

Potencial izvlečkov luščin zrnja navadne in tatarske ajde za zaviranje rasti patogenih gliv

BIOLOGIJA

RAZISKOVALNA NALOGA

Anej Cunk in Pija Burger

3. letnik

Mentorica: Eva Šajn, mag. prof. biologije, Gimnazija Vič

Somentor: asist. Jure Mravlje, mag. prof., Biotehniška fakulteta UL

2023

Gimnazija Vič, Ljubljana

POVZETEK

Rastline v naravi pogosto kolonizirajo različne glive. Do okužbe lahko pride že na polju ali pa med samim shranjevanjem in transportom. Kmetijske rastline, predvsem žitarice oziroma njihova zrna, so izjemno pomembne za prehrambno industrijo ali živalsko krmo. Večino teh za prehranske namene ali pred nadaljnjo uporabo oluščijo. Podobno velja tudi za ajdo, ki jo pred uporabo oluščijo, luščine pa se običajno zavrže. Namen raziskovalne naloge je bil preveriti, ali izvlečki iz luščin navadne in tatarske ajde zavirajo rast patogenih gliv. Ajdova zrna so namreč bogata s fenoli, ki naj bi imeli tudi proti glivno delovanje. Izvlečki iz luščin ajdovih zrn bi lahko predstavljali novo bioaktivno učinkovino za zaviranje rasti gliv, ki je človeku in naravi povsem ne nevarna, za razliko od mnogih umetnih pripravkov kot so denimo fungicidi. Prav tako pa te luščine največkrat predstavljajo le odpadke ali stranski produkt pri proizvodnji tržnih izdelkov iz ajdovih zrn, tako da predstavljajo neizkoriščen potencial, ki se ga sicer zavrže. Testirali smo dve različni koncentraciji izvlečka zrn navadne in tatarske ajde, in sicer 0,5 g/L in 1,0 g/L. Poskus smo izvedli na sedmih različnih glivnih vrstah in opazovali zaviranje njihove rasti v primerjavi s kontrolo. Prav tako smo v izvlečkih spektrofotometrično določili tudi vsebnost skupnih fenolov in flavonoidov. Na štiri glive je izvleček deloval povsem zaviralno, na dve ni imel vpliva, pri eni vrsti pa je rast celo pospešil. Izvleček iz luščin zrnja tatarske ajde je v povprečju že pri nižji koncentraciji bolj zaviral rast gliv kot izvleček iz luščin zrnja navadne ajde.

Ključne besede: navadna ajda, tatarska ajda, patogene glive, fenoli, flavonoidi, proti glivno delovanje

ABSTRACT

Plants in nature are often colonised by various fungi. Infection can occur already in the field or during storage and transport. Agricultural plants, especially cereals and their grains, are extremely important for the food industry or animal feed. Most of these are peeled for food purposes or before further processing. The same applies to buckwheat, which is peeled before use, and the husks are usually considered only a waste product. This research aimed to test whether extracts from the husks of common and Tartary buckwheat inhibit the growth of selected pathogenic fungi. Buckwheat grains are rich in phenols, which are also said to have anti-fungal activity. Extracts from the hulls of buckwheat grains could represent a new bioactive agent for inhibiting the growth of fungi, as they are entirely harmless to humans and nature, unlike many artificial preparations such as fungicides. Also, these husks are mostly only waste or a by-product in processing commercial products from buckwheat grains, so they represent an unused potential that is otherwise thrown away. We tested two different concentrations of common and Tartary buckwheat extract, namely 0,5 g/L and 1,0 g/L. We performed the experiments on seven different fungal species and observed some inhibition of their growth compared to the control. We also spectrophotometrically determined the content of total phenols and flavonoids in the extracts. The extracts had a significant inhibitory effect on four tested fungi, they did not affect two species, and in one species, they even accelerated the fungal growth. On average, even at a lower concentration, the extract from the husks of Tartary buckwheat inhibited the growth of fungi more than the extract from the husks of common buckwheat.

Key words: common buckwheat, Tartary buckwheat, pathogenic fungi, fenolos, flavonoids, antifungal activity

Kazalo vsebine

1	Uvod.....	7
1.1	Oprelitev problema	7
1.2	Namen raziskovalne naloge	7
1.3	Hipoteze	7
2	Teoretično ozadje	9
2.1	O ajdi (<i>Fagopyrum sp.</i>).....	9
2.2	Značilnosti gliv in glivnih celic	10
2.3	Problematika glivnih okužb	10
2.4	Fenoli in njihovo delovanje	11
2.4.1	Flavonoidi in njihovo delovanje.....	11
3	Materiali in metode dela.....	13
3.1	Laboratorijska oprema in seznam kemikalij	13
3.2	Izvor luščin zrnja navadne in tatarske ajde	13
3.3	Priprava izvlečka.....	13
3.4	Priprava agarnih gojišč z izvlečkom	14
3.5	Cepljenje gliv	15
3.6	Spektrofotometrične analize	16
3.6.1	Analiza vsebnosti skupnih fenolov	16
3.6.2	Analiza vsebnosti flavonoidov	16
3.7	Statistična analiza	17
4	Rezultati z razpravo.....	18
4.1	Rast posamezne glive na različnih izvlečkih	18
4.2	Primerjava rasti različnih gliv glede na izvleček	32
4.3	Analiza vsebnosti sekundarnih metabolitov v izvlečkih.....	36
5	Zaključek.....	37
6	Viri in literatura	38

