthaler (1987). Absorbance was measured at 665, 652, and 470 nm, and pigment concentrations were calculated and expressed in mg/g fresh leaf weight.

Data processing and statistical analysis

Data were processed using XL Toolbox NG. For each sample, mean values and standard deviations were calculated from three replicates. Statistical differences among sampling dates were evaluated using analysis of variance (ANOVA), with significance set at $p < 0.05$.

Results

Seasonal changes in ammonium content

Ammonium content changed significantly between sampling dates (ANOVA, $F = 33.53$, $p = 1.19 \times 10^{-6}$). The lowest content was measured in May, while the highest content occurred in August (Figure 1). Compared to May, ammonium levels were significantly higher in June and August. After the August peak, content decreased markedly in September and slightly increased again in October.

Seasonal changes in potassium content

Potassium content differed significantly among sampling dates (ANOVA, $F = 121.14$, $p = 7.69 \times 10^{-10}$). Potassium levels remained relatively stable from May to July, followed by a pronounced increase in August, when the highest content was recorded (Figure 2). After August, potassium content progressively declined during September and October.

Seasonal changes in calcium content

Calcium content also varied significantly during the season (ANOVA, $F = 5.95$, $p = 0.0054$). Calcium levels remained relatively low from May to July, increased in August, slightly decreased in September, and reached the highest values in October (Figure 3).

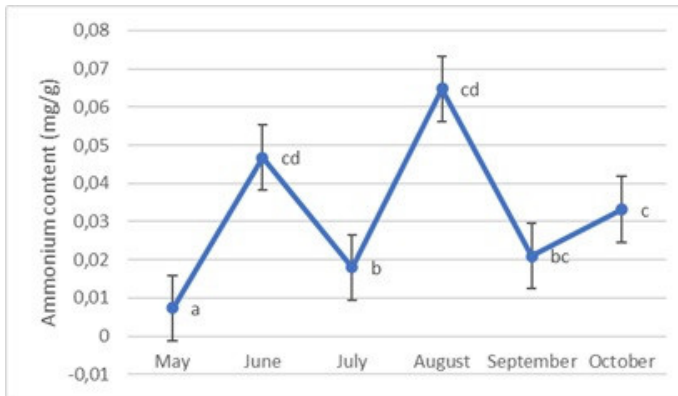


Figure 1. Seasonal changes in ammonium content in leaves of *Acer pseudoplatanus* from May to October. Values represent means $\pm$ standard errors. Different letters indicate statistically significant differences between sampling dates (one-way ANOVA followed by Bonferroni–Holm post-hoc test, $p < 0.05$).

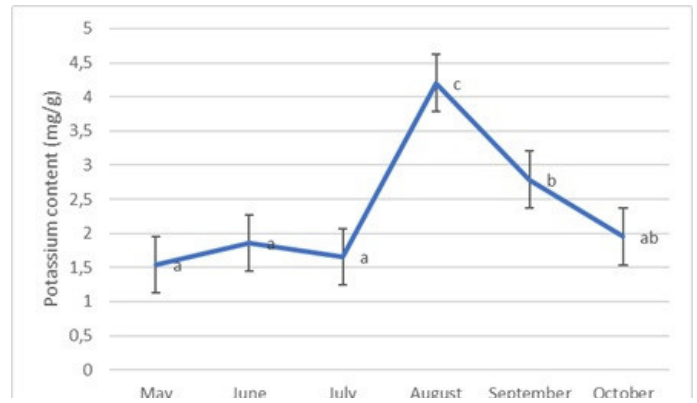


Figure 2. Seasonal changes in potassium content in leaves of *Acer pseudoplatanus* from May to October. Values represent means $\pm$ standard errors. Different letters indicate statistically significant differences between sampling dates (one-way ANOVA followed by Bonferroni–Holm post-hoc test, $p < 0.05$).

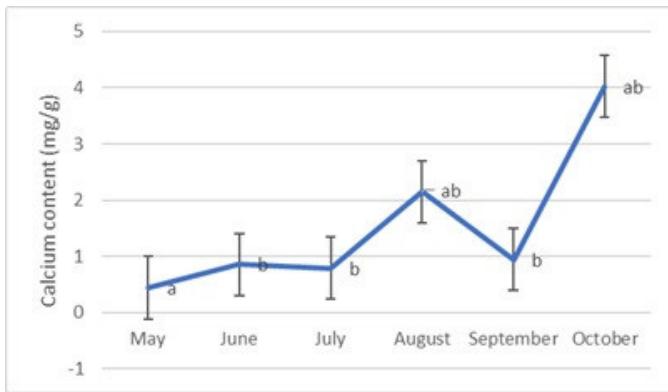


Figure 3. Seasonal changes in calcium content in leaves of *Acer pseudoplatanus* from May to October. Values represent means $\pm$ standard errors. Different letters indicate statistically significant differences between sampling dates (one-way ANOVA followed by Bonferroni–Holm post-hoc test, $p < 0.05$).

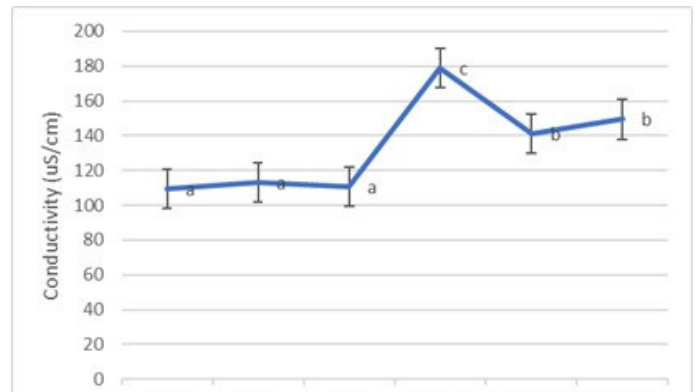


Figure 4. Seasonal changes in conductivity of leaf extracts from *Acer pseudoplatanus* between May and October. Values represent means $\pm$ standard errors. Different letters indicate statistically significant differences between sampling dates (one-way ANOVA followed by Bonferroni–Holm post-hoc test, $p < 0.05$).

Seasonal changes in conductivity

Conductivity showed strong seasonal variation (ANOVA, $F = 97.04$, $p = 2.81 \times 10^{-9}$). Conductivity values were relatively stable from May to July, followed by a sharp increase in August (Figure 4). Elevated conductivity persisted during September and October, although values remained lower than the August maximum.

Seasonal changes in anthocyanins

Anthocyanin content changed significantly throughout the season (ANOVA, $F = 60.21$, $p = 4.43 \times 10^{-8}$). The lowest anthocyanin content was observed in June, whereas the highest content occurred in July (Figure 5). After July, anthocyanin content gradually declined toward autumn.

Seasonal changes in chlorophyll a content

Chlorophyll a content differed significantly between sampling dates (ANOVA, $F = 113.92$, $p = 1.10 \times 10^{-9}$). Content increased from May to June, remained relatively high throughout summer, and then declined abruptly in October (Figure 6).

Seasonal changes in chlorophyll b content

Chlorophyll b content varied significantly among sampling dates (ANOVA, $F = 54.33$, $p = 7.95 \times 10^{-8}$). Chlorophyll b remained relatively stable from May to August, increased significantly in September, and then sharply declined in October (Figure 7). October samples showed the lowest chlorophyll b concentration and differed significantly from all previous sampling dates.

Seasonal changes in carotenoid content

Carotenoid concentration changed significantly during the growing season (ANOVA, $F = 42.47$, $p = 3.20 \times 10^{-7}$). Carotenoid levels increased from May to June, slightly decreased in July, and reached their highest values in September (Figure 8). In October, carotenoid concentration declined again to levels comparable to those measured in spring. Compared to chlorophylls, carotenoids showed a less pronounced autumn decline.

Discussion

The results of this study demonstrate that leaf senescence in *Acer pseudoplatanus* is accompanied by pronounced

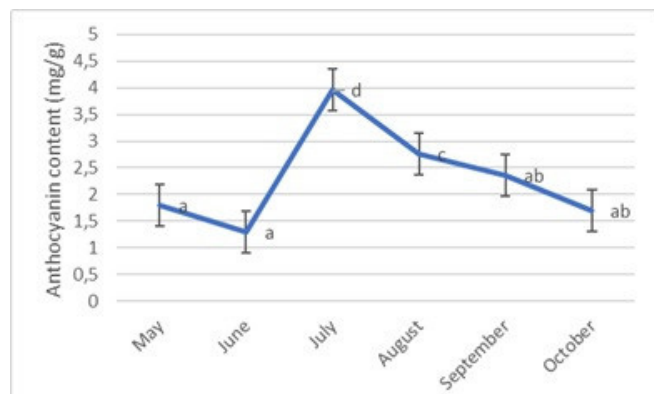


Figure 5. Seasonal changes in anthocyanin content in leaves of *Acer pseudoplatanus* from May to October. Values represent means $\pm$ standard errors. Different letters indicate statistically significant differences between sampling dates (one-way ANOVA followed by Bonferroni–Holm post-hoc test, $p < 0.05$).

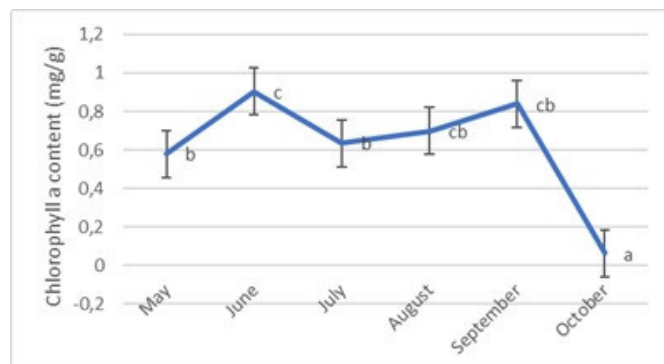


Figure 6. Seasonal changes in chlorophyll a content in leaves of *Acer pseudoplatanus* from May to October. Values represent means $\pm$ standard errors. Different letters indicate statistically significant differences between sampling dates (one-way ANOVA followed by Bonferroni–Holm post-hoc test, $p < 0.05$).

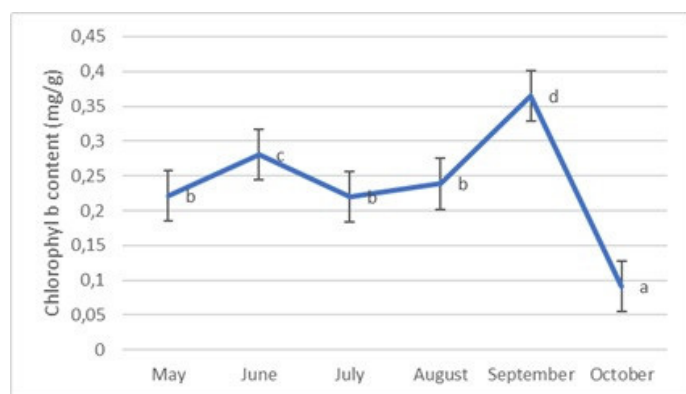


Figure 7. Seasonal changes in chlorophyll b content in leaves of *Acer pseudoplatanus* from May to October. Values represent means $\pm$ standard errors. Different letters indicate statistically significant differences between sampling dates (one-way ANOVA followed by Bonferroni–Holm post-hoc test, $p < 0.05$).

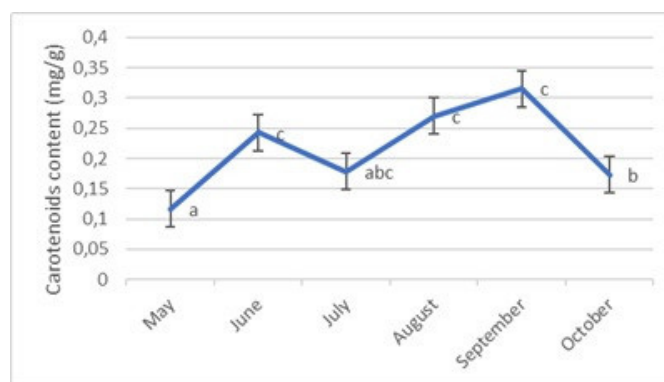


Figure 8. Seasonal changes in carotenoid content in leaves of *Acer pseudoplatanus* from May to October. Values represent means $\pm$ standard errors. Different letters indicate statistically significant differences between sampling dates (one-way ANOVA followed by Bonferroni–Holm post-hoc test, $p < 0.05$).

seasonal changes in both photosynthetic pigments and ionic composition. The observed trends support the hypothesis that senescence is a coordinated physiological process involving degradation of the photosynthetic apparatus, nutrient remobilization, and progressive changes in ion balance. Most measured parameters showed statistically significant variation across sampling dates, indicating that the physiological status of leaves changed continuously throughout the growing season.

The concentrations of chlorophyll a and chlorophyll b declined strongly toward October, which corresponds to the advanced stages of autumn senescence. Chlorophyll degradation is one of the most characteristic features of senescence in deciduous species and reflects the dismantling of chloroplast structures and recycling of nitrogen-containing molecules (Pei et al. 2024). In our study, chlorophyll a remained relatively stable from June to September, then sharply decreased in October, whereas chlorophyll b showed a similar but slightly more variable pattern. Previous studies on sycamore maple demonstrated that chlorophyll b is often degraded earlier than chlorophyll a, because proteins of the light-harvesting complexes are dismantled before the reaction centre pigments (Fulgosi et al. 2012). The severe decline of both chlorophylls in October, therefore, likely indicates extensive degradation of

chloroplast membranes and reduced photosynthetic capacity in senescent leaves.

In contrast to chlorophylls, carotenoid concentrations showed a less pronounced decline during autumn. Carotenoid levels increased during summer and remained relatively high until September then decreased in October. This slower decline is consistent with the protective role of carotenoids during senescence. Carotenoids participate in photoprotection by quenching reactive oxygen species and singlet oxygen produced during chlorophyll breakdown and oxidative stress (Ramel et al. 2012). Their persistence in senescent tissues also explains the characteristic yellow coloration of autumn maple leaves after chlorophyll degradation reveals accessory pigments. Similar seasonal carotenoid dynamics have previously been observed in other maple species undergoing autumn senescence (Macioszek et al. 2025).

Ammonium concentrations showed significant seasonal variation, with the highest values recorded in August. This increase may be associated with enhanced nitrogen turnover and protein degradation during the early phases of senescence. During leaf ageing, degradation of chloroplast proteins and amino acids releases ammonium, which must rapidly be reassimilated because of its toxicity at higher concentrations (Esteban et al. 2016). Increased ammonium

concentrations in late summer may therefore reflect intensified nitrogen recycling processes before nutrients are transported to other plant organs. Nitrogen remobilization is one of the central physiological processes during senescence and is essential for nutrient conservation in deciduous plants (Wen et al. 2020).

Potassium concentration followed a seasonal pattern similar to ammonium, with a pronounced maximum in August followed by a decline in autumn. Potassium is a highly mobile ion involved in osmotic regulation, stomatal movement, enzyme activation, and maintenance of cellular turgor (Sardans and Peñuelas 2021). The late-summer increase may indicate elevated metabolic activity and active nutrient transport before the onset of advanced senescence. The subsequent decline during autumn likely reflects remobilization of potassium from senescing leaves into storage tissues. Previous studies on maple senescence also reported decreasing potassium concentrations during later senescence stages due to nutrient redistribution and increased membrane permeability (Moore 1965). However, our results suggest that potassium dynamics are not linear and may include temporary accumulation before final remobilization.

Anthocyanin content showed significant seasonal variation, with the highest values recorded in July and a gradual decline toward autumn. This pattern differs from the autumn anthocyanin accumulation reported for many deciduous species. Anthocyanins are flavonoid pigments that contribute red, purple, and blue coloration to plant tissues and are commonly associated with photoprotection and antioxidant activity during periods of environmental stress and senescence (Teng et al. 2020). The elevated anthocyanin content observed in mid-summer may therefore reflect increased protection against high light intensity, elevated temperatures, or oxidative stress during the period of maximum metabolic activity. The subsequent decline toward autumn suggests that anthocyanins were not strongly accumulated during the later stages of senescence in the studied trees. This observation is consistent with previous reports indicating that anthocyanin concentrations in sycamore maple generally remain low and show limited seasonal changes compared with species that develop intense red autumn coloration (Fulgosi et al. 2012). Because *Acer pseudoplatanus* typically exhibits yellow rather than red autumn leaves, chlorophyll degradation and the persistence of carotenoids appear to play a greater role in autumn coloration than anthocyanin accumulation. The seasonal dynamics observed in this study therefore suggest that anthocyanins in sycamore maple may be more closely related to photoprotective functions during active growth than to the senescence process itself.

Conductivity closely mirrored the trends observed for potassium and ammonium, reaching the highest values in August. Since conductivity reflects the total concentration of dissolved ions in leaf extracts, the increase likely resulted from the simultaneous accumulation of multiple mobile ions during late summer. Elevated conductivity may also indicate changes in membrane permeability associated with progressing senescence and cellular reorganization. The persistence of relatively high conductivity values in September and October suggests that ionic redistribution continues even during advanced senescence stages.

Calcium showed a distinctly different seasonal pattern compared to the other ions. Calcium concentration gradually

increased throughout the season, reaching its highest values in October. This pattern supports the hypothesis that calcium accumulates in senescing leaves due to its limited mobility in the phloem. Calcium transport occurs mainly through the xylem and is strongly associated with transpiration flow, meaning that once deposited in leaf tissues, calcium is not efficiently redistributed to younger organs (White and Broadley 2003). Accumulation of calcium in older leaves has also been linked to stabilization of cell walls and membranes during senescence and stress responses (Thor 2019). The high calcium concentration observed in October therefore likely reflects both long-term accumulation and reduced export from ageing tissues.

Taken together, the observed trends indicate that August may represent a transitional physiological phase between active metabolism and the onset of senescence. Several parameters, including ammonium, potassium, conductivity, and carotenoids, reached maximum values during this period, suggesting that leaves were still metabolically active while nutrient remobilization processes had already begun. By October, strong chlorophyll degradation and calcium accumulation indicated progression into advanced senescence. Although the results generally support the initial hypotheses, some parameters showed more complex behavior than expected. Potassium did not decrease continuously throughout the season, and carotenoids remained relatively stable until late autumn. These findings suggest that senescence is not simply a passive degenerative process but rather a highly regulated sequence of metabolic adjustments influenced by both developmental and environmental factors.

One limitation of this study is the absence of direct environmental measurements such as temperature, precipitation, and light intensity. Seasonal environmental conditions strongly influence photosynthesis, nutrient uptake, and senescence timing; therefore, some of the observed variation may reflect environmental responses in addition to internally programmed senescence. Furthermore, monthly sampling intervals may not fully capture rapid physiological transitions occurring during early autumn. Future studies should combine ion measurements with chlorophyll fluorescence, antioxidant enzyme activity, leaf color quantification, and environmental monitoring to obtain a more comprehensive understanding of senescence dynamics in *Acer pseudoplatanus*.

Conclusion

This study showed that leaf senescence significantly affects the ionic composition of *Acer pseudoplatanus* leaves. The concentrations of ammonium, potassium, calcium, and total conductivity varied with sampling date, indicating that the physiological state of the leaves shifted progressively from spring to autumn. These results confirm that senescence is not only visible through external color changes, but also through internal biochemical and ionic modifications.

Potassium, ammonium, and conductivity followed closely related seasonal trends. The August samples were especially distinct, which suggests that late summer may represent an early transition phase between active metabolism and senescence-related nutrient reorganization. During this period, leaves may still be functional, but internal changes linked to nutrient recycling and stress adaptation are already underway.

Calcium showed a different pattern, with stronger accumulation toward September and October. This supports the hypothesis that less mobile ions tend to accumulate in aging leaves. Since calcium is mainly transported through the xylem and is poorly redistributed through the phloem, it remains in older tissues rather than being efficiently moved to other parts of the plant. The distinct position of October samples also suggests that the leaves had reached a more advanced stage of senescence, with greater variability between individual samples.

Anthocyanin content also varied significantly throughout the season, reaching its maximum in July and decreasing thereafter. Unlike species that accumulate anthocyanins during autumn senescence, *Acer pseudoplatanus* did not show a pronounced increase in anthocyanin content during the final stages of leaf ageing. This finding suggests that anthocyanins may primarily contribute to photoprotection during periods of high summer metabolic activity rather than serving as a major determinant of autumn leaf coloration in this species. Chlorophyll a and chlorophyll b declined remarkably during autumn, whereas carotenoids persisted longer and anthocyanins showed their highest concentrations during summer, reflecting distinct physiological roles during seasonal development and senescence.

Overall, the results mostly support the hypotheses. Senescence was associated with significant changes in nitrogen-related ions, clear seasonal variation in potassium, and late accumulation of calcium. However, potassium did not show a simple progressive decrease, suggesting that its behavior during senescence is more complex than expected and may include a late-summer increase before later remobilization or leakage.

In conclusion, senescence in *Acer pseudoplatanus* appears to be a coordinated process involving nutrient redistribution, changes in ion balance, and likely degradation of photosynthetic pigments. Future studies should combine ion measurements with direct pigment analysis, chlorophyll fluorescence, leaf color scoring, and environmental monitoring. This would make it possible to better distinguish between changes caused by internal senescence and those driven by seasonal environmental conditions.

Literature

1. Oregon State University. Landscape Plants: *Acer pseudoplatanus*. <https://landscapeplants.oregonstate.edu/plants/acer-pseudoplatanus> (20. feb. 2026)

2. Fulgosi H, Jezic M, Lepedus H, Peharec Stefanic P, Curkovic-Perica M, Cesar V, 2012. Degradation of chloroplast DNA during natural senescence of maple leaves. *Tree Physiology* 32(3):346-354
3. Nooden LD, Guamet JJ, John I, 2006. Senescence mechanisms. *Physiologia Plantarum* 101(4):746-753
4. Ramel F, Birtic S, Cuine S, Triantaphylides C, Ravanat JL, Havaux M, 2012. Chemical Quenching of Singlet Oxygen by Carotenoids in Plants. *Plant Physiology* 158(3):1267-1278
5. Ferrante A, Carillo P, 2025. Leaf senescence-associated genes and transcriptional changes under dark conditions. *Annals of Botany* 20:1-13
6. Pei Z, Huang Y, Ni J, Liu Y, Yang Q, 2024. Biology of leaf senescence and its regulation in plants. *Biology (Basel)* 13(5):329
7. Wen B, Xiao W, Mu Q, Li D, Chen X, Wu H, Li L, Peng F, 2020. How does nitrate regulate plant senescence? *Plant Physiology and Biochemistry* 157:60-69
8. Liu Y, Wiren N, 2017. Ammonium as a signal for physiological responses in plants. *Journal of Experimental Botany* 68(10):2581-2592
9. Howitt SM, Udvardi MK, 2000. Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* 1465:152-170
10. Yayed O, Hewedy OA, Abdelmoteleb A, Ali M, Youssef MS, Roumia AF, Seymour D, Yuan ZC, 2023. Nitrogen Journey in Plants: From Uptake to Metabolism, Stress Response, and Microbe Interaction. *Biomolecules* 13(10):1443
11. Esteban R, Ariz I, Cruz C, Moran JF, 2016. Review Mechanisms of ammonium toxicity and the quest for tolerance. *Plant Science* 248:92-101
12. Thor K, 2019. Calcium – Nutrient and Messenger. *Frontiers in Plant Science* 10:440
13. White PJ, Broadley MR, 2003. Calcium in Plants. *Annals of Botany* 92(4):487-511
14. Sardans J, Peñuelas J, 2021. Potassium Control of Plant Functions: Ecological and Agricultural Implications. *Plants (Basel)* 10(2):419
15. Xu X, Du X, Wang F, Sha J, Chen Q, Tian G, Zhu Z, Ge S, Jiang Y, 2020. Effects of Potassium Levels on Plant Growth, Accumulation and Distribution of Carbon, and Nitrate Metabolism in Apple Dwarf Rootstock Seedlings. *Plant Science* 11:984
16. Moore KG 1965. Senescence in Leaves of *Acer pseudoplatanus* L. and *Parthenocissus tricuspidate* Planch. *Annals of Botany* 29(3):433-444
17. Macioszek VK, Chalamonska K, Oliwa J, Staszak AM, Sobczak M, 2025. Phenological, Physiological, and Ultrastructural Analyses of 'Green Islands' on Senescent Leaves of Norway Maple (*Acer platanoides* L.). *Plants* 14(6):909
18. Teng Z, Jiang X, He F, Bai W, 2020. Qualitative and Quantitative Methods to Evaluate Anthocyanins. *EFood* 1(5):339-346

Vpliv senescence na vsebnost fotosinteznih pigmentov in izbranih ionov v listih perzijske bukve ali parocije (*Parrotia persica*)

Nina Fon, Nika Geršak, Jerca Rihtaršič, Maša Šnajcer, Yining Isabell Ye

Študij biotehnologije, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

- Namen raziskave je bil preučiti razlike v vsebnosti fotosinteznih pigmentov in izbranih ionov (Ca^{2+} , Cl^- , K^+ , NH_4^+) v različnih fazah senescence listov parocije.
- Liste parocije smo vzorčili v šestih obdobjih med majem in oktobrom. Iz liofiliziranega materiala smo pripravili vodne in metanolne izvlečke. V vodnih izvlečkih smo z uporabo Vernierjevih senzorjev določili vsebnost ionov (NH_4^+ , Cl^- , K^+ , Ca^{2+}) in prevodnost ter spektrofotometrično antociane, v metanolnih pa spektrofotometrično fotosintezne pigmente.
- Opazili smo, da obstajajo razlike v vsebnosti ionov in fotosinteznih pigmentov med opazovanimi meseci, vendar razlike niso prisotne med vsemi meseci, temveč so omejene na posamezne skupine.
- Ca^{2+} se zmanjšuje do sredine sezone in nato stabilizira, K^+ narašča z izrazitim padcem v oktobru. Medtem ko pri Cl^- niso bile očitne spremembe, NH_4^+ upada tekom senescence, vendar v drugi literaturi opazimo povečanje njegove koncentracije. Prevodnost se zmanjšuje tekom senescence, pravtako se zmanjšuje tudi koncentracija fotosinteznih barvil klorofil a in b. Vsebnosti karotenoidov niha brez večjih sprememb. Vsebnost antocianov se med senescenco povečuje.

Ključne besede: klorofil a, klorofil b, karotenoidi, antociani, staranje

Uvod

Perzijska bukev (*Parrotia persica*) je listopadno drevo iz družine Hamamelidaceae, ki izvira iz gorovja Alborz v severnem Iranu (Shariatnagad 2005). Zanj je značilna nizka razvejanost ter rast z enim ali več debli, pri katerih se skorja značilno lušči in daje deblu mozaičen videz. V Severni Ameriki in Evropi se pogosto goji kot okrasna rastlina predvsem zaradi barvitih cvetov in listov (Nicholson 1989).

Senescenca listov je zadnji korak v razvoju lista in predstavlja gensko programirano razgradnjo rastlinskega tkiva (Guo in Gan 2005). Pri listopadnih drevesnih vrstah je ta proces tesno povezan s sezonskimi spremembami in pripravo rastline na obdobje mirovanja (Millard in Grelet, 2010). Za perzijsko bukev je značilna izrazita jesenska senescenca listov, ki se kaže v spremembi barve listov iz zelene v rumene, oranžne in rdeče odtenke. Podobni vzorci v spremembi barve so opisani tudi pri sorodnih vrstah, kot je *Liquidambar formosana*, kjer je senescenca povezana s kompleksnimi spremembami v presnovi pigmentov in fotosintezni aktivnosti (Zidong 2017). Med senescenco listov prihaja do razgradnje kloroplastov, ki jo spremlja katabolizem nukleinskih kislin, beljakovin in lipidov, pri čemer se sproščena hranila transportirajo iz starejših listov v mlajše dele rastline. Ta proces omogoča učinkovito remobiliziranje virov in lahko poveča reproduktivni uspeh rastline (Lim s sod. 2007). Razgradnja kloroplastov je neposredno povezana z zmanjšanjem vsebnosti fotosinteznih barvil, predvsem klorofila a in klorofila b, ki sta ključna za absorpcijo svetlobe v rdečem in modrem delu spektra in za proces fotosinteze (Lee s sod. 2024). Tekom senescence se klorofil postopoma razgrajuje, kar vodi do izgube zelene barve listov, pri čemer postanejo vidni drugi pigmenti, predvsem karotenoidi (Ougham s sod. 2005). Ti imajo pomembno vlogo pri zaščiti rastline pred oksidativnimi poškodbami in so prekurzorji za nekatere rastlinske hormone (Maoka 2019). Pri nekaterih sorodnih listopadnih vrstah, kot je *Disanthus cercidifolius*, se med senescenco poveča tudi sinteza antocianov, ki prispevajo k rdečim odtenkom listov in imajo zaščitno vlogo pri fotooksidativnem stresu (Xiaoming 2024). Poleg sprememb v vsebnosti pigmentov se med senescenco listov spreminja tudi vsebnost mineralnih hranil (Killingbeck 1996). Pri listopadnih drevesnih vrstah so ti procesi tesno povezani s sezonskimi spremembami, saj rastline pred obdobjem mirovanja učinkovito prerazporejajo hranila, dušikove spojine, pa tudi ione, kot so kalij, kalcij in klor v trajna tkiva, kot je deblo, kjer se shranjujejo čez zimo (Millard in Grelet, 2010). Remobilizacija mineralnih hranil poteka predvsem s floemskim transportom (White 2012). Spomladi se ta hranila ponovno mobilizirajo iz zaloga v deblu in omogočajo rast novih listov (Millard 2006). Med posameznimi elementi ima kalij pomembno vlogo zaradi svoje visoke mobilnosti, saj se, podobno kot dušik in fosfor, remobilizira že v poletnem obdobju. To je lahko povezano z njegovo resorpcijo pred odpadanjem listov ali pa s povečano potrebo rastline po hranilih v razmerah omejene dostopnosti v tleh (Milla 2005). Z raziskavo smo želeli preučiti razlike v vsebnosti fotosinteznih pigmentov in izbranih ionov (Ca^{2+} , Cl^- , K^+ , NH_4^+) v različnih fazah senescence listov perzijske bukve.

Postavili smo naslednje hipoteze:

- Med senescenco listov se bo vsebnost fotosinteznih barvil (klorofila a, klorofila b in karotenoidov) zmanjševala kot posledica njihove razgradnje.

- Vsebnost antocianov se bo med senescenco povečevala.
- Med senescenco se bo koncentracija kloridnih, kalijevih in amonijevih ionov zmanjševala, medtem ko se bo koncentracija kalcijevih ionov povečevala.
- Prevodnost se bo tekom senescence zmanjševala.

Materiali in metode

Rastlinski material za analizo vpliva senescence na vsebnost pigmentov in izbranih ionov smo pridobili iz listov parocije, ki raste v bližini Biotehniške fakultete v Ljubljani. Nabrani so bili v šestih različnih časovnih obdobjih, ki so predstavljala različne faze razvoja in staranja listov. Nabrani so bili v obdobju od maja do oktobra na časovni razmak enega meseca. Po nabiranju so bili listi liofilizirani, vzorci pa nato shranjeni v ločenih vrečkah glede na čas vzorčenja.

Priprava vodnih in metanolnih izvlečkov

Liofilizirane liste smo mehansko strli v terilnici ob dodatku tekočega dušika in kremenčevega peska, da smo pridobili fin homogen prah. Iz tako pripravljenega rastlinskega materiala smo pripravili vodne in metanolne izvlečke. Vodni so služili za nadaljnje analize vsebnosti izbranih ionov in antocianov, metanolni pa analizi fotosinteznih pigmentov.

Za pripravo vodnih izvlečkov smo v stekleno čašico (frutek) zatehtali 1 g strtega rastlinskega materiala in dodali 50 mL zakisane bidestilirane vode (pH 5). Vzorce smo stresali približno 1 uro pri sobni temperaturi (okoli 25 °C) in 160 rpm, nato pa jih filtrirali pod znižanim tlakom (nučiranje). Pridobljene filtrate smo prenesli v označene falkonke ter jih do nadaljnjih analiz hranili v hladilniku.

Metanolne izvlečke smo pripravili tako, da smo 50 mg strtega rastlinskega prahu dodali 20 mL 100% ohlajenega metanola (4 °C). Zmes smo dobro premešali, vorteksirali in inkubirali 45 minut pri sobni temperaturi v temi, pri čemer smo vzorce večkrat premešali. Po inkubaciji smo ekstrakte filtrirali, razdelili v centrifugirke in centrifugirali 3 minute pri 2500 rpm, nato pa supernatant uporabili za spektrofotometrično določanje fotosinteznih pigmentov.

Meritve vsebnosti izbranih ionov

Vsebnost izbranih ionov smo določili iz predhodno pripravljenih vodnih izvlečkov. Vzorce smo dobro homogenizirali ter pripravili 5-kratne redčitve (4 mL izvlečka + 16 mL bidestilirane vode) v treh tehničnih ponovitvah (skupaj 18 vzorcev). Meritve koncentracij amonijevih (NH_4^+), kloridnih (Cl^-), kalijevih (K^+) in kalcijevih ionov (Ca^{2+}) ter celokupne prevodnosti smo izvedli z uporabo Vernierjevih senzorjev (Go Direct®), povezanih s tabličnimi računalniki, pri čemer je vsaka meritev trajala 60 sekund. Dobljene vrednosti (mg/L) smo ob upoštevanju faktorjev redčenja in začetnega razmerja med maso vzorca in volumnom ekstrakta preračunali na mg/g suhe mase listov.

Meritve vsebnosti fotosinteznih pigmentov

Vsebnost fotosinteznih pigmentov smo določili spektrofotometrično iz supernatanta, pridobljenega iz metanolnih izvlečkov. Absorbanco smo izmerili pri valovnih dolžinah 665 nm, 652 nm in 470 nm, ki ustrezajo klorofilu a, klorofilu b in karotenoidom (Lichtenthaler 1987, Lichtenthaler 2001).

Statistična analiza podatkov

Podatke smo najprej uredili v programu MS Excel, nato pa jih uvozili v program Jamovi, ki deluje na podlagi programa R, kjer smo izvedli nadaljnjo statistično analizo. Za vsako preučevano spremenljivko smo najprej pripravili opisno statistiko ter grafični prikaz povprečnih vrednosti in njihovih standardnih odklonov. Razlike med posameznimi časovnimi obdobji smo preverili z enosmerno analizo variance (ANOVA) z Welchovim testom, ki ne predpostavlja enakosti varianc med skupinami. Pred izvedbo posthoc testov, ki primerjajo vsak vzorec z vsakim, znotraj spremenljivke, smo enakost varianc preverili z Levenovim testom. Na podlagi rezultata Levenovega testa, smo za post-hoc analizo uporabili ali Games-Howellov model (nehomogene variance), ali Tukeyev post-hoc test (homogene variance). Kot statistično značilne smo obravnavali razlike pri vrednosti $p < 0,05$.

Rezultati

Kalcij

Vsebnost Ca^{2+} ionov (Slika 1a) se je med meseci statistično značilno razlikovala ($p < 0,001$), pri čemer so razlike omejene

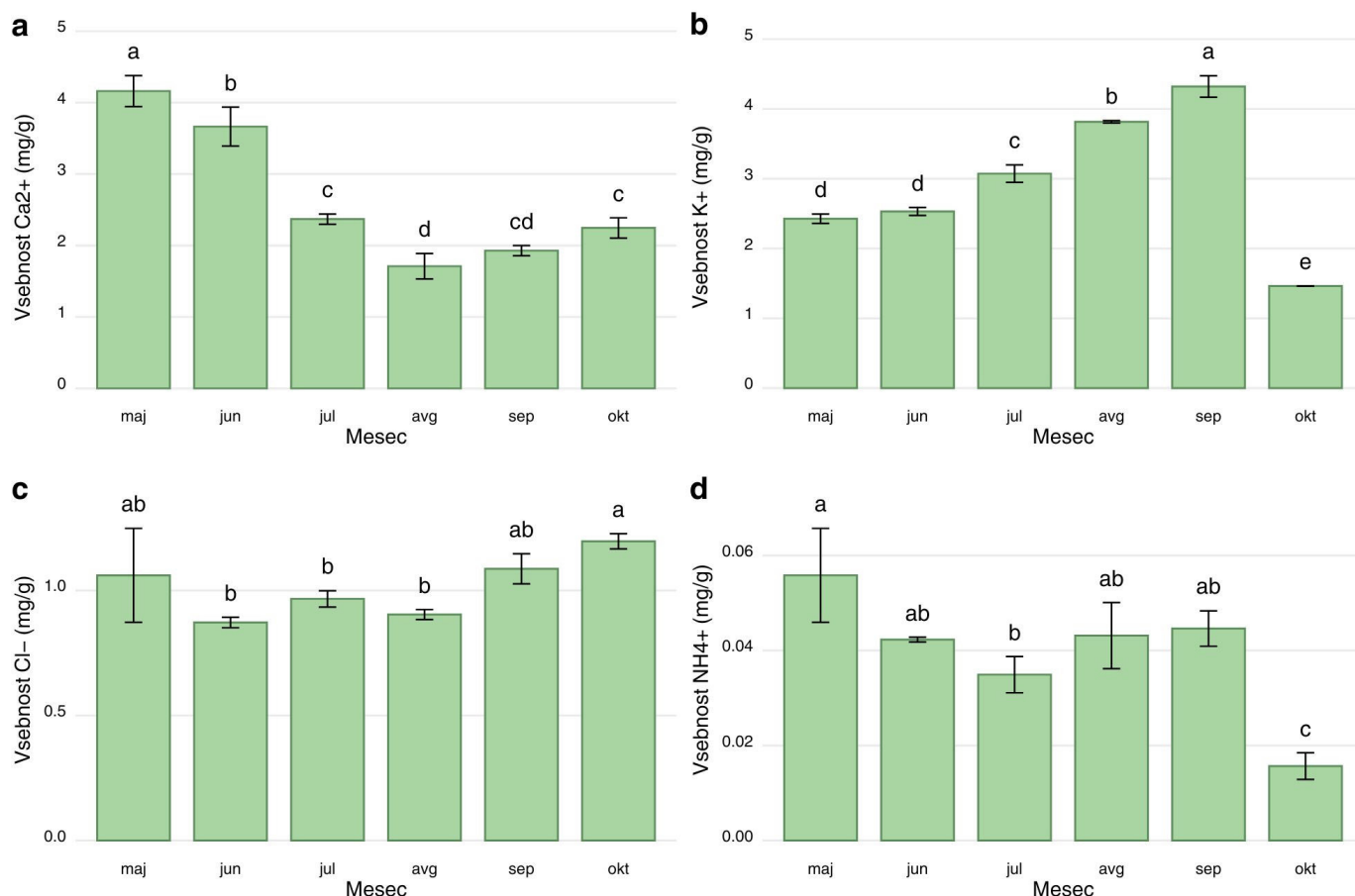
predvsem na primerjave med zgodnjimi in nekaterimi poznejšimi meseci. Najvišje vrednosti so bile zabeležene maja, le rahlo nižje pa junija. V obdobju od julija do oktobra so bile vrednosti bistveno nižje kot v pomladnih mesecih, a med seboj relativno podobne. Čeprav avgust izkazuje najnižjo povprečno vrednost, so razlike med posameznimi poznejšimi meseci majhne, kar kaže na relativno konstantnost kalcijevih ionov v tem obdobju.

Kalij

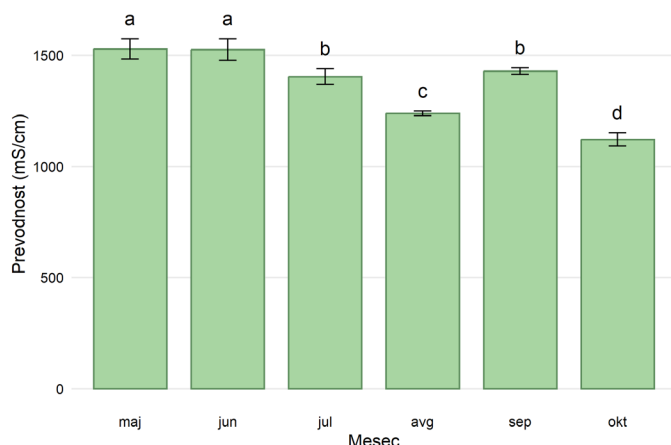
Vsebnost K^+ ionov (Slika 1b) se je med meseci statistično značilno razlikovala ($p < 0,001$), in sicer se je od pomladi proti višku poletja in začetku jeseni postopno povečevala. Najnižje vrednosti so bile maja in junija, nato pa se je koncentracija v juliju opazno zvišala. Najvišje vrednosti so bile dosežene avgusta in septembra, ko je bila vsebnost kalija najbolj izrazita. Oktobra je sledil precejšen padec, kar pomeni, da se je trend obrnil. Tak potek kaže na postopno kopičenje kalija v poletnem obdobju, medtem ko se proti jeseni njegova vsebnost ponovno zmanjša.

Klor

Vsebnost Cl^- ionov (Slika 1c) se skozi opazovano obdobje ni izrazito spreminjala, temveč je ostajala razmeroma stabilna z manjšimi nihanji med posameznimi meseci. Nekoliko nižje



Slika 1. Sezonske spremembe v vsebnosti izbranih ionov: Ca^{2+} (a), K^+ (b), Cl^- (c) in NH_4^+ (d) v listih parocije (*Parrotia persica*) v obdobju od maja do oktobra izražene v mg na gram suhe mase lista. Stolpci predstavljajo povprečne vrednosti $\pm$ SD. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike med meseci (enosmerna ANOVA, $p < 0,05$; Tukeyev ali Games-Howellov post hoc test).



Slika 2. Sezonske spremembe električne prevodnosti (mS/cm) v listih *Parrotia persica*. Stolpci predstavljajo povprečne vrednosti $\pm$ SD. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike med meseci (enosmerna ANOVA, $p < 0,05$; Tukeyev post-hoc test).

vrednosti so bile zaznane v obdobju med junijem in avgustom, medtem ko so se proti jeseni koncentracije postopno zvišale, tako da so bile najvišje vrednosti zabeležene oktobra. Kljub tem spremembam razlike med meseci niso velike, kar kaže na to, da so kloridni ioni skozi celotno obdobje prisotni precej

enakomerno, brez izrazitih sezonskih vrhov.

Amonij

Vsebnost NH_4^+ ionov (Slika 1d) je bila najvišja maja, nato pa se je do julija postopno zniževala. V tem obdobju je padec precej enakomeren, kar nakazuje na postopno zmanjševanje razpoložljivega amonija. V avgustu in septembru se je vrednost nekoliko povečala, vendar ni dosegla začetnih, spomladanskih ravni. Oktobra je bila vsebnost najnižja.

Prevodnost

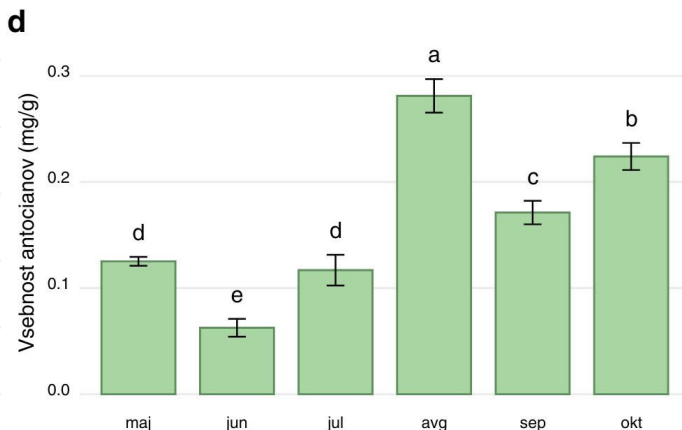
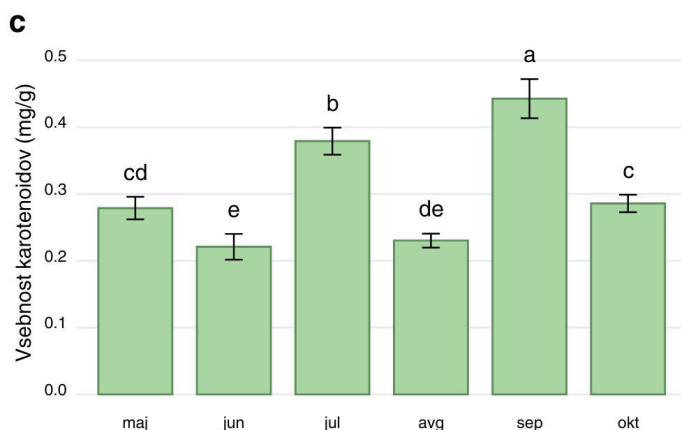
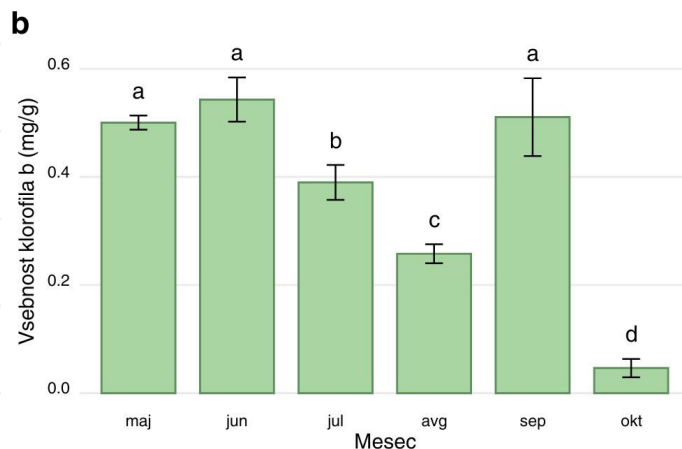
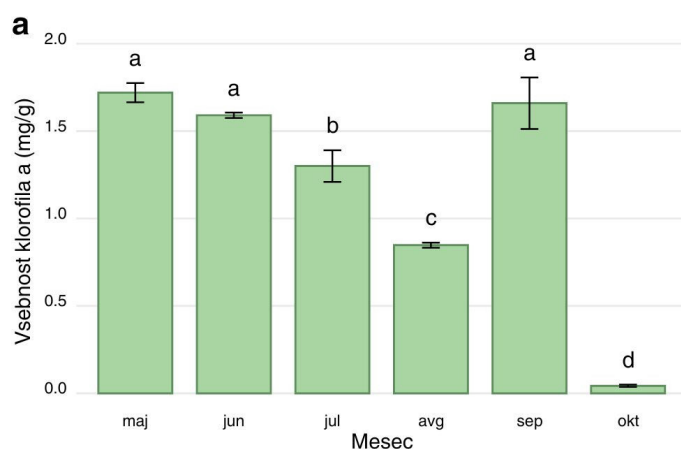
Prevodnost (Slika 2) se je med meseci statistično značilno razlikovala ($p < 0,001$). Najvišja je bila spomladi (maj in junij), medtem ko je od julija dalje upadla. Najnižja prevodnost je bila opažena v zadnjih fazah senescence, oktobra.

Klorofil a

Vsebnost klorofila a (Slika 3a) se je med meseci statistično značilno razlikovala ($p < 0,001$) in je bila najvišja maja, nato pa se je do avgusta postopno zmanjševala. V septembru je sledilo ponovno povečanje, ki se je približalo začetnim vrednostim. Oktobra je vsebnost močno upadla.

Klorofil b

Vsebnost klorofila b (Slika 3b) kaže podoben vzorec kot klorofil a, vendar z manj izrazitim začetnim upadom. Najvišje vrednosti



Slika 3. Spremembe v vsebnosti fotosinteznih pigmentov: klorofil a (a), klorofil b (b), karotenoidi (c) in antocianov (d) v listih *Parrotia persica* izražene v mg na gram suhe mase lista med vegetacijsko sezono. Stolpci predstavljajo povprečne vrednosti $\pm$ SD. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike med meseci (enosmerna ANOVA, $p < 0,05$; Tukeyev ali Games-Howellov post hoc test)

so bile zabeležene junija, v juliju in predvsem avgustu je sledil padec, pri čemer je bila avgusta vrednost najnižja v poletnem obdobju. Septembra se je vsebnost ponovno povečala, nato pa oktobra izrazito upadla. Ta dinamika kaže, da se klorofil b skozi sezono spreminja podobno kot klorofil a, vendar z rahlo zamaknjениm vrhom in nekoliko bolj postopnimi spremembami.

Karotenoidi

Vsebnost karotenoidov (Slika 3c) se je med meseci statistično značilno razlikovala ($p < 0,001$), pri čemer se je po nižjih vrednostih v maju in juniju koncentracija v juliju izrazito povečala. V avgustu je ponovno nekoliko upadla, nato pa v septembru dosegla najvišjo vrednost. Oktobra se je vsebnost znova znižala. Tak vzorec nakazuje, da karotenoidi bolj variirajo skozi sezono.

Antociani

Vsebnost antocianov (Slika 3d) se je skozi opazovano obdobje statistično značilno razlikovala ($p < 0,001$).

Najnižje vrednosti so bile zabeležene junija, nato pa se je vsebnost v juliju ponovno nekoliko povečala. Najizrazitejši porast je bil v avgustu, ko so antociani dosegli najvišje vrednosti. V septembru je sledil padec, vendar so bile vrednosti še vedno višje kot v začetnih mesecih. Oktobra se je vsebnost ponovno nekoliko povečala.

Diskusija

Senescenca listov predstavlja ključno fazo recikliranja hranil, kjer koordinirana razgradnja celičnih komponent omogoča njihovo remobilizacijo v druge dele rastline (Avlila-Ospina s sod. 2014). Ta metabolni prehod se neposredno odraža v dinamiki mineralnih ionov in fotosinteznih pigmentov, kar so potrdili tudi naši rezultati pri perzijski bukvi. Upad koncentracije Ca^{2+} ionov od začetka poletja oziroma pozne pomladi in relativna konstantnost v poznejših mesecih, se ne skladata s študijo švedskega bukovega gozda, kjer so dobili precej drugačne rezultate: koncentracija se je od julija proti novembru sicer rahlo povečala, vendar ta razlika v koncentraciji ni bila statistično značilna (Tyler 2005). Z našimi rezultati nismo potrdili naše hipoteze, da se vsebnost kalcijevih ionov poveča med senescenco, zato smo hipotezo ovrgli. Primerljiv rezultat z zgoraj omenjeno študijo smo dobili za K^{+} ione. Postopno povečanje je bilo zaznано tudi pri bukvi iz švedskega bukovega gozda, kjer je trend povečanja opazen od julija do septembra, in sicer z 0,0057 mg/g na 0,0083 mg/g, v jesenskem času pa je opazen obrnjen trend, kajti koncentracija K^{+} ionov je v novembru upadla na 0,0025 mg/g (Tyler 2005). To se sklada z našimi rezultati, saj smo oktobra opazili izrazit upad K^{+} ionov. Med senescenco se je vsebnost K^{+} ionov zmanjšala, s čimer smo potrdili našo hipotezo glede kalijevih ionov. Med tem ko pri parociji nismo zaznali večjih sprememb v nihanju Cl^{-} ionih, so raziskave na treh vrstah mangrov pokazale, da se s staranjem listov kopičijo Cl^{-} ioni (Lin 2001). Tudi McRoberts s sodelavci (2015) v raziskavi drevesnih vrst zmernega pasu (bukve, jesena, norveškega javorja in hrasta) poročajo, da se je celokupni klor v listih povečal s staranjem listov. Ker nismo zaznali padca koncentracije kloridnih ionov, smo hipotezo ovrgli. V naši raziskavi je koncentracija amonijevih ionov postopno upadala, s čimer smo potrdili našo hipotezo. Druge

študije pa kažejo, da je koncentracija NH_4^{+} ionov med razvojem in staranjem listov oziroma rastlin visoka, medtem ko je med senescenco običajno opazen porast koncentracije (Avlila-Ospina s sod. 2014).

Prevodnost se je z meseci znižala, kar se sklada tudi z literaturo, saj listi med staranjem zgubljajo elektrolite (Rolny s sod. 2011). Tako smo s poskusom potrdili našo hipotezo.

Upad koncentracije klorofila a in b med senescenco se sklada z drugimi študijami, neskladje pa opazimo v izrazitem porastu koncentracije v septembru (Mattila s sod. 2018; Sanger s sod. 1971; Whitfield s sod. 1974). Predvidevamo, da je neskladje v rezultatu morda posledica napake pri merjenju ali nenatančnega laboratorijskega dela. Nenaden porast koncentracije v septembru bi lahko pripisali tudi napakam pri našem delu, pri čemer smo morda vzorec iz septembra bolj homogenizirali kot ostale in posledično bolj ekstrahirali pigmente. Študije kažejo, da tudi količina karotenoidov med senescenco upada, vendar je upad koncentracije bolj stabilen in počasen, kar opazimo tudi v variaciji njihovih koncentracij v našem poskusu (Biswal s sod. 1983; Whitfield s sod. 1974). Glede na naše rezultate in primerjavo z literaturo smo delno potrdili našo hipotezo, saj se je vsebnost fotosinteznih barvil (klorofila a in klorofila b) med senescenco zmanjševala, medtem ko je raven karotenoidov kljub manjšim nihanjem med rastno sezono ostala primerljiva z začetno koncentracijo. Tako smo hipotezo o zmanjševanju vsebnosti karotenoidov ovrgli.

Naraščanje vsebnosti antocianov med senescenco se sklada z literaturo, saj imajo antociani fotoprotektivno vlogo, zlasti v obdobju resorpcije hranil je potreba po zaščiti pred sončnimi žarki velika (Hoch s sod. 2001). Tako smo potrdili tudi našo hipotezo, da se vsebnost antocianov med senescenco poveča.

Zaključek

Vsebnost različnih ionov v listih parocije se je med senescenco različno spreminjala. Vsebnost Ca^{2+} ionov se je od maja proti juliju zmanjševala, nato pa je ostala relativno konstantna, medtem ko je vsebnost K^{+} ionov v poletnih mesecih naraščala in v jesenskem obdobju upadala. Pri Cl^{-} ioni nismo zaznali večjih sprememb, vsebnost NH_4^{+} ionov pa je postopno upadala, kar se razlikuje od podatkov v literaturi. Celotna prevodnost listov je med senescenco upadla, prav tako tudi vsebnost klorofil a in b. Vsebnost karotenoidov je med senescenco nihala brez večjih sprememb. Obratno od fotosinteznih pigmentov pa je vsebnost antocianov med senescenco naraščala. V našem poskusu je verjetno prišlo do eksperimentalne napake, zaradi česar so nekatere pridobljene vrednosti izven pričakovanih okvirov. Za pridobitev zanesljivejših podatkov bi bilo treba poskus ponoviti ter s tem izključiti morebitne napake pri izvedbi.

Literatura

1. Biswal UC, Bergfeld R, Kasemir H, 1983. Phytochrome-mediated delay of plastid senescence in mustard cotyledons: changes in pigment contents and ultrastructure. *Planta* 157:85–90. <https://doi.org/10.1007/BF00394545> (3. maj 2026)
2. Guo Y, Gan S, 2005. Leaf senescence: signals, execution, and regulation. *Current Topics in Developmental Biology* 71: 83–112. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(05\)71003-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(05)71003-6) (2. apr. 2026)
3. Hoch WA, Zeldin EL, McCown BH, 2001. Physiological significance of anthocyanins during autumnal leaf senescence. *Tree physiology*

- 21:1-8. <https://doi.org/10.1093/treephys/21.1.1> (3. maj 2026)
4. Killingbeck KT, 1996. Nutrients in senesced leaves: keys to the search for potential resorption and resorption proficiency. *Ecology* 77: 1716–1727. <https://doi.org/10.2307/2265777> (1. maj 2026)
5. Lee TY, Lam L, Patel-Tupper D, Roy PP, Ma SA, Lam HE, Lucas-Demott A, Karavolis NG, Iwai M, Niyogi KK, Fleming GR, 2024. Chlorophyll to zeaxanthin energy transfer in nonphotochemical quenching: An exciton annihilation-free transient absorption study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 121:e2411620121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2411620121> (2. apr. 2026)
6. Lichtenthaler HK, 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148:350–382. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1) (30. Maj 2026)
7. Lichtenthaler HK, Buschmann C, 2001. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* F4.3.1–F4.3.8. 10.1002/0471142913.faf0403s01 (30. Maj 2026)
8. Lim PO, Kim HJ, Nam HG, 2007. Leaf senescence. *Annual Review of Plant Biology* 58: 115–136. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105316> (2. apr. 2026)
9. Avila-Ospina L, Moison M, Yoshimoto K, Masclaux-Daubresse C, 2014. Autophagy, plant senescence, and nutrient recycling. *Journal of Experimental Botany* 65:3799–3811. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru039> (2. maj 2026)
10. Lin P, Wang WQ, 2001. Changes in the leaf composition, leaf mass and leaf area during leaf senescence in three species of mangroves. *Ecological Engineering* 16:415–424. [https://doi.org/10.1016/S0925-8574\(00\)00126-9](https://doi.org/10.1016/S0925-8574(00)00126-9) (2. maj 2026)
11. Maoka T, 2019. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines* 74: 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x> (2. apr. 2026)
12. Mattila H, Valev D, Havurinne V, Khorobrykh S, Virtanen O, Antinluoma M, Tyystjärvi E, 2018. Degradation of chlorophyll and synthesis of flavonols during autumn senescence—the story told by individual leaves. *AoB Plants* 10:ply028. <https://doi.org/10.1093/aobpla/ply028> (2. maj 2026)
13. McRoberts WC, Keppler F, Harper DB, Hamilton JTG, 2015. Seasonal changes in chlorine and methoxyl content of leaves of deciduous trees and their impact on release of chloromethane and methanol at elevated temperatures. *Environmental Chemistry* 12:426–437. <https://doi.org/10.1071/EN14208> (2. maj 2026)
14. Milla R, Castro-Díez P, Maestro-Martínez M, Montserrat-Martí G, 2005. Relationships between phenology and the remobilization of nitrogen, phosphorus and potassium in branches of eight Mediterranean evergreens. *New Phytologist* 168: 167–178. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01477.x> (1. maj 2026)
15. Millard P, Grelet G, 2010. Nitrogen storage and remobilization by trees: ecophysiological relevance in a changing world. *Tree Physiology* 30: 1083–1095. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpq042> (1. maj 2026)
16. Millard P, Wendler R, Grassi G, Grelet GA, Tagliavini M, 2006. Translocation of nitrogen in the xylem of field-grown cherry and poplar trees during remobilization. *Tree Physiology* 26: 527–536. <https://doi.org/10.1093/treephys/26.4.527> (1. maj 2026)
17. Nicholson RG, 1989. *Parrotia persica*: an ancient tree for modern landscapes. *Arnoldia* 49: 34–39. <https://doi.org/10.5962/p.258525> (1. maj 2026)
18. Ougham HJ, Morris P, Thomas H, 2005. The colors of autumn leaves as symptoms of cellular recycling and defenses against environmental stresses. *Current Topics in Developmental Biology* 66: 135–160. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(05\)66004-8](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(05)66004-8) (2. apr. 2026)
19. Rolny N, Costa L, Carrión C, Guiamet JJ, 2011. Is the electrolyte leakage assay an unequivocal test of membrane deterioration during leaf senescence? *Plant physiology and biochemistry* 49:1220–1227. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.06.010> (2. maj 2026)
20. Sanger JE, 1971. Quantitative investigations of leaf pigments from their inception in buds through autumn coloration to decomposition in falling leaves. *Ecology* 52:1075–1089. <https://doi.org/10.2307/1933816> (2. maj 2026)
21. Shariatnegad S, 2005. Global forest resources assessment country reports: Islamic Republic of Iran. Rome: 41. (1. maj 2026)
22. Teng Z, Jiang X, He F, Bai W, 2020. Qualitative and Quantitative Methods to Evaluate Anthocyanins. *EFood* 1, 5: 339–346. 10.2991/efood.k.200909.001 (1. maj 2026)
23. Tyler G, 2005. Changes in the concentrations of major, minor and rare-earth elements during leaf senescence and decomposition in a *Fagus sylvatica* forest. *Forest Ecology and Management* 206:167–177. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2004.10.065> (2. maj 2026)
24. White PJ, 2012. Chapter 3 - Long-distance transport in the xylem and phloem. *Mineral Nutrition of Higher Plants*: 49–70. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00003-0> (1. maj 2026)
25. Whitfield DM, Rowan KS, 1974. Changes in the chlorophylls and carotenoids of leaves of *Nicotiana tabacum* during senescence. *Phytochemistry* 13:77–83. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)91270-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)91270-6) (3. maj 2026)
26. Xiaoming T, Guangfeng X, Cun M, Lu Z, Jing S, Gaofei L, Hao L, 2024. Integrated transcriptomic and metabolomic analysis reveals possible molecular mechanisms of leaf growth and development in *Disanthus cercidifolius* var. *longipes*. *Metabolites* 14(12): 654. <https://doi.org/10.3390/metabo14120654> (1. maj 2026)
27. Zidong L, Huade G, Xinping Z, Na L, 2017. Photosynthetic capacity of senescent leaves for a subtropical broadleaf deciduous tree species *Liquidambar formosana* Hance. *Scientific Reports* 7: 6323. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06629-7> (1. maj 2026)

Vpliv delcev mikroplastike na rast in razvoj graha (*Pisum sativum*)

Aljaž Bratanič, Samo Colasanti Tekavec, Neža Janežič, Neja Konečnik, Luka Sajovic

Študij molekulske in funkcionalne biologije, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

- Namen raziskave je bil preveriti vpliv mikroplastike v substratu na rast, razvoj in izbrane fiziološke lastnosti graha (*Pisum sativum*), pri čemer smo želeli ovrednotiti, kako različne koncentracije mikroplastike vplivajo na nadzemne in podzemne dele rastline.
- Rastline smo štiri tedne gojili v kontroliranih razmerah v substratu z dodatkom mikroplastike v koncentracijah 0,5 %, 1 % in 5 %, medtem ko je kontrolna skupina rasla brez dodatka mikroplastike. Spremljali smo rast poganjkov in korenin, svežo in suho biomaso, fotokemično učinkovitost, transpiracijo ter vsebnost fotosinteznih pigmentov.
- Prisotnost mikroplastike ni statistično značilno vplivala na rast poganjkov, fotokemično učinkovitost, transpiracijo ali vsebnost fotosinteznih pigmentov. Pri 0,5 % in 1 % koncentraciji mikroplastike smo zaznali statistično značilno zmanjšanje dolžine korenin, medtem ko so spremembe v biomasi večinoma nakazovale trendom spodbujanja rasti brez statistične značilnosti.
- Ugotovili smo, da je koreninski sistem graha bolj občutljiv na prisotnost mikroplastike kot nadzemni deli. Uporabljene koncentracije mikroplastike v obravnavanem časovnem obdobju niso povzročile izrazitih fizioloških motenj, kar nakazuje, da so za izrazitejše učinke potrebne višje koncentracije ali daljša izpostavljenost.

Ključne besede: fotokemična učinkovitost, transpiracija, fotosintezni pigmenti, biomasa

Uvod

Grah (*Pisum sativum*) je hranljiva stročnica iz družine metuljnic (Fabaceae), ki vsebuje visoke ravni beljakovin (20–25 %), ogljikovih hidratov ter številne minerale in vitamine (Windsor s sod. 2024). Uspeva na različnih tipih tal. Manj produktivna rast je bila zabeležena na tleh s trdo površinsko skorjo in na težkih glinastih tleh z omejenim odcejanjem vode.

Rastlina ima razmeroma plitek koreninski sistem in visoko učinkovitost izrabe vode, zaradi česar se jo uporablja v namene kolobarjenja na območjih, kjer je ohranjanje talne vlage problematično (Velykis in Satkus 2012).

Grah je pomemben kot modelni organizem v raziskavah rasti in razvoja, saj so ga zaradi jasno opredeljenih morfoloških faz in dostopnih meristemskih tkiv široko uporabljali pri preučevanju korelacij v rasti poganjkov in nastanku vegetativnih organov (Smýkal 2014).

Rast in razvoj graha potekata v dobro opredeljenih fenoloških fazah. Kalitev je počasnejša kot pri žitih, saj večja semena zahtevajo večjo potrebo po vlagi; kalitev običajno traja 10–14 dni. Rastlina nato preide v vegetativno rast, kot najbolj občutljivi fazi na pomanjkanje vode pa sledita tvorba cvetov in razvoj strokov. Cvetenje graha se prične približno 40–50 dni po setvi, uspešen nastanek strokov pa je odvisen od zadostne količine vode in ugodnih talnih razmer (Velykis in Satkus 2012). Grah je lahko zaradi plitvega koreninskega sistema izpostavljen raznolikim onesnaževalom v tleh. Med njimi ima velik vpliv mikroplastika (MP), ki vstopa v rastlino preko korenin in posledično vpliva na rast in fiziološke procese graha (Nikolov s sod. 2023).

Svetovna letna proizvodnja plastike presega 359 milijonov ton. Približno dve tretjini te plastike ima kratek cikel uporabe (manj kot en mesec). Kopičenje plastičnih odpadkov je bilo od leta 1950 do 2015 ocenjeno na približno 6,3 milijarde ton, pri čemer okoli 80 % plastike ostane v naravnem okolju (Pilapitiya in Ratnayake 2024).

Danes je vse več raziskav osredotočenih na proučevanje MP (delci manjši od 1 mm) in njenega vpliva na okolje. V naravi predstavlja težavo predvsem zaradi kopičenja v prehranjevalnih verigah ter zaradi vezave onesnaževal na svojo površino, kar povečuje njihovo koncentracijo v tleh. V okolje je lahko vnesena primarno (neposredno iz industrije in kemično pridobljenih izdelkov) ali sekundarno z razpadanjem večjih kosov plastike v okolju (Rillig 2012).

Tla so heterogeno življenjsko okolje, ki ga tvori zmes mineralov in organske snovi, s sistemom povezanih por, napolnjenih z zrakom ali vodo. Ugotovljeno je bilo, da lahko MP spremeni različne fizikalno-kemijske lastnosti tal, kot so nasipna gostota, sposobnost zadrževanja vode, pH vrednost in vsebnost organske snovi. Ti vidiki so ključni za delovanje talnega sistema ter vplivajo na rast, razvoj in druge fiziološke procese rastlin. S svojo dimenzijo, sestavo in koncentracijo vpliva na razne procese, vključno s fotosintezo, privzemom hranil, rastjo in razvojem ter povzročajo osmotske in oksidativne poškodbe, podobne tistim, ki jih povzročajo abiotični stresni dejavniki (Santini s sod. 2023).

Dokazano je, da lahko MP vpliva na sposobnost zadrževanja vode v tleh (Wang s sod. 2020), fiziološke procese in razvoj organizmov v prsti (Zhu s sod. 2018), v drugih predstavnikih poddružine Faboideae pa je prišlo do povišane rasti poganjkov (Singh in Singh 2022). S poskusom smo želeli preveriti kakšen vpliv ima prisotnost MP v prsti na rast in razvoj graha pri treh

različnih koncentracijah: 0,5 %, 1 % ter 5 %. Pričakujemo, da bo z naraščanjem koncentracije MP v prsti prišlo do zmanjšanja mase korenin, naraščanja mase poganjkov ter znižanja v stopnji transpiracije, fotokemične učinkovitosti in vsebnosti fotosinteznih pigmentov.

Materiali in metode

Nastavitev poskusa

Mlade dvotedenske sadike graha smo izpostavili različnim koncentracijam MP. Pripravili smo 4 različne izpostavitve, in sicer s koncentracijami 0,5 % (C1), 1 % (C2), 5 % (C3), skupina z 0 % MP pa je služila kot kontrola (K). Standardni substrat LUFA (LUFA Speyer, Nemčija) nam je služil kot glavni rastni medij, ki smo mu dodali MP, pridobljeno z mletjem črne kmetijske folije iz polipropilena

t.i. »P8« (interna referenčna koda: C3-PPDE-200-black-A0) (van Loon s sod., 2025). Za vsak tretma posebej smo zmešali 1500 g substrata – pri kontroli zgolj LUFA, pri C1 smo dodali 7,5 g mikroplastike, pri C2 15 g in pri C3 75 g. Znotraj vsake izpostavitve smo izvedli pet ponovitev.

Izbrali smo 20 sadik podobne velikosti in jih presadili iz vermikulita v lončke s 300 g pripravljenega substrata. Pred presajanjem smo na dno lončkov položili kovinske mrežice, ki so omejile izhajanje substrata ter sprali korenine, da bi zmanjšali vnos prvotnega rastnega medija v lončke. Vsako sadiko smo zalili s 50 mL destilirane vode in 20 mL polovične Hoaglandove hranilne raztopine (Hoagland in Arnon 1950) ter pred začetkom poskusa izmerili začetno višino poganjkov (Slika 1).

Gojenje rastlin in merjenje poganjkov

Pripravljene rastline smo gojili 4 tedne v rastni komori. Vzpostavljeni so bili naslednji pogoji: 16 ur svetlobe pri 22 °C, 8 ur teme pri 18 °C, povprečna relativna vlažnost zraka je bila 60 %. Rastline smo zalivali s polovično Hoaglandovo hranilno raztopino, in sicer dvakrat na teden (torek in petek). Prvi teden smo jih zalivali z 20 mL, v naslednjih tednih pa so že toliko zrastle, da smo jih zalivali s 40 mL. Dolžine poganjkov smo merili na 7 dni, kjer je bila prva meritev ob sami postavitvi poskusa in zadnja ob podiranju poskusa. Merili smo razdaljo od baze stebela do apikalnega meristema poganjka.



Slika 1. Fotografija nastavitve poskusa. Rastline so izpostavljene različnim koncentracijam MP. Kontrolna skupina je vrsta spredaj, nato si sledijo skupine z 0,5 %, 1 % in 5 % izpostavitvijo.

Meritve fotokemične učinkovitosti in transpiracije

Tretji teden poskusa smo rastlinam izmerili dejansko fotokemično učinkovitost (Y) fotosistema II in transpiracijo. Meritve smo izvedli v rastni komori v času osvetlitve. Fotokemično učinkovitost smo izmerili s fluorometrom PAM-2500 (Heinz Walz GmbH) na osvetljenih listih. Merili smo fluorescenco klorofila a, meritve pa smo izvedli pri vsaki rastlini na primerljivih popolnoma razvitih listih 3. nodija. Transpiracijo oziroma prevodnost listnih rež smo izmerili s porometrom SC-1 (Decagon Devices). Meritve transpiracije smo izvedli na med rastlinami primerljivimi popolnoma razvitimi listi 4. nodija.