Zahvala	41
---------------	----

Kazalo slik

Sl. 1: Tehtanje finega prahu navadne ajde na točno 10 g z analitsko tehtnico	14
Slika 2: Kozarčki z 10 g izvlečka in 90 mL 70 % etanola pripravljeni za 24 urno stresanje	14
Sl. 3: Kontrolna agarna gojišča (svetlejša) in agarna gojišča z dodanimi izvlečki luščin ajde (temnejša).....	15
Sl. 4: Centrifugiranje vzorcev v ultracentrifugi.....	16
Sl. 5: Rast glive <i>Alternaria alternata</i> na kontrolnem gojišču in na gojiščih z dodanimi različnimi koncentracijami izvlečka luščin navadne ajde (NA) in tatarske ajde (TA)....	18
Sl. 6: Reprezentativni prikaz rasti glive <i>Alternaria alternata</i>	19
Sl. 7: Rast glive <i>Alternaria infectoria</i> na kontrolnem gojišču in na gojiščih z dodanimi različnimi koncentracijami izvlečka luščin navadne ajde (NA) in tatarske ajde (TA)....	20
Sl. 8: Reprezentativni prikaz rasti glive <i>Alternaria infectoria</i>	21
Sl. 9: Rast glive <i>Aspergillus flavus</i> na kontrolnem gojišču in na gojiščih z dodanimi različnimi koncentracijami izvlečka luščin navadne ajde (NA) in tatarske ajde (TA)....	22
Sl. 10: Reprezentativni prikaz rasti glive <i>Aspergillus flavus</i>	23
Sl. 11: Rast glive <i>Epicoccum nigrum</i> na kontrolnem gojišču in na gojiščih z dodanimi različnimi koncentracijami izvlečka luščin navadne ajde (NA) in tatarske ajde (TA)....	24
Sl. 12: Reprezentativni prikaz rasti glive <i>Epicoccum nigrum</i>	25
Sl. 13: Rast glive <i>Fusarium fujikuroi</i> na kontrolnem gojišču in na gojiščih z dodanimi različnimi koncentracijami izvlečka luščin navadne ajde (NA) in tatarske ajde (TA)....	26
Sl. 14: Reprezentativni prikaz rasti glive <i>Fusarium fujikuroi</i>	27
Sl. 15: Rast glive <i>Fusarium graminearum</i> na kontrolnem gojišču in na gojiščih z dodanimi različnimi koncentracijami izvlečka luščin navadne ajde (NA) in tatarske ajde (TA).	28
Sl. 16: Reprezentativni prikaz rasti glive <i>Fusarium graminearum</i>	29
Sl. 17: Rast glive <i>Fusarium oxysporum</i> na kontrolnem gojišču in na gojiščih z dodanimi različnimi koncentracijami izvlečka luščin navadne ajde (NA) in tatarske ajde (TA)....	30
Sl. 18: Reprezentativni prikaz rasti glive <i>Fusarium oxysporum</i>	31
Sl. 19: Primerjava relativne rasti gliv glede na njihove kontrole na manj koncentriranem (0,5 g/L) izvlečku navadne ajde	32
Sl. 20: Primerjava relativne rasti gliv glede na njihove kontrole na bolj koncentriranem (1,0 g/L) izvlečku navadne ajde	33
Sl. 21: Primerjava relativne rasti gliv glede na njihove kontrole na manj koncentriranem (0,5 g/L) izvlečku tatarske ajde	34
Sl. 22: Primerjava relativne rasti gliv glede na njihove kontrole na bolj koncentriranem (1,0 g/L) izvlečku tatarske ajde.	35

Kazalo tabel

Tab. 1: Vsebnost skupnih fenolov in flavonoidov na gram suhega izvlečka luščin navadne (NA) in tatarske (TA) ajde.....	36
--	----

1 Uvod

1.1 Opredelitev problema

Na svetu se vsako minuto rodi okoli 250 ljudi [1]. S strmim naraščanjem števila prebivalcev, ki naj bi na svetovni ravni po ocenah doseglo 10 milijard do leta 2050, se izredno povečuje tudi potreba po hrani, ki pa jo, predvsem v državah v razvoju, že danes primanjkuje [2]. Cilj vseh svetovnih držav je zagotoviti ali proizvesti zadostno količino hrane za naraščajočo populacijo. Največji del prehranske industrije predstavljajo poljščine, tj. žitarice in zelenjava. Človeštvo že vrsto let poizkuša izkoristiti in pridelati kar največje količine hrane. Skozi zgodovino smo razvili številne stroje in drugo moderno tehnologijo, ki nam to olajšajo, prav tako tudi kemijske spojine (pesticide), ki zavirajo rast »škodljivcev«, predvsem za rast gliv, večinoma plesni (fungicidi) in za zatiranje živalskih škodljivcev, predvsem žuželk (insekticidi). S tem pa se je hkrati pojavila nova, okoljska problematika, kajti velika večina teh zatiralcev oz. zaviralcev (pesticidov) je umetnih in škodljivih ter potencialno nevarnih za zdravje ljudi in okolja. Številni, za pridelke škodljivi organizmi, pa so celo razvili odpornost proti pesticidom, kar je povzročilo uporabo pesticidov v še v večjih (prekomernih) količinah. V prihodnosti so zato nujno potrebna odkritja novih, alternativnih in bolj okolju prijaznih sredstev za zatiranje škodljivcev.

Uporaba bioaktivnih izvlečkov iz ajde, bi lahko predstavljala eno izmed rešitev. Luščine ajde, se po navadi le zavrže kot odpadke v živilski industriji. Vendar pa naj bi bile tudi te luščine bogate z različnimi fenolnimi spojinami, kot to velja za celotna ajdova zrna oziroma rastline ajde nasploh. Fenoli so naravne spojine, ter posledično okolju in človeku povsem ne škodljivi in ne nevarni, celo koristni, saj v našem telesu delujejo kot antioksidanti. Zato bi lahko izvlečke iz luščin zrnja ajde, ki naj bi bili predvsem bogati s fenoli, brez negativnih posledic uporabljali tudi v kmetijstvu. Izkazalo se je namreč, da fenoli, ki jih ajda vsebuje lahko delujejo fungicidno, pomeni, da zavirajo rast gliv. Uporaba izvlečkov luščin zrnja navadne in tatarske ajde bi tako lahko preprečila in vsaj zavirala rast plesni na kulturnih rastlinah.

1.2 Namen raziskovalne naloge

Namen raziskovalne naloge je bil ugotoviti ali izvlečki iz luščin zrnja navadne in tatarske ajde zavirajo rast izbranih gliv. Prav tako smo želeli določiti vsebnost celokupnih fenolov in flavonoidov v izvlečkih luščin navadne in tatarske ajde. Cilj je naloge je bil ugotoviti, kateri od izvlečkov obeh vrst ajd ima učinkovitejše proti glivno delovanje.

1.3 Hipoteze

Postavili smo naslednje hipoteze:

- 1) Izvlečki iz luščin zrnja ajde zavirajo rast patogenih gliv.

- 2) Izvlečki zrnja tatarska ajde vsebujejo več skupnih fenolov kot izvlečki luščin navadne ajde.
- 3) Izvlečki zrnja tatarska ajde vsebujejo več flavonoidov kot izvlečki luščin navadne ajde.
- 4) Izvleček z večjo koncentracijo skupnih fenolov oziroma flavonoidov bo bolj učinkovito zaviral rast patogenih gliv.

2 Teoretično ozadje

2.1 O ajdi (*Fagopyrum* sp.)

Ajda (*Fagopyrum* sp.) je dvokaličnica, ki spada v družino dresnovk. Je precej drugačna od žit, ki so sicer enokaličnice in spadajo v družino trav. Kljub tej botanični razliki pa pogosto v kmetijstvu, v trgovini in predelavi ajdo uvrščamo skupaj z žiti v isto skupino, saj jo pridelujemo na podoben način, prav tako pa jo tudi uporabljamo v podobne prehranske namene kot žitarice (predvsem za moko in različne izdelke iz nje). Bližnji sorodniki ajde so številne dresni, znane plevelne rastline, med daljnimi sorodniki je tudi špinača. Je enoletna rastlina, ki se razmnožuje s semeni [3]. Najbolj gojena je navadna ajda (*Fagopyrum esculentum*), ki je razširjena v državah nekdanje Sovjetske zveze, srednji Evropi, na Kitajskem in v Ameriki [4].