Tehtanje sveže in suhe biomase ter analiza fotosinteznih pigmentov

Četrty teden smo podrli poskus. Rastline smo odstranili iz prsti in korenine čim bolj očistili prsti in MP. Nato smo poganjke ločili od korenin in stehali svežo biomaso vsake rastline tako, da smo posebej stehali korenine in poganjke. Nato smo stehane zavili v aluminijasto folijo in jih liofilizirali, nato pa stehali še suho biomaso poganjkov. Zatem smo posamezne rastline s pestilom v terilnici strli v prah, ki smo ga v nadaljevanju uporabili za analizo fotosinteznih pigmentov. Odtehtali smo 35 mg strtega prahu treh naključno izbranih poganjkov v sklopu vsake izpostavitve. Prah smo vmešali v 15 mL ohlajenega 100 % metanola z uporabo vibracijskega stresalnika. Sledila je 30 min inkubacija v temi pri sobni temperaturi. Med inkubacijo smo ekstrakte še dvakrat premešali in s tem povečali uspešnost ekstrakcije pigmentov. Ekstrakt smo prefiltrirali skozi filter papir in 2 mL filtrata vsakega vzorca odpipetirali v mikrocentrifugirko. Mikrocentrifugirke smo centrifugirali 3 min pri 2500 rpm. Za vsak vzorec smo prenesli dvakrat po 1 mL ekstrahiranih pigmentov v kiveto ter izmerili absorbanco pri valovni dolžini 665, 652 in 470 nm. Iz dobljenih meritev smo izračunali koncentracijo klorofila a, klorofila b ter karotenoidov v mg/mL na podlagi formule za izračunavanje koncentracije pigmentov (Lichtenthaler in Buschmann, 2001).

Statistična obdelava podatkov

Statistično obdelavo podatkov smo izvedli v programu Google Sheets (Google LLC). Vsem meritvam smo določili povprečno vrednost, standardni odklon in standardno napako. Enosmerna analiza variance (ANOVA) je bila narejena v programu LibreOffice Calc (The Document Foundation, verzija 7.3.7.2). Na podatkih, kjer je bila prisotna statistično značilna razlika smo izvedli tudi Bonferroni-Holm post-hoc test v RStudio (Posit Software, PBC, verzija 2025.09.2). Razlike smo upoštevali kot statistično značilne pri vrednosti $p < 0,05$. Paketi uporabljeni za analizo v R so bili agricolae (de Mendiburu, 2024), pander (Daráczki in Tsegelskyi, 2024) ter knitr (Xie, 2024). S programom MS Excel smo pripravili grafični prikaz podatkov, pri čemer smo uporabili vmesnik XL_toolbox.

Rezultati

Dolžina poganjkov in korenin

Pri vseh skupinah se je ob vsaki meritvi, ki smo jo izvedli na 7 dni, povprečna dolžina poganjkov povečala, kar je razvidno iz Slike 2. Skupina C2 je imela trend nekoliko počasnejše

rasti, vendar primerjava povprečnih dolžin poganjkov med skupinami ni pokazala statistično značilnih razlik. Po končanem poskusu so bile korenine pri skupinah C1 in C2 statistično značilno krajše v primerjavi s kontrolno skupino, kot je razvidno v Tabeli 1.

Tabela 1. Dolžina korenin po končanem poskusu (5. teden). Prikazana je dolžina korenin (srednja vrednost $\pm$ standardna napaka, $n = 5$). Oznaka K predstavlja kontrolno skupino - skupina, ki ni bila izpostavljena MP. C1 prikazuje izpostavljenost 0,5 %, C2 1 % ter C3 5 % MP. Črke ob podatkih označujejo statistično značilne razlike v dolžini korenin med posameznimi skupinami (enosmerna ANOVA, Holm-Bonferroni post-hoc test, $p < 0,05$).

Tretma	Dolžina korenin [cm]
K	25,06 $\pm$ 1,64 a
C1	18,32 $\pm$ 0,89 b
C2	17,66 $\pm$ 1,02 b
C3	21,58 $\pm$ 1,91 ab

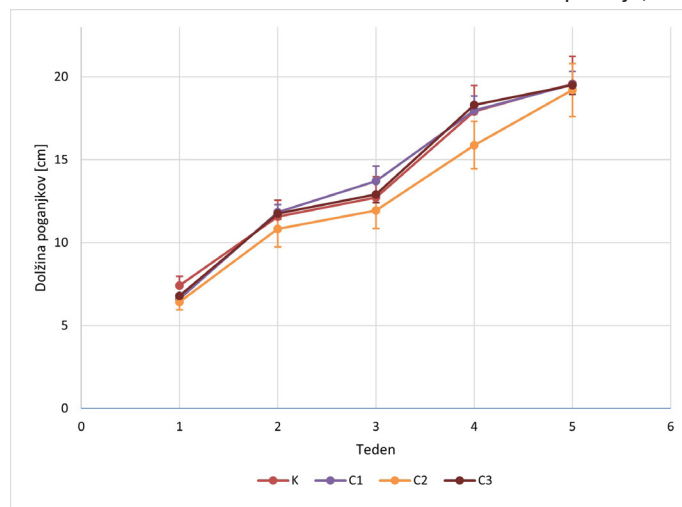
Sveža in suha biomasa

Slika 3 prikazuje, kako je izpostavitve z različnimi koncentracijami MP vplivala na svežo biomaso poganjkov in korenin. Po končanem poskusu je bila sveža biomasa poganjkov med skupinama C2 in C3 statistično značilno različna, vendar se nobena ni razlikovala od kontrolne skupine. Sveža biomasa korenin pa se med skupinami ni statistično značilno razlikovala.

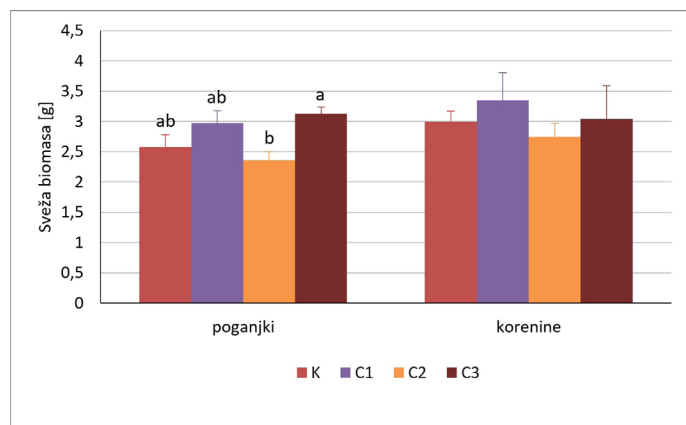
S Slike 4 vidimo trend, da suha biomasa korenin sicer nekoliko pada z večanjem koncentracije MP, vendar to manjšanje biomase ni bilo statistično značilno. Prav tako med skupinami ni bilo statističnih razlik v suhi biomasi poganjkov.

Fotokemična učinkovitost in transpiracija

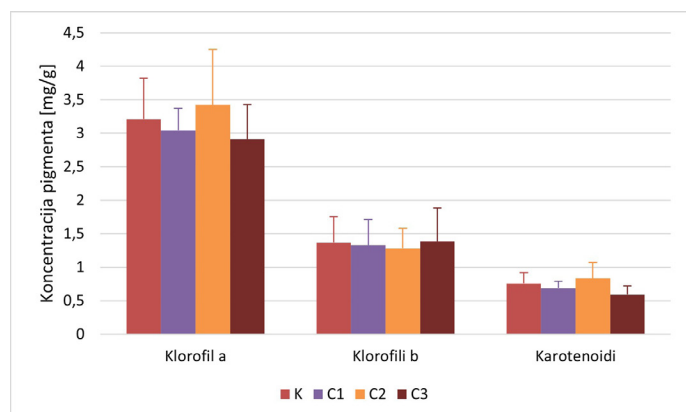
Rezultati meritev fotokemične učinkovitosti in transpiracije,



Slika 2. Grafični prikaz rasti poganjkov ob izpostavljenosti različnim koncentracijam MP v obdobju štirih tednov. Prikazane so dolžine poganjkov (srednja vrednost $\pm$ standardna napaka, $n = 5$). Oznaka K predstavlja kontrolno skupino - skupina, ki ni bila izpostavljena MP. C1 prikazuje izpostavljenost 0,5 %, C2 1 % ter C3 5 % MP. Med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik v dolžini poganjkov (enosmerna ANOVA, $p < 0,05$).



Slika 3. Grafični prikaz sveže biomase poganjkov in korenin po končanem poskusu (5. teden). Prikazana je masa poganjkov in korenin (srednja vrednost $\pm$ standardna napaka, $n = 5$). Oznaka K predstavlja kontrolno skupino - skupina, ki ni bila izpostavljena MP. C1 prikazuje izpostavljenost 0,5 %, C2 1 % ter C3 5 % MP. Črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike v sveži biomasii poganjkov med posameznimi skupinami. V sveži biomasii korenin ni bilo statistično značilnih razlik (enosmerna ANOVA, Holm-Bonferroni post-hoc test, $p < 0,05$).



Slika 5. Grafični prikaz vsebnosti pigmentov [mg/g] po končanem poskusu. Prikazana je koncentracija klorofila a, klorofila b in karotenoidov (srednja vrednost $\pm$ standardna napaka, $n = 3$). Oznaka K predstavlja kontrolno skupino - skupina, ki ni bila izpostavljena MP. C1 prikazuje izpostavljenost 0,5 %, C2 1 % ter C3 5 % MP. Med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik v koncentraciji pigmentov (enosmerna ANOVA, $p < 0,05$).

ki so prikazani v Tabeli 2, niso pokazali razlik med skupinami, ki bile statistično značilne. Pri skupini C1 in C2 sicer vidimo v povprečju nekoliko nižje vrednosti transpiracije v primerjavi s kontrolno skupino, vendar le-te niso bile statistično značilne.

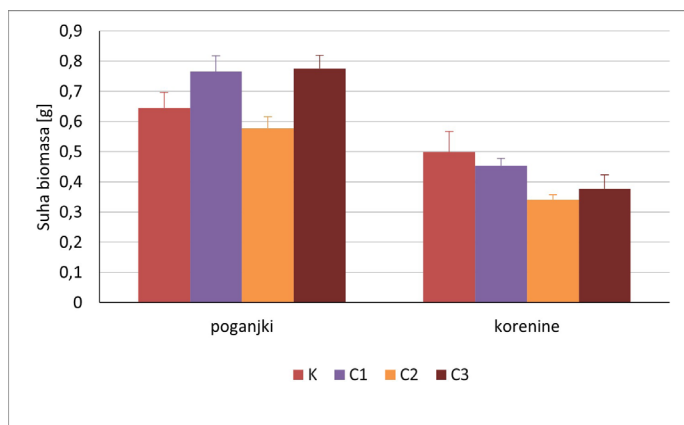
Vsebnost fotosinteznih pigmentov

Vsebnosti fotosinteznih pigmentov se med skupinami niso razlikovale, kar je razvidno iz Slike 5.

Diskusija

Dolžina poganjkov

Pri poskusu smo opazili trend, ki je nakazoval, da izpostavljenost graha izbranim koncentracijam MP ni



Slika 4. Grafični prikaz suhe biomase poganjkov in korenin po končanem poskusu. Prikazana je masa poganjkov in korenin (srednja vrednost $\pm$ standardna napaka, $n = 5$). Oznaka K predstavlja kontrolno skupino - skupina, ki ni bila izpostavljena MP. C1 prikazuje izpostavljenost 0,5 %, C2 1 % ter C3 5 % MP. Med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik v suhi biomasii poganjkov in korenin (enosmerna ANOVA, Holm-Bonferroni post-hoc test, $p < 0,05$).

Tabela 2. Prikaz fotokemične učinkovitosti in transpiracije.

Meritev je bila izvedena 21. dan poskusa. Prikazani sta fotokemična učinkovitost in transpiracija (srednja vrednost $\pm$ standardna napaka, $n = 5$). Oznaka K predstavlja kontrolno skupino - skupina, ki ni bila izpostavljena MP. C1 prikazuje izpostavljenost 0,5 %, C2 1 % ter C3 5 % MP. Med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik v fotosintezni učinkovitosti, prav tako ne v transpiraciji (enosmerna ANOVA, $p < 0,05$).

Tretma	Fotokemična učinkovitost	Transpiracija [mmol/m ² s]
K	0,695 $\pm$ 0,0070	40,30 $\pm$ 7,1040
C1	0,708 $\pm$ 0,0034	35,10 $\pm$ 6,2284
C2	0,688 $\pm$ 0,0061	25,16 $\pm$ 4,6780
C3	0,699 $\pm$ 0,0095	40,68 $\pm$ 5,6426

negativno vplivala na rast poganjkov. Razlike med dolžino poganjkov eksperimentalnih skupin in kontrolne skupine niso bile statistično značilne. Takšen odziv je nakazoval, da MP pri uporabljenih koncentracijah ni delovala kot izrazit stresni dejavnik na nadzemne dele rastline.

Li s sod. (2024) so v raziskavi preučevali vpliv različnih koncentracij in velikosti polistirenskih mikrodlecev na rast graha v hidroponskem sistemu. Spremembe dolžine poganjkov so bile pri večjih delcih (5 μ m) in pri nižjih koncentracijah (100 mg/L) v primerjavi s kontrolo majhne in niso bile statistično značilne, medtem ko so pri manjših delcih (0,1 μ m in 0,08 μ m) in pri višjih koncentracijah (500 mg/L) ugotovili statistično značilno zmanjšanje rasti poganjkov. Nikolov s sod. (2023) so v sorodni raziskavi prav tako preučevali vpliv polistirenskih mikrodlecev (1 μ m, 5 μ m in 100 μ m) na rast graha, vendar pri enotni koncentraciji (100 mg/L). Dolžina poganjkov rastlin, izpostavljenih večjim delcem (5 μ m in 100 μ m), je bila večja v primerjavi s kontrolo in statistično značilna, medtem ko pri

manjših delcih (1 μm) statističnih razlik niso zaznali. Na podlagi primerjave našega poskusa z navedenima raziskavama je mogoče sklepati, da na rast poganjkov vplivajo lastnosti MP, predvsem velikost delcev, uporabljena koncentracija in čas izpostavitve. Razlike med raziskavami nakazujejo, da se učinki MP na nadzemne dele graha izražajo šele ob specifičnih kombinacijah omenjenih dejavnikov. V prihodnjih raziskavah bi bilo smiselno prilagoditi časovni okvir poskusov, kar bi omogočilo boljšo analizo morebitnih dolgoročnih vplivov MP na rast poganjkov.

Dolžina korenin

Prisotnost MP je imela statistično značilen vpliv na dolžino korenin graha pri 0,5 % in 1 % koncentracijah MP, kjer so bile korenine statistično značilno krajše v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. Pri 5 % koncentraciji razlik ni bilo. Podobne ugotovitve navajajo Xu s sod. (2024), ki so v kombinirani eksperimentalni in meta-analizi študiji preučevali vpliv MP na koreninski sistem pri navadni pšenici, koruzi in solati (*Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Lactuca sativa*). Opazili so, da je pri večini vrst prišlo do statistično značilne krajše rasti korenin. Korenine so bile krajše za povprečno 10 do 20 % od kontrolne skupine, predvsem pri nižjih in srednjih koncentracijah MP. Pri višjih koncentracijah so poleg zmanjšane rasti dodatno opazili morfološke spremembe korenin, kar je nakazovalo prilagoditveni, a hkrati stresni odziv koreninskega sistema. Dodatno sta Das in Alam (2024) v eksperimentalni raziskavi na mali vodni leči (*Lemna minor*) pokazala, da izpostavljenost MP v gojišču povzroči statistično značilno zmanjšano rast korenin, pri čemer so bile spremembe izrazitejše pri delcih z ostrejšimi robovi. Pri najvišjih uporabljenih koncentracijah se je dolžina korenin zmanjšala za približno 25 % v primerjavi s kontrolno skupino. Učinek je bil pripisan kombinaciji mehanskih poškodb koreninske površine in motenj v absorpciji vode. Razlike v intenzivnosti odziva med raziskavami so verjetno posledica uporabe različnih rastlinskih vrst, trajanja izpostavitve ter fizikalnih lastnosti MP in substrata, saj se učinki MP na korenine pogosto odražajo preko sprememb v poroznosti tal, vodnem režimu in mehanskih ovirah za rast korenin. Glede na rezultate sklepamo, da je koreninski sistem bolj občutljiv na prisotnost MP kot nadzemni deli graha. To je v skladu z našo hipotezo, da bo MP negativno vplivala na razvoj koreninskega sistema.

Sveža biomasa poganjkov in korenin

Pri analizi sveže biomase smo zaznali različen odziv poganjkov in korenin na prisotnost MP. Razlik v sveži biomasi korenin nismo opazili, medtem ko so bile pri poganjkih razlike le med skupinama z 1 % in 5 % koncentracijo MP. Zhang s sod. (2025) so opazili pri proučevanju vpliva MP na ljuljko (*Lolium sp.*), da je prišlo do zmanjšanja sveže biomase zaradi izpostavljenosti MP. V poskusu je bila sveža biomasa za 39 do 48 % manjša v primerjavi s kontrolo, pri koncentracijah 20 mg/L, 50 mg/L in 500 mg/L pri različnih velikostih MP. Pri našem poskusu takšen trend ni bil opazen, nakazoval se je celo trend povečanja sveže biomase pri 0,5 % in 5 % koncentraciji MP, vendar razlika ni bila statistično značilna v primerjavi s kontrolo. Suha biomasa poganjkov in korenin Xu s sod. (2024) so z meta-analizami pokazali, da dodajanje MP statistično značilno zmanjša dolžino korenin in

koreninske biomase. Nekatere študije so pokazale, da lahko izpostavljenost MP negativno vpliva na morfologijo in strukturo korenin. Negativni učinki MP na korenine so lahko posledica zamažitve celične stene ali celičnih stikov, mehanske poškodbe korenin in zmanjšanje aktivnosti antioksidativnih encimov, kar vodi v zaviranje rasti korenin. Čeprav rastlinske korenine ne morejo absorbirati velikih delcev MP, se ti lahko kopičijo na površini korenin. To je bilo opaženo tudi pri naših rastlinah, kjer je MP povsem obdajala koreninski sistem. MP ima veliko površino in se nanjo zlahka oprimejo izločki korenin, zato so korenine glavno mesto kopičenja MP. Njen vpliv na lastnosti korenin pa lahko neposredno in posredno vpliva na rast in preživetje rastlin (Xu s sod. 2024). Prav tako so Xu s sod. (2024) z meta-regresijsko analizo pokazali, da imata suha biomasa poganjkov in korenin nasprotni odziv na koncentracijo MP. S tem so ugotovili, da koncentracija MP lahko vpliva na porazdelitev biomase med koreninskimi in nadzemnimi deli rastline. To je bilo opaženo tudi pri naši raziskavi, kjer se je nakazoval trend povečanja suhe biomase poganjka pri izpostavitvi višji koncentraciji MP. V hipotezi smo navedli, da pričakujemo zmanjšanje suhe biomase korenin in povečanje suhe biomase poganjkov ob naraščajoči koncentraciji MP, vendar v raziskavi nismo dobili statistično značilnih razlik.

Fotokemična učinkovitost in transpiracija

Med posameznimi skupinami rastlin izpostavljenih MP in kontrolno skupino nismo zasledili razlik v povprečni stopnji fotokemične učinkovitosti, niti transpiracije. V skladu s hipotezo smo pričakovali zmanjšanje fotokemične učinkovitosti in transpiracije ob naraščajočih koncentracijah mikroplastike, vendar naši rezultati tega niso potrdili. MP v uporabljenih koncentracijah in v danem časovnem obdobju ni povzročila zaznavnih motenj v delovanju fotosinteznega sistema ali v regulaciji vodnega režima graha. Colzi s sod. (2022) so izvedli študijo, v sklopu katere so preverjali fotokemično učinkovitost buče (*Cucurbita pepo*) ob izpostavitvi rastline različnim koncentracijam in vrstam, mikroplastike v prsti. Rastline so vzgajali v lončkih, ki so vsebovali 0,02%, 0,10% in 0,20% koncentracije posameznih vrst PE, PVC, PP in PET mikroplastike. Preverjali so fotokemično učinkovitost, morfološke parametre in vsebnost posameznih mikronutrientov v rastlinah. Ugotovili so, da je s povišanjem prisotnosti mikroplastike prišlo do zmanjšanja v listnih površini, vsebnosti železa in stopne fotosinteze. Ugotovili so tudi, da je vrsta prisotne mikroplastike imela statistično značilen vpliv, pri čemer je skupina izpostavljena PVC plastiki imela najbolj intenzivne razlike v stopnji fotosintezne učinkovitosti napram kontrolni skupini in drugim skupinam z MP (Colzi s sod., 2022). V študiji Riaz s sod. (2025) so preverjali vpliv prisotnosti MP v zemlji na rast in razvoj navadne pšenice (*Triticum aestivum*) ob prisotnosti polistirena v različnih oblikah, kot so prah, kroglice in vlakna, pri koncentracijah 1 %, 3 % in 5 %. V nasprotju z našimi rezultati so ugotovili, da je z naraščanjem koncentracije mikroplastike prišlo tudi do vpadanja v stopnji transpiracije. Vsebnost fotosinteznih pigmentov Koncentracije klorofila a, klorofila b in karotenoidov v našem poskusu niso pokazale statistično značilnih sprememb, kar ni skladno z našo hipotezo, saj smo pričakovali znižanje vsebnosti fotosinteznih pigmentov ob naraščajočih koncentracijah MP. Boots s sod. (2019) so pri ljuljki (*Lolium sp.*) ugotovili, da MP v substratu ni povzročila statistično značilnih sprememb

v koncentracijah klorofila, temveč predvsem spremembe v razmerju med klorofilom a in b. Avtorji raziskave so to interpretirali kot blag stresni odziv brez očitne prizadetosti fotosinteznega sistema. Nasprotno so Chen s sod. 2025 pri solati (*Lactuca sativa*) in špinači (*Spinacia oleracea*) poročali o statistično značilnem znižanju skupne vsebnosti klorofila za približno 15 do 30 % pri višjih koncentracijah MP. Rastline so gojili v substratu s polistirenskimi mikrodelci. Znižanje vsebnosti klorofila so avtorji povezali s povečanim oksidativnim stresom in motnjami v presnovi dušika, kar kaže, da se negativni učinki MP na fotosintezni sistem izrazijo predvsem ob močnejši ali dolgotrajnejši izpostavljenosti.

Odsotnost razlik v koncentracijah fotosinteznih pigmentov v našem primeru nakazuje, da uporabljene koncentracije MP in trajanje poskusa verjetno niso povzročili zaznavnih sprememb v delovanju fotosinteznega aparata graha. Obstaja možnost, da so bile koncentracije MP prenizke ali izpostavitve prekratke, da bi se učinki izrazili na ravni fotosinteznih pigmentov, ki so pogosto manj občutljiv kazalec stresa kot morfološki parametri.

Zaključki

V naši raziskavi smo preučevali vpliv različnih koncentracij MP na rast in fiziološke odzive graha (*Pisum sativum*). Merili smo rast, biomaso in nekatere fiziološke (fotokemična učinkovitost, transpiracija) in biokemijske (vsebnost fotosintetskih pigmentov) parametre. V zadnjem desetletju je MP vse pogostejše obravnavana kot nov stresni dejavnik v naravi. Zaradi svoje obstojnosti, razširjenosti in raznolikih fizikalno-kemijskih lastnosti predstavlja dolgoročno obremenitev za okolje in s tem za rastline. Številne raziskave kažejo, da MP ne deluje zgolj kot pasivni onesnaževalec, temveč lahko neposredno in posredno vpliva na rast, razvoj in delovanje rastlin. Naši rezultati kažejo, da MP v uporabljenih koncentracijah ni imela enotnega negativnega vpliva na rast rastlin, ampak so bili odzivi odvisni predvsem od dela rastline (poganjek ali korenina) in obravnavane koncentracije MP. V raziskavi smo uspeli pokazati, da je koreninski sistem bolj občutljiv na prisotnost MP, saj smo zaznali statistično značilno zmanjšanje dolžine korenin. To potrjuje našo hipotezo, da MP negativno vpliva predvsem na podzemne dele rastline. Korenine so v neposrednem stiku s substratom, kjer se MP kopiči, kar lahko vodi do oviranja rasti in mehanskih poškodb in s tem motenj v absorpciji vode in hranil. Tudi pri analizi biomase smo lahko zaznali trend zmanjševanja suhe mase korenin, medtem ko je pri suhi masi poganjkov prišlo do povečanja. Razlika med suho maso korenin in poganjkov je bila izrazitejša kot pri sveži biomasi, kar lahko kaže na spremenjeno razporeditev biomase v rastlini. Te morfološke spremembe (dolžina in biomasa) so se izkazale kot bolj občutljivi pokazatelji vpliva MP kot fiziološki in biokemijski parametri (fotokemična učinkovitost, transpiracija in vsebnost fotosintetskih pigmentov). S temi ugotovitvami naši rezultati delno potrjujejo zastavljene hipoteze in poudarjajo potrebo po nadaljnjih raziskavah, ki bi vključevale podrobnejšo analizo z večjim razponom koncentracij MP in daljšim časom izpostavitve, kjer bi se najverjetneje bolje izrazil stresni učinek na fiziološki ravni.

Literatura

- Boots B, Russell CW, Green DS, 2019. Effects of microplastics in soil ecosystems: Above and below ground. *Environmental Science & Technology* 53:11496–11506.

- Chen Z, Carter LJ, Banwart SA, Kay P, 2025. Environmental levels of microplastics disrupt growth and stress pathways in edible crops via species-specific mechanisms. *Frontiers in Plant Science* 16:1670247.
- Colzi I, Renna L, Bianchi E, Castellani MB, Coppi A, Pignattelli S, Lippi S, Gonnelli C, 2022.
- Impact of microplastics on growth, photosynthesis and essential elements in *Cucurbita pepo*
- L. *Journal of Hazardous Materials* 423:127238.
- Das EJ, Alam AKMR, 2024. Effects of microplastics polluted soil on the growth of *Solanum lycopersicum* L. *Environmental Systems Research* 13:36.
- Hernández-Sánchez L, Cruz-López V, Herrera-Rivera R, Solis-Pomar F, Navarro-Antonio J,
- Cruz-Martínez H, 2025. Impacts of microplastics and nanoplastics on tomato crops: A critical review. *Environments* 12:328.
- Hoagland DR, Arnon DI, 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular* 347:1–32.
- Li Y, Yang G, Yu C, Lei X, Xing X, Ma X, Sun Y, 2024. The impact of microplastic concentration and particle size on the germination and seedling growth of pea (*Pisum sativum* L.). *Agronomy* 14:923.
- Lichtenthaler H, Buschmann C, 2001. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. V: Wrolstad RE (ur) Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV–VIS spectroscopy. Wiley, New York, ZDA.
- Nikolov B, Stanchev G, Petrova S, 2023. Bioaccumulation of microplastics in *Pisum sativum* L. – a pot experiment. *Ecologia Balkanica* 15:215–221.
- Pilapitiya NT, Ratnayake SA, 2024. The world of plastic waste: A review. *Cleaner Materials* 11:100220.
- Riaz K, Yasmeen T, Attia KA, Kimiko I, Arif MS, 2025. Phytotoxic Effects of Polystyrene Microplastics on Growth Morphology, Photosynthesis, Gaseous Exchange and Oxidative Stress of Wheat Vary with Concentration and Shape. *Toxics* 13:57.
- Rillig CM, 2012. Microplastic in terrestrial ecosystems and the soil? *Environmental Science and Technology* 46:6453–6454.
- Santini G, Castiglia D, Perrotta MM, Landi S, Maisto G, Esposito S, 2023. Plastic in the environment: A modern type of abiotic stress for plant physiology. *Plants* 12:3717.
- Singh B, Singh K, 2022. Microplastics contamination in soil affects growth and root nodulation of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) and 16 s rRNA sequencing of rhizosphere soil. *Journal of Hazardous Materials Advances* 7:100146.
- Smýkal P, 2014. Pea (*Pisum sativum* L.) in Biology prior and after Mendel's Discovery. *Czech J. Genet. Plant Breed* 50:52–64.
- van Loon S, Saartama V, Šmídová K, Kokalj AJ, Zidar P, Salanitri GP, Riccobene P, Gargiulo L, Hofman J, Hurley R, Nizzetto L, Haimi J, Selonen S, van Gestel CAM, 2025. Sublethal effects of microplastics sourced from polypropylene agricultural plastics on four soil invertebrate species. *Journal of Hazardous Materials* 499:140247.
- Velykis A, Satkus A, 2012. Response of field pea (*Pisum sativum* L.) growth to reduced tillage of clayey soil. *Zemdirbyste-Agriculture* 99:61–70.
- Wang W, Ge J, Yu X, Li H, 2020. Environmental fate and impacts of microplastics in soil ecosystems: Progress and perspective. *Science of The Total Environment* 708:134841.
- Windsor N, Boatwright L, Boyles R, Bridges W, Rubiales D, Thavarajah D, 2024. Characterizing Dry Pea (*Pisum sativum* L.) for Improved Nutritional Traits and the Potential for Biofortification. *Legume Science* 6:250.
- Xu H, Chen C, Pang Z, Zhang G, Zhang W, Kan H, 2024. Effects of microplastics concentration on plant root traits and biomass: Experiment and meta-analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 285:117038.
- Zhang Y, Wang X, Li J, Yang Y, Gao Y, Wang P, 2025. Polyethylene microplastic: impacts on ryegrass seed germination and seedling development. *BMC Plant Biology* 25:876.

-
25. Zhu D, Chen QL, An XL, Yang XR, Christie P, Ke X, Wu LH, Zhu YG, 2018. Exposure of soil collembolans to microplastics perturbs their gut microbiota and alters their isotopic composition. *Soil Biology and Biochemistry* 116:302–310.

Vpliv slanosti na rast in razvoj graha (*Pisum sativum*)

Alenka Červ, Nuša Jurkovič, Zala Klinar, Gaja Mrzelj, Neža Ručigaj

Študij molekulske in funkcionalne biologije, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

- Namen poskusa je bil preveriti, kako različne koncentracije soli vplivajo na rast in preživetje poganjkov, fotokemično učinkovitost, transpiracijo in vsebnost različnih asimilacijskih barvil pri grahu (*Pisum sativum*).
- Dvotedenske sadike graha smo posadili v zemljo s štirimi različnimi koncentracijami soli. Rastline smo en mesec dvakrat tedensko zalivali, tedensko spremljali dolžino poganjkov in beležili preživetje osebkov. Po treh tednih smo na prvih polno razvitih zelenih listih z uporabo fluorometra izmerili fotokemično učinkovitost ter s porometrom določili prevodnost listnih rež. Po štirih tednih smo določili svežo in suho biomaso ter izmerili končno dolžino poganjkov in korenin. Iz liofiliziranih zelenih delov rastlin smo nato ekstrahirali in določili vsebnost asimilacijskih barvil na podlagi absorpcijskega spektra pri različnih valovnih dolžinah.
- Izmed nastavljenih dvajsetih rastlin jih je do konca poskusa preživel le devet (vseh 5 iz kontrolne skupine ter 4 izpostavljene 0,1 % NaCl). Najintenzivnejša rast je bila zaznana pri kontrolni skupini. Izpostavljenost 0,1 % NaCl je negativno vplivala tako na rast poganjkov in korenin kot tudi na fotokemično učinkovitost poganjkov. Dodatek 0,1 % NaCl je prav tako vplival na zmanjšano vsebnost klorofila a in karotenoidov v zelenih delih rastlin.
- Prisotnost NaCl lahko že v majhnih koncentracijah negativno vpliva na rast in razvoj korenin in poganjkov graha, njihovo fotokemično učinkovitost ter na vsebnost asimilacijskih barvil.

Ključne besede: osmotski stres, fotosintezna učinkovitost, transpiracija, asimilacijska barvila

Uvod

Zasoljevanje tal pomeni kopičenje vodotopnih soli v tleh in ima negativen vpliv na rast, razvoj in produktivnost večine rastlin (Rengasamy 2006; Zelm s sod. 2020). Zaradi podnebnih sprememb in človekovih dejavnosti so v tleh vedno višje koncentracije soli, kar predstavlja pereč problem pri pridelovanju poljščin (Qadir s sod. 2014; Zaman s sod. 2018). Da bi znali vzgojiti rastline, ki uspešno rastejo v takšnih pogojih, je pomembno poznavanje mehanizmov, s katerimi se rastline odzivajo in prilagajajo na s slanostjo povzročen stres. Večina gojenih rastlin, med katerimi je tudi grah, je glikofitov, ki so slabo prilagojeni na rast v slanem okolju. Visoka koncentracija soli v tleh namreč zniža vodni potencial tal in s tem zveča razliko med vodnim potencialom tal in korenin (Munns in Tester 2008; Zelm s sod. 2020). Posledično je koreninskemu sistemu otežen privzem vode, kar za rastlino predstavlja osmotski stres (Zelm s sod. 2020). Hkrati kopičenje natrijevih in kloridnih ionov poruši ionsko ravnovesje, kar med drugim vodi v produkcijo reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), vsi ti dejavniki pa skupaj omejujejo normalno rast in razvoj rastline. Kot odgovor lahko pri rastlinah spremljamo različne fiziološke in biokemijske prilagoditve (Gill in Tuteja 2010; Zhao s sod. 2022).

Eden izmed glavnih odgovorov rastline na primanjkljaj vode je zapiranje listnih rež, kar omeji dostop CO₂ v liste in zmanjša učinkovitost fotosinteze (Hsiao 2003; Slatyer 1957). Nižja učinkovitost fotosinteze je med drugim posledica porušenega ravnovesja fotosinteznih pigmentov (Martin-StPaul s sod. 2017; Zahedi s sod. 2022). S slanostjo povzročen stres se odraža tudi v upadu klorofila a in b ter karotenoidov (Mostafa 2011). Osmotski in ionski stres povzročita, da rastlina svojo energijo, namesto rasti in razvoju, nameni preživetju. To vpliva na dolžino poganjkov, korenin in sveže ter suhe biomase (Zakharin in Panichkin 2009).

Cilj raziskave je bil ugotoviti, kako s slanostjo izzvan stres vpliva na rast poganjkov in korenin, stopnjo transpiracije, fotosintezno učinkovitost ter vsebnost pigmentov v rastlinah graha. S tem namenom smo rastline gojili v substratu z dodatkom različnih koncentracij soli. Predpostavili smo, da bo pri višjih koncentracijah soli v prsti, stopnja transpiracije nižja (1). Hkrati smo pri rastlinah graha, izpostavljenim višjim koncentracijam soli, pričakovali nižjo fotosintezno učinkovitost (2). Pri rastlinah graha, ki so rastle v substratu z višjo slanostjo, smo pričakovali tudi nižje ravni fotosinteznih pigmentov (klorofila a, b in karotenoidov) (3). Naša hipoteza je bila tudi, da so imele rastline graha, izpostavljene višjim koncentracijam soli, krajše poganjke in korenine ter s tem manjšo biomaso (4).

Materiali in metode

Rastlinski material in zasnova poskusa

Za testiranje vpliva slanosti na rast in razvoj je bila izbrana rastlinska vrsta graha (*Pisum sativum*). Slanost je bila uvedena z dodatkom različnih koncentracij NaCl direktno v substrat. V poskusu smo imeli kontrolno in 3 testne skupine:

- A. Kontrola: 0 % NaCl
- B. Skupina 1: 0,1 % NaCl
- C. Skupina 2: 0,25 % NaCl
- D. Skupina 3: 0,5 % NaCl

Vsaka skupina je vsebovala pet rastlin, skupaj smo torej

uporabili 20 cvetličnih loncev. Vsak lonec je bil napolnjen s 300 g substrata (komercialna zemlja Lufa).

Za pripravo substrata posamezne serije je bila pripravljena mešanica skupno 1500 g Lufa substrata in ustrezne količine soli:

- A. Kontrola: 1500 g Lufa + 0 g soli
- B. Skupina 1: 1500 g Lufa + 1,5 g soli
- C. Skupina 2: 1500 g Lufa + 3,75 g soli
- D. Skupina 3: 1500 g Lufa + 7,5 g soli

Rastline so bile posamezno posajene v lonec in zalite s 50 mL destilirane vode, nato pa je bilo dodanih še 20 mL ½ Hoaglandove raztopine (Yadav s sod. 2015; Esperin 1972). Rastline so rasle v rastni komori pod nadzorovanimi pogoji (16/8 h dnevno/nočna ritmika, dnevna temperatura 22 °C, nočna 18 °C). Zalivanje je potekalo dvakrat tedensko (torek in petek), prva dva tedna s po 20 mL, nato pa s 40 mL Hoaglandove raztopine na lonec.

Meritve

Rast rastlin smo spremljali enkrat tedensko (ob torkih) z merjenjem višine poganjkov in beleženjem preživetja osebkov. Višina je bila izmerjena z ravnilom od površine substrata do baze najvišjih zelenih listov.

3. teden rasti so bile izvedene naslednje meritve fizioloških parametrov:

A. Fotokemična učinkovitost fotosistema II je bila določena po protokolu (Murchie in Lawson 2013), z uporabo fluorometra PAM-2500 proizvajalca Walz. Na osnovi fluorescence klorofila a popolno razvitih zelenih listih, smo izmerili dejansko fotosintezno učinkovitost.

B. Transpiracija oz. prevodnost listnih rež je bila izmerjena s pomočjo porometra (Leaf Porometer, Steady State Diffusion Porometer, Model SC-1, Decagon Devices). Tudi te meritve so bile opravljene na popolnoma razvitih zelenih listih vsake rastline.

Ob zaključku poskusa (3. teden) so bile izvedene morfometrične meritve:

- C. Dolžina poganjkov in korenin.
- D. Sveža biomasa poganjkov in korenin.

Po tridnevnem liofiliziranju so bile izvedene še naslednje analize:

- E. Suha biomasa poganjkov in korenin.
- F. Določanje asimilacijskih barvil (klorofili, karoteinoidi), ki je potekalo po protokolu (Lichtenthaler in Buschmann 2001). Liofilizirane zelene dele rastline smo homogenizirali.

K 35 mg prahu smo dodali 15 mL 100% ohlajenega metanola. Ekstrakcija je potekala 30 minut (v temi in na sobni temperaturi) z občasnim vorteksiranjem. Po filtraciji smo ekstrakt centrifugirali 3 min pri 2500 rpm, nato smo spektrofotometrično izmerili absorpcijo pri valovnih dolžinah 665, 652 in 470 nm. Iz teh podatkov smo z uporabo formul v Tabeli 1 izračunali koncentracijo fotosintetskih pigmentov.

Statistična analiza

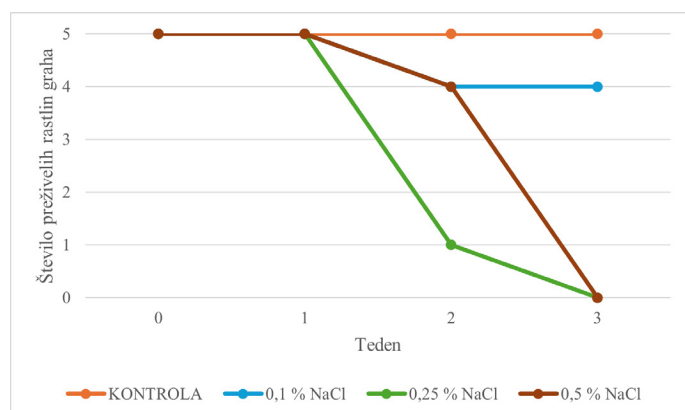
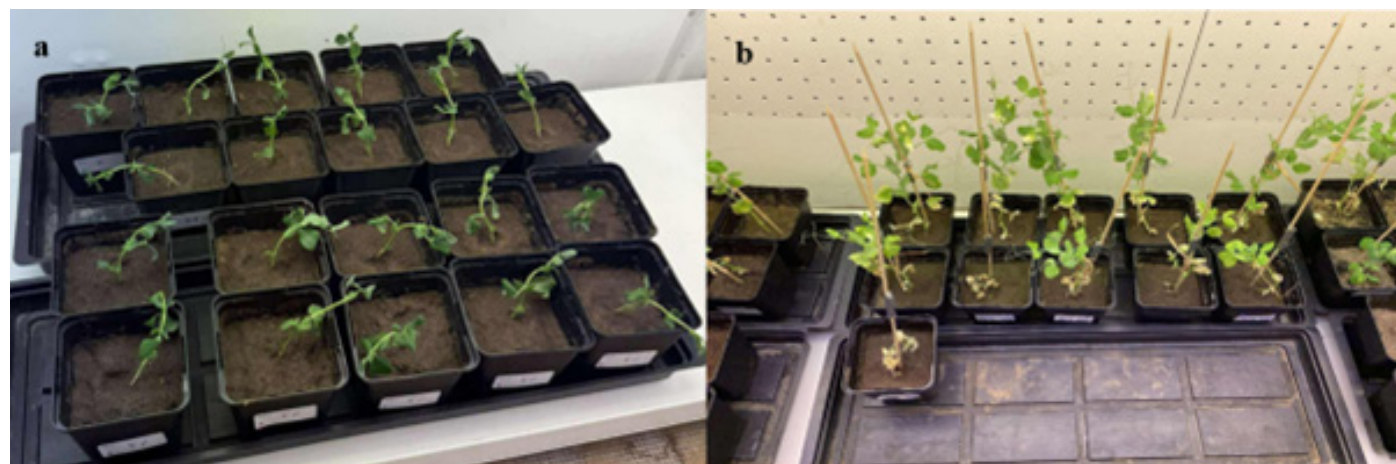
Pri obdelavi rezultatov smo uporabljali program Microsoft Excel, orodje XL Toolbox. Ker so do konca poskusa preživele le rastline iz kontrole in skupine z 0,1 % slanostjo, smo za primerjavo med obema skupinama uporabili neodvisni t-test. Rezultate smo prikazali na grafih v programu Microsoft Excel. Rezultati

Tabela 1. Prikaz formul po katerih smo izračunali koncentracijo klorofila a, b in karotenoidov.

Pigment ($\mu\text{g/mL}$)	Formula
Koncentracija klorofila a	$16,72 \times A_{664} - 9,16 \times A_{647}$
Koncentracija klorofila b	$34,09 \times A_{647} - 15,28 \times A_{664}$
Koncentracija skupnih karotenoidov	$(1000 \times A_{470} - 1,63 \times \text{Chla} - 104,96 \times \text{Chlb}) / 221$
Pretvorba iz $\mu\text{g/mL}$ v mg/g ($\text{konc pigment} \times \text{Vekstrakt (mL)} / (1000 \times \text{msveža (g)})$)	

Od nastavljenih 5 rastlin vsake skupine je do konca poskusa preživel le 5 rastlin kontrolne skupine in 4 rastline, ki smo jih izpostavili 0,1 % slanosti (Slika 1). Pri koncentraciji 0,25 % NaCl je po dveh tednih preživel le ena rastlina, po treh tednih pa je tudi ta umrla. Pri koncentraciji 0,5 % NaCl so po tretjem tednu umrle vse rastline. Na Sliki 2a vidimo rastline graha ob začetku poskusa, na Sliki 2b pa preostale rastline po treh tednih gojenja.

Na začetku poskusa so bile razlike v višini poganjkov med skupinami statistično značilne ($p < 0,05$); v povprečju najvišje so bile rastline v kontrolni skupini, najkrajše pa pri izpostavitvi z 0,5 % NaCl (Slika 3). V 1. tednu je bila razlika v višinah med skupinami še bolj izrazita ($p < 0,001$). Rastline, izpostavljene koncentraciji 0,5 % NaCl in 0,25 % NaCl, so imele statistično

**Slika 1.** Graf preživetja graha glede na koncentracijo soli (NaCl) tekom trajanja poskusa. Točke na grafu predstavljajo število živih rastlin znotraj posamezne skupine na posamezen teden.**Slika 2.** Rastline graha ob začetku poskusa (a) in po treh tednih gojenja (b).

značilno krajše poganjke v primerjavi s kontrolno skupino. V 2. tednu se je statistično značilna razlika med kontrolno skupino in obravnavo z 0,1 % NaCl ohranila ($p < 0,05$), prav tako tudi ob koncu poskusa (3. teden).

V Tabeli 2 so predstavljeni rezultati merjenja sveže in suhe biomase. Izpostavljenost 0,1 % NaCl je povzročila statistično značilno zmanjšanje sveže biomase korenin ($p=0,00026$) in poganjkov ($p=1,31 \times 10^{-5}$), kakor tudi suhe biomase korenin ($p=0,0016$) in poganjkov ($p=3,05 \times 10^{-6}$) v primerjavi s kontrolno skupino.

Rastline v skupini z 0,1 % NaCl so imele statistično značilno nižjo dejansko fotokemično učinkovitost v primerjavi s kontrolnimi rastlinami ($p=0,004$), medtem ko smo ugotovili, da izpostavitve z 0,1 % NaCl ni imela statistično značilnega vpliva na stopnjo transpiracije v primerjavi s kontrolo (Tabela 3). Na Sliki 4 vidimo, da je bila dolžina korenin pri rastlinah graha, ki so rasle v substratu z dodatkom 0,1 % NaCl statistično značilno krajša od korenin kontrolne skupine ($p=0,0016$). Dodatek NaCl (0,1 %) je prav tako zmanjšal vsebnost klorofila a ($p=0,0058$) (Slika 5a) in karotenoidov ($p=0,00023$) v listih graha (Slika 5c), medtem ko na vsebnost klorofila b ni imel statistično značilnega vpliva (Slika 5b).

Diskusija

Visoke koncentracije soli v tleh takoj povzročijo osmotski stres, kar koreninam oteži črpanje vode (van Zelm s sod. 2020; Munns in Tester 2008) in povzroči stanje fiziološke suše v rastlini (Zakharin in Panichkin 2009). Učinki slanosti na rast graha so bili opazni že po enem tednu od postavitve poskusa, v drugem tednu pa jih je nekaj že začelo odmirati. Rezultati so pokazali, da je s slanostjo izzvan stres vplival na rast poganjkov, saj smo pri skupini izpostavljeni 0,5 % slanosti opazili, da so bili poganjki po 1. tednu rasti značilno nižji od kontrole, po 2. tednu pa tako od kontrole, kot tudi od skupine izpostavljene 0,1 % slanosti. Prav tako so bile korenine pri skupini, ki je rastla pri 0,1 % slanosti krajše, stehtana suha in sveža biomasa korenin in poganjkov pa manjša od kontrolne skupine, kar se sklada s postavljenimi hipotezo (4). Enako so dokazali tudi Hernandez s sod. (1995), pri čemer je bil padec suhe biomase listov po izpostavitvi 70 mM NaCl večji pri bolj občutljivih kultivarjih graha (62 %), pri odpornejših pa manjši (44 %). Atiyah s sod. (2025) so spremljali rast različnih kultivarjev graha, tako da so 2 tedna postopoma povečevali koncentracijo NaCl v substratu. Razdalja med internodiji se je

Tabela 2. Rezultati merjenja sveže in suhe biomase poganjkov ter korenin rastlin, izpostavljenih kontrolnim pogojem (K) in 0,1 % NaCl. Prikazane so povprečne vrednosti meritev posameznih izpostavitvev s pripadajočimi standardnimi napakami (K: n=5; 0,1 % NaCl: n=4). Različne črke označujejo statistično značilne razlike med skupinama (t-test, $p < 0,05$).

Tretma	poganjki-sveža biomasa [g]	poganjki-suha biomasa [g]	korenine-sveža biomasa [g]	korenine-suha biomasa [g]
KONTROLA	2,79 ± 0,11 a	0,771 ± 0,04 a	1,79 ± 0,15 a	0,432 ± 0,05 a
0,1 % NaCl	1,20 ± 0,09 b	0,073 ± 0,01 b	0,56 ± 0,05 b	0,214 ± 0,005 b

Tabela 3. Prikaz povprečnih vrednosti dejanske fotokemične učinkovitosti in transpiracije ter standardne napake (±) (K: n=5; 0,1 % NaCl: n=4). Črke pri podatkih označujejo statistično značilne razlike med skupinama (t-test, $p < 0,05$).

Tretma	Dejanska fotokemična učinkovitost [RU]	transpiracija [mmol/m ² s]
K	0,633 ± 0,026 a	40,66 ± 8,024 a
0,1 % NaCl	0,3235 ± 0,079 b	17,85 ± 1,05 a

značilno zmanjšala pod vplivom izpostavljenosti naraščajočim koncentracijam NaCl med 0 in 75 mM. Krajši poganjki so bili posledica spremenjenega osmotskega ravnotežja in ionske toksičnosti zaradi česar so se celice z rastjo manj podaljševale (Munns in Tester 2008).

Stres, povzročen s slanostjo, je pri grahu znatno inhibiral fotosintezo. Učinkovitost fotosinteze smo primerjali med kontrolo in skupino izpostavljeno 0,1 % koncentraciji soli, saj skupine izpostavljene višjim koncentracijam niso preživele do 3. tedna, ko smo izvajali meritve. V nadaljnjih raziskavah bi bilo po zgledu Atiyah s sod. (2025) zato smiselno uporabiti pristop s postopnim višanjem koncentracije soli v substratu, saj bi s tem preprečili osmotski šok in predčasno odmiranje rastlin. To bi nam omogočilo primerjavo merjenih parametrov pri več različnih koncentracijah. Glede na rezultate smo potrdili hipotezo (2), saj je bila fotosintezna učinkovitost, izmerjena pri skupini, izpostavljeni 0,1 % slanosti, značilno nižja v primerjavi s kontrolo. Ugotovitev se sklada z rezultati Atiyah s sod. (2025), kjer je bila najnižja učinkovitost fotosinteze izmerjena pri najvišji koncentraciji soli, tj. 75 mM. Eden izmed razlogov za upad fotosintezne učinkovitosti je zmanjšan privzem CO₂ kot posledica zaprtja listnih rež (Munns in Tester 2008). Dosedanje raziskave na grahu so dokazale zmanjšano prevodnost listnih rež ter s tem zmanjšano stopnjo transpiracije kot odziv na slanost (Atiyah s sod. 2025; Dhokne s sod. 2022). Vendar na podlagi naših rezultatov nismo mogli potrditi vpliva 0,1 % koncentracije soli na nižjo stopnjo transpiracije (1). Poganjki, ki so rastle v substratu z 0,1 % koncentracijo soli, so imeli glede na kontrolo nižje vrednosti klorofila a ter karotenoidov, medtem ko vpliva na vsebnost klorofila b nismo zaznali. Zato lahko hipotezo (3) le deloma potrdimo. V raziskavi Atiyah s sod. (2025) se je vpliv slanosti substrata odražal v zmanjšani vsebnosti celokupnega klorofila, Dhokne s sod. (2022) pa so poleg tega izmerili tudi padec vsebnosti karotenoidov. Gre za posledico toksičnih učinkov povišane koncentracije Na⁺ in Cl⁻ ionov, ki prizadenejo delovanje fotosinteznih encimov in vplivajo na funkcijo kloroplastov (Parida in Das 2005). Hernandez s sod. (1995) so pri kultivarjih graha, občutljivih na slanost, opazili zmanjšano vsebnost antioksidanta α-tokoferola v tilakoidah, kar so povezali z zvečano koncentracijo H₂O₂ in povečano lipidno peroksidacijo membran. Iz tega sledi, da povišane koncentracije ionov vodijo v oksidativne poškodbe kloroplastov. Z elektronsko mikroskopijo so potrdili vpliv NaCl na zmanjšano integriteto

tilakoidnih membran ter povečano število kot tudi velikost plastoglobulov (Hernandez s sod. 1995; Dhokne s sod. 2022). Stefanov s sod. (2024) so dokazali povezavo med izpostavljenostjo povišanim koncentracijam soli v substratu in okvarami reakcijskih centrov v fotosistemu II. Zaradi teh sprememb je pri rastlinah graha prišlo do motenega prenosa energije med pigmentno-proteinskimi kompleksi, zmanjšane vsebnosti fotosinteznih pigmentov – klorofila in karotenoidov, zaznali pa so tudi povečane markerje oksidativnega stresa (H₂O₂ in malondilaldehid). Karotenoidi imajo pomembno antioksidativno vlogo v odzivu rastline na reaktivne kisikove spojine (Stahl in Sies 2003), zato znižane vrednosti teh pigmentov oslabijo odgovor rastline na oksidativni stres (Stefanov s sod. 2024).

Zaključki

Izmed dvajsetih rastlin graha, ki smo jih izpostavili različnim koncentracijam soli, jih je preživel le devet. Rastline, gojene v substratu z več kot 0,1 % NaCl, so propadle pred tretjim tednom poskusa, ko smo merili fotokemično učinkovitost, učinkovitost transpiracije in vsebnost različnih pigmentov. Za pridobitev natančnejših rezultatov bi bilo smiselno koncentracijo soli zviševati postopoma, da bi se rastline lažje prilagodile in bi lahko opazovane parametre merili pri več različnih koncentracijah.

Poganjki rastlin graha, izpostavljenih 0,1 % in 0,5 % NaCl, so bili nekoliko krajši kot pri kontrolni skupini, pri rastlinah, ki so rastle v 0,1 % koncentraciji NaCl, pa smo izmerili tudi nižjo svežo in suho biomaso, s čimer je bila potrjena hipoteza (4). Fotosintezna učinkovitost te skupine je bila v primerjavi s kontrolno skupino prav tako nižja, kar potrjuje hipotezo (2). Značilnega vpliva 0,1 % koncentracije NaCl na zmanjšanje transpiracije nismo zaznali, zato hipoteze (1) nismo potrdili. V poganjkih rastlin, gojenih v substratu z 0,1 % vsebnostjo NaCl, smo ugotovili nižjo vsebnost klorofila a in karotenoidov v primerjavi s kontrolno skupino. Vpliva na vsebnost klorofila b pa nismo zaznali, zato lahko hipotezo (3) le deloma potrdimo.

Literatura

- Atiyah F, Hammad M, 2025. Impact of Salt Stress on Pea (*Pisum sativum*) Physiological Features in Lab Settings. Razi Medical Journal 1:54–59.
- Dhokne K, Pandey J, Yadav RM, Ramachandran P, Rath JR,

Subramanyam R, 2022. Change in the photochemical and structural organization of thylakoids from pea (*Pisum sativum*) under salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 177:46–60.

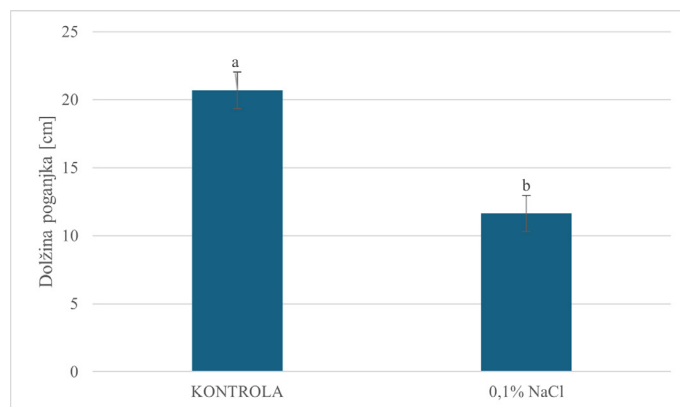
Gill SS, Tuteja N, 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:909–930.

Hernandez JA, Olmos E, Corpas FJ, Sevilla F, del Rio LA, 1995. Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science* 105:151–167.

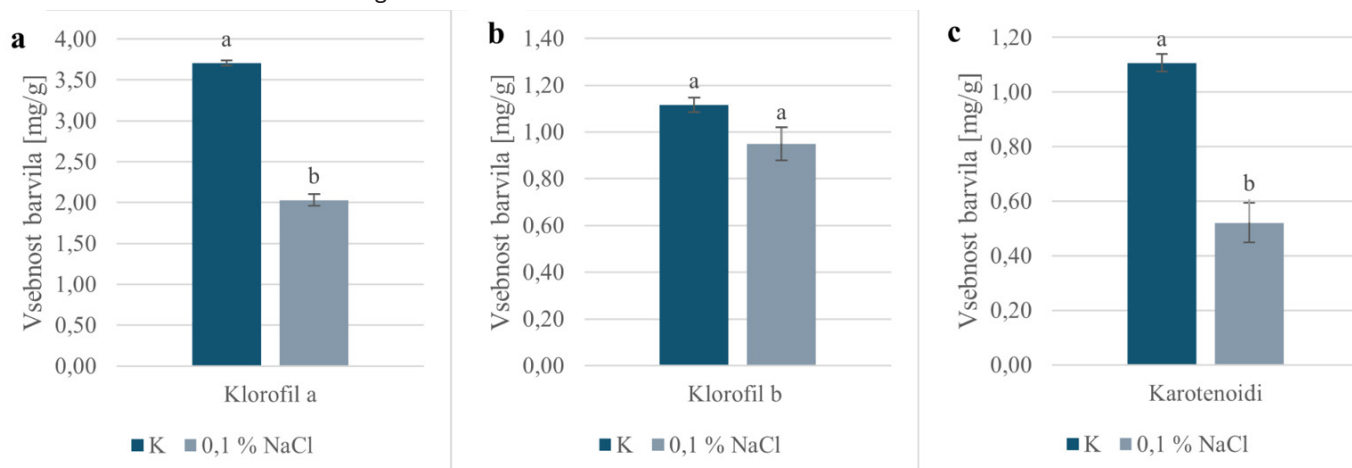
Hsiao T, 2003. Plant Responses to Water Stress. *Annual Review of Plant Biology* 24:519–570.

Lichtenthaler HK, Buschmann C, 2001. Extraction of Photosynthetic Tissues: Chlorophylls and Carotenoids. *Current*

Slika 3. Višina poganjkov graha glede na koncentracijo soli (NaCl) tekom trajanja poskusa. Točke na grafu predstavljajo povprečje višin poganjkov znotraj posameznega substrata, označena je tudi standardna napaka (n se razlikuje med tedni glede na število preživelih rastlin, začetni n=5). Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami na posamezen teden opazovanja (enosmerna ANOVA, Bonferroni-Holm post-hoc test, $p < 0,05$). * pomeni, da je preživela le ena rastlina in izračun statistike ni bil mogoč.



Slika 4. Grafični prikaz povprečne dolžine korenin, izmerjene ob koncu poskusa (po treh tednih) pri kontrolni skupini in skupini izpostavljeni 0,1 % NaCl. Stolpci prikazujejo povprečne vrednosti in standardno napako (K: n=5; 0,1 % NaCl: n=4). Črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike med skupinama (t-test, $p < 0,05$).



Slika 5. Grafični prikaz vsebnosti klorofila a (a), klorofila b (b) in karotenoidov (c) v listih graha v dveh izpostavitvah (0 % NaCl (K) in 0,1 % NaCl) po treh tednih trajanja poskusa. Stolpci prikazujejo povprečne vrednosti koncentracij asimilacijskih pigmentov za vsako izpostavitvev ($n=3$) $\pm$ standardna napaka. Različne črke označujejo statistično značilne razlike med skupinama (t-test, $p < 0,05$).

Protocols in Food Analytical Chemistry 1:F4.2.1-F4.2.6.

Martin-StPaul N, Delzon S, Cochard H, 2017. Plant resistance to drought depends on timely stomatal closure. *Ecology Letters* 20:1437–1447.

Mostafa H, 2011. Effects of salinity stress on growth, chlorophyll content and osmotic components of two basil (*Ocimum basilicum* L.) genotypes. *African journal of biotechnology* 11:379–384.

Munns R, Tester M, 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59:651–681.

Murchie EH, Lawson T, 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany* 64:3983–3998.

Parida AK, Das AB, 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60:324–349.

Qadir M, Quill  rou E, Nangia V, Murtaza G, Singh M, Thomas RJ, Drechsel P, Noble AD, 2014. Economics of salt-induced land degradation and restoration. *Natural Resources Forum* 38:282–295.

Rengasamy P, 2006. World salinization with emphasis on Australia. *Journal of Experimental Botany* 57:1017–1023.

Slatyer R, 1957. The Influence of Progressive Increases in total Soil Moisture Stress on Transpiration, Growth, and Internal Water Relationships of Plants. *Australian Journal of Biological Sciences* 10:320–336.

Stahl W, Sies H, 2003. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine* 6:345–351.

Stefanov M, Rashkov G, Borisova P, Apostolova E, 2024. Changes in Photosystem II Complex and Physiological Activities in Pea and Maize Plants in Response to Salt Stress. *Plants* 13:1025.

Yadav AK, Pathak B, Fulekar MH, 2015. Rhizofiltration of Heavy Metals (Cadmium, Lead and Zinc) From Fly Ash Leachates

Using Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*). International Journal of Environment 4:179–196.

Zahedi SM, Hosseini MS, Hakimi Meybodi ND, Abadía J, Germ M, Gholami R, Abdelrahman M, 2022. Evaluation of drought tolerance in three commercial pomegranate cultivars using photosynthetic pigments, yield parameters and biochemical traits as biomarkers. Agricultural Water Management 261:107357.

Zakharin AA, Panichkin LA, 2009. Glycophyte salt resistance. Russian Journal of Plant Physiology 56:94–103.

Zaman M, Shahid SA, Heng L, 2018. Guideline for Salinity Assessment, Mitigation and Adaptation Using Nuclear and

Related Techniques. Springer International Publishing, Cham, Švica.

van Zelm E, Zhang Y, Testerink C, 2020. Salt Tolerance Mechanisms of Plants. Annual Review of Plant Biology 71:403–433.

Zhao H, Li Z, Wang Y, Wang J, Xiao M, Liu H, Quan R, Zhang H, Huang R, Zhu L, Zhang Z, 2022. Cellulose synthase-like protein OsCSLD4 plays an important role in the response of rice to salt stress by mediating abscisic acid biosynthesis to regulate osmotic stress tolerance. Plant Biotechnology Journal 20:468–484.

Vpliv suše na rast in razvoj graha (*Pisum sativum*)

Marta Dimkowska, Tine Muršec Pitamic, Nikola Leontić, Nejc Tomšič, Metka Vrečko

Študij molekulske in funkcionalne biologije, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

- Opazovali smo vpliv suše, simulirane z dodatkom polietilen glikola (PEG) v zemlji, na rast in razvoj graha (*Pisum sativum* L.), saj je zaradi vse pogostejših okoljskih katastrof razumevanje njenega vpliva na rast kulturnih rastlin pomembno.
- Proučevali smo tri testne skupine, in sicer 0,5 % koncentracijo PEG, 1 % koncentracijo PEG ter 5 % koncentracijo PEG. Slednja se je izkazala za previsoko inducirano sušo, saj so vsi osebki v tretmaju do tretjega tedna poskusa že umrli. Pri ostalih skupinah smo skupno pet tednov merili višino poganjkov, na koncu poskusa pa smo merili tudi fotokemično učinkovitost in transpiracijo, dolžino korenin ter suho in svežo biomaso.
- Ugotovili smo, da je indukcija blage suše (skupina z 0,5 % PEG in pogosto tudi 1 % PEG) spodbudil statistično značilen odziv na stres, predvsem na področju proizvodnje pigmentov in rasti poganjkov. Jasna razlika se je poznala tudi pri biomasu korenin, ne pa pri njihovi dolžini.
- Z rezultati smo jasno pokazali pragovno naravo odziva rastlin graha na sušo, ki se v prvi fazi kaže kot sprememba režima rasti in spreminjanja biomase, v drugi fazi pa kot popolna odpoved fotokemičnih procesov in transpiracije, kar rezultira v hitri smrti osebkov.

Ključne besede: PEG, stres, zaviranje rasti, fotokemični procesi, transpiracija

Uvod

Rastline graha (*Pisum sativum* L.) sodijo med ene najstarejših kulturnih rastlin, ki človekov vsakdan spremljajo že več tisočletij. Ne le, da imajo pomembno vlogo v prehrani, zlasti iz vidika bogate vsebnosti makrohranil, temveč imajo tudi pomembno zgodovinsko vlogo v razvoju sodobnih bioloških znanosti. Poskusi, ki jih je na teh preprostih rastlinah v 19. stoletju zasnoval Gregor Mendel, so namreč omogočili temelje sodobne genetike. Grah, kot pomembna poljščina zmerne podnebja, je tako še danes izjemno primeren, klasičen modelni organizem za eksperimentalno delo, zaradi kombinacije določenih bioloških in praktičnih lastnosti. Odlikujejo ga namreč kratek življenjski cikel, nezahtevna vzgoja ter izrazite fenotipske značilnosti, ki med drugim omogočajo hitro in zanesljivo spremljanje vzorcev dedovanja med generacijami. Zaradi prevladujoče samooploditve zagotavlja stabilne genetske linije in hkrati omogoča nadzorovana križanja. Velika variabilnost med samimi sortami ter dovolj velika semena omogočajo kakovostne fenotipske, fiziološke ter molekularne analize (Wu s sod. 2023).

V eksperimentalni fiziologiji rastline graha služijo kot zanesljiv model pri preučevanju odzivov na različne abiotične stresne dejavnike, od slanosti, suše do temperaturnih nihanj. V kmetijski pridelavi enega najpomembnejših abiotičnih stresorjev predstavlja vodni stres. Ta namreč vpliva na rast in razvoj, fotosintezo ter s tem tudi končni pridelek rastlin. Sodobni podnebni modeli napovedujejo povečano pogostost in intenzivnost sušnih obdobj, kar povečuje potrebo po razumevanju mehanizmov prilagoditve rastlin na razmere z zmanjšano razpoložljivostjo vode v okolju. Eden izmed učinkovitih eksperimentalnih pristopov, ki ga uporabljamo za simulacijo sušnega stresa je uporaba kemikalije polietilen glikol (PEG). Je nestrupen osmotski reagent, ki znižuje vodni potencial substrata, ne da bi penetriral v rastlinske celice, s katerim lahko učinkovito in nadzorovano ustvarimo različne stopnje vodnega stresa v raziskavah fiziologije rastlin (Soboleva s sod. 2022).

Rastline se na pogoje zmanjšane dostopnosti vode odzivajo na več ravneh. Iz vidika morfoloških odzivov pogosto opazimo zlasti upočasnjeno rast korenin in poganjkov ter zmanjšanje rastlinske biomase. Na fiziološki ravni vodni stres zapiranje listnih rež, kar vodi v zmanjšanje prevodnosti listnih rež ter s tem zmanjša transpiracijo in upočasnjuje fotosintezo. Prav tako lahko vpliva tudi na samo vsebnost fotosinteznih pigmentov, zlasti klorofilov in karotenoidov, ki imajo ključno vlogo pri absorpciji svetlobe ter zaščiti fotosinteznega aparata. Ker je fotosistem II (PSII) izjemno občutljiv na tovrstne stresne razmere, se ravno fotokemična učinkovitost PSII lahko uporablja kot koristen indikator pri spremljanju fiziološkega stanja rastlin (Soboleva s sod. 2022; Wu s sod. 2023).

V okviru našega raziskovalnega dela smo preučevali odziv graha (*P. sativum*) na različne stopnje osmotskega stresa, inducirane z dodatkom PEG v substrat. Namen naše raziskave je bil celostno oceniti, kako se grah prilagodi različnim intenzitetam osmotskega stresa.

Hipoteze:

- Z naraščanjem koncentracije PEG v substratu se bo rast graha (dolžina korenin, dolžina poganjkov, sveža in suha biomasa) zmanjšala, kot posledica zmanjšane razpoložljivosti vode.
- Višje koncentracije PEG v substratu bodo povzročile

zmanjšano transpiracijo ter slabšo fotokemično učinkovitost PSII.

Materiali in metode

V poskusu smo uporabili dvotedenske sadike graha (*Pisum sativum*), ki so bile predhodno vzgojene na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin, Oddelka za biologijo. Skupaj smo za izvedbo poskusa uporabili 20 rastlin, od tega za vsako skupino (kontrola oz. 0 %; 0,5 %; 1 %; in 5 % PEG) po pet rastlin. Pri izboru rastlin smo bili pozorni, da smo izbrali rastline primerljive velikosti. S tem smo omogočili, da so bili začetni pogoji za vse rastline karseda podobni. Poskus smo izvajali 5 tednov.

Nastavitev poskusa

Različne sušne pogoje smo vzpostavili z dodatkom PEG v substrat zemlje komercialnega proizvajalca Lufa Speyer. V vsak lonček smo odmerili 300 g substrata, kateremu je bila predhodno primešana ustrezna koncentracija PEG (0 %, 0,5 %, 1 % ali 5 %). Imeli smo po pet lončkov (ponovitev) za vsako testno skupino. Izbrane sadike smo najprej očistili ter izmerili začetne dolžine korenin in poganjkov. V vsak lonček smo posadili po eno rastlino, pri čemer smo najprej dodali nekaj substrata, nato pa preostanek substrata previdno nasuli okrog podzemnega dela rastline. Po sajenju smo rastline najprej zalili s 50 mL destilirane vode in počakali, da se je voda vpila v substrat. Nato smo dodali še 20 mL polovične Hoaglandove hranilne raztopine (Sourour s sod. 2011).