Semena navadne ajde so triroba, navadno dolga od 4 do 7mm. Robovi so včasih krilati, krilca na robovih so lahko koničasta ali zaokrožena [3]. Ajdovo seme je orešek, sestavljeno je iz kalčka, endosperma in luske. Kalček je v sredini semena in postavljen na glavo glede na lego semena, včasih tik pod lusko. V kalčku s kličnima listoma je veliko beljakovin, z veliko hranilno vrednostjo. V celicah endosperma je veliko škrobnih zrn, ki so pri ajdi zelo majhna. Zunanja plast celic endosperma je enoslojna alevronska plast, debela približno 10 do 15 μm . Nad alevronsko plastjo je tanka testa, v njej so tanini in klorofil. Luska je del semena, ki je gensko identičen materni rastlini. Pri različnih vrstah ajde je različno debela [3].

V primerjavi s pšenico, sojo ali mesom so beljakovine iz ajde kakovostnejše. Zaradi vse večje ozaveščenosti ljudi o uravnoteženi prehrani in kakovosti ajdove moke, se pridelava ajde povečuje [5]. Pri procesu pridelave ajdine moke, pa njene luščine zavržemo.

Tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum*) vsebuje več flavonoidov in drugih polifenolov kot navadna ajda, ima pa tudi uravnoteženo aminokislinsko zgradbo in je kakovosten vir mineralov, vlaknin, in vitaminov B1, B2 in B6, zato je mnogo bolj zdrava od njene sestrskes vrste, visoka vsebnost rutina in kvercetina pa ji daje bolj grenak okus. Blaži negativne učinke nekaterih kroničnih bolezni, kot so diabetes, hipertenzija in hiperholesterolemija, in bolezni srca in ožilja. Navadna in tatarska ajda sta zaradi vsebnosti fenolnih snovi pomembna vira antioksidantnih lastnosti hrane. Živila, ki vsebujejo navadno ali tatarsko ajdo, so pomembna za zmanjševanje vsebnosti holesterola v krvnem serumu, vplivajo na zmanjševanje utrujenosti pri ljudeh omogočajo povečanje kapacitete pljuč. Izvlečki navadne in tatarske ajde ščitijo DNK pred poškodbami, ki jih povzročajo hidroksilni radikali. V tatarski ajdi so najvišje koncentracije kalcija v luščini [6]. Kalčki tatarske ajde (*Fagopyrum tataricum*) so se razširili po vsem svetu, tudi v vzhodno Azijo, Evropo, Avstralijo in ZDA, zaradi svoje visoke hranilne vrednosti in uporabe kot živila brez glutena za bolnike s celiakijo. Polifenoli (flavonoidi in antrakinoni) so glavne aktivne sestavine tatarske ajde. Flavonoidi kažejo antioksidativno, protitumorsko, antihipertenzivno in protivnetno delovanje, približno sedemnajst

flavonoidov pa je bilo izoliranih in identificiranih iz kalčkov tatarske ajde. Naravni antrakinoni imajo različne biološke aktivnosti, kot so antioksidativne, antibakterijske in protiglivne lastnosti več antrakinonov pa je bilo ugotovljenih tudi v semenih in kalčkih tatarske ajde [7].

2.2 Značilnosti gliv in glivnih celic

Kraljestvo gliv spada pod domeno evkariontov – pomeni, da imajo glivne celice svoje jedro. Poleg celične membrane imajo celično steno, ki je največkrat sestavljena iz hitina, nimajo pa klorofila oz. kloroplastov, zato celica spada pod heterotrofne organizme – organizme, ki si hrane ne pridelujejo sami. Enocelični ali več celični organizmi so večinoma sestavljeni iz vode (69–90%) ter ogljikovih hidratov in maščobnih lipidov [8].

Glive se pojavljajo v dveh oblikah, obliki kvasovk ali nitastih gliv. Nekatere glive se pod vplivom okolja lahko preobrazijo, takšne imenujemo dimorfne glive [9].

2.3 Problematika glivnih okužb

Glivne okužbe, ki so prisotne po vsem svetu povzročajo številna rastlinska obolenja. Nevarne so tudi za človeka, sploh ob zaužitju nekaterih vrst gliv, ki izločajo mikotoksine, saj lahko te ob zaužitju vodijo do hudih zdravstvenih težav [10].

Mikotoksini so sekundarni metaboliti gliv. Delovanje mikotoksinov lahko povzroči številne biokemijske, fiziološke ali patološke spremembe pri različnih vrstah organizmov. Spremembe vključujejo rakotvornost, imunsko toksičnost, nevrotoksičnost ali toksičnost za spolne celice. Glive, ki jih izločajo, so predvsem različne plesni in velikokrat povzročajo okužbe v prehrambeni industriji. To je predvsem odvisno od vsebnosti vlage v ozračju, pH vrednosti in temperature zraka in seveda prisotnosti spor te plesni. Ukrepi, ki naj bi preprečevali okužbo z različnimi patogenimi glivami (plesnimi) so skrbno načrtovani in izvajani z različnimi postopki in sredstvi [11]. Do sedaj je bilo odkriti preko 400 mikotoksinov, ki so predvsem metaboliti gliv iz rodov *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium* in *Penicillium* [12].

Izredno veliko gliv rodu *Fusarium* je patogenih za sadje, zelenjavo in žita. Njihovi sekundarni metaboliti se kopičijo v okuženih živilih ali krmi. Že zelo majhna količina zaužitega mikotoksina lahko povzroči hude zdravstvene težave ljudi in živali. Se pa zaradi njihovega protimikrobnega delovanja in citotoksičnosti uporabljajo kot sestavni deli pri odkrivanju novih zdravil, tudi za zdravljenje raka [13]. Glive iz rodu *Fusarium* so nasploh med najpogostejšimi in najbolj problematičnimi patogeni žitaric, ki povzročajo mnoge bolezni žit in so sposobne produkcije številnih mikotoksinov kot so fumozini, trihoteceni (npr. deoksinivalenol, T-2 toksin idr.), in zearalenon [14].

Prav tako je v okolju zelo razširjen rod gliv *Alternaria*. Tudi ta rod gliv je sposoben produkcije mikotoksinov. Večina alternarijskih toksinov ima genotoksične in citotoksične učinke [15].

Vsaka gliva ne more okužiti človeka. Za to mora izpolnjevati določene kriterije in te so življenje pri temperaturi in pH človeškega telesa, liza in prebijanje skozi površinske ovire, absorpcija tkiva in odpornost na človeško imunsko aktivnost. Kot je znano je človeški imunski sistem dokaj močan, saj se je razvil v interakciji s potencialnimi glivnimi patogeni, kar pomeni, da dokaj malo gliv izpolnjuje vse kriterije, da se lahko kljub povišani temperaturi razmnožujejo v človeškem telesu. Moramo pa poudariti, da je zaradi napredka medicinske tehnologije in farmacije človeški imunski sistem oslabljen, zato bomo ljudje vedno bolj ogroženi za okužbo z patogenimi glivami [16].