Spremljanje poskusa

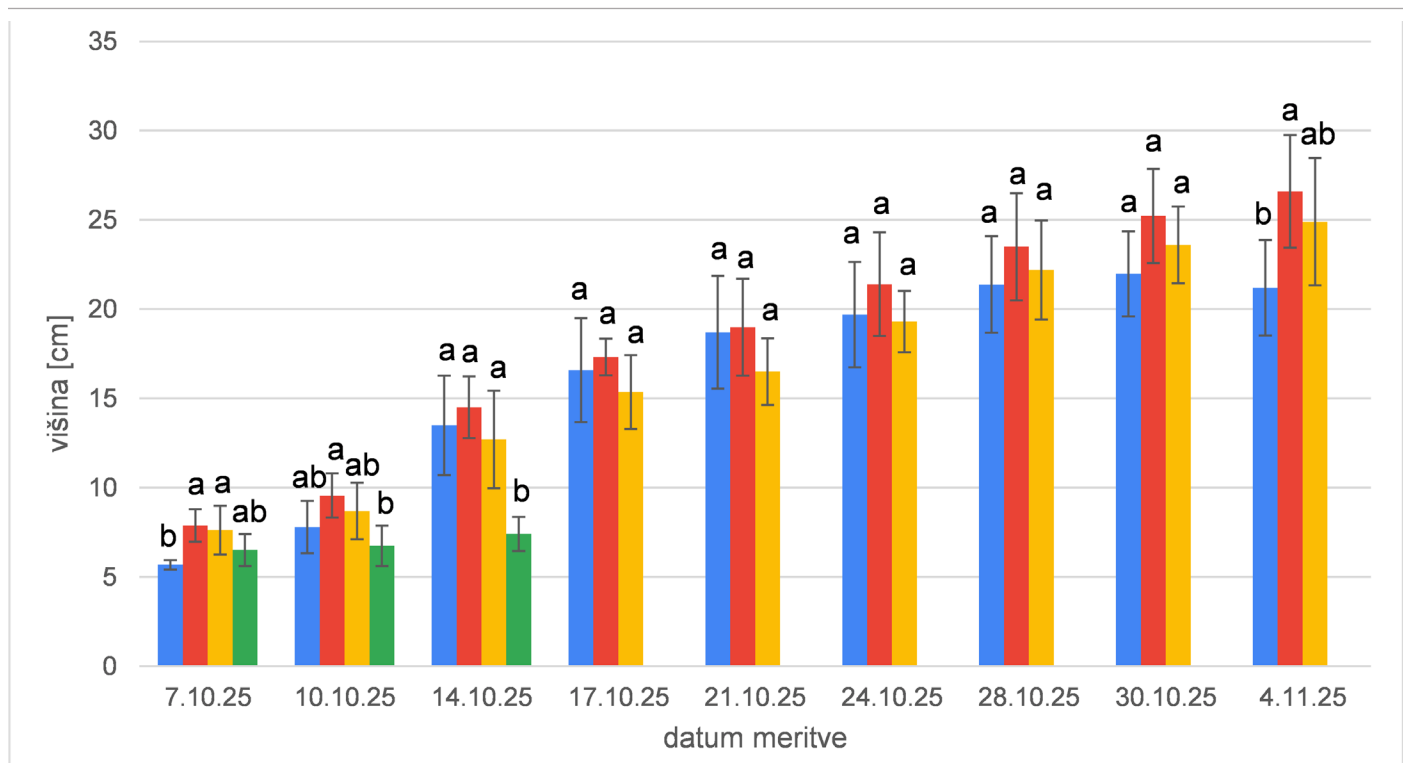
Rastline smo gojili v rastni komori, kjer smo vzdrževali dnevno-nočni svetlobni in temperaturni cikel. Tako so bile sadike 16 ur izpostavljene svetlobi in temperaturi 22 °C, 8 ur pa so bile v temi pri temperaturi 18 °C. Gojenje je potekalo pet tednov. Zalivali smo jih dvakrat tedensko. Prva dva tedna smo jih zalivali z 20 mL hranilne raztopine, ko so pa rastline zrasle, smo količino hranilne raztopine povečali na 40 mL.

Dvakrat na teden smo merili dolžino poganjkov in si rezultate sproti beležili. Po štirih tednih gojenja v rastni komori, smo izmerili fotokemično učinkovitost fotosistema II in stopnjo transpiracije. Oboje smo merili na primerljivih, polno razvitih listih. Fotokemično učinkovitost smo merili z uporabo fluorometra (PAM-2500). Merili smo dejansko fotokemično učinkovitost (Y) na osvetljenih listih. Stopnjo transpiracije smo merili z uporabo porometra (Leaf Porometer, Steady State Diffusion Porometer, Model SC-1, Decagon Devices), ki nam je podal stopnjo prevodnosti listnih rež (mmol m⁻² s⁻¹).

Podiranje poskusa

Po petih tednih smo rastline previdno odstranili iz substrata in jih očistili. Izmerili smo dolžino korenin in poganjkov ter tehtali svežo biomaso obeh delov. Korenine in poganjke vsake rastline smo nato ločeno zapakirali v aluminijaste folije in jih tri dni liofilizirali.

Šesti teden smo stehali še suhe biomase poganjkov in rastlin. Liofilizirane poganjke smo v terilnici s pomočjo tekočega dušika strli v prah. Odtehtali smo 35 mg strtega prahu liofiliziranih listov in dodali 15 mL 100 % ohlajenega metanola (4 °C), dobro premešali in vorteksirali. Sledila je inkubacija približno 30 min na sobni temperaturi v temi. Med inkubacijo smo ekstrakt



Slika 1. Povprečna višina poganjkov (cm) rastlin graha v posameznih terminih meritev pri različnih testnih skupinah. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ standardna deviacija ($n = 5$). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike med obravnavami znotraj posameznega termina merjenja (enosmerna ANOVA, Bonferroni – Holmov post hoc test, $p < 0,05$).

večkrat vorteksirali. Ekstrakt vsake rastline smo prefiltrirali čez filter papir v merilni valj in nato filtrat odpipetirali v dve ločeni mikrocentrifugirki (2 mL). Centrifugirali smo 3 min pri 2500 rpm. Na spektrofotometru smo izmerili absorpcijo pigmentov pri 665, 652 in 470 nm. Iz vrednosti absorpcij smo dobili izračun količine fotosinteznih pigmentov (mg/g) (Lichtenthaler in Buschmann 2001).

Obdelava in statistična analiza podatkov

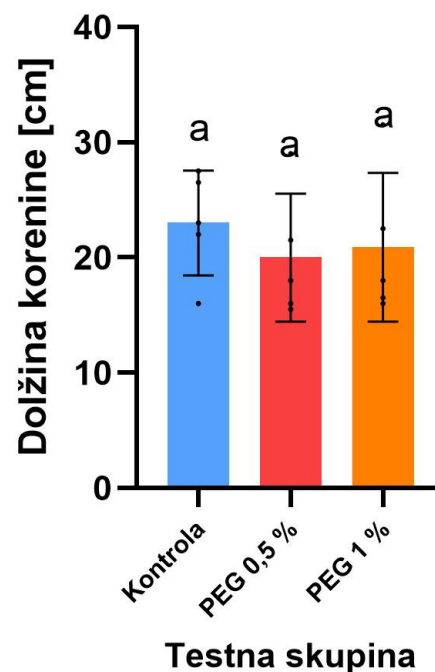
Statistična analiza podatkov je bila izvedena v programu GraphPad Prism 10. Za primerjavo povprečnih vrednosti med skupinami je bila uporabljena enosmerna analiza variance (ANOVA). Statistično značilne razlike med skupinami pa so bile določene s Tukeyjevim post-hoc testom. Meja statistične značilnosti je bila določena pri $p < 0,05$. Črke na grafih označujejo statistično značilne razlike med posameznimi skupinami.

Rezultati

Na začetku poskusa je bilo vključenih 20 rastlin (5 v vsaki testni skupini). Okoli tretjega tedna poskusa smo zaradi odmrtja vseh petih rastlin v testni skupini, izpostavljeni 5 % PEG, izključili iz vseh nadaljnjih analiz in prikazanih podatkov, razen iz grafa, ki prikazuje spremembo rasti.

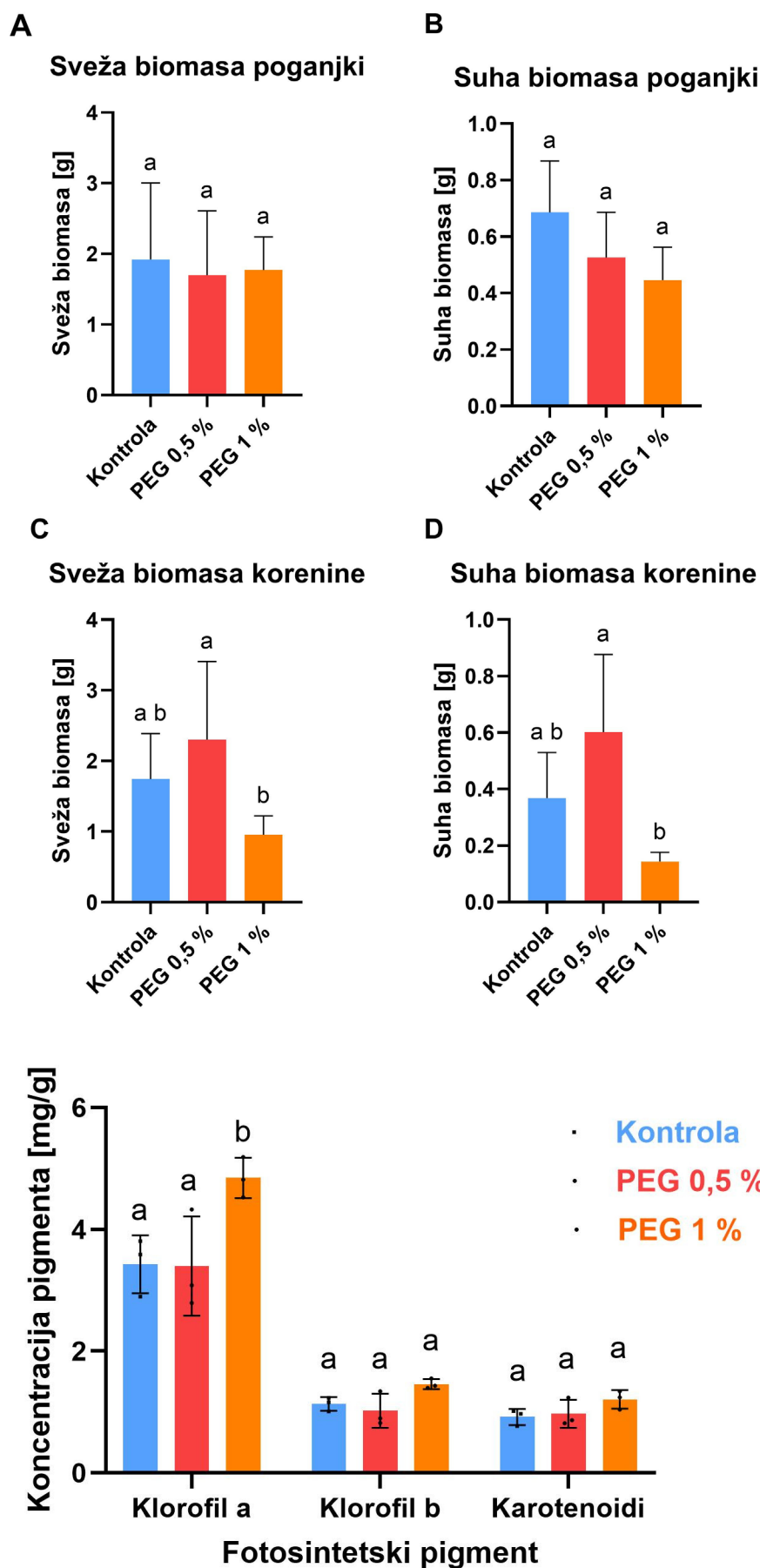
Rastni parametri

Na sliki 1 vidimo, da so v zgodnjih fazah rasti (prva meritev) bile rastline pri obravnavah s PEG (0,5 % in 1 %) višje od kontrolnih rastlin ($p = 0,0099$ in $p = 0,0237$). V poznejših terminih meritev so rastline, izpostavljene PEG 0,5 %, pogosto dosegle najvišjo povprečno višino. Pri končni meritvi smo zaznali statistično značilno razliko med kontrolno skupino in skupino, obravnavano s PEG 0,5 % ($p = 0,0465$).



Slika 2. Povprečna dolžina korenin [cm] rastlin graha po izpostavitvi različnim koncentracijam PEG. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ standardna deviacija ($n = 5$). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike med obravnavami (enosmerna ANOVA, Tukeyjev post – hoc test, $p < 0,05$).

Slika 3. Povprečna sveža (A) ter suha biomasa poganjkov [g] (B) po izpostavitvi različnim koncentracijam PEG ter povprečna sveža (C) in suha biomasa korenin [g] (D) po izpostavitvi različnim koncentracijam PEG. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ standardna devijacija (n=5). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike med obravnavanimi (Enosmerna ANOVA, Tukeyjev post – hoc test, $p < 0,05$)



Slika 4. Koncentracije fotosinteznih pigmentov (mg/g suhe mase) v listih graha (*Pisum sativum* L.), izpostavljenega različnim koncentracijam polietilen glikola (PEG) po petih tednih rasti. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ standardna deviacija (n = 3). Različne črke (a,b) označujejo statistično značilne razlike med obravnavami znotraj posameznega pigmenta (enosmerna ANOVA, Tukeyjev post – hoc test, $p < 0,05$).

Dolžina korenin se med kontrolno skupino in rastlinami, izpostavljenimi PEG (0,5 % in 1 %), ni statistično značilno razlikovala (Slika 2).

Svežo in suho biomaso poganjkov ter korenin smo primerjali med kontrolno skupino in rastlinami, izpostavljenimi različnim koncentracijam PEG. Povprečne vrednosti biomase so se

Tabela 1. Povprečne vrednosti fotokemične učinkovitosti in transpiracije izmerjene po štirih tednih od postavitve poskusa, ter standardne deviacije. Statistična analiza je bila izvedena z enosmerno ANOVO in Tukeyjevim post-hoc testom ($p < 0,05$).

Tretma	Fotokemična učinkovitost	Transpiracija [mmol/m ² s]
Kontrola	0.660 ± 0.056 a	25.64 ± 8.983 a
PEG 0,5 %	0.678 ± 0.016 a	20.84 ± 1.083 a
PEG 1 %	0.698 ± 0.019 a	38.38 ± 15.988 a

med testnimi skupinami razlikovale predvsem pri koreninah, medtem ko pri poganjkih statistično značilnih razlik nismo zaznali (Slika 3). Pri sveži biomasi korenin so rastline v testni skupini PEG 1 % dosegle statistično značilno nižje vrednosti v primerjavi s testno skupino PEG 0,5 % ($p = 0,0383$), medtem ko kontrolna skupina ni pokazala statistično značilnih razlik v primerjavi z ostalimi testnimi skupinami. Podoben vzorec smo opazili tudi pri suhi biomasi korenin, kjer je bila biomasa v testni skupini PEG 1 % statistično značilno nižja v primerjavi s testno skupino PEG 0,5 % ($p = 0,0054$). Nasprotno pri sveži in suhi biomasi poganjkov med testnimi skupinami nismo zaznali statistično značilnih razlik, saj so vse testne skupine dosegle primerljive povprečne vrednosti.

Analiza fotosinteznih pigmentov

Na sliki 4 so prikazane izmerjene koncentracije klorofila a, b in karotenoidov. Vsebnost klorofila a je bila pri rastlinah, obravnavanih z 1 % PEG, statistično značilno večja kot pri kontrolnih rastlinah ($p = 0,0004$) in rastlinah obravnavanih z 0,5 % PEG ($p = 0,0003$).

Fotokemična učinkovitost in transpiracija

Dejanska fotokemična učinkovitost fotosistema II in hitrost transpiracije nista bili statistično značilno spremenjeni zaradi PEG-induciranega sušnega stresa (Tabela 1).

Diskusija

Rezultati naše raziskave kažejo pragovno odvisen odziv graha (*Pisum sativum* L.) na s PEG induciran osmotski stres: pri 0,5 % in 1 % PEG nismo zaznali statistično značilnega poslabšanja dejanske fotokemične učinkovitosti PSII (Y) niti transpiracije v primerjavi s kontrolo, medtem ko je 5 % PEG povzročil propad rastlin že med spremljanjem rasti. Tak izid podpira interpretacijo, da sta bili obravnavi 0,5–1 % v našem poskusu pretežno blagi do zmerni, tj. pod pragom, pri katerem bi pričakovali sistemsko okvaro fotosinteznega aparata, vendar dovolj izraziti, da vplivata na rastne procese. V literaturi so pri izrazitejšem sušnem stresu v grahu pogosto opisani močni padci fotosinteze, transpiracije in prevodnosti listnih rež ter spremljajoč oksidativni stres in spremembe antioksidativnih encimov (Kamran s sod., 2025; Lei s sod., 2021). V tem kontekstu naše ugotovitve (ohranjena vrednost Y in transpiracija pri 0,5–1 % PEG) niso v nasprotju s pričakovanji, temveč kažejo, da v obravnavah, kjer so rastline preživele, ni prišlo do izrazitega zmanjšanja učinkovitosti PSII in transpiracije. Hkrati pa rastni podatki nakazujejo, da se učinki stresa lahko najprej izrazijo kot spremembe rasti: pri 0,5 % PEG rast ni bila zavrta, 5 % PEG pa je presegel tolerančni prag, saj so rastline po treh tednih odmrle.

To je skladno z ugotovitvami pri stročnicah, da suša pogosto najprej omeji rast in biomaso in sicer, zaradi turgorske omejitve

celične ekspanzije in porabe asimilatov za prilagoditev, medtem ko se večje razlike v fotosintezni aktivnosti in stresnih markerjih pokažejo šele pri hujših stopnjah suše (Khatun s sod. 2021). Razlago dodatno podpira pigmentni profil: pri 1 % PEG je bila vsebnost klorofila a celo najvišja, medtem ko se klorofil b in karotenoidi niso značilno razlikovali. Tak odziv je skladen z možnostjo aklimacijskega odziva pri zmernem stresu, kjer rastlina ohranja (ali delno prilagodi) fotosintezno aktivnost brez merljivega zmanjšanja vrednosti Y. S PEG induciran osmotski stres v grahu namreč inducira sintezo galaktinola ter rafinoze in stahioze (RFO) skupaj z aktivacijo pripadajočih encimov, kar predstavlja tipičen zgodnji zaščitni/osmotsko-prilagoditveni odziv (Pluskota s sod. 2015).

V našem poskusu se to lahko kaže kot situacija, kjer zaščitni metabolni odzivi pomagajo vzdrževati stabilno stopnjo Y, medtem ko je rast (ki je bolj občutljiva na turgor) že delno omejena. Pomemben signal v tej smeri je tudi koreninski odziv: pri 1 % PEG je bila sveža in suha biomasa korenin nižja (v primerjavi z 0,5 %), dolžina korenin pa se ni jasno razlikovala. To nakazuje, da stres ni nujno vplival na »doseg« korenin, temveč na akumulacijo tkiva/razvejanost, kar je pri stročnicah pogosto povezano z alokacijskimi kompromisi pod pogoji pomanjkanja vode (Khatun s sod. 2021).

Ob tem velja upoštevati, da PEG predstavlja laboratorijsko definiran osmotski stres, ki ni popoln ekvivalent talne suše. Ker smo PEG dodajali v trdnem stanju v zemljo in nato zalivali, je možna neenakomerna porazdelitev stresnega dejavnika med posameznimi rastlinami, kar je skladno z visoko variabilnostjo transpiracije in zmanjšuje moč zaznave manjših razlik. Kljub temu kombinacija (i) stabilnega Y in transpiracije pri 0,5–1 % PEG, (ii) zaznavnih razlik v rasti in koreninski biomasi ter (iii) letalnega izida pri 5 % PEG dosledno kaže na hierarhijo odzivov, kjer se rastni parametri spremenijo prej kot »končni« indikatorji okvare fotosintezne funkcije. Sklepno naši podatki podpirajo, da grah pri blagem do zmernem s PEG induciranem stresu ohranja funkcionalno stabilnost PSII, medtem ko višje obremenitve hitro presežejo tolerančni prag. S tem delom prispevamo k razumevanju, da lahko zmerne vodne omejitve vplivajo na rast že brez jasnega padca Y, kar je v skladu z dosedanjimi raziskavami na grahu in stročnicah (Kamran s sod. 2025; Khatun s sod. 2021; Lei s sod. 2021).

Zaključki

Ugotovili smo, da s PEG induciran osmotski stres pri grahu kaže pragovno naravo, saj je pri 5 % PEG prišlo do propada rastlin. Prva hipoteza je tako delno potrjena: pri 5 % PEG je prišlo do propada rastlin, medtem ko pri 0,5 % in 1 % PEG nismo zaznali statistično značilnega zmanjšanja rasti poganjkov v primerjavi s kontrolo; se je pa pri 1 % PEG odziv pokazal na ravni koreninskega sistema, saj sta bili sveža in suha biomasa korenin statistično značilno nižji kot pri 0,5 % PEG (kontrola je bila vmesna in se ni jasno razlikovala od nobene od obravnav).

Druga hipoteza je za obravnavi 0,5 % in 1 % PEG ovržena, ker vrednosti dejanske fotokemične učinkovitosti in transpiracije niso bile statistično značilno nižje od kontrole; pri 5% PEG teh parametrov zaradi propada rastlin ni bilo mogoče neposredno ovrednotiti. Skupaj rezultati kažejo, da se pri grahu odziv na osmotski stres najprej izrazi na ravni rasti in alokacije biomase, medtem ko se funkcionalni kazalniki kot sta fotokemična učinkovitost in transpiracije pri blažjih obravnavah ohranijo. To poudarja pomen uporabe več komplementarnih kazalnikov pri vrednotenju sušnega/osmotskega stresa ter potrjuje, da pri višjih obremenitvah obstaja jasen prag, po katerem ta toleranca odpove.

Literatura

1. Kamran A, Shakeel K, Jahan S, Komal L, 2025. Comparative effect of gibberellic acid and brassinolide for mitigating drought stress in pea (*Pisum sativum* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants* 31:979–991. doi:10.1007/s12298-025-01617-y
2. Khatun M, Sarkar S, Era FM, Islam AKMM, Anwar MP, Fahad S, Datta R, Islam AKMA, 2021. Drought stress in grain legumes: effects, tolerance mechanisms and management. *Agronomy* 11(12): 2374. doi:10.3390/agronomy11122374
3. Lei C, Bagavathiannan M, Wang H, Sharpe SM, Meng W, Yu J, 2021. Osmopriming with polyethylene glycol (PEG) for abiotic stress tolerance in germinating crop seeds: a review. *Agronomy* 11(11): 2194. doi:10.3390/agronomy11112194
4. Lichtenthaler HK, Buschmann C, 2001. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy.
5. Soboleva A, Frolova N, Bureiko K, Shumilina J, Balcke GU, Zhukov VA, Tikhonovich IA, Frolov A, 2022. Dynamics of reactive carbonyl species in pea root nodules in response to polyethylene glycol (PEG)-induced osmotic stress. *International Journal of Molecular Sciences* 23(5):2726. doi:10.3390/ijms23052726
6. Sourour A, Olfa S-A, Hajer S-A, n.d. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and nitrate silver on the efficiency of haploid production in durum wheat × maize crosses. *International Journal of Plant Breeding* 5: 101-105.
7. Wu X, Cheng C, Ma R, Xu J, Ma C, Zhu Y, Ren Y, 2023. Genome-wide identification, expression analysis, and functional study of the bZIP transcription factor family and its response to hormone treatments in pea (*Pisum sativum* L.). *BMC Genomics* 24:705. doi:10.1186/s12864-023-09793-5

Vpliv delcev mikroplastike na rast in razvoj paradižnika (*Solanum lycopersicum*)

Biderman Sergeja, Gazvoda Suzana, Jazbec Špela, Klepec Vita, Mihelič Nika

Študij molekulske in funkcionalne biologije, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

- Namen raziskave je bil določiti vpliv različnih koncentracij mikroplastike (tip C3-PPDE-200) v substratu na rast in fiziološke parametre paradižnika (*Solanum lycopersicum*). Mikroplastika je vse bolj prisotna v okolju, o njenem vplivu na rastline pa je še veliko neznanega.
- Rastline smo gojili sedem tednov v substratu z dodanimi različnimi koncentracijami mikroplastike (0 %, 0,5 %, 1 % in 5 %). Spremljali smo rast poganjkov in korenin, izmerili fotokemično učinkovitost, transpiracijo ter svežo in suho biomaso poganjkov in korenin. Določili smo tudi vsebnosti fotosinteznih pigmentov.
- Raziskava je pokazala, da mikroplastika vpliva na dolžino poganjkov in korenin, njihovo biomaso in določene fiziološke lastnosti, vendar učinki niso bili povsem linearni in se niso dosledno kazali pri vseh koncentracijah. Večji deleži mikroplastike so zmanjšali rast, biomaso, fotosintezno učinkovitost ter vsebnosti pigmentov, medtem ko je bil vpliv pri nižjih koncentracijah manj izrazit.
- Mikroplastika deluje kot koncentracijsko odvisen stresor, ki zavira rast in fotosintezno učinkovitost paradižnika. Visoke koncentracije mikroplastike pomembno zmanjšajo vitalnost rastlin, kar potrjuje negativno vlogo mikroplastike v kmetijskih tleh.

Ključne besede: korenine, poganjki, pigmenti, fotokemična učinkovitost, transpiracija

Uvod

Mikroplastika (MP) so plastični delci, manjši ali enaki 5 mm v vseh dimenzijah. Ločimo primarno MP, ki je namenoma proizvedena v tej mikroskopski velikosti in sekundarno MP, ki nastane z razpadanjem večjih plastičnih izdelkov zaradi mehanskih, kemičnih ali bioloških procesov. Lahko je v obliki fragmentov, vlaken, peletov ali filamentov (Massarelli s sod. 2021). MP predstavlja pomembno tveganje za okolje zaradi svoje razširjenosti, obstojnosti in sposobnosti vplivanja na zdravje organizmov. MP se kopiči v tleh, vodi in zraku, kjer lahko spremeni strukturo tal, zmanjša raznovrstnost mikrobov in vpliva na rast rastlin (Koelmans s sod. 2022). MP je sestavljena iz različnih polimerov (npr. polietilen, polipropilen, polistiren) in pogosto vsebuje dodatne onesnaževalce. Zaradi močne hidrofobne površine se na njej zlahka koncentrirajo onesnaževalci, kot so težke kovine in obstojna organska onesnaževala, ki se nato vnašajo v prehranske verige. Vsebuje tudi plastične dodatke, kot so mehčala, zaviralci gorenja in UV-stabilizatorji, ki spreminjajo lastnosti polimera za boljšo trpežnost in obstojnost (Xiang s sod. 2021).

Paradižnik (*Solanum lycopersicum*) je enoletna rastlina iz družine razhudnikovk (Solanaceae), ki izvira iz zahodne Južne Amerike. Je pomembna zelenjadnica in modelni organizem za raziskave rastlin z mesnatimi plodovi. Ima značilne sestavljene liste, simpodialno rast (rast s stranskimi poganjki) in mesnate plodove, ki so kmetijsko zelo pomembni (Kimura in Sinha 2008).

MP se lahko absorbira v rastlino paradižnika na dva glavna načina. Preko korenin iz zemlje ali preko listov iz zraka. Najpogosteje pride do absorpcije skozi korenine, kjer zelo majhni delci MP (manj kot 10 mikrometrov) prodrejo v koreninsko tkivo, običajno skozi apoplastno pot ali endodermalne celice, če so dovolj majhni (Nuamzei s sod. 2024). Pri izpostavljenosti zraku lahko nanoplastika vstopi tudi neposredno skozi listne reže ali poškodbe na povrhnjici lista. Ti delci se lahko nato translocirajo iz listov v korenine in druge dele rastline (Shi s sod. 2023).

Ko MP enkrat vstopi v rastlino, se je največ zadrži v koreninah, kjer jo je mogoče MP zaznati. Prehod v nadzemne dele (steblo, liste, plodove) pa je omejen in redek, predvsem zaradi velikosti delcev in preprek v rastlinskih tkivih (Nuamzanei s sod. 2024). V listih se lahko nanoplastika razprši po mezofilnih celicah, medtem ko so večji delci MP večinoma omejeni na korenine (Nuamzanei s sod. 2024; Shi s sod. 2023).

Prisotnost MP povzroča zmanjšano rast rastline, površino listov, premera stebela, sveže in suhe mase ter števila sekundarnih korenin. Poleg tega MP zmanjšuje vsebnost klorofila in karotenoidov, povzroča oksidativni stres ter moti presnovo hranil, kar vodi v zaviranje rasti in slabšo vitalnost rastline. Učinki so odvisni od vrste in koncentracije MP. Višje koncentracije povzročajo izrazitejša negativna posledice (Nuamzanei s sod. 2024; Shi s sod. 2023). Nekatere vrste MP lahko tudi spremenijo mikrobovno združbo v rizosferi, kar dodatno poslabša rast in absorpcijo hranil (Fan s sod. 2025). Namen naše raziskave je bil ugotoviti, ali prisotnost MP vpliva na rast paradižnika (*Solanum lycopersicum*). Paradižnik (*Solanum lycopersicum*) smo posadili v substrat, ki smo mu dodali različne koncentracije delcev MP. Skozi obdobje sedmih tednov smo spremljali velikost rastlin, na koncu pa analizirali še fotokemično učinkovitost, transpiracijo in biomaso, da bi razumeli vpliv delcev MP na rast. Naša hipoteza je bila, da bo

povečana koncentracija MP v zemlji zavirala rast paradižnika, kar se bo kazalo kot zmanjšana dolžina in biomasa nadzemnega in podzemnega dela (1). Pričakovali smo tudi, da bo pri rastlinah, izpostavljenih višjim koncentracijam MP, fotokemična učinkovitost zmanjšana, vsebnost fotosinteznih pigmentov pa nižja v primerjavi s kontrolnimi rastlinami brez MP (2). Stopnja transpiracije naj bi bila nižja pri rastlinah, izpostavljenih višjim koncentracijam MP (3). Domnevali smo še, da bodo razlike v odzivu rastlin relativno sorazmerne koncentraciji MP, pri čemer bi večje koncentracije povzročile izrazitejše učinke (4).

Materiali in metode

Poskus je bil izveden v časovnem obdobju sedmih tednov. V tem času smo nastavili eksperiment, rastline gojili ter jih redno zalivali. Redno smo spremljali dolžine poganjkov. Rastlinski material in vir mikroplastike Sadike paradižnika (*Solanum lycopersicum*) so bile predhodno vzgojene v vermikulitu. Vir MP so predstavljale črne polipropilenske kmetijske folije za zastirko (tip C3-PPDE-200) (van Loon s sod. 2025). MP so pripravili na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo UL.

Postavljanje eksperimenta

Eksperiment je bil zasnovan v štirih izpostavitvah in petih ponovitvah vsake izpostavitve. Vsaka izpostavitve je vsebovala substrat z različno koncentracijo MP. Prva izpostavitve je vsebovala 0 % (kontrola), druga 0,5 %, tretja 1 % in četrta 5 % MP. Rastline smo gojili v plastičnih lončkih. V vsak lonček smo dodali 300 g substrata Lufa Speyer, zmešanega z ustrežno količino MP. Dvotedenskim sadikam paradižnika smo previdno sprali korenine ter po dve zasadili v substrat, vsako na svojo polovico lončka. Sadike smo zalili s 50 mL destilirane vode, zatem pa še z 20 mL hranilne (½ Hoaglandove) raztopine. Lončke smo namestili v rastno komoro. Rastline smo zalivali dvakrat tedensko s Hoaglandovo raztopino (Epstein 1972). Prva dva tedna smo zalivali z 20 mL, naslednjih pet tednov pa s 40 mL. Skupno smo rastline gojili sedem tednov in v tem času spremljali rast poganjkov (merjenje dolžine) in opazovali morebitne znake pomanjkanja.

Pogoji gojenja

Rastline smo gojili v rastni komori z dnevno-nočnim ritmom 16 ur svetlobe in 8 ur teme. Ko je bila komora osvetljena, je bila njena temperatura 22 °C, ponoči pa je bila temperatura 18 °C. Relativna zračna vlažnost v komori je v povprečju znašala 60 %.

Meritve

Višino poganjkov rastlin smo izmerili, ko so bile posajene in v lončke in zalite (na začetku poskusa), potem pa enkrat na teden, do konca sedmega tedna, z izjemo prvega in šestega tedna. Merili smo razdaljo med bazo stebela nad substratom in apikalnim meristemom poganjka. Pri meritvah smo si pomagali s centimetrskim ravnilom. Dolžino korenin smo izmerili na koncu sedmega tedna. Pri merjenju višine smo izračunali povprečje obeh rastlin v posameznem lončku in to obravnavali kot en podatek.

Po sedmih tednih gojenja, smo izmerili tudi fotokemično učinkovitost in transpiracijo. Fotokemična učinkovitost (FU) je mera za delež svetlobne energije, ki se pretvori v kemično energijo med fotosintezo v zelenih listih (Murchie

in Lawson 2013). S pomočjo fluorometra PAM-2500 Portable Chlorophyll Fluorometer (Walz, Meß- und Regeltechnik) smo merili fluorescenco klorofila a na osvetljenih listih in pridobili dejansko FU (Y). Merjenje smo opravili na enem polno razvitem listu v vsakem lončku. Meritve smo izvedli na približno enako razvitih listih, da so podatki čim bolj reprezentativni.

Transpiracijo smo izmerili s porometrom Leaf Porometer, Steady State Diffusion Porometer, Model SC-1 (Decagon Devices) na enem polno razvitem listu v vsakem lončku. Tudi pri teh meritvah smo izbrali primerljive liste. Meritve transpiracije oz. prevodnosti listnih rež smo merili trideset sekund, po postavitvi lista v niz z dvema znanima prevodnima elementoma (senzorjema vlažnosti). Z merjenjem razlike v vlažnosti teh senzorjev smo izmerili pretok vodne pare. Vrednosti prevodnosti listov smo izračunali iz treh spremenljivk, saj je vlažnost znana na treh točkah, na listih in na dveh senzorjih vlažnosti (AlphaOmega Electronics 2025). Na koncu sedmega tedna smo na tehtnici (Kern EW4200-2NM; Kern & Sohn GmbH) stehali svežo biomaso poganjkov in korenin posameznih rastlin. Svež material poganjka smo ločili, zavili v alu-folijo, potopili v tekoči dušik in liofilizirali ter nato shranili za potrebe analize pigmentov in tehtanja suhe biomase. Preostali material korenin smo prav tako liofilizirali in zatem stehali še suho biomaso korenin. Pri izračunu biomase smo izračunali povprečje obeh rastlin v posameznem lončku in to obravnavali kot en podatek. S pomočjo določene sveže in suhe biomase smo izračunali odstotek vsebnosti vode v poganjkih in koreninah pri posamezni izpostavitvi po spodnji formuli:

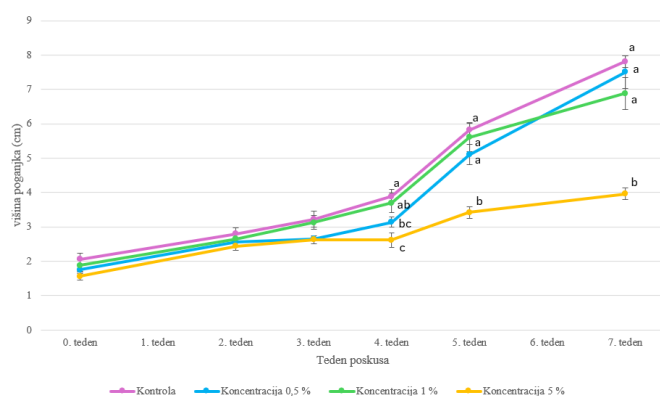
$$\%vode = (sveža\ biomasa - suha\ biomasa) / (sveža\ biomasa) \times 100\%$$

Ekstrakcija pigmentov

Določili smo tudi vsebnost asimilacijskih pigmentov, in sicer klorofila a, klorofila b in karotenoidov. Suho biomaso listov smo strli v terilnici in 35 mg strtegu prahu liofiliziranih listov dodali 15 mL 100 % ohlajenega metanola (na 4 °C) ter mešali in vorteksirali, dokler ekstrakt ni postal homogen. Mešanico smo inkubirali 30 minut na sobni temperaturi v temi in vmes večkrat premešali. Ekstrakt smo potem prefiltrirali skozi filter papir v merilnem valju. Ekstrakt smo razdelili v 2 centrifugirki (približno 2 ml) in centrifugirali 3 minute pri 2500 rpm. Absorbcijo centrifugiranega ekstrakta smo izmerili na spektrofotometru (SpectroVisPlus, Spectrophotometer + Fluorometer; Vernier) pri valovnih dolžinah 664 nm, 647 nm in 470 nm. Iz pridobljenih podatkov smo s pomočjo formul (Lichtenthaler 1987) izračunali vsebnost fotosintetskih pigmentov (v mg/g sveže mase), kot prikazano v Tabeli 1.