V kmetijstvu lahko glive povzročijo zmanjšanje količine celotnega pridelka, če pa se z okuženo krmo hrani živina, pa lahko glive povzročijo tudi obolenja živine. Gliva *Aspergillus flavus* je talna gliva, ki lahko okuži semenske pridelke z rakotvornim sekundarnim presnovkom aflatoksinom [17]. Aflatoksini, ki so vrsta mikotoksinov, prav tako pogosto kontaminirajo pridelke kot so arašidi, koruza, bombaževa semena, brazilski oreški, pistacije, različne začimbe [10].

Mikotoksini, ki še lahko kontaminirajo kmetijske kulturne pridelke so ohratoksini (proizvajajo jih glive iz rodov *Aspergillus* in *Penicillium*), ki kontaminira na primer pšenico, koruzo, oves, sire in mesne izdelke živine, ki ta toksin zauživajo. Prav tako patulin (ki ga prav tako proizvajata rodova *Aspergillus* in *Penicillium*), ki kontaminira predvsem sadje, tj. marelice, grozdje, breskve, jabolka, hruške, olive in sadne sokove z nizko vsebnostjo kislin, npr. hruškin, jabolčni ali grozdni sok [10].

2.4 Fenoli in njihovo delovanje

Fenoli so aromatske spojine (vsebujejo benzenov obroč) in so pogosti sekundarni metaboliti, ki jih sintetizirajo marsikateri organizmi. Predvsem pri rastlinah predstavljajo najbolj razširjeno skupino naravnih produktov. Fenolne spojine kažejo več bioloških aktivnosti, med drugim velikokrat delujejo fungicidno [18], kar pomeni, da zavirajo rast in razmnoževanje nekaterih gliv. Eden izmed potencialno zanimivih in okolju prijaznih fungicidov bi lahko bila tudi mešanica naravno prisotnih fungicidov, ki so pridobljeni iz luščine navadne in tatarske ajde. Tudi navadna in tatarska ajda sta namreč bogati s polifenoli [19], zato sklepamo, da bi lahko imeli njuni izvlečki prav tako tudi protivno delovanje. Vsi rastlinski fenoli izhajajo iz običajnega vmesnega fenilalanina ali njegovega bližnjega predhodnika šikimske kisline, ter se sintetizirajo po poti šikimske kisline v rastlinah. Lahko jih razdelimo v vsaj 10 različnih razredov na podlagi njihove splošne kemijske strukture, pri čemer je skupna značilnost vsaj ena aromatska obročna struktura z eno ali več hidroksilnimi skupinami. Obstaja veliko različnih rastlinskih (poli)fenolov, vključno s cimetovo kislino, benzojsko kislino, flavonoidi, vključno s proantocianidini, stilbeni, kumarini, lignani in lignini. V vsaki družini rastlinskih fenolov je lahko prisotnih veliko spojin [20].

2.4.1 Flavonoidi in njihovo delovanje

Flavonoidi so velika družina sintetiziranih spojin iz rastlin, ki spadajo med fenole. Naloga flavonoidov v cvetovih je, da zagotavljajo barvo in z njo privabljajo opraševalce. Na

splošno naj bi flavonoidi pri rastlinah v listih spodbujali fiziološko preživetje rastline, njeno zaščito pred glivnimi patogeni in UV-sevanjem . Več flavonoidov s fungicidnim delovanjem je bilo izoliranih iz različnih rastlin. Flavonoidi postajajo vse bolj raziskovan predmet medicinskih raziskav. O njih so poročali, da imajo številne uporabne lastnosti, vključno s protivnetnimi delovanjem, zaviranjem encimov, fungicidnim delovanjem in proti tumorskim delovanjem. Široka in nenadzorovana uporaba kemikalij in konzervansov je bil vzrok za pojav odpornosti pri mikroorganizmih, kar predstavlja danes velik svetovni problem na mnogih področjih. Posledica tega je vedno večje zanimanje za pridobivanje alternativnih protimikrobnih sredstev iz naravnih virov za najrazličnejše namene, tudi za podaljševanje roka trajanja živil. Raziskave so pokazale, da nekatere rastline vsebujejo spojine, kot so flavonoidi, ki lahko zavirajo rast mikrobov [21].

3 Materiali in metode dela

3.1 Laboratorijska oprema in seznam kemikalij

- aluminijev klorid (5 % AlCl_3)
- analitska tehtnica
- antibiotik kloramfenikol
- avtomatske pipete
- brezprašna komora
- centrifuga (Sigma 3K30)
- destilirana voda
- etanol (70 %)
- filter papir
- gojišče PDA (krompirjev dekstrozni agar)
- katehol (standard)
- metanol
- mikrocentrifugirke
- natrijev karbonat (Na_2CO_3)
- plastične petrijevke
- plinski gorilnik
- reagent Folin-Ciocalteu
- rutin (standard)
- spatule
- spektrofotometer (UV-1800 Shimadzu)
- terilnica in pestilo
- žličke

3.2 Izvor luščin zrnja navadne in tatarske ajde

Luščine zrnja navadne ajde (NA) in tatarske ajde (TA) smo pridobili iz ekološke pridelave in sicer pridelovalca Mlina Rangus (Šentjernej, Dolenjska). Eksperimenti so bili opravljeni na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin, Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete UL decembra 2022 in januarja 2023.

3.3 Priprava izvlečka

Luščine ajde smo strli s pomočjo krogličnega mlinčka, dokler nismo pridobili finega prahu. Trli smo s frekvenco 21 obratov/s, 7 minut. Nato smo v stekleno čašo natehtali 10 g finega prahu in dodali 90 mL 70 % denaturiranega etanola (Sl. 1). Za vsak izvleček smo pripravili 5 ekstrakcijskih mešanic (tj. po 5 za luščine NA in 5 za luščine TA), skupno torej 10 ekstrakcijskih mešanic (Sl. 2).



Sl. 1: Tehtanje finega prahu navadne ajde na točno 10 g z analitsko tehtnico. Avtor: Anej Cunk, 2022.



Sl. 2: Kozarčki z 10 g izvlečka in 90 mL 70% etanola pripravljeni za 24 urno stresanje. Avtor: Anej Cunk, 2022.

Tako pripravljene mešanice v steklenih posodah smo nato s pomočjo rotacijskega stresalnika stresali približno 5 dni (120 ur) pri frekvenci 130 obratov/min, na sobni temperaturi. Nato smo odpipetirali in skozi sterilni filter papir debeline 0,2 mm prefiltrirali supernatant ter tako dobili primarni izvleček (po 450 mL za vsako ajdo). Za tem smo etanol izparili s pomočjo rotavaporja (izhlapevanja pri znižanem tlaku) in tako pridobili suhi izvleček. Rotavapirali smo pri 40 °C in tlaku 100 mbar dokler ni izparel etanol. Po rotavapiranju smo dobili 1,77 g ekstrakta luščin NA in 2,16 g ekstrakta luščin TA. Ta suh izvleček smo znova raztopili v 70 % etanolu in sicer tako, da je bila končna koncentracija 1 g / 10 mL, tj. navadno ajdo smo raztopili v 17,7 mL 70 % etanola, tatarsko ajdo pa 21,6 mL 70 % etanola. Tako pridobljeni izvleček smo do nadaljnje uporabe shranili v hladilniku.

3.4 Priprava agarnih gojišč z izvlečkom

Za ugotavljanje proti glivne učinkovitosti naših izvlečkov, smo le te vmešali v agarna gojišča za glive. Pripravili smo gojišča iz krompirjevega dekstroznega agarja (angl. »potato dextrose agar« oz. PDA). Pripravili smo 2 % gojišča PDA in sicer tako, da smo zatehtali 15 g PDA in dodali 700 mm destilirane vode. Za preprečevanje rasti bakterij smo dodali 35 mg antibiotika kloramfenikola, tako da je bila končna koncentracija v gojišču 50 mg/L. Zaradi potreb našega raziskovanja je bil agarju dodan izvleček luščin

zrnja navadne oziroma tatarske ajde. Pripravili smo po 2 testni koncentraciji gojišč z izvlečki (tako za luščine navadne kot tatarske ajde) in sicer tako, da je končna koncentracija izvlečka v gojišču ustrezala 1 g/L oziroma 0,5 g/L. V kontrolno gojišče smo dodali ustrezen (ekvivalenten) volumen 70 % etanola, tako da smo izničili učinke etanola na rast gliv, čeprav je bila končna efektivna koncentracija etanola v gojiščih manjša od 1 %. To pomeni, da smo v prvo gojišče dodali 7 mL izvlečka, v drugo pa polovični volumen torej 3,5 mL (za vsako od obeh vrst ajde). V kontrolno gojišče smo vlili le 7 mL 70 % etanola. Skupaj smo torej pripravili 5 različnih gojišč in sicer: kontrolna gojišča z dodanim etanolom, gojišča z izvlečkom NA v koncentraciji 0,5 g/L, gojišča z izvlečkom NA v koncentraciji 1 g/L, gojišča z izvlečkom TA v koncentraciji 0,5 g/L, gojišča z izvlečkom TA v koncentraciji 1 g/L (Sl. 3).



Sl. 3: Kontrolna agarna gojišča (svetlejša) in agarna gojišča z dodanimi izvlečki luščin ajde (temnejša). Avtor: Anej Cunk, 2022.

3.5 Cepljenje gliv

Za namene proti glivnih testov smo izbrali sedem vrst gliv, ki se pogosto pojavljajo na kulturnih rastlinah in sicer vrste: *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria infectoria*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium graminearum* in *Fusarium oxysporum*. Glive smo pridobili iz glivne banke Skupine za fiziologijo rastlin, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete UL. Pred pričetkom proti glivnih testov smo morali najprej vse glive dvakrat zaporedoma precepiti, da smo pridobili sveže čiste kulture gliv. To smo naredi tako, da smo s pomočjo spatule izrezali približno 5 mm x 5 mm velik robni košček agarja, ki je vseboval micelij glive. Ta košček smo nato položili na sveže gojišče PDA (kontrolno) in počakali, da je gliva zrastle. Ko smo imeli čiste, sedem dni stare glivne kulture, smo te nacepili na prilagojena (prej opisana) testna gojišča, na katerih smo opazovali zaviranje rasti. Za vsako testno gojišče smo vsako glivo precepili v 5 paralelkah. Skupaj smo tako nacepili 175 testnih plošč z glivami.

3.6 Spektrofotometrične analize

Spektrofotometrija je metoda za merjenje koncentracije snovi v raztopini, ki temelji na tem, koliko neka kemična snov absorbira svetlobo z merjenjem jakosti svetlobe, ko žarek prehaja skozi raztopino vzorca. Osnovno načelo je, da vsaka spojina absorbira ali prepušča svetlobo v določenem območju valovnih dolžin. To meritev se lahko uporablja tudi za merjenje količine znane kemične snovi. Spektrofotometrijo smo uporabili za merjenje količine skupnih fenolov in flavonoidov, ki jih vsebuje ekstrakt luščin navadne in tatarske ajde.

3.6.1 Analiza vsebnosti skupnih fenolov

Za določanje vsebnosti skupnih fenolov v naših izvlečkih smo uporabili metodo določanja z uporabo Folin-Ciocalteu (FC) reagenta, merimo absorbanco pri 750 nm [22]. Kot standard smo uporabili umeritveno krivuljo z različnimi koncentracijami katehola.

Priprava vzorcev: Pripravili smo po tri vzorce za vsak izvleček in sicer tako, da smo v vsakega odpipetirali 100 μL ustrezno redčenega izvlečka, 750 μL dH_2O , ter 50 μL FC reagenta.

Priprava slepega vzorca: Za vsak izvleček smo pripravili tudi po dva slepa vzorca. V vsakega smo odpipetirali 100 μL ustrezno redčenega izvlečka in dodali 800 μL dH_2O .

Počakali smo 3 minute, nato pa vsakemu vzorcu dodali še 100 μL 20 % Na_2CO_3 pufra.

Po tem smo vzorce 60 minut inkubirali v temi (Sl. 4), ter nato s spektrofotometrom pomerili absorbanco pri 750 nm.



Sl. 4: Centrifugiranje vzorcev v ultracentrifugi. Avtor: Anej Cunk, 2023.

3.6.2 Analiza vsebnosti flavonoidov

Za določanje vsebnosti flavonoidov v naših izvlečkih smo uporabili metodo določanja z uporabo s 5 % AlCl_3 , merimo absorbanco pri 425 nm [22]. Kot standard smo uporabili standardno raztopino rutina.

Priprava vzorcev: Pripravili smo po tri vzorce za vsak izvleček in sicer tako, da smo v vsakega odpipetirali 900 μL ustrezno redčenega izvlečka, 100 μL ter dodali 5 % AlCl_3 v metanolu.

Priprava slepe probe: Za vsak izvleček smo pripravili tudi po dva slepa vzorca. V vsakega smo odpipetirali 900 μL ustrezno redčenega izvlečka in dodali 100 μL metanola.

Po tem smo vzorce 30 minut inkubirali v temi, ter nato s spektrofotometrom pomerili absorbanco pri 425 nm.