Statistična analiza

Pri obdelavi rezultatov smo uporabljali program Microsoft Excel, in sicer orodje XL Toolbox NG. Za vsako skupino smo podatke analizirali z enosmerno analizo variance (one-way ANOVA), pri čemer smo za statistično značilne smatrali rezultate s p-vrednostjo < 0,05. Kadar je ANOVA pokazala statistično značilne razlike med obravnavanji, smo nadalje uporabili post hoc test (p < 0,05). Rezultate smo prikazali na grafih v programu Microsoft Excel.



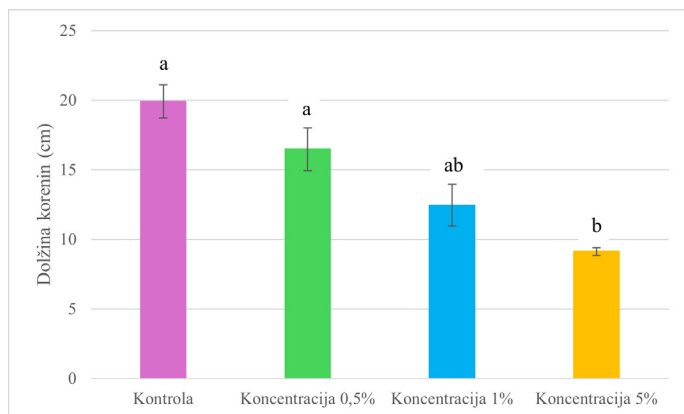
Slika 1. Grafični prikaz povprečne višine poganjkov (povprečje ± standardna napaka, n = 10) paradižnika (*Solanum lycopersicum*), gojenega 7 tednov v zemlji brez MP (kontrola) ter v substratu z 0,5 %, 1 % in 5 % deležem MP. 0. teden prikazuje izmerjene povprečne višine poganjkov na dan postavitve poskusa. Meritve smo izvedli vsakih 7 dni, razen 1. in 6. teden. Različne črke označujejo statistično značilne razlike med skupinami, izpostavljenimi različnim koncentracijam MP na posamezen teden opazovanja (enosmerna ANOVA, Holm-Šidák posthoc test, p < 0,05).



Slika 2. Fotografija lončkov z reprezentativnimi paradižniki (*Solanum lycopersicum*), gojenimi v substratu z različnimi koncentracijami MP, posneto v zadnjem tednu poskusa. Koncentracije MP v substratu si od leve proti desni sledijo: 0 %, 0,5 %, 1 % in 5 %. Vidne so razlike v višini rastlin med posameznimi izpostavitvami.

Tabela 1. Formule za izračun koncentracij klorofila a in b ter karotenoidov (Lichtenthaler 1987).

Pigment	Formula
Klorofila a (ug/mL)	$16,72 \times A_{664} - 9,16 \times A_{647}$
Klorofila b (ug/mL)	$34,09 \times A_{647} - 15,28 \times A_{664}$
Skupnih karotenoidov (ug/mL)	$(1000 \times A_{470} - 1,63 \times Chla - 104,96 \times Chlb) / 221$



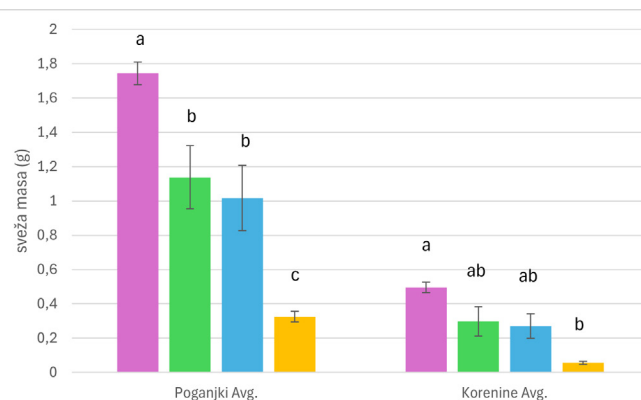
Slika 3. Grafični prikaz povprečne dolžine korenin (povprečje $\pm$ standardna napaka, $n = 5$) paradižnika (*Solanum lycopersicum*) po sedmih tednih gojenja v substratu z različnimi koncentracijami MP (0 %, 0,5 %, 1 % in 5 %). Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike med različnimi izpostavitvami MP (enosmerna ANOVA, Tukeyjev post hoc test, $p < 0,05$).

Rezultati

Dolžina poganjkov in korenin

Na Sliki 1 vidimo, kako se je povprečna dolžina poganjkov paradižnikov posameznih izpostavitvev spreminjala skozi časovno obdobje sedmih tednov. V prvih treh tednih poskusa smo opazili, da se je pri vseh izpostavitvah povprečna višina poganjkov z vsako meritvijo povečevala, vendar med njimi ni bilo statistično značilnih razlik. Primerjava povprečnih višin poganjkov med izpostavitvami je pokazala statistično značilne razlike v 4. tednu poskusa, in sicer sta najboljše rastli kontrolna skupina in izpostavitve 1 % MP, slabše pa 0,5 % MP in 5 % MP. Od 5. tedna do konca poskusa pa so najslabše rastle rastline izpostavljene najvišji (5 %) MP, medtem ko med kontrolno skupino in nižjima izpostavitvama MP razlik v rasti nismo zaznali. Razlike v rasti poganjkov on koncu poskusa so vidne na Sliki 2.

Dolžine korenin so se med izpostavitvami statistično značilno razlikovale, kot prikazuje Slika 3. V povprečju najdaljše korenine so bile izmerjene pri kontrolnih rastlinah in pri skupini z 0,5 % MP. Pri rastlinah, izpostavljenih 1 % MP, se je kazal trend zmanjšane povprečne dolžine korenin, vendar razlika v primerjavi s kontrolo ni bila statistično značilna. Nasprotno pa je bila pri 5 % MP povprečna dolžina korenin statistično



Slika 4. Grafični prikaz povprečne sveže mase poganjkov (levo) in korenin (desno) (povprečje $\pm$ standardna napaka, $n = 5$) paradižnika (*Solanum lycopersicum*), gojenega 7 tednov v zemlji brez MP (kontrola) ter v substratu z 0,5 %, 1 % in 5 % deležem MP, izmerjene po sedmih tednih poskusa. Različne črke označujejo statistično značilne razlike med skupinami, izpostavljenimi različnim koncentracijam MP (enosmerna ANOVA, Holm-Šidák posthoc test, $p < 0,05$).

značilno manjša v primerjavi s kontrolo in skupino z 0,5 % MP. Rezultati kažejo na koncentracijsko odvisen vpliv MP na rast korenin, pri čemer višje koncentracije (zlasti 5 %) izraziteje zavirajo rast podzemnega dela rastline.

Fotokemična učinkovitost in transpiracija

Fotokemična učinkovitost fotosistema II (FU) se je med izpostavitvami statistično značilno razlikovala, kot je razvidno iz Tabele 2. V primerjavi s kontrolnimi rastlinami, je bila FS učinkovitost nižja pri rastlinah, izpostavljenih 1 % in 5 % MP, medtem ko pri skupini z 0,5 % MP nismo zaznali razlik v primerjavi s kontrolo.

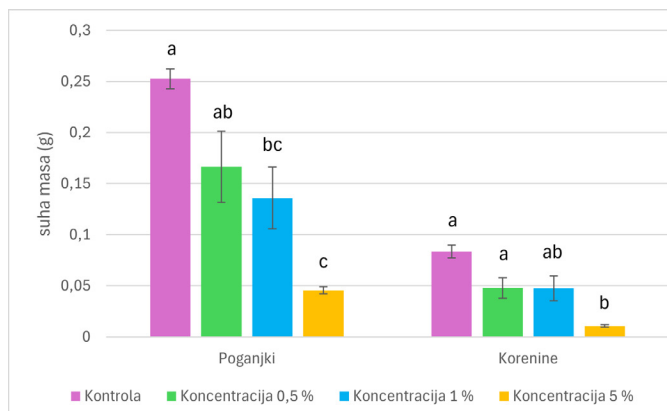
Nasprotno pa rezultati meritev transpiracije med izpostavitvami niso pokazali statistično značilnih razlik, kar kaže, da prisotnost MP v preučevanem koncentracijskem razponu ni imela merljivega vpliva na prevodnost listnih rež oziroma stopnjo transpiracije, kar prikazuje Tabela 2.

Biomasa in vsebnost vode

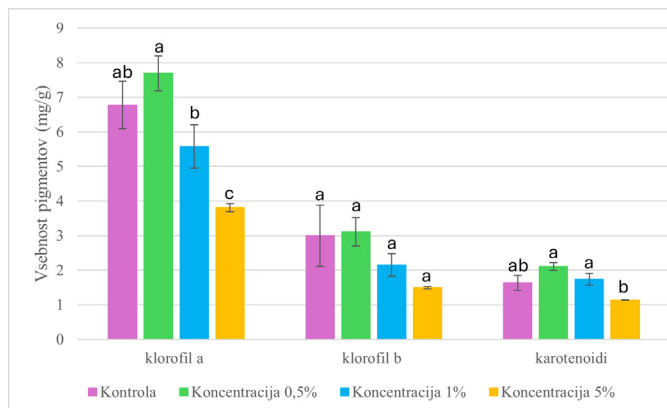
Na Sliki 4 vidimo, da je bila povprečna sveža masa poganjkov pri izpostavitvah 0,5 % in 1 % MP manjša od povprečne mase poganjkov kontrolne skupine; v povprečju najmanjšo svežo biomaso pa smo izmerili pri rastlinah, izpostavljenih 5 % MP. Pri koreninah smo prav tako najnižjo svežo biomaso

Tabela 2. Fotokemična učinkovitost fotosistema II (FU) in transpiracija listov (povprečje $\pm$ standardna napaka, $n = 5$) paradižnika (*Solanum lycopersicum*) po sedmih tednih gojenja v substratu z različnimi koncentracijami MP (0 %, 0,5 %, 1 % in 5 %). Različne črke v stolpcih označujejo statistično značilne razlike med različnimi izpostavitvami MP (enosmerna ANOVA, Tukeyjev post-hoc test, $p < 0,05$).

Tretma	Dejanska fotokemična učinkovitost (RU)	Transpiracija (mmol/m ² s)
Kontrola 0 %	0,4976 $\pm$ 0,0429 a	149,96 $\pm$ 19,49 a
Koncentracija 0,5 %	0,3168 $\pm$ 0,0807 ab	136,48 $\pm$ 24,45 a
Koncentracija 1 %	0,2016 $\pm$ 0,0337 b	183,90 $\pm$ 37,18 a
Koncentracija 5 %	0,1976 $\pm$ 0,0288 b	199,68 $\pm$ 25,32 a



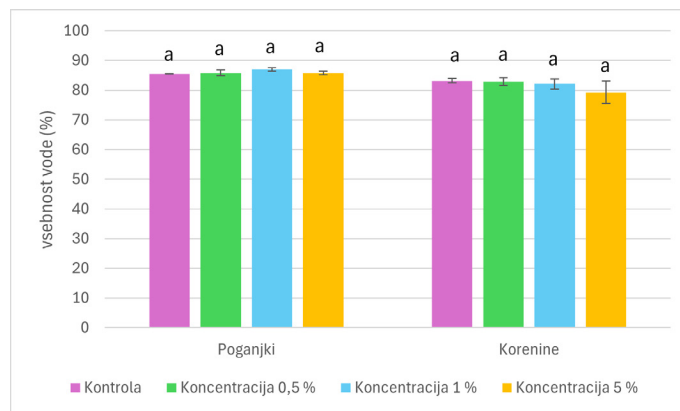
Slika 5. Grafični prikaz suhe mase poganjkov (levo) in korenin (desno) (povprečje $\pm$ standardna napaka, $n = 5$) paradižnika (*Solanum lycopersicum*), gojenega 7 tednov v zemlji brez MP (kontrola) ter v substratu z 0,5 %, 1 % in 5 % deležem MP, izmerjene po sedmih tednih poskusa. Različne črke označujejo statistično značilne razlike med skupinami, izpostavljenimi različnim koncentracijam MP. (enosmerna ANOVA, Holm-Šidák posthoc test, $p < 0,05$).



Slika 7. Grafični prikaz vsebnosti klorofila a (levo), klorofila b (na sredini) in karotenoidov (desno) (povprečje $\pm$ standardna napaka, $n = 5$) v listih paradižnika (*Solanum lycopersicum*) gojenega 7 tednov v zemlji brez MP (kontrola) ter v substratu z 0,5 %, 1 % in 5 % deležem MP, izmerjene po sedmih tednih poskusa. Različne črke nad stolpci označujejo statistično značilne razlike med skupinami, izpostavljenimi različnim koncentracijam MP (Tukeyjev post-hoc test, $p < 0,05$).

zabeležili pri najvišji (5 %) izpostavitvi MP, medtem ko se skupini z 0,5 % in 1 % koncentracijo MP v substratu nista razlikovali od kontrole, niti od najvišje koncentracije, je bil pa opazen trend zmanjševanja sveže biomase korenin z naraščajočo koncentracijo MP.

Podobne trende smo opazili tudi v primeru suhe biomase paradižnikov, ki se je zmanjševala z naraščajočo koncentracijo MP, kot lahko vidimo na Sliki 5. V povprečju se suha masa poganjkov izpostavitve 0,5 % MP ni razlikovala od povprečne suhe mase kontrole in 1 % MP, le-ta pa je bila manjša kot pri kontroli. Najnižjo povprečno suho biomaso so imeli poganjki pri najvišji (5 %) koncentraciji MP, ki se je razlikovala od kontrole in 0,5 % MP. Prav tako smo tudi pri koreninah zabeležili najnižjo povprečno suho maso pri izpostavitvi najvišji (5 %) koncentraciji MP, ki se je razlikovala od kontrole in 0,5 % MP v substratu.



Slika 6. Grafični prikaz odstotka vsebnosti vode v poganjkih (levo) in koreninah (desno) (povprečje $\pm$ standardna napaka, $n = 5$) paradižnika (*Solanum lycopersicum*), gojenega 7 tednov v zemlji brez MP (kontrola) ter v substratu z 0,5 %, 1 % in 5 % deležem MP, izračunane iz sveže in suhe biomase poganjkov in korenin, izmerjene po sedmih tednih poskusa. Iste črke (a) označujejo, da med skupinami, izpostavljenimi različnim koncentracijam MP, ni statistično značilnih razlik. (enosmerna ANOVA, Holm-Šidák posthoc test, $p < 0,05$).

Slika 6 prikazuje, da med posameznimi skupinami ni bilo opaznih razlik v vsebnosti vode v poganjkih, kakor tudi ne v koreninah, čeprav je bil pri slednjih opazen trend zmanjševanja, sploh v primeru najvišje koncentracije.

Vsebnost asimilacijskih pigmentov

Analiza vsebnosti fotosinteznih pigmentov je pokazala, da izpostavljenost MP vpliva na vsebnost klorofila a, klorofila b in karotenoidov v listih paradižnika (Slika 7), pri čemer so bile razlike med skupinami odvisne od vrste pigmenta. Vsebnost klorofila a je bila največja pri kontrolnih rastlinah in tistih izpostavljenih 0,5 % MP, in najmanjša pri 5 % MP. Rezultati kažejo na trend povečanja vsebnosti klorofila a pri nizki koncentraciji MP ter zmanjšanja pri višjih koncentracijah. Pri klorofilu b med posameznimi skupinami razlik nismo zaznali, čeprav je bil opazen trend zmanjševanja z višjo koncentracijo MP. Vsebnost karotenoidov je bila največja pri 0,5 in 1 % MP in najmanjša pri 5 % MP, medtem ko se kontrola od ostalih skupin ni razlikovala. Skupno rezultati kažejo, da nizka koncentracija MP (0,5 %) lahko celo spodbuja vsebnost fotosinteznih pigmentov, medtem ko višje koncentracije MP, zlasti 5 %, vodijo v zmanjšanje njihove vsebnosti, kar je skladno z zmanjšano fotosintezno učinkovitostjo rastlin, izpostavljenih MP.

Diskusija

MP je prepoznana kot potencialni stresor za višje rastline, pri čemer različne raziskave kažejo, da učinki na rast in razvoj rastlin variirajo glede na vrsto rastline, koncentracijo delcev in trajanje izpostavljenosti (Nuzmanei s sod. 2024; Shi s sod. 2023). Naši rezultati kažejo, da MP v substratu vpliva na rast poganjkov paradižnika (*Solanum lycopersicum*) na koncentracijsko odvisen način. Pri najvišji koncentraciji (5 %), je prišlo do največjega zaviranja rasti, kar se sklada z literaturo, ki poudarja koncentracijsko odvisen odziv rastlin na MP (Fan s sod. 2025; Nuzmanei s sod. 2024). Prisotnost MP v substratu ni povzročila sprememb v dolžini poganjkov do četrtega tedna

gojenja, kar nakazuje na to, da MP deluje kot kronični stresor z zamaknjenim učinkom. Podobno Shi s sod. (2023) poročajo, da lahko MP posredno vpliva na rast rastlin preko fizioloških mehanizmov, kot so oksidativni stres in motnje celičnih delitev, čeprav so ti učinki odvisni od vrste MP, koncentracije in trajanja izpostavljenosti. Naši rezultati potrjujejo, da MP postopoma omejuje elongacijo poganjkov paradižnika, pri čemer so učinki izrazitejši pri višjih koncentracijah in po daljšem časovnem obdobju, kar je skladno z večino obstoječe literature. Rezultati kažejo, da MP v substratu vpliva na rast korenin v paradižniku na izrazito koncentracijsko odvisen način. Pri višjih koncentracijah MP (1 % in 5 %) je prišlo do značilnega zmanjšanja dolžine korenin, kar je skladno z ugotovitvami, da MP posredno ali neposredno ovira rast koreninskega sistema. Nuzmanei s sod. (2024) so pri paradižniku pokazali, da MP negativno vpliva na razvoj korenin in privzem hranil, kar lahko vodi v zmanjšano elongacijo korenin. Podobno Shi s sod. (2023) poročajo, da MP povzroča fiziološki stres, vključno z oksidativnimi poškodbami in motnjami celičnih delitev, kar se pogosto najprej izrazi v koreninskem sistemu, ki je primarni stik rastline z MP. Zaviranje rasti korenin je možno razložiti z več procesi, vključno s fizičnim oviranjem rasti koreninskih laskov, zmanjšanim privzemom vode in hranil ter povečanim oksidativnim stresom v koreninskih tkivih. Korenine so neposredno izpostavljene delcem MP v substratu in so zato pogosto bolj občutljive kot nadzemni deli rastlin, kar se kaže v zgodnejših in izrazitejših spremembah rasti (Fan s sod. 2025). Rezultati kažejo, da je fotokemična učinkovitost pri koncentracijah MP višjih od 1 % nižja v primerjavi s kontrolo, medtem ko pri 0,5 % MP ni bilo zaznani pomembnih sprememb. To kaže, da MP pri višjih koncentracijah že povzroča motnje v fotokemičnih procesih. MP lahko inducira oksidativni stres, kar poškoduje celične membrane kloroplastov, moti delovanje fotosistemov in zmanjšuje prenos elektronov (Nuzmanei s sod. 2024; Shi s sod. 2023). MP lahko prav tako vpliva na porazdelitev fotosinteznih pigmentov in absorpcijo svetlobe, kar dodatno zmanjša učinkovitost fotosistema (Fan s sod. 2025).

V nasprotju z našimi rezultati, kjer nismo opazili vpliva MP na transpiracijo pri paradižniku, Urbina s sod. (2020) poročajo o izrazitem zmanjšanju transpiracije pri koruzi (*Zea mays*) gojeni v hidroponskem sistemu. V njihovem eksperimentu je nabiranje MP v rizosferi korenin povzročilo slabši privzem vode in hranil in s tem zmanjšalo transpiracijo kot tudi rast rastlin. Razlika med našimi in njihovimi rezultati nakazuje, da učinek MP na transpiracijo ni enoznačen in je odvisen od vrste rastline, tipa substrata in specifičnih eksperimentalnih pogojev. Urbina s sod. (2020) so izvedli raziskavo v povsem tekočem gojenju, kar lahko poveča neposreden stik MP s koreninami in s tem motnje pri absorpciji vode. V našem primeru je uporaba Lufa Speyer kot substrata lahko zmanjšala ta efekt. Pri Urbina s sod. (2020) je prisotnost MP v hidroponskem okolju vodila do akumulacije delcev na površini korenin, kar vodi do oviranega pretoka vode in spremenjenega toka transpiracije. Poleg tega MP lahko posredno vpliva na vodni režim s spremembo fizikalnih lastnosti tal, denimo z spremembo poroznosti in sposobnosti zadrževanja vode. Nekatere študije na kopenskih sistemih so pokazale, da lahko MP spremeni sposobnost tal, da zadržujejo in oddajajo vodo, čeprav neposredne meritve transpiracije v takih okoljih še niso bile široko dokumentirane (Bakhshaei 2025).

Rezultati naše raziskave kažejo, da MP v substratu vpliva na

biomasa paradižnika na izrazito koncentracijsko odvisen način. Sveža masa poganjkov je bila pri rastlinah izpostavljenih 0,5 % in 1 % MP manjša v primerjavi s kontrolno skupino, medtem ko je bila pri 5 % koncentracije MP bistveno nižja. To potrjuje, da višje koncentracije MP močno omejujejo rast, kar je skladno z ugotovitvami, da MP deluje kot kronični stresor in postopoma zmanjšuje rastno sposobnost rastlin (Fan s sod. 2025; Nuzmanei s sod. 2024). Sveža masa korenin je bila zmanjšana le pri najvišji koncentraciji MP (5 %), kar kaže, da je koreninski sistem do določene mere sposoben kompenzirati vpliv nižjih koncentracij. Podobne negativne učinke MP na koreninsko rast so opisali tudi Urbina s sod. (2020) ter Shi s sod. (2023), čeprav v drugačnih eksperimentalnih sistemih. Zmanjšanje suhe mase poganjkov in korenin pri 5 % koncentraciji MP kaže, da vpliv MP ni omejen zgolj na vodni status, temveč posega tudi v akumulacijo organske biomase. Suha masa je pokazatelj rasti in presnovne učinkovitosti, zato njeno zmanjšanje kaže na dolgoročnejši vpliv MP na rast rastlin. Izrazitejše zmanjšanje suhe mase korenin v primerjavi s poganjki potrjuje, da so korenine primarna tarča delovanja MP, saj so neposredno izpostavljene delcem v substratu. Takšen vzorec je skladen z ugotovitvami Fan s sod. (2025) ter z ocenami tveganja MP v kopenskih ekosistemih (Koelmans s sod. 2022).

Kljub zmanjšanju sveže in suhe biomase, pa med skupinami ni bilo zaznati statistično značilnih razlik v vsebnosti vode v poganjkih ali koreninah. To kaže, da MP v uporabljenih koncentracijah ni povzročila izrazitega vodnega stresa, temveč je zmanjšanje sveže mase predvsem posledica omejene rasti in manjše akumulacije biomase. Rahlo nakazan trend zmanjševanja vsebnosti vode v koreninah z naraščajočo koncentracijo MP lahko nakazuje začetne spremembe v vodnem režimu, ki pa v pogojih tega poskusa niso bile dovolj izrazite, da bi povzročile jasne razlike med obravnavanimi skupinami.

Analiza pigmentov je pokazala, da MP v substratu Lufa Speyer vpliva na vsebnost klorofila a, klorofila b in karotenoidov pri paradižniku, na koncentracijsko odvisen način. Pri nizki koncentraciji MP (0,5 %) je bila zaznana rahla stimulacija vsebnosti pigmentov, pri čemer je bila koncentracija klorofila a statistično značilno višja, kot pri skupinah z višjimi koncentracijami MP. Pri višjih koncentracijah (1 % in 5 %) je prišlo do izrazitega zmanjšanja tako klorofilov kot karotenoidov, kar je skladno z ugotovitvami, da MP povzroči oksidativni stres in motnje v sintezi pigmentov (Fan s sod. 2025; Nuzmanei s sod. 2024). Rahlo povečanje vsebnosti fotosinteznih pigmentov pri nizki koncentraciji lahko nakazuje kompenzacijski odziv fotosinteznega aparata, kjer rastlina poskuša ohraniti fotokemično učinkovitost kljub začetnemu stresu. Pri višjih koncentracijah MP pride do izrazitejše poškodbe fotosinteznega aparata, kar se sklada tudi z znižano učinkovitostjo fotosistema v naših meritvah. Ti rezultati kažejo, da učinki MP na fotosintezne pigmente niso linearni, ampak odvisni od koncentracije. Nizke koncentracije lahko stimulirajo kompenzacijske mehanizme, medtem ko višje koncentracije povzročajo oksidativni stres in degradacijo pigmentov. Skupno rezultati kažejo, da MP predvsem omejuje rast in biomasa paradižnika, pri čemer so učinki najizrazitejši pri najvišji koncentraciji in v koreninskem sistemu, medtem ko vsebnost vode v tkivih ostaja relativno stabilna. To potrjuje, da MP deluje predvsem kot rastni in presnovni stresor, ne pa kot neposreden povzročitelj pomanjkanja vode.

Zaključki

V raziskavi smo preučevali vpliv različnih koncentracij MP na rast paradižnika (*Solanum lycopersicum*) ter na njegove fiziološke odzive. Rezultati nakazujejo, da MP vpliva na rast paradižnika, vendar ti vplivi niso enoznačni in linearni. Dolžina poganjkov in korenin se je pri višjih koncentracijah MP zmanjšala, medtem ko pri nižjih koncentracijah razlike niso bile izrazite. Tudi pri biomasi smo opazili trend zmanjševanja z večanjem koncentracije MP, vendar so bile razlike med posameznimi skupinami opazne šele pri najvišjem odmerku. Zato prvo hipotezo, ki je predvidevala postopen upad rasti in biomase z višanjem koncentracije MP, lahko le delno potrdimo. Pri vsebnosti fotosinteznih pigmentov so bile za klorofil a in karotenoide ugotovljene jasne razlike med kontrolno in najvišjo koncentracijo, vendar se zmanjšanje ni kazalo linearno med vsemi koncentracijami. Pri vsebnosti klorofila b ni bilo statistično značilnih razlik med izpostavitvami, a opazen je nakazajoč trend. Zato drugo hipotezo lahko potrdimo le v smeri negativnega vpliva, ne pa kot popolnoma koncentracijsko odvisnega odziva. Fotokemična učinkovitost se je prav tako zmanjšala le pri višjih koncentracijah MP. Zato drug del druge hipoteze ne moremo povsem potrditi, ampak jo interpretiramo kot delno podprto z rezultati. Stopnja transpiracije se med skupinami ni razlikovala, zato tretjo hipotezo o vplivu MP na transpiracijo zavračamo. Na podlagi rezultatov, lahko tudi četrto hipotezo pretežno potrdimo, saj so se negativni učinki MP stopnjevali z naraščajočo koncentracijo MP, vendar pa odziv paradižnika ni bil povsem linearen. Skupno gledano rezultati kažejo, da MP deluje kot stresni dejavnik in lahko negativno vpliva na rast in razvoj paradižnika, vendar je učinek odvisen od koncentracije, parametra in fiziološkega odziva. Čeprav rezultati nakazujejo vpliv MP na rast in fiziološke procese paradižnika, ima raziskava tudi nekatere omejitve. Poskus je potekal v kontroliranih rastnih pogojih, v umetnem substratu in v omejenem časovnem obdobju, zato izsledkov ni mogoče neposredno prenesti na poljske razmere ali na daljše rastne cikle. Uporabili smo le en tip delcev MP, enakomerno zmešane v substrat, medtem ko se v okolju MP pojavlja v različnih velikostih, oblikah in kemičnih sestavah. Velikost vzorca je bila relativno majhna, kar lahko vpliva na statistično moč posameznih izsledkov, poleg tega pa je bila analiza osredotočena le na eno razvojno fazo paradižnika in omejeno število meritev, zato nekateri prehodni fiziološki odzivi rastlin morda niso bili zajeti. Ker nismo spremljali sprememb mikrobne združbe rastišča ali morebitne akumulacije MP v rastlinskih tkivih, ostaja mehanizem opaženih učinkov deloma nepojasnen.

Za natančnejšo oceno vpliva MP na paradižnik bi bila koristna nadgradnja raziskave z več ponovitvami ter z uporabo različnih velikosti in tipov MP. Smiselno bi bilo meritve transpiracije in fotokemične učinkovitosti izvajati pogostejše ter raziskavo podaljšati na daljše rastno obdobje, da bi ugotovili, kako MP vpliva na kasnejše razvojne faze rastline. Dodatno bi bilo vredno analizirati vsebnosti mineralov v rastlinah, spremljati mikrobno združbo substrata ter vključiti meritve oksidativnega stresa, saj bi tak pristop omogočil boljše razumevanje fizioloških mehanizmov odziva. Takšne razširitve bi zagotovile celovitejši vpogled v vpliv MP na kulturne rastline ter njeno morebitno tveganje za kmetijski ekosistem.

Literatura

1. AlphaOmega-Electronics, 2025. SC-1 Porometer to measure the stomatal conductance - Leaf Porometer. <https://www.alphaomega-electronics.com/en/sensors-probes/5507-sc-1-porometer-to-measure-the-stomatal-conductance-leaf-porometer.html> (10. nov. 2025)
2. Bakhshaei R, Liu Y, Wang X, Chen L, 2025. Microplastic-induced changes in soil water retention and their potential impact on plant water relations. *Scientific Reports* 15:93668.
3. Epstein E, 1972. Mineral nutrition of plants: principles and perspectives, John Wiley & Sons Inc, New York, USA.
4. Fan H, Hong X, Wang H, Gao F, Su Z, Yao H, 2025. Biodegradable microplastics affect tomato (*Solanum lycopersicum* L.) growth by interfering rhizosphere key phylotypes. *Journal of hazardous materials* 487:137208.
5. Kimura S, Sinha N, 2008. Tomato (*Solanum lycopersicum*): A Model Fruit-Bearing Crop. <https://doi.org/10.1101/pdb.emo105> (15. dec. 2025)
6. Koelmans A, Redondo-Hasselerharm P, Nor N, De Ruijter V, Mintenig S, Kooi M, 2022. Risk assessment of microplastic particles. *Nature Reviews Materials* 7:138-152.
7. Lichtenthaler HK, 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Plant Cell Membranes* 148:350-382.
8. Massarelli C, Campanale C, Uricchio V, 2021. A Handy Open-Source Application Based on Computer Vision and Machine Learning Algorithms to Count and Classify Microplastics. *Water* 13:2104.
9. Murchie EH, Lawson T, 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *Journal of Experimental Botany* 64:3983-3998.
10. Nuzmanei N, Changmai U, Sk S, Kumar N, Borah B, Chikkaputtaiah C, Saikia R, Phukan T, 2024. Impact of polyvinyl chloride (PVC) microplastic on growth, photosynthesis and nutrient uptake of *Solanum lycopersicum* L. (Tomato). *Environmental pollution* 249:123994.
11. Shi R, Liu W, Lian Y, Wang X, Men S, Zeb A, Wang Q, Wang J, Li J, Zheng Z, Zhou Q, Tang J, Sun Y, Wang F, Xing B, 2023. Toxicity Mechanisms of Nanoplastics on Crop Growth, Interference of Phyllosphere Microbes, and Evidence for Foliar Penetration and Translocation. *Environmental science & technology* 58:1010-1021.
12. Urbina MA, Correa F, Aburto F, Ferrio JP, 2020. Adsorption of polyethylene microbeads and physiological effects on hydroponic maize. *Science of the Total Environment* 741:140216.
13. van Loon S, Saartama V, Šmídová K, Jemec Kokalj A, Zidar Salanitri GP, Riccobene P, Gargiulo L, Hofman J, Hurley R, Nizzetto L, Haimi J, Selonon S, van Gestel CAM, 2025. Sublethal effects of microplastics sourced from polypropylene agricultural plastics on four soil invertebrate species. *Journal of Hazardous Materials* 499: 140247.
14. Xiang Y, Jiang L, Zhou Y, Luo Z, Zhi D, Yang J, Lam S, 2021. Microplastics and environmental pollutants: Key interaction and toxicology in aquatic and soil environments. *Journal of hazardous materials* 422:126843.

Vpliv slanosti na rast in razvoj paradižnika (*Solanum lycopersicum*)

Tajda Bratec, Katja Cigoj, Mojca Erzin, Eva Seifried in Zala Svetec

Študij molekulske in funkcionalne biologije, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

- Namen poskusa je bil ugotoviti kako različne koncentracije soli v substratu vplivajo na rast in razvoj paradižnika.
- Paradižnike smo izpostavili petim različnim koncentracijam natrijevega klorida in jih dvakrat tedensko zalili s Hoaglandovo raztopino. Enkrat tedensko smo izmerili dolžino poganjkov na koncu poskusa pa še dolžino korenin. Po sedmih tednih smo izmerili transpiracijo in fotosintezno učinkovitost. Ob zaključku smo izmerili tudi svežo in suho biomaso ter vsebnost asimilacijskih pigmentov.
- Ugotovili smo, da paradižnik pri visokih koncentracijah soli v substratu (0,5 %, 1 % in 1,5 %) propade, saj je izredno občutljiv na močan osmotski stres.

Ključne besede: transpiracija, fotosintezna učinkovitost, asimilacijska barvila, biomasa

Uvod

Paradižnik (*Solanum lycopersicum*) je ena najpomembnejših vrtnin na svetu. Je bogat vir hranil in bioaktivnih spojin (npr. likopena, karotenoidov, fenolov) z antioksidativnim delovanjem. Kljub gospodarskemu pomenu pa je njegova pridelava pogosto omejena zaradi abiotičnih stresorjev, med katerimi ima pomembno vlogo tudi slanost tal (Rošca s sod. 2023). Zasoljevanje tal je eden najresnejših okoljskih dejavnikov, ki omejuje svetovno kmetijsko proizvodnjo, saj prizadene skoraj tretjino vseh kmetijskih površin (Fu in Yang 2023), pri čemer se zaradi podnebnih sprememb in intenzivnega kmetijstva pričakuje nadaljnje širjenje slanosti tal (Rošca s sod. 2023). Med glavnimi vzroki za povečanje soli v prsti so nepravilna raba gnojil, prekomerno namakanje in industrijsko onesnaževanje (Fu in Yang 2023).

Slanost tal se nanaša na visoko koncentracijo raztopljenih mineralnih soli, predvsem natrijevega klorida, v tleh in vodi. V majhnih količinah so te soli nujne za rast rastlin, v večjih pa postanejo toksične in povzročijo zaviranje rasti, fiziološke motnje ter lahko vodijo celo v odmrtnost rastlin (Rošca s sod. 2023). Na rastline deluje slanost preko dveh glavnih mehanizmov: osmotskega stresa, ki se pojavi takoj po izpostavitvi soli in zmanjšuje dostopnost vode rastlini, ter ionskega stresa, ki se razvije postopno zaradi kopičenja Na^+ in Cl^- ionov v tkivih rastline, kar povzroča poškodbe membran, motnje v fotosintezi, prehranskem ravnotežju in presnovi (Rošca s sod. 2023 in Alam s sod. 2021).