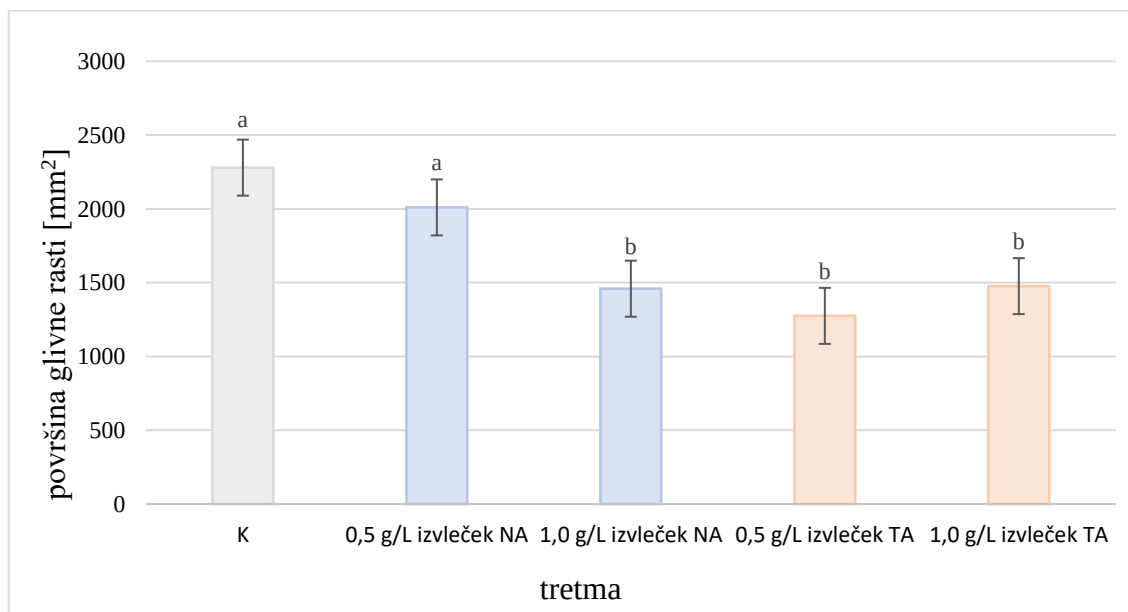
3.7 Statistična analiza

Meritve glivne rasti smo izvedli z računalniškim programom ImageJ (Fiji). Pridobljene podatke smo analizirali s programskim kompletom Statistica (Statsoft 7.0.61.0 EN) in MicroSoft Excel 2022. Izračunali smo povprečja, standardne odklone in standardne napake. Statistično značilne razlike smo določili na osnovi t-testa oziroma enosmerne analize variance (ANOVA) s Tukeyevim post-hoc testom. Grafe smo narisali v Excelu.

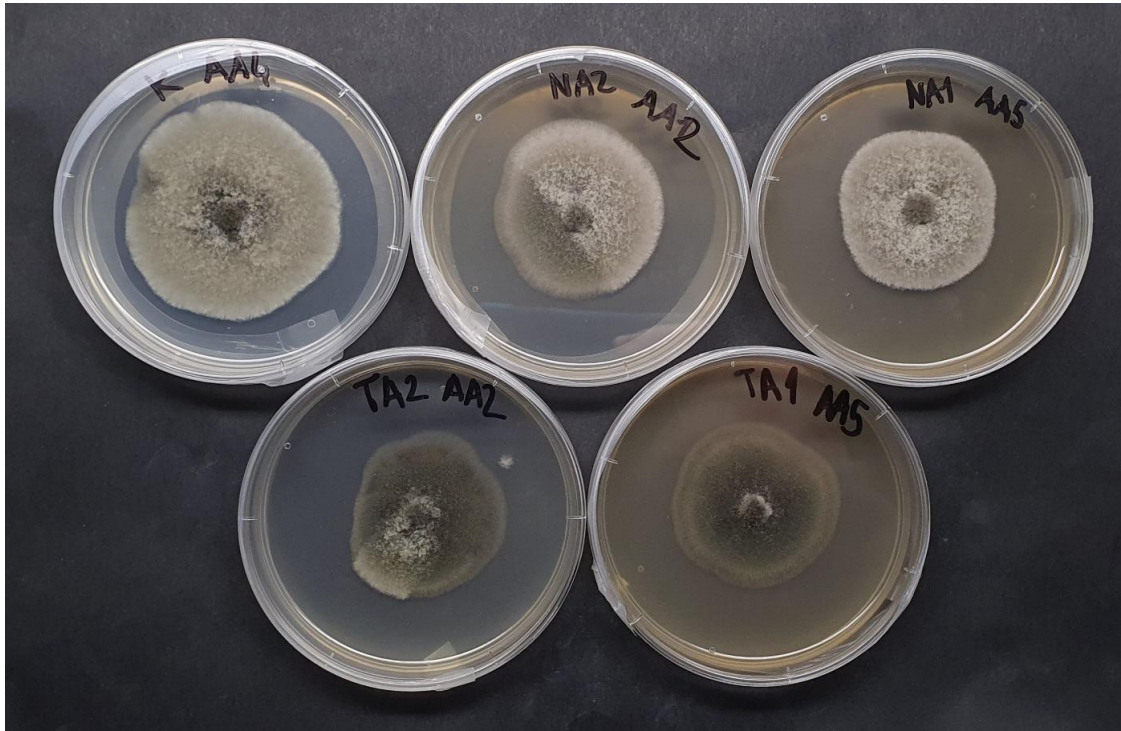
4 Rezultati z razpravo

4.1 Rast posamezne glive na različnih izvlečkih

Rast glive *Alternaria alternata* je bila zavrta v vseh primerih, razen pri manj koncentriranem (0,5 g/L) izvlečku luščin NA, kar je razvidno iz slike 5. Med bolj koncentriranim izvlečkom NA (1,0 g/L) in obema izvlečkoma TA (1,0 in 0,5 g/L) pa ni bilo razlike v učinkovitosti zaviranja rasti, ta je bila v povprečju zavrta za približno 35 % glede na kontrolo. Poleg tega pa smo opazili, da sta predvsem izvlečka luščin TA vplivala tudi na morfologijo glive *A. alternata*, saj je bila ta bolj polegla in manj puhasta (Slika 6). Rezultati so se skladali z rezultati ostalih raziskav, ki sicer niso vključevale izvlečka luščin ajde, vendar so prav tako proučevale odziv glive *A. alternata* na fenole. Tako kot fenoli iz luščin ajde, so tudi povišane koncentracije fenolov v paradižniku [23], ter izvleček fenolov iz olupka pomaranče [24] zaviralno vplivali na rast glive.

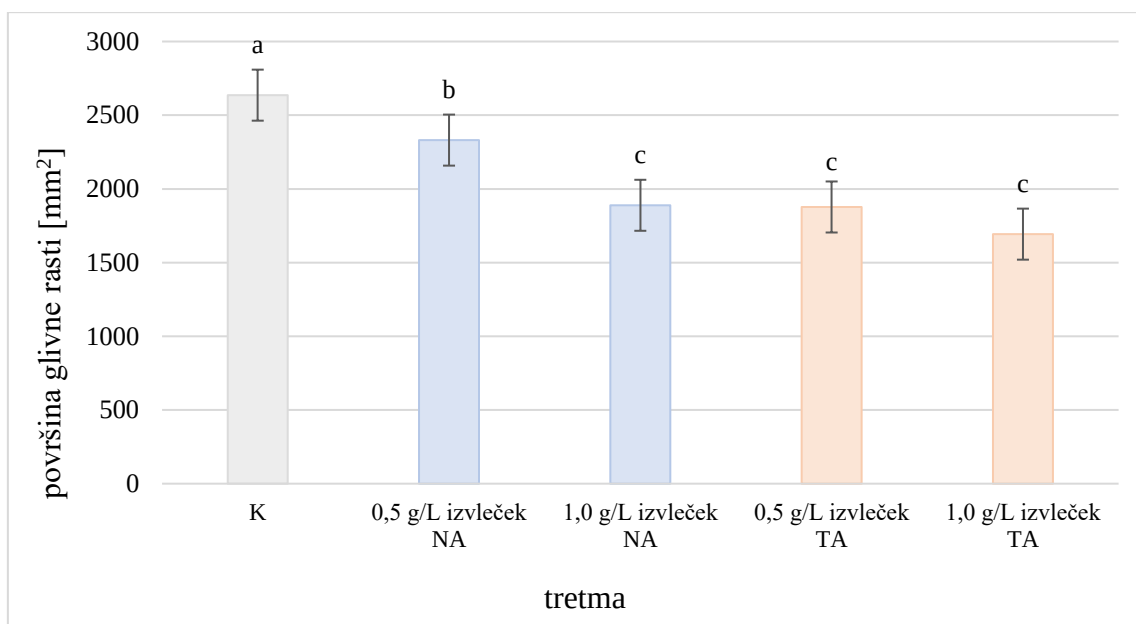


Sl. 5: Rast glive *Alternaria alternata* na kontrolnem gojišču in na gojiščih z dodanimi različnimi koncentracijami izvlečka luščin navadne ajde (NA) in tatarske ajde (TA). Prikazane so povprečne vrednosti in standardne napake (n=5). Različne črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami ($p < 0,05$, enosmerna ANOVA, Tukey-ev post hoc test).

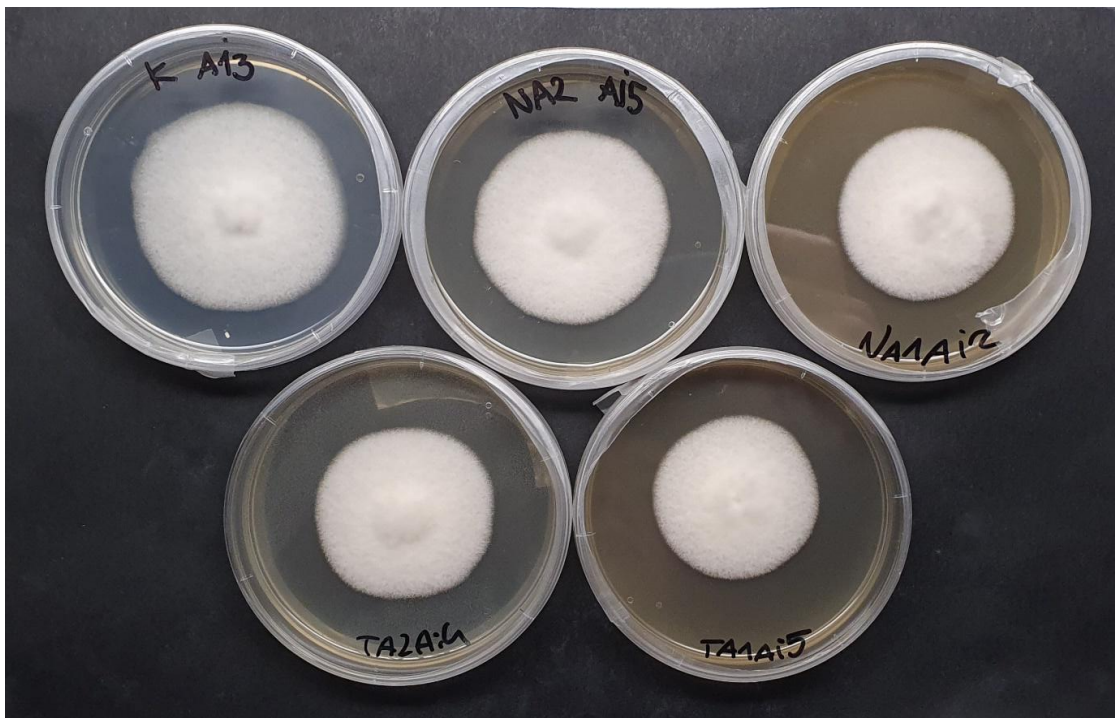


Sl. 6: Reprezentativni prikaz rasti glive *Alternaria alternata* na kontrolnem gojišču (zgoraj levo), gojišču z dodanim izvlečkom navadne ajde v koncentraciji 0,5 g/L (zgoraj sredina), gojišču z dodanim izvlečkom navadne ajde v koncentraciji 1,0 g/L (zgoraj desno), gojišču z dodanim izvlečkom tatarske ajde v koncentraciji 0,5 g/L (spodaj levo) in gojišču z dodanim izvlečkom tatarske ajde v koncentraciji 1,0 g/L (spodaj desno). Avtor: Anej Cunk, 2023.

Na rast glive *Alternaria infectoria* pa so vsi naši izvlečki delovali zaviralno (Sl. 7). Učinkovitost vpliva izvlečka v gojiščih lahko razvrstimo v dve skupini. V prvo skupino spada manj koncentriran izvleček luščin NA (0,5 g/L), ki je rast glive zaviral za približno 12 %, medtem ko so ostali izvlečki (bolj koncentriran izvleček luščin NA (1,0 g/L) in oba izvlečka luščin TA (1,0 in 0,5 g/L)) zavirali rast glive *A. infectoria* za približno 35 %. Reprezentativni predstavniki gliv na vsakem od proučevanih gojišč so prikazani na sliki 8. Na glivi *A. infectoria* ni bilo narejeno toliko raziskav, kot na njeni sorodni glivi *A. alternata*, vendar lahko primerljiv učinek na obe vrsti pripisujemo tudi podobnosti v njuni morfologiji [25].