Pri paradižniku slanost negativno vpliva na vse razvojne faze, od kalitve do razvoja plodov. Med prvimi znaki stres povzročene s slanostjo so zavrta kalitev, zmanjšana višina rastlin, manjše število listov in cvetov ter zmanjšana masa suhe snovi (Rošca s sod. 2023 in Alam s sod. 2021).

Kljub temu pa vsi vplivi slanosti niso nujno negativni. V svoji raziskavi so Rivera s sod. (2022) pokazali, da lahko nizke koncentracije soli (25-50 mM NaCl) celo spodbudijo rast paradižnika, predvsem razvoj stranskih korenin in podaljšanje poganjkov. Takšni učinki so verjetno povezani z rahlim osmotskim stresom, ki aktivira rastlinske mehanizme prilagoditve brez večjih toksičnih posledic (Rivera s sod. 2022). V naši raziskavi smo paradižnike izpostavili petim različnim koncentracijam NaCl (0,1 %, 0,25 %, 0,5 %, 1 % in 1,5 %). Zanimalo nas je, kako te različne koncentracije vplivajo na rast poganjkov in korenin, fotosintezno učinkovitost, transpiracijo, svežo in suho biomaso ter vsebnost asimilacijskih barvil. Naše hipoteze so bile, da:

- bo pri najnižji koncentraciji soli (0,1 %) viden blag spodbujevalni učinek na rast paradižnika.
- bodo imele višje koncentracije soli (0,25 - 1,5 %) negativen vpliv na rast in razvoj paradižnika, pri čemer pričakujemo, da bo najvišja koncentracija (1,5 %) povzročila najizrazitejše zaviranje rasti in presnovnih procesov.

Material in metode

V raziskavi o vplivu slanosti na rast in razvoj paradižnika (*Solanum lycopersicum*) smo uporabili eksperimentalni pristop, pri katerem smo rastline izpostavili različnim koncentracijam natrijevega klorida (NaCl) direktno v substratu in sicer: 0 %, 0,1 %, 0,25 %, 0,5 %, 1 % in 1,5 %.

Nastavitev poskusa

Dvotedenske sadike paradižnika smo posadili v lončke s po 300 g substrata, v katerega smo pred sajenjem zamešali ustrezno količino NaCl za dosego posamezne koncentracije. V vsak lonček smo posadili dve rastlini. Na tak način smo za vsako izpostavitve pripravili 5 lončkov – torej smo imeli za vsako izpostavitve po 10 rastlin. Rastline smo gojili pri: 16/8h dnevno-nočni ritmiki, temperaturi podnevi 22 °C in ponoči 18 °C, 60 % relativni zračni vlažnosti in jih dvakrat tedensko zalivali s Hoaglandovo hranilno raztopino (Hoagland in Arnon 1950) (prva dva tedna s po 20 mL in nato po 40 mL).

Meritve rastnih parametrov

Rast poganjkov smo spremljali tedensko z merjenjem njihove dolžine. Ob koncu poskusa smo izmerili končno dolžino poganjkov in korenin ter določili svežo in suho biomaso obeh delov rastlin. Za določitev suhe mase smo vzorce predhodno liofilizirali. Po izračunani povprečni sveži in suhi biomasi poganjkov in korenin smo izračunali tudi odstotni delež vode s formulo:

$$\text{odstotek vode} = (\text{sveža biomasa} - \text{suha biomasa}) / (\text{sveža biomasa}) \times 100$$

Fotokemična učinkovitost

Fotokemično učinkovitost fotosistema II (FS II) smo določali s fluorometrom PAM-2500 (Walz) na osvetljenih listih (dejanska FS učinkovitost Y).

Transpiracija

Za oceno vpliva slanosti na izhlapevanje vode iz listov smo uporabili porometer SC-1 Leaf Porometer (Decagon Devices), s katerim smo izmerili prevodnost listnih rež (v enotah $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Vsebnost asimilacijskih pigmentov

Za določitev vsebnosti asimilacijskih pigmentov (klorofil a, klorofil b in karotenoidi) smo 35 mg liofiliziranega listnega prahu ekstrahirali v 15 mL hladnega 100% metanola in inkubirali 30 minut v temi na sobni temperaturi, vmes večkrat dobro premešali, nato smo ekstrakte prefiltrirali, centrifugirali 3 minute pri 2500 rpm in izmerili absorbanco pri valovnih dolžinah 665, 652 in 470 nm s spektrofotometrom. Koncentracije fotosinteznih pigmentov smo izračunali po formulah (Lichtenthaler in Buschmann 2001).

Statistična analiza

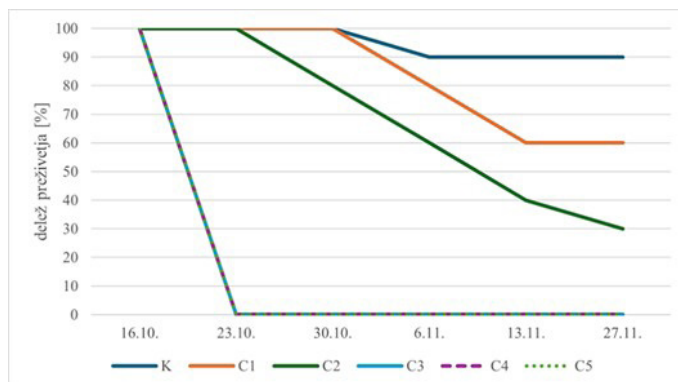
Podatke smo statistično obdelali s programom MS Excel z vmesnikom XL_toolbox. V vsaki od opazovanih skupin smo vsem izmerjenim parametrom določili povprečno vrednost, standardni odklon in standardno napako. Skupine smo med seboj primerjali z enosmerno analizo variance (ANOVA). Kot statistično značilne smo upoštevali rezultate, kjer je bila vrednost $p < 0,05$. Kjer je prišlo do statistično značilnih razlik, smo naredili še Holm-Sidak post-hoc test, s pomočjo katerega smo ugotovili, katere od skupin se statistično značilno razlikujejo. Grafični prikaz izmerjenih parametrov smo oblikovali s pomočjo programa MS Excel.

Rezultati

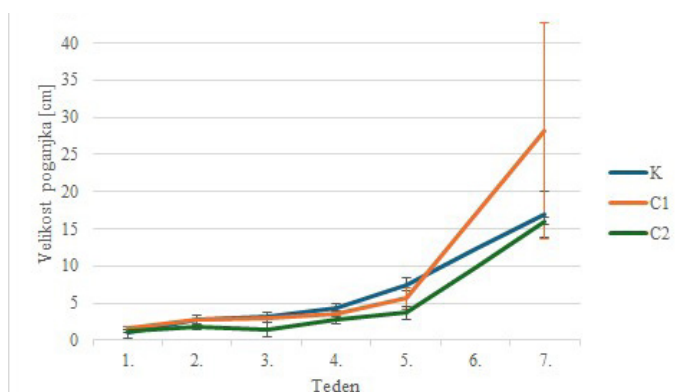
Na sliki 1 so prikazane preživele rastline paradižnika po sedmih



Slika 1. Fotografija preživelih skupin, po en lonček iz vsakega tretmaja po sedmih tednih gojenja v rastni komori. Iz leve proti desni: koncentracija soli 0,25 %, koncentracija soli 0,1 % in kontrolna skupina (0 % soli).



Slika 2. Grafični prikaz deleža preživetja paradižnika ob izpostavljenosti različnim koncentracijam soli v substratu v obdobju sedmih tednov. K: kontrolna skupina (0 % soli); C1: skupina z 0,1 % soli; C2: skupina z 0,25 % soli; C3: skupina z 0,5 % soli; C4: skupina z 1 % soli; C5: skupina z 1,5 % soli v substratu.

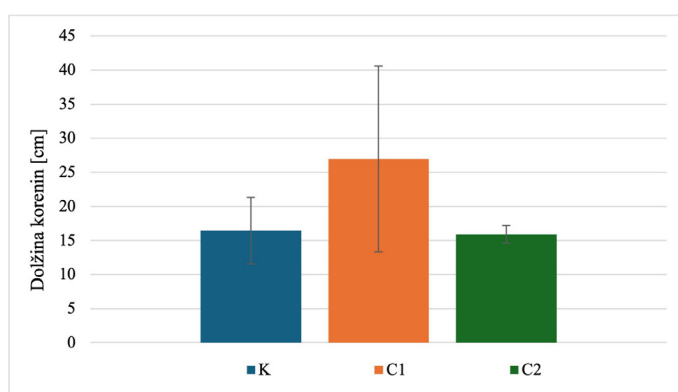


Slika 3. Grafični prikaz rasti paradižnika ob izpostavljenosti različnim koncentracijam soli v substratu v obdobju sedmih tednov. Graf prikazuje povprečne vrednosti dolžine poganjkov za posamezni teden in standardne napake ($\pm$ SE). K: kontrolna skupina (0 % soli); C1: skupina z 0,1 % soli; C2: skupina z 0,25 % soli v substratu. Razlike med skupinami v nobenem tednu opazovanja niso bile statistično značilne (enosmerna ANOVA, $p > 0,05$). K: N = 9; C1: N = 6; C2: N = 3.

tednih gojenja pri različnih koncentracijah soli. Vidne so razlike v vitalnosti med skupinami, pri čemer so bile rastline iz kontrolne skupine in pri 0,1 % NaCl bolj razvite kot rastline pri 0,25 % NaCl, ki kažejo znake zavrte rasti.

Preživetje rastlin

Na sliki 2 je prikazano preživetje rastlin paradižnika v obdobju sedmih tednov pri različnih koncentracijah soli v substratu. Razvidno je, da se smrtnost izrazito poveča pri koncentracijah 0,5 % NaCl in več, kjer so rastline propadle že v zgodnjih fazah poskusa. Iz grafa je razvidno, da so rastline izpostavljene koncentracijam 0,5 – 1,5 % NaCl v substratu propadle že v prvem tednu poskusa. Pri nižjih koncentracijah (0 - 0,25 %) je bila smrtnost bistveno manjša ali zanemarljiva. Pri 0,25 % NaCl lahko sprva opazimo, da so v prvih dveh tednih preživele vse rastline, nato pa je delež preživelih rastlin pričel padati, na koncu poskusa je delež preživelih rastlin padel na 30%. Iz grafa pa lahko prav tako razberemo, da tudi vse kontrolne rastline niso preživele, s tem da je bil tukaj upad deleža preživelih zanemarljiv.



Slika 4. Grafični prikaz dolžine korenin paradižnika ob zaključku poskusa (7. teden). Graf prikazuje povprečne vrednosti dolžine korenin in standardne napake ($\pm$ SE). K: kontrolna skupina (0 % soli); C1: skupina z 0,1 % soli; C2: skupina z 0,25 % soli v substratu. Med skupinami ni statistično značilnih razlik (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post hoc test, $p < 0,05$). K: N = 9; C1: N = 6; C2: N = 3.

Dolžine poganjkov

Iz grafa rasti poganjkov (Slika 3) je razvidno, da so rastline v kontrolni skupini in pri obeh preživelih skupinah z dodatkom NaCl rastle primerljivo skozi celotno obdobje poskusa. Šele zadnji teden opazovanja je bil opazen trend, kjer so bile rastline pri nižji (0,1 %) koncentraciji NaCl nekoliko višje. Pri končni velikosti poganjkov kontrole in koncentracije 0,25 % nismo opazili nobenega trenda. Največjo rast smo zaznali v obdobju zadnjih treh tednov, kar je razvidno tudi iz grafa. Meritve smo opravljali na majhnem številu osebkov, kar zmanjša statistično moč.

Dolžine korenin

Na sliki 4 so prikazane povprečne dolžine korenin ob zaključku poskusa. Opazen je trend, kjer so bile najdaljše korenine izmerjene pri rastlinah, izpostavljenih 0,1 % NaCl, medtem ko so bile korenine pri kontrolni skupini in skupini z 0,25 % NaCl nekoliko krajše. Razlike med tretmaji niso bile statistično značilne.

Biomasa

Tabela 1 prikazuje povprečne vrednosti sveže in suhe biomase poganjkov ter korenin paradižnika pri različnih koncentracijah soli v substratu. Med kontrolno skupino ter skupinama z 0,1 % in 0,25 % NaCl ni bilo ugotovljenih statistično značilnih razlik. Kljub temu je opazen trend nižje biomase poganjkov in korenin pri skupini, ki je rastla v substratu z 0,25 % NaCl.

Transpiracija in fotokemična učinkovitost

V tabeli 2 so prikazane povprečne vrednosti transpiracije rastlin paradižnika pri različnih koncentracijah NaCl. Rezultati kažejo, da se transpiracija med obravnavanimi skupinami ni statistično značilno razlikovala, saj so bile izmerjene vrednosti zelo podobne. Kljub podobnosti med vrednostmi pa lahko opazimo trend, kjer se z višanjem koncentracije, višajo tudi povprečne vrednosti transpiracije.

Dejanska fotokemična učinkovitost fotosistema II (Slika 5) je bila med vsemi obravnavanimi skupinami primerljiva, razlike niso bile statistično značilne.

Vsebnost asimilacijskih pigmentov

Na sliki 6 so prikazani relativni deleži klorofila a, klorofila b in karotenoidov v listih paradižnika ob koncu poskusa. Med skupinami z različnimi koncentracijami soli ni bilo statistično značilnih razlik v deležih posameznih pigmentov.

Diskusija

V raziskavi smo preučevali vpliv različnih koncentracij soli v substratu na rast, razvoj in fiziološke parametre paradižnika (*Solanum lycopersicum*). Naše hipoteze so predvidevale blag spodbujevalni učinek nizke koncentracije soli (0,1 %) ter izrazito zaviranje rasti in presnovnih procesov pri višjih koncentracijah. Dobljeni rezultati te predpostavke le delno potrjujejo.

Najizrazitejši učinek slanosti se je pokazal že pri smrtnosti rastlin. Rastline so pri koncentracijah 0,5 % in več začele propadati že v prvem tednu poskusa, pri čemer je bila smrtnost

pri najvišjih koncentracijah popolna. Zaradi tega nadaljnje meritve za izpostavitve z 0,5 %, 1 % in 1,5 % soli v substratu niso bile mogoče. Takšen odziv je v skladu z literaturo, ki navaja, da visoke koncentracije soli pri paradižniku hitro povzročijo hude osmotske in ionske motnje, ki vodijo v odmrtnje rastlin (Rošca s sod. 2023; Fu in Yang 2023).

Opažen je bil trend povečane rasti poganjkov pri 0,1 % NaCl v substratu, a razlika ni bila statistično značilna od kontrole. Podobno tudi pri 0,25 % soli, kljub opaznemu trendu nekoliko počasnejše rasti ta ni bila statistično značilna zaradi velike variabilnosti in majhnega števila ponovitev. Ta opažen trend zavirane rasti pri zmerno povišani slanosti je skladen z opisi zgodnjih morfoloških odzivov na stres povzročenih s slanostjo (Alam s sod. 2021), vseeno pa bi pričakovali bolj izrazit odziv. Opažen je bil trend povečane rasti korenin pri 0,1 % NaCl v substratu v primerjavi s kontrolo in višjimi koncentracijami. Takšen odziv je skladen z Rivera s sod. (2022), ki poročajo, da lahko nizke koncentracije soli (25–50 mM) pri nekaterih sortah paradižnika spodbudijo rast korenin in tvorbo lateralnih korenin, kar je del prilagoditvenega mehanizma za učinkovitejšo črpanje vode in hranil v rahlo stresnih razmerah, medtem ko višje koncentracije rast zavirajo. Koreninski sistem je sicer prvi del rastline, ki zazna spremembe v koncentraciji NaCl v substratu. Pri višjih koncentracijah NaCl se zmanjša volumen korenin in število koreninskih vršičkov, kar vpliva na sposobnost črpanja hranil. Raziskave kažejo na močno pozitivno korelacijo med volumnom korenin in višino rastline ter neto hitrostjo fotosinteze. To pomeni, da propadanje koreninskega sistema zaradi NaCl neposredno omejuje rast poganjkov (Zhang s sod. 2025).

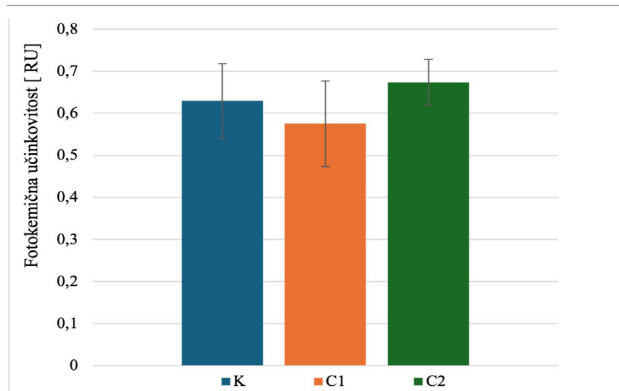
Sveže in suhe biomase poganjkov in korenin se med posameznimi izpostavitvami prav tako niso statistično značilno razlikovale. Podoben vzorec so opazili tudi Rivera s sod. (2022), kjer pri nizkih koncentracijah NaCl niso zaznali pomembnih sprememb v sveži in suhi masi, medtem ko je pri višji slanosti biomasa izrazito upadla. Literatura poroča, da se spremembe v sveži in suhi biomasi praviloma pojavijo šele pri višjih stopnjah slanosti, ko osmotski stres postane izrazitejši (Rošca s sod. 2023). Suha masa korenin se lahko pri izpostavitvi

Tabela 1. Sveže in suhe biomase poganjkov ter korenin rastlin paradižnika, ki so bile izpostavljene različnim koncentracijam soli v substratu. K: kontrola (0 % soli), C1: skupina z 0,1 % soli, C2: skupina z 0,25 % soli v substratu. Prikazana so povprečja tretmajev s pripadajočimi standardnimi napakami ($\pm$ SE). Med skupinami ni statistično značilnih razlik (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post hoc test, $p < 0,05$).

Tretma	poganjki - sveža biomasa [g]	poganjki - suha biomasa [g]	korenine - sveža biomasa [g]	korenine - suha biomasa [g]
K	1,31 $\pm$ 0,45	0,34 $\pm$ 0,12	0,46 $\pm$ 0,24	0,20 $\pm$ 0,16
C1	1,27 $\pm$ 0,47	0,22 $\pm$ 0,12	0,42 $\pm$ 0,20	0,21 $\pm$ 0,25
C2	0,58 $\pm$ 0,21	0,12 $\pm$ 0,09	0,13 $\pm$ 0,10	0,05 $\pm$ 0,04

Tabela 2. Rezultati meritev transpiracije rastlin ob izpostavljenosti različnim koncentracijam soli v substratu. K: kontrola (0 % soli), C1: skupina z 0,1 % soli, C2: skupina z 0,25 % soli v substratu. Prikazana so povprečja transpiracije posamezne skupine s pripadajočimi standardnimi napakami ($\pm$ SE). Med skupinami ni statistično značilnih razlik (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post hoc test, $p < 0,05$).

Tretma	Transpiracija [$\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]
K	129,9 $\pm$ 23,3
C1	135,5 $\pm$ 19,31
C2	148,0 $\pm$ 40,59



Slika 5. Grafični prikaz fotokemične učinkovitosti listov paradižnika izpostavljenega različnim koncentracijam soli v substratu s pripadajočimi standardnimi napakami ($\pm$ SE). K: kontrolna skupina (0 % soli); C1: skupina z 0,1 % soli; C2: skupina z 0,25 % soli v substratu. Med skupinami ni statistično značilnih razlik (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post hoc test, $p < 0,05$). K: N = 9; C1: N = 6; C2: N = 3.

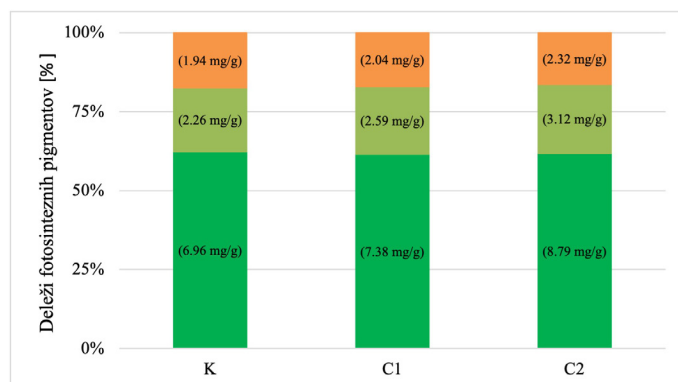
visoki koncentraciji NaCl zmanjša tudi za 90%. Med tem ko je upad suhe biomase poganjkov lahko okrog 40%. Sol povzroči nastanek krajših poganjkov, kar neposredno vodi do manjše mase poganjkov. Korenine so pa v neposrednem kontaktu s substratom, kar vpliva na njihovo rast in s tem zmanjšano biomaso (Imran s sod. 2024).

Imran s sod. (2024) so pri raziskovanju vpliva NaCl na jajčevce, potegnili nekatere vzporednice s paradižnikom. Med drugim omenjajo vpliv NaCl na nastanek cvetov, kar bi tudi mi lahko opazovali s podaljšanjem časa našega poskusa.

Rezultati meritev transpiracije niso pokazali statistično značilnih razlik med različnimi koncentracijami NaCl. Vrednosti so bile med različnimi izpostavitvami zelo podobne, kar nakazuje, da uporabljene koncentracije soli niso bistveno vplivale na prevodnost listnih rež. Slanost okolja sicer lahko pomembno zmanjša transpiracijo, saj rastline ob povečani koncentraciji soli običajno hitro zmanjšajo izhlapevanje vode skozi liste, da bi preprečile izsušitev. Ta odziv je povezan z zapiranjem listnih rež, ki predstavlja enega prvih obrambnih mehanizmov pred osmotskim stresom (Rošca s sod., 2023). Ta mehanizem se izraziteje pojavi šele pri višjih koncentracijah NaCl. Transpiracija se pri paradižniku pomembno zmanjša predvsem pri visokih stopnjah slanosti, ko je zaščita pred izgubo vode ključnega pomena (Rošca s sod. 2023). Naši rezultati tako potrjujejo, da blaga slanost ($< 0,25$ % NaCl) še ne sproži močnega zapiranja listnih rež (Rošca s sod. 2023; Alam s sod. 2021).

Fotokemična učinkovitost se med izpostavitvami ni statistično značilno razlikovala. Takšen odziv je v skladu z ugotovitvami Rošca s sod. (2023), ki poročajo, da se parametri klorofilne fluorescence pri paradižniku izrazito poslabšajo šele pri visoki slanosti, predvsem zaradi poškodbe tilakoidnih membran in posledičnega zmanjšanja učinkovitosti fotosistema II (PSII). Solni stres namreč znatno zavira delovanje fotosistema II, ki je ključen za pretvorbo svetlobne energije in določa fotosintezno učinkovitost rastline (Fu in Yang 2023).

Vsebnosti klorofila a, klorofila b in karotenoidov se med posameznimi izpostavitvami niso statistično značilno razlikovali. To je v skladu z literaturo, ki navaja, da se vsebnost klorofilov pri paradižniku zmanjša predvsem pri zmerni do



Slika 6. Deleži fotosinteznih pigmentov klorofila a, klorofila b in karotenoidov v listih paradižnika ob koncu poskusa (7. teden). Prikazani so povprečni relativni deleži in absolutne vrednosti pigmentov (v mg/g) v vzorcu. K: kontrolna skupina (0 % soli); C1: skupina z 0,1 % soli; C2: skupina z 0,25 % soli v substratu. Razlike v vsebnosti posameznih pigmentov med skupinami z različnimi koncentracijami soli niso bile statistično značilno različne (enosmerna ANOVA, Holm-Sidak post-hoc test, $p < 0,05$).

visoki slanosti, medtem ko nizke koncentracije pogosto ne povzročijo merljivih sprememb (Rivera s sod. 2022; Rošca s sod. 2023). Študije kažejo, da so dušikovi in magnezijevi ioni ključni za biosintezo klorofila, stres zaradi povišane koncentracije soli pa močno zmanjša njun vnos, kar zavira nastajanje klorofila in s tem delovanje fotosinteznega aparata (Fu in Yang 2023), kar pa se pri naših najnižjih koncentracijah glede na rezultate še ne pojavi. Povišana koncentracija soli v substratu vpliva tudi na vsebnost drugih pigmentov kot so beta karoteni, likopeni in karotenoidi (Imran s sod. 2024).

Zaključek

V naši raziskavi smo preučevali vpliv različnih koncentracij NaCl na rast in razvoj paradižnika. Rezultati so pokazali, da nizke koncentracije soli (0,1 - 0,25 %) niso povzročile statistično značilnih razlik v sveži in suhi biomasi poganjkov ter korenin, prav tako pa nismo zaznali pomembnih razlik v dolžini poganjkov in korenin. Ti izsledki nakazujejo, da uporabljene nizke koncentracije NaCl v našem primeru niso imele izrazito negativnega vpliva na rast paradižnika. Največji vpliv slanosti smo opazili pri višjih koncentracijah (0,5 %, 1 % in 1,5 % NaCl), kjer so rastline propadle že v začetnih tednih poskusa, kar potrjuje visoko občutljivost paradižnika na močan osmotski stres.

Kljub temu da rezultati niso bili statistično značilno različni, smo zaznali določene trende, ki kažejo na spremembe v fizioloških procesih. Pri fotokemični učinkovitosti in vsebnosti fotosinteznih pigmentov nismo ugotovili statistično značilnih razlik, vendar so bile vrednosti pri 0,25 % NaCl rahlo povišane, kar bi lahko nakazovalo kompenzacijske mehanizme, ki rastlinam omogočajo ohranjanje fotosintezne aktivnosti v rahlo stresnih razmerah. Podobno nespremenjena transpiracija potrjuje, da uporabljene koncentracije NaCl niso bile dovolj visoke, da bi povzročile izrazite motnje v prevodnosti listnih rež. Ker naši rezultati niso bili statistično značilno različni, naše prve hipoteze, da bo pri najnižji koncentraciji soli (0,1 %) viden blag spodbujevalni učinek na rast paradižnika, ne moremo potrditi. Čeprav smo zaznali določene trende tudi naše druge hipoteze, da bodo imele višje koncentracije soli (0,25 - 1,5

%) negativen vpliv na rast in razvoj paradižnika, pri čemer pričakujemo, da bo najvišja koncentracija (1,5 %) povzročila najizrazitejše zaviranje rasti in presnovnih procesov, ne moremo potrditi, saj naši rezultati niso bili statistično značilno različni.

Te ugotovitve kažejo, da je odziv rastlin na slanost kompleksen in odvisen od intenzivnosti slanosti. Naše delo predstavlja pomembno izhodišče za nadaljnje raziskave. V prihodnje bi bilo smiselno poskus nadgraditi z večjim številom ponovitev ter daljšim obdobjem spremljanja rastlin, kar bi omogočilo zanesljivejšo statistično obdelavo podatkov. Prav tako bi bilo koristno vključiti širši nabor fizioloških in biokemijskih parametrov, ki bi omogočili boljše razumevanje zgodnjih odzivov rastlin na slanost. Uporaba dodatnih koncentracij NaCl ter primerjava različnih genotipov paradižnika, bi lahko razkrile različne stopnje tolerance ter omogočile boljši vpogled v mehanizme prilagajanja rastlin na slana okolja.

Literatura

1. Alam M, Tester M, Fiene G, Mousa M, 2021. Early Growth Stage Characterization and the Biochemical Responses for Salinity Stress in Tomato. *Plants* 10(4): 712.
2. Fu H, Yang Y, 2023. How Plants Tolerate Salt Stress. *Current Issues in Molecular Biology* 45(7): 5914-5934.
3. Hoagland DR, Arnon DI, 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *Circular (California Agricultural Experiment Station)* 347: 4-32.
4. Imran S, Sarker P, Mahamud MA, Paul NC, Chakroborty J, Harine IJ, Rahimi M, 2024. Copper mitigates salinity stress by regulating water status, photosynthetic pigments and ion homeostasis and increases the yield of Eggplant (*Solanum melongena*). *BMC Plant Biology* 24(1): 927.
5. Lichtenthaler HK, Buschmann C, 2001. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* 1(1):F4.3.1-F4.3.8.
6. Rivera P, Moya C, O'Brien J, 2022. Low Salt Treatment Results in Plant Growth Enhancement in Tomato Seedlings. *Plants* 11(6): 807.
7. Rošca M, Mihalache G, Stoleru V, 2023. Tomato responses to salinity stress: From morphological traits to genetic changes. *Frontiers in Plant Science* 14: 1118383.
8. Zhang X, Gao Y, Wang W, Wang H, Xin Y, Kang R, Shi Q, 2025. *Pleurotus eryngii* Stipe Base-Derived Carbon Dots Enhanced the Growth and Salt Tolerance of Tomato. *Plants* 14(20): 3227.

Vpliv suše na rast in razvoj paradižnika (*Solanum lycopersicum*)

Jan Gale, Lana Rina Kastelic, Marko Kos, Gaj Kušar, Zala Puklavec, Jan Rom

Študij molekulske in funkcionalne biologije, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

- Razumevanje vpliva pomanjkanja vode na morfološke, fiziološke in biokemijske odzive paradižnika predstavlja temelj za razvoj sort z izboljšano toleranco na sušni stres, kar lahko znatno prispeva k stabilnejši pridelavi in učinkovitejšemu prilagajanju naraščajoči problematiki pogostih in intenzivnih sušnih razmer.
- Namen poskusa je bil preveriti vpliv treh različnih intenzitet suše (simulirane z 0,5 %, 1 % in 5 % PEG) na rast in razvoj paradižnika. Rastlinam smo tedensko merili višino in spremljali znake pomanjkanja, proti koncu poskusa pa smo izmerili še dolžino korenin, fotokemično učinkovitost, učinkovitost transpiracije, svežo in suho biomaso ter vsebnost fotosinteznih pigmentov.
- 0,5 % in 1 % PEG v substratu ni povzročil merljivih sprememb v rasti ali delovanju fotosinteznega aparata paradižnika. Pri nobenem od analiziranih rastnih, fizioloških ali biokemijskih parametrov nismo zaznali statistično značilnih razlik med skupinami. Rastline posajene v substrat s 5 % PEG, pa so po enem tednu propadle.
- Rezultati kažejo na nelinearen odziv med rastjo paradižnika in koncentracijo PEG (sušnim stresom). Poskus bi bilo smiselno nadgraditi s širšim razponom koncentracij PEG med 1 % in 5 %, podaljšanjem trajanja raziskave ter vključitvijo dodatnih meritev.

Ključne besede: PEG, vodni stres, pomanjkanje, dolžina, fotokemična učinkovitost, transpiracija

Uvod

Suša je ena večjih posledic podnebnih sprememb, ki ima velik vpliv na kmetijsko pridelavo po celem svetu (Petrović s sod. 2021). Voda je v naravi najbolj omejujoči dejavnik rasti rastlin – njeno pomanjkanje lahko zavre rast bolj kot vsi drugi okoljski stresni dejavniki skupaj (Khan s sod. 2015). Med gojenimi vrstami, ki so še posebej občutljive na pomanjkanje vode, je paradižnik (*Solanum lycopersicum* L.), ena najbolj razširjenih in gojenih zelenjadnic po svetu zaradi svojega gospodarskega in prehranskega pomena (Mahapatra s sod. 2025). Paradižnik za optimalno rast in razvoj potrebuje znatne količine vode (Mahapatra s sod. 2025; Klunklin in Savage 2017), zaradi česar je tako občutljiv na sušo. Čeprav je zmerno odporen na slanost, je dovzeten za resno škodo v sušnih razmerah (Ors s sod. 2021) v vseh razvojnih fazah, od kalitve do zorenja plodov (Hasanagić s sod. 2020). Naraščajoča pogostost in intenzivnost sušnih obdobj, ki sta posledica podnebnih sprememb, tako predstavljata resno grožnjo stabilnosti pridelave te pomembne vrtnine (Petrović s sod. 2021).

Sušni stres neposredno zavira vegetativno rast paradižnika, kar se kaže v morfoloških in fizioloških spremembah kot posledica regulacijskih mehanizmov za ohranjanje vode (Hasanagić s sod. 2020; Petrović s sod. 2021; Ors s sod. 2021). Pomanjkanje vode neposredno vpliva na celične procese, kot sta delitev in podaljševanje celic, kar posledično zavira rast celotne rastline (Hasanagić s sod. 2020). To se odraža v zmanjšani višini rastlin in manjši skupni listni površini (Hasanagić s sod. 2020; Mahapatra s sod. 2025; Pervez s sod. 2009) ter zmanjšanju sveže in suhe mase rastline, kar pomeni tudi zmanjšano akumulacijo biomase (Ors s sod. 2021; Khan s sod. 2015). Eden od glavnih fizioloških odzivov na pomanjkanje vode je zmanjšana neto stopnja fotosinteze (Hasanagić s sod. 2020; Pervez s sod. 2009). Zapiranje listnih rež je primarni obrambni mehanizem, s katerim rastlina poskuša omejiti izgubo vode v procesu transpiracije. Vendar pa zaprte listne reže hkrati omejujejo vstop CO₂, ki je ključen substrat za fotosintezo, zato njegova zmanjšana razpoložljivost neposredno zavira hitrost fotosintezne asimilacije (Hasanagić s sod. 2020; Mingchi s sod. 2010; Mahapatra s sod. 2025; Ors s sod. 2021). Študije poročajo o znatnem zmanjšanju prevodnosti listnih rež in hitrosti transpiracije pri paradižniku, izpostavljenem sušnemu stresu (Ors s sod. 2021; Mingchi s sod. 2010).

Pri dolgotrajnejšem ali hujšem sušnem stresu pa postanejo prevladujoče biokemijske omejitve. Te vključujejo zmanjšano učinkovitost fotosistema II (PSII) (Petrović s sod. 2021) ter razgradnjo klorofila in zmanjšanje karotenoidov. Slednji imajo pri tem tudi pomembno zaščitno vlogo, saj ščitijo fotosintezni aparat pred fotooksidativnimi poškodbami (Hasanagić s sod. 2020; Ors s sod. 2021). Neravnovesje v transportu elektronov znotraj fotosinteznega aparata med sušo vodi v prekomerno tvorbo reaktivnih kisikovih spojin (ROS), kot je vodikov peroksid (H₂O₂) (Hasanagić s sod. 2020; Petrović s sod. 2021), ki lahko povzročijo obsežne poškodbe celičnih struktur (Liang s sod. 2020; Mahapatra s sod. 2025). Rastline se odzovejo na oksidativni stres z aktivacijo antioksidativnih obrambnih sistemov, da preprečijo oksidativne poškodbe (Hasanagić s sod. 2020; Khan s sod. 2015; Mahapatra s sod. 2025; Petrović s sod. 2021).

Namen naše raziskave je bil ugotoviti, kako sušni stres vpliva na rast in razvoj paradižnika (*Solanum lycopersicum* L.).

Cilj je bil preučiti odziv rastlin na različne intenzitete suše,

ki smo jih povzročili z dodatkom polietilenglikola (PEG) v različnih koncentracijah, ter spremljati morfološke, fiziološke in biokemijske spremembe. Predvidevali smo, da (1) se bo rast paradižnika zmanjševala z večanjem koncentracije PEG, (2) bosta fotokemična učinkovitost in transpiracija največji pri kontroli in nižji pri višjih koncentracijah PEG, ter (3) bo vsebnost fotosinteznih pigmentov največja pri kontroli in najmanjša pri rastlinah, izpostavljenih višjim koncentracijam PEG.

Materiali in metode

Priprava rastlinskega materiala

Poskus smo izvedli na mladih dvotedenskih kalicah paradižnika (*Solanum lycopersicum* L.). Te smo posadili v substrat z dodanim PEG v koncentracijah 0,5 %, 1 % in 5 % ter v substrat brez dodanega PEG, ki je služil kot kontrola. Za pripravo substrata smo komercialni substrat (Lufa) zmešali z ustrezno količino PEG (7,5 g za 0,5 %, 15 g za 1 % in 75 g za 5 % na 1500 g substrata). Mešanico smo nato enakomerno razdelili v pet lončkov po 300 g, enako tudi pri kontrolni skupini. V vsak lonček smo zasadili po dve približno enakomerno razviti ter zdravi kalici. Skupno smo tako pripravili 20 lončkov oziroma zasadili 40 rastlin. Po sejanju smo rastline zalili z 50 mL destilirane vode (dH₂O) in dodatno z 20 mL hranilne ½ Hoaglandove raztopine (Rajan s sod. 2019). Rastline smo gojili v rastni komori pri fotoperiodi 16/8 ur in dnevno/nočnih temperaturah 22/18 °C. Zalivali smo jih dvakrat tedensko, sprva z 20 mL hranilne raztopine, po 21. dneh od začetka poskusa pa smo volumen povečali na 40 mL. Tekom poskusa smo večkrat spremenili postavitev lončkov v rastni komori, da bi zmanjšali morebiten vpliv položaja na končne rezultate.

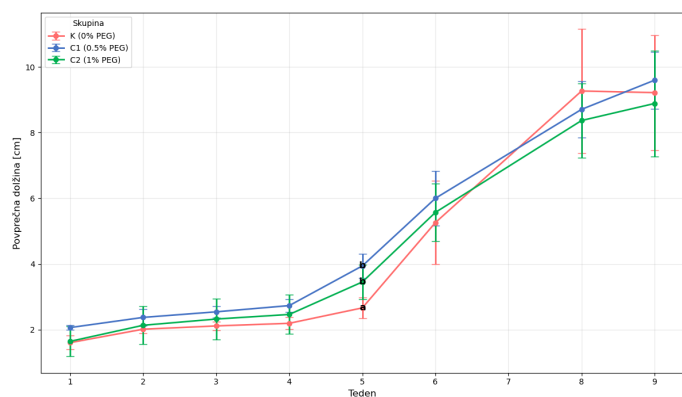
Analiza rastlinskega materiala

Enkrat na teden smo izmerili dolžino poganjkov vseh rastlin (v vsakem lončku sta bili posajeni po 2 rastlini, zato smo za nadaljnje analize upoštevali povprečno dolžino obeh; v primeru propada enega poganjka pa le dolžino preživele). Na 8. teden poskusa smo za določanje fotokemične učinkovitosti fotosistema II opravili meritve dejanske učinkovitosti na svetlobi rastnih komor. Pri vsaki skupini smo pri petih rastlinah na polno razvitem listu opravili meritve s fluorometrom (PAM-2500, Walz). Na teh istih rastlinah smo nato izmerili tudi transpiracijo s porometrom (Leaf Porometer, Steady State Diffusion Porometer, Model SC-1, Decagon Devices). Po 9. tednih smo poskus podrli. Rastline smo previdno vzeli iz lončkov in jih sprali z vodo, da smo odstranili ves odvečni substrat. Še zadnjič smo izmerili dolžine vseh korenin in poganjkov. Nato smo v posameznem lončku ločili poganjke od korenin in stehali njihovo svežo biomaso. Poganjke in korenine smo nato ločeno zavili v aluminijasto folijo, jih potopili v tekočem dušiku ter liofilizirali. Po enem tednu smo tako dehidriranim poganjkom in koreninam izmerili še suho biomaso.

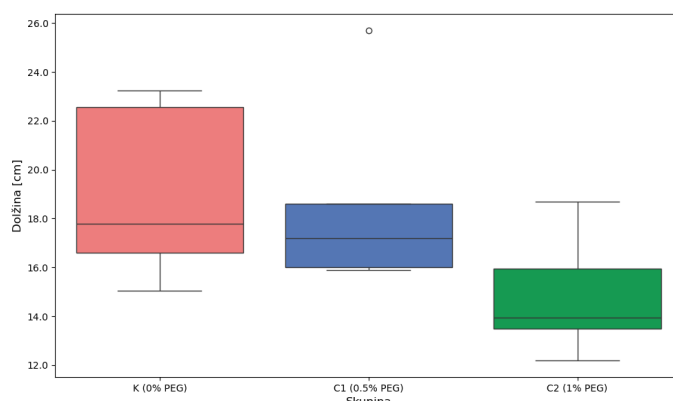
Liofiliziranemu materialu smo določili koncentracijo asimilacijskih pigmentov, kot je opisano v Lichtenthaler in Buschmann (2001). Po 3 poganjke liofiliziranih rastlin iz vsake skupine (kontrola in različne koncentracije PEG) smo strli v terilnici, odtehtali 35 mg strtega prahu, pridobljenega iz vsakega posamezne skupine, dodali 15 mL 10 % ohlajenega



Slika 1. Lončki posamezne skupine po 9. tednu izvajanja poskusa, od desne proti levi: kontrola (0 %), 0,5 %, 1% in 5 % PEG.



Slika 2. Trend rasti poganjkov pri različnih sušnih pogojih (K oz. 0 %, C1 oz. 0,5 %, C2 oz. 1 % PEG) tekom 9 tednov izvajanja poskusa. Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ SD ($n = 5$), kjer n predstavlja število lončkov. Različne črke označujejo statistično značilne razlike med skupinami (Tukeyjev post hoc test, $p > 0,05$).



Slika 3. Grafikon dolžin korenin pri kontroli (K, 0 % PEG) in posameznem eksperimentalnem pogoju (C1, 0,5 % in C2, 1 % PEG), izmerjenih po devetih tednih opazovanja rasti rastlin. Prikazani so prvi in tretji kvartil, mediana ter najmanjša in največja vrednost ($n = 5$), kjer n predstavlja število lončkov. Med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik (ANOVA, $p > 0,05$).

metanola (na 4 °C), premešali in vorteksirali. Tako pripravljene ekstrakte smo inkubirali 30 min na sobni temperaturi v temi in jih na nekaj minut sproti premešali. Po inkubaciji smo vsak ekstrakt preko filter papirja prefiltrirali v merilni valj in odčitali dobljeni volumen. Po 2 mL posameznega ekstrakta smo odpipetirali v 2 mikrocentrifugirki in centrifugirali 3 minute pri 2500 rpm. Sledila je meritev absorbance s spektrofotometrom (Agilent UV-1800, Shimadzu, Japonska) pri treh različnih valovnih dolžinah (665, 652 in 470 nm), na podlagi česar smo izračunali koncentracije asimilacijskih pigmentov (Lichtenthaler in Buschmann 2001).

Analiza podatkov

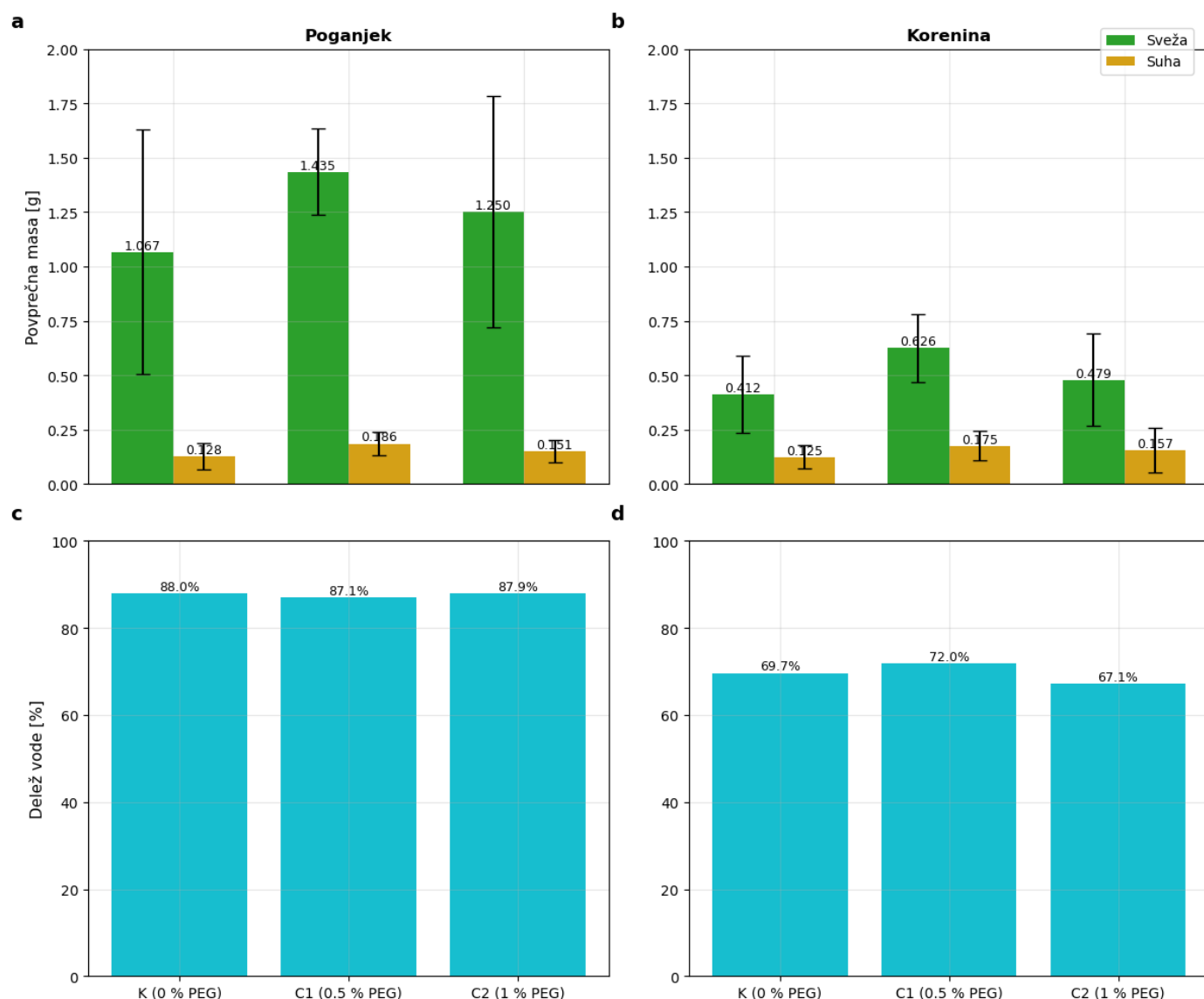
Pridobljene podatke smo uredili v programu Microsoft Excel. Rezultate smo statistično analizirali in grafično prikazali s pomočjo programskega jezika Python, različica 3.11.6, pri čemer smo za grafični prikaz podatkov uporabili knjižnici Matplotlib (Hunter, 2007) in Seaborn (Waskom, 2021), za statistično analizo pa knjižnice Numpy (Harris s sod. 2020), Pandas (The pandas development team, 2025), Scipy (Virtanen s sod. 2020) in Statsmodels (Seabold, 2010). Za obdelavo

podatkov smo uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA), v primeru statistično značilnih razlik smo izvedli še Tukeyjev post hoc test. Za mejo statistične značilnosti smo izbrali vrednost $p < 0,05$.

Rezultati

Od 40 zasejanih rastlin jih je do konca izvajanja meritev preživel 27. Vse rastline v 5 % PEG so propadle že po prvem tednu izvedbe poskusa, zaradi česar smo jih izključili iz obravnave. Pri kontroli ter 0,5 % in 1 % PEG je do konca meritev rasti poganjkov propadla po 1 rastlina v vsakem od pogojev, torej je skupaj preživel 19 rastlin. Slika 1 prikazuje po en lonček kontrole in različnih koncentracij PEG pred podrtjem poskusa.

Povprečno je velikost poganjkov rastlin naraščala pri vseh treh pogojih. Do 4. tedna poskusa je bila rast rastlin počasnejša s tedensko prirastjo manj kot 0,2 cm pri kontroli in obeh eksperimentalnih pogojih. Od 4. tedna naprej je bila rast pri vseh treh pogojih večja, kar se tudi odraža v večji povprečni tedenski prirasti (Slika 2). Na začetku poskusa je bila povprečna velikost poganjkov pri kontroli $1,6 \pm 0,21$ cm, pri 0,5 % PEG



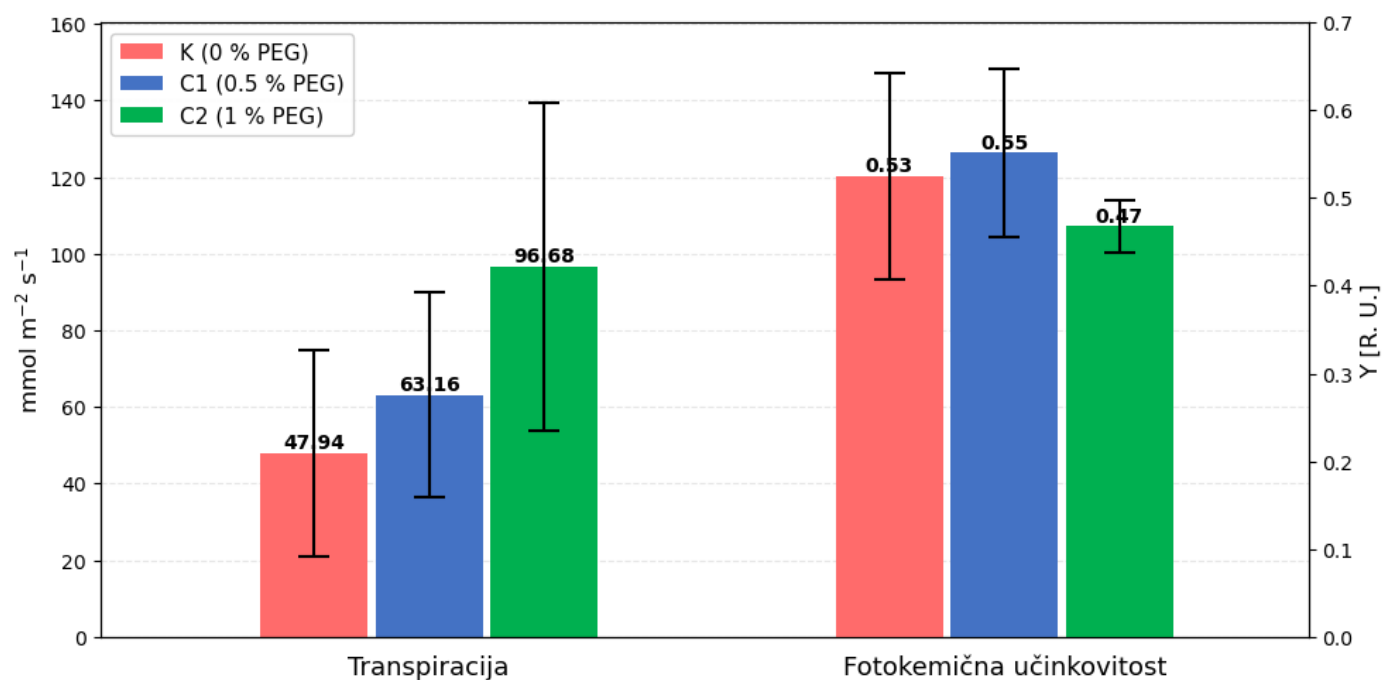
Slika 4. Grafični prikaz povprečne suhe in sveže mase poganjka (a) in korenine (b) ter delež vode pri kontroli (K, 0 % PEG) in posameznem eksperimentalnem pogoju (C1, 0,5 %, in C2, 1 % PEG) v poganjkih (c) in koreninah (d). Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ SD ($n = 5$), kjer n predstavlja število lončkov. Med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik (ANOVA, $p > 0,05$).

2,06 $\pm$ 0,07 cm in pri 1 % PEG 1,64 $\pm$ 0,64 cm, ob zaključku pa 9,22 $\pm$ 1,75 cm, 9,6 $\pm$ 0,87 cm in 8,89 $\pm$ 1,61 cm. Višine poganjkov se v posameznem tednu med skupinami statistično niso razlikovale z izjemo 5. tedna ($p = 0,001355$). Meritev velikosti poganjkov nismo izvedli 7. teden poteka poskusa. Rastline se niso statistično značilno razlikovale v dolžini korenin ($p = 0,151412$), kljub temu pa je bil opazen trend zmanjševanja povprečne dolžine korenin z naraščajočo stopnjo suše (Slika 3). Prav tako nismo opazili razlik v sveži ($p = 0,209298$) in niti v suhi masi korenin ($p = 0,591962$). Statistično značilnih razlik nismo zaznali tudi pri analizi sveže ($p = 0,473794$) in suhe mase ($p = 0,286539$) poganjkov. Vrednosti sveže in suhe mase poganjkov in korenin ter delež vode so prikazane na Sliki 4. Pri meritvah fizioloških in biokemijskih odzivov rastlin sicer lahko vidimo trend naraščanja povprečne transpiracije in trend zmanjševanja povprečne koncentracije karotenoidov, medtem ko povprečna koncentracija klorofila b s povečevanjem deleža PEG narašča. Kljub temu pa razlike niso bile statistično značilne pri nobenem od opazovanih parametrov: transpiraciji ($p =$

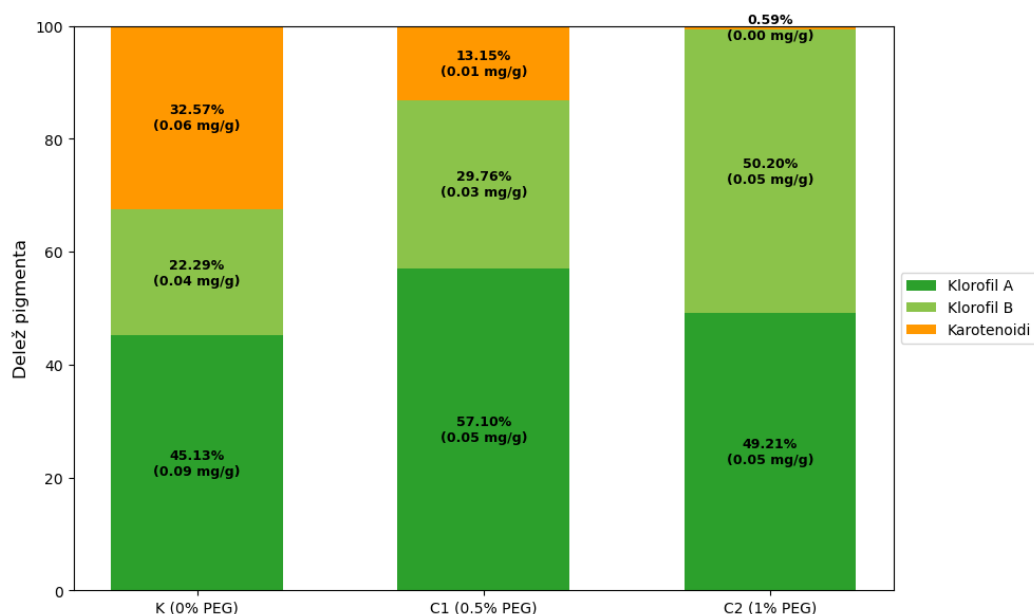
0,097446), fotokemični učinkovitosti ($p = 0,349735$) (Slika 5) ter izračunanimi koncentracijami asimilacijskih pigmentov (Slika 6) – klorofilom a ($p = 0,260732$), klorofilom b ($p = 0,502872$) in karotenoidi ($p = 0,065566$).

Diskusija

V raziskavi smo preučevali vpliv različno intenzivnega sušnega stresa, simuliranega z dodatkom PEG, na rast in fiziološke ter biokemijske odzive paradižnika (*Solanum lycopersicum* L.). Naše hipoteze so temeljile na predpostavki, da bo z naraščajočo koncentracijo PEG prišlo do postopnega zmanjšanja rasti, fotokemične učinkovitosti fotosistema II, transpiracije in vsebnosti fotosinteznih pigmentov, kar je skladno z ugotovitvami številnih predhodnih študij o vplivu suše na paradižnik (Khan s sod. 2015; Hasanagić s sod. 2020; Liang s sod. 2020; Ors s sod. 2021; Mahapatra s sod. 2025). Kljub tem pričakovanjem večina analiziranih parametrov v našem poskusu ni pokazala statistično značilnih razlik med kontrolnimi rastlinami ter rastlinami, izpostavljenimi 0,5 % in



Slika 5. Grafični prikaz transpiracije in dejanske fotokemične učinkovitosti pri kontroli (K, 0 % PEG) in posameznem eksperimentalnem pogoju (C1, 0,5 %, in C2, 1 % PEG). Prikazane so povprečne vrednosti $\pm$ SD (n = 5), kjer n predstavlja število lončkov. Med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik (ANOVA, $p > 0,05$).



Slika 6. Deleži vsebnosti posameznega pigmenta – klorofila a, b in karotenoidov – pri kontroli (K, 0 % PEG) in posameznem eksperimentalnem pogoju (C1, 0,5 %, in C2, 1 % PEG). Med skupinami ni bilo statistično značilnih razlik (ANOVA, $p > 0,05$).

1 % PEG. Takšen rezultat kaže, da uporabljene koncentracije PEG in/ali trajanje poskusa niso bile zadostne za povzročitev sušnega stresa z dovoljšno intenzivnostjo, potrebno za sprožitev negativnih morfoloških, fizioloških in biokemijskih odzivov, o katerih poročajo raziskave drugih avtorjev. Le pri 5 % PEG je bil odziv drugačen, saj so rastline že po prvem tednu poskusa propadle, zaradi česar te obravnave ni bilo mogoče vključiti v nadaljnje analize. Podoben odziv ob visoki intenziteti osmotskega stresa opisujejo Mingchi s sod. (2010), ki poročajo o močno zavrti rasti, zmanjšani fiziološki aktivnosti in propadu rastlin paradižnika ob izrazito znižanem vodnem potencialu. Meja tolerance za izbrano sorto paradižnika torej verjetno leži nekje med 1 % in 5 % koncentracijo PEG. Popoln propad rastlin pri 5 % PEG dodatno potrjuje, da je bil eksperimentalni sistem dovolj občutljiv za zaznavanje hudega sušnega stresa, hkrati

pa poudarja, da so bile nižje koncentracije PEG verjetno pod pragom, pri katerem bi se pojavili merljivi odzivi. Prva hipoteza je predvidevala postopno zmanjševanje rasti paradižnika z naraščajočo koncentracijo PEG. Naši rezultati te hipoteze ne potrjujejo. Rast pogankov je bila v vseh skupinah skozi celoten potek poskusa primerljiva, zato statistično značilnih razlik med kontrolo in obravnavama z 0,5 % in 1 % PEG nismo zaznali. Končne višine rastlin so bile primerljive, čeprav so vrednosti pri 0,5 % PEG nakazovale trend višjih višin v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. Ti rezultati so v nasprotju s številnimi študijami, ki poročajo o zmanjšani rasti paradižnika pod sušnim stresom. Sušni stres povzroči zmanjšano relativno stopnjo rasti (Khan s sod. 2015) – ob izpostavitvi suši imajo rastline paradižnika krajše pogankje in manjše število listov (Hasanagić s sod. 2020). Razlike med našimi rezultati in

literaturo bi lahko izhajale iz dejstva, da sta bili uporabljeni koncentraciji 0,5 % in 1 % PEG relativno nizki. Odsotnost statistično značilnih razlik lahko morda pripišemo tudi prekratnemu trajanju stresa. Hasanagić s sod. (2020) namreč poudarjajo, da se izrazitejši negativni učinki suše na rast pri paradižniku pojavijo šele po daljšem obdobju trajanja stresa. Alternativno je morda bila uporabljena sorta bolj tolerantna na sušni stres, saj je znano, da se odziv na sušo močno razlikuje med sortami (Mahapatra s sod. 2025).

Pri meritvah sveže in suhe biomase poganjkov ter korenin prav tako nismo zaznali statistično značilnih razlik med skupinami. V literaturi je opisano znatno zmanjšanja biomase paradižnika v sušnih razmerah (Khan s sod. 2015, Ors s sod. 2021), kar pa je običajno povezano z daljšim trajanjem ali višjo intenziteto sušnega stresa (Hasanagić s sod. 2020). Odsotnost statistično značilnih razlik v dolžini korenin bi lahko bila posledica prilagoditvenih mehanizmov, ki rastlinam omogočajo ohranjanje razvoja koreninskega sistema tudi v razmerah zmerne vodnega stresa. Khan s sod. 2015 ponujajo sorodno razlago, da sušni stres na rast listov vpliva močneje kot na rast korenin, ker so korenine sposobne bolje kompenzirati pomanjkanje vlage, vendar ne poročajo o tem, da razlik v dolžini korenin ne bi bilo. Druge raziskave pa so ugotovile, da se je dolžina korenin (poleg višine rastline in dolžine poganjka) paradižnika v sušnem stresu znatno zmanjšala (Mahapatra s sod. 2025; Ors s sod. 2021).

Druga hipoteza je predvidevala, da bosta fotokemična učinkovitost fotosistema II in transpiracija najvišji pri kontroli ter nižji pri višjih koncentracijah PEG. Naši rezultati tudi te hipoteze ne potrjujejo, saj se fotokemična učinkovitost med skupinami ni statistično značilno razlikovala. To je v nasprotju z dosedanjimi raziskavami, ki opisujejo upad učinkovitosti ob sušnem stresu (Hasanagić s sod. 2020, Ors s sod. 2021). Ohranitev fotokemične učinkovitosti v našem poskusu morda nakazuje, da fotosintezni aparat pri rastlinah, izpostavljenih PEG, še ni bil kritično prizadet in da je osnovni transport elektronov ostal neokrnjen kljub zmanjšani razpoložljivosti vode. Petrović s sod. (2021) namreč poročajo, da se fotokemična učinkovitost pri zmerni suši lahko ohranja kot del adaptivnega odziva, zlasti pri genotipih z večjo toleranco. Prav tako se transpiracija med skupinami ni statistično razlikovala, torej kratkotrajen zmeren stres ni povzročil sprememb v fizioloških procesih, povezanih z izgubo vode. Nasprotno Liang s sod. (2020) poročajo o zmanjšani fotosintezi zaradi stomatalnih in nestomatalnih omejitev, Hasanagić s sod. (2020) pa o postopnem upadu fotosintezne in transpiracijske stopnje že po 15. dneh suše.

Tretja hipoteza je predvidevala, da bo vsebnost fotosinteznih pigmentov najvišja pri kontroli in najnižja pri rastlinah, izpostavljenih višjim koncentracijam PEG. Tudi te hipoteze naši rezultati ne potrjujejo, saj pri klorofilu a, klorofilu b in karotenoidih nismo zaznali statistično značilnih razlik, čeprav je bil pri karotenoidih zaznan trend. Stabilna vsebnost klorofilov in karotenoidov dodatno nakazuje, da fotosintezni aparat ni bil izpostavljen stopnji stresa, ki bi povzročila povečano razgradnjo pigmentov ali aktivacijo močnih zaščitnih odzivov, povezanih z oksidativnim stresom (Hasanagić s sod. 2020; Khan s sod. 2015; Mahapatra s sod. 2025; Petrović s sod. 2021). To pomeni, da so zaščitni mehanizmi, ki ohranjajo funkcijo fotosinteznega aparata, pri uporabljenih koncentracijah in trajanju stresa zadostni za preprečevanje oksidativnih poškodb. Skladnost med stabilno fotokemično učinkovitostjo,

nespremenjeno transpiracijo in nespremenjeno vsebnostjo fotosinteznih pigmentov kaže na usklajen odziv rastline, pri katerem osnovna funkcionalnost fotosinteznega aparata ni bila bistveno oslABLJENA. Hasanagić s sod. (2020) poročajo, da se koncentracije fotosinteznih pigmentov pri paradižniku zmanjšajo šele ob dolgotrajnem in intenzivnem stresu, medtem ko Petrović s sod. (2021) poudarjajo, da je ohranjanje klorofilov pri zmerni suši pomemben zaščitni mehanizem pred fotooksidativnimi poškodbami.

Na podlagi naših rezultatov lahko zaključimo, da nobene izmed treh hipotez ne moremo potrditi za obravnavi z 0,5 % in 1 % PEG. Rast, biomasa ter fiziološki in biokemijski parametri pri teh koncentracijah niso kazali statistično značilnih razlik v primerjavi s kontrolo. Edini izrazit učinek PEG je bil opažen pri 5 % PEG, kjer je prišlo do popolnega propada rastlin, kar potrjuje, da je odziv paradižnika močno odvisen od intenzitete vodnega stresa in da je ta odziv izrazito nelinearen. Po drugi strani pa so naši rezultati skladni z raziskavami, ki poudarjajo, da zmeren vodni stres ne vodi nujno v zmanjšanje rasti ali fotosintezne učinkovitosti, temveč lahko rastline ohranijo funkcionalno stabilnost fotosinteznega aparata in vodnega režima (Klunklin in Savage 2017; Hasanagić s sod. 2020; Petrović s sod. 2021). Omejitve raziskave vključujejo relativno majhno število opazovanih rastlin, kratko trajanje poskusa, relativno nizke koncentracije PEG ter omejeno število analiziranih parametrov. V prihodnjih raziskavah bi bilo smiselno proučiti daljše trajanje stresa, širši razpon koncentracij PEG, predvsem med 1 % in 5 %, ter vključiti dodatne meritve, kot so antioksidativni odzivi in razmerje biomase korenin in poganjkov, da bi pridobili bolj celovito razumevanje odzivov paradižnika na sušni stres. Prav tako bi bilo smiselno povečati število opazovanih rastlin, saj bi s tem tudi zmanjšali vpliv naključja in individualnih značilnosti vsake posamezne opazovane rastline.

Zaključki

Na podlagi dobljenih rezultatov smo zavrgli vse postavljene hipoteze pri obravnavah z 0,5 % in 1 % PEG, ki so predvidevale postopno zmanjševanje rasti, fotokemične učinkovitosti, transpiracije ter vsebnosti fotosinteznih pigmentov. Pri teh dveh koncentracijah PEG v primerjavi s kontrolno skupino nismo ugotovili statistično značilnih razlik v nobenem od merjenih parametrov. Nasprotno pa so rezultati pri 5 % PEG jasno pokazali izrazit vpliv sušnega stresa, saj so rastline že po prvem tednu propadle, kar potrjuje občutljivost paradižnika na visoko intenziven osmotski stres. Na osnovi teh ugotovitev lahko zaključimo, da meja tolerance preučevane sorte paradižnika leži v razponu med 1 % in 5 % koncentracijo PEG. Raziskava tako kaže, da odziv paradižnika na sušni stres ni nujno postopen, temveč je izrazito pragovno pogojen. Blage do zmerne stopnje stresa namreč ne vodijo v merljive spremembe analiziranih morfoloških, fizioloških in biokemijskih kazalnikov. Ti rezultati poudarjajo pomen ustrezne izbire intenzitete in trajanja stresa pri eksperimentalnem modeliranju suše. V prihodnjih raziskavah bi bilo zato smiselno preučiti vpliv koncentracij PEG znotraj omenjenega razpona, podaljšati čas izpostavljenosti stresu ter vključiti dodatne meritve. Čeprav statistično značilnih razlik nismo zaznali, naši pridobljeni rezultati nudijo vpogled v odpornost paradižnika v začetnih fazah suše in predstavljajo izhodišče za optimizacijo prihodnjih eksperimentalnih pogojev.

Literatura

1. Harris CR, Millman KJ, van der Walt SJ, Gommers R, Virtanen P, Cournapeau D, Wieser E, Taylor J, Berg S, Smith NJ, Kern R, Picus M, Hoyer S, van Kerkwijk MH, Brett M, Haldane A, Fernández del Río J, Wiebe M, Peterson P, Gérard-Marchant P, Sheppard K, Reddy T, Weckesser W, Abbasi H, Gohlke C, Oliphant TE, 2020. Array programming with NumPy. *Nature* 585 (7825): 357–62.
2. Hasanagić D, Koleška I, Kojić D, Vlaisavljević S, Janjić N, Kukavica B, 2020. Long term drought effects on tomato leaves: anatomical, gas exchange and antioxidant modifications. *Acta Physiologiae Plantarum* 42 (7): 121.
3. Hunter JD, 2007. Matplotlib: A 2D graphics environment. *Computing in Science & Engineering* 9 (3): 90–95.
4. Khan SH, Khan A, Litaf U, Shah AS, Khan MA, Bilal M, Ali MU, 2015. Effect of Drought Stress on Tomato cv. Bombino. *Journal of Food Processing & Technology* 6: 465.
5. Klunklin W, Savage G, 2017. Effect on Quality Characteristics of Tomatoes Grown Under Well-Watered and Drought Stress Conditions. *Foods* 6: 56.
6. Liang G, Liu J, Zhang J, Guo J, 2020. Effects of Drought Stress on Photosynthetic and Physiological Parameters of Tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 145(1): 12–17.
7. Lichtenthaler HK, Buschmann C, 2001. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* 1(1):F4.3.1-F4.3.8.
8. Mahapatra PP, Bae DW, Prakash MAS, Muneer S, 2025. Exploring Adaptive and Susceptible Mechanism in Selected Tomato Genotypes Employing Physiological Modulations and Antioxidative Pathways under Drought Stress. *Agricultural Science Digest*: 1-8. doi: 10.18805/ag.D-6310
9. Mingchi L, Xiangli L, Jing H, Lihong G, 2010. Effect of Simulated Drought Stress on Plant Growth, Yield and Fruit Properties of Tomato. *Acta Horticulturae* 856: 193–202.
10. Ors S, Ekinici M, Yildirim E, Sahin U, Turan M, Dursun A, 2021. Interactive effects of salinity and drought stress on photosynthetic characteristics and physiology of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) seedlings. *South African Journal of Botany* 137: 335–339.
11. Pervez MA, Ayub CM, Khan HA, Shahid MA, Ashraf I, 2009. Effect of drought stress on growth, yield and seed quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* 46(3): 174–178.
12. Petrović I, Savić S, Gricourt J, Causse M, Jovanović Z, Stikić R, 2021. Effect of long-term drought on tomato leaves: the impact on metabolic and antioxidative response. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 27(12): 2805–2817.
13. Rajan P, Lada RR, MacDonald MT, 2019. Advancement in Indoor Vertical Farming for Microgreen Production. *American Journal of Plant Sciences* 10, 8: 1397–1408.
14. Seabold S, Perktold J, 2010. Statsmodels: Econometric and statistical modeling with python. *Proceedings of the 9th Python in Science Conference*.
15. The pandas development team, 2025. pandas-dev/pandas: Pandas (v3.0.0rc1). Zenodo.
16. Virtanen P, Gommers R, Oliphant TE, Haberland M, Reddy T, Cournapeau D, Burovski E, Peterson P, Weckesser W, Bright J, van der Walt SJ, Brett M, Wilson J, Millman KJ, Mayorov N, Nelson ARJ, Jones E, Kern R, Larson E, Carey CJ, Polat İ, Feng Y, Moore EW, VanderPlas J, Laxalde D, Perktold J, Cimrman R, Henriksen I, Quintero EA, Harris CR, Archibald AM, Ribeiro AH, Pedregosa F, van Mulbregt P, 2020. SciPy 1.0: Fundamental Algorithms for Scientific Computing in Python. *Nature Methods*, 17(3), 261-272.
17. Waskom ML, 2021. Seaborn: Statistical data visualization. *Journal of Open Source Software* 6 (60): 3021.