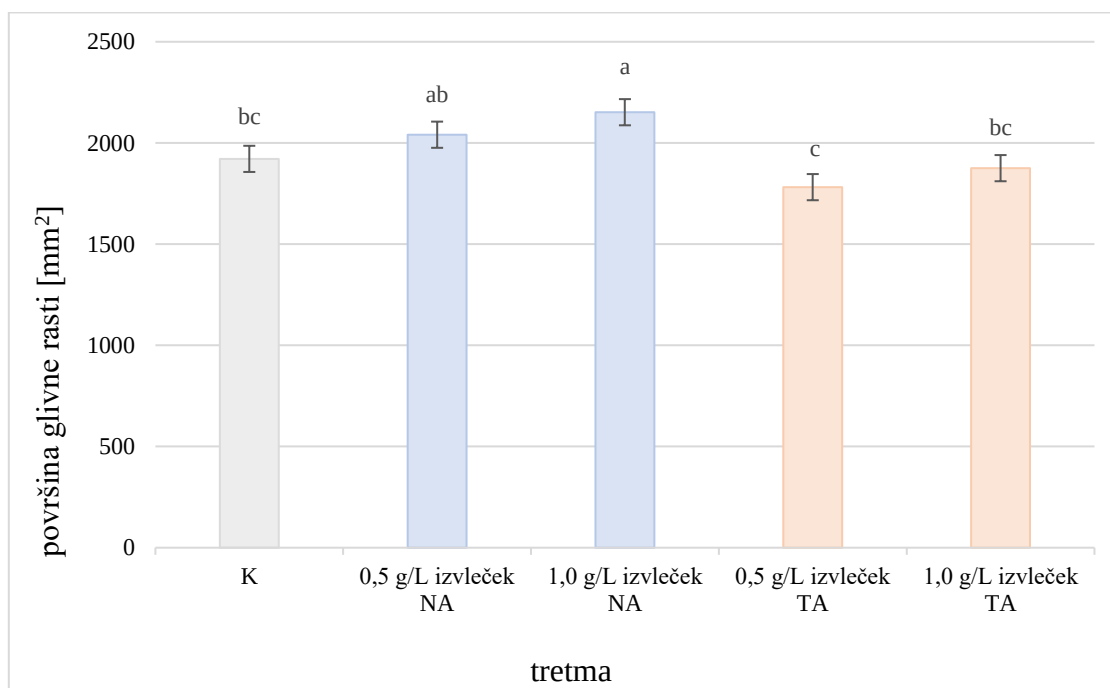


Sl. 7: Rast glive *Alternaria infectoria* na kontrolnem gojišču in na gojiščih z dodanimi različnimi koncentracijami izvlečka luščin navadne ajde (NA) in tatarske ajde (TA). Prikazane so povprečne vrednosti in standardne napake (n=5). Različne črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami ($p < 0,05$, enosmerna ANOVA, Tukey-ev post hoc test).

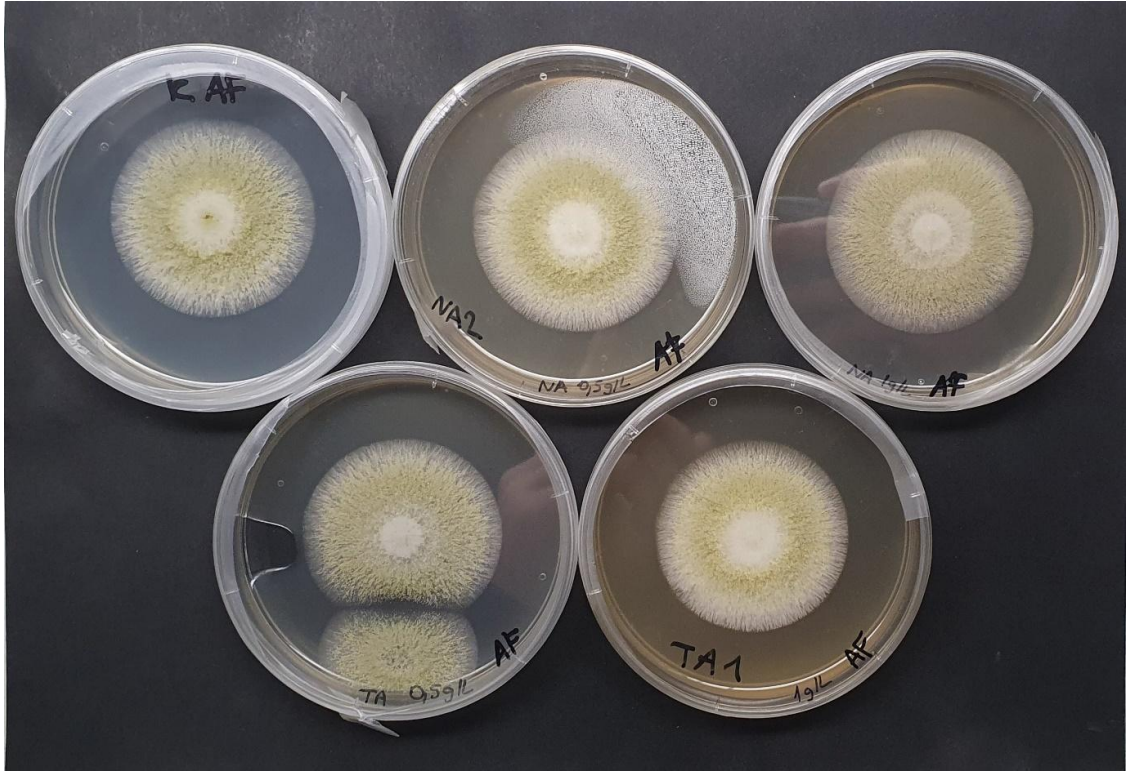


Sl. 8: Reprezentativni prikaz rasti glive *Alternaria infectoria* na kontrolnem gojišču (zgoraj levo), gojišču z dodanim izvlečkom navadne ajde v koncentraciji 0,5 g/L (zgoraj sredina), gojišču z dodanim izvlečkom navadne ajde v koncentraciji 1,0 g/L (zgoraj desno), gojišču z dodanim izvlečkom tatarske ajde v koncentraciji 0,5 g/L (spodaj levo) in gojišču z dodanim izvlečkom tatarske ajde v koncentraciji 1,0 g/L (spodaj desno). Avtor: Anej Cunk, 2023.

Glive *Aspergillus flavus* noben od proučevanih izvlečkov v gojiščih ni zaviral, kar je razvidno iz slike 9. Nasprotno, bolj koncentriran izvleček luščin NA (1,0 g/L) je celo nekoliko povečal rast omenjene glive in sicer za približno 16 % glede na kontrolo, vendar pa je to verjetno bolj posledica naključja. V nasprotju z našo raziskavo pa so Nobili in sod. [26] dokazali, da različno pripravljene izvlečki luščin zrnja ajde zavirajo rast glive *A. flavus*. V našem poskusu je bila gliva *A. flavus* tudi najbolj problematična z vidika cepljenja, saj hitro in zelo močno sporulira, zato jo je v primerjavi z ostalimi težje vzgojiti v eni sami koloniji, kar je razvidno iz slike 10.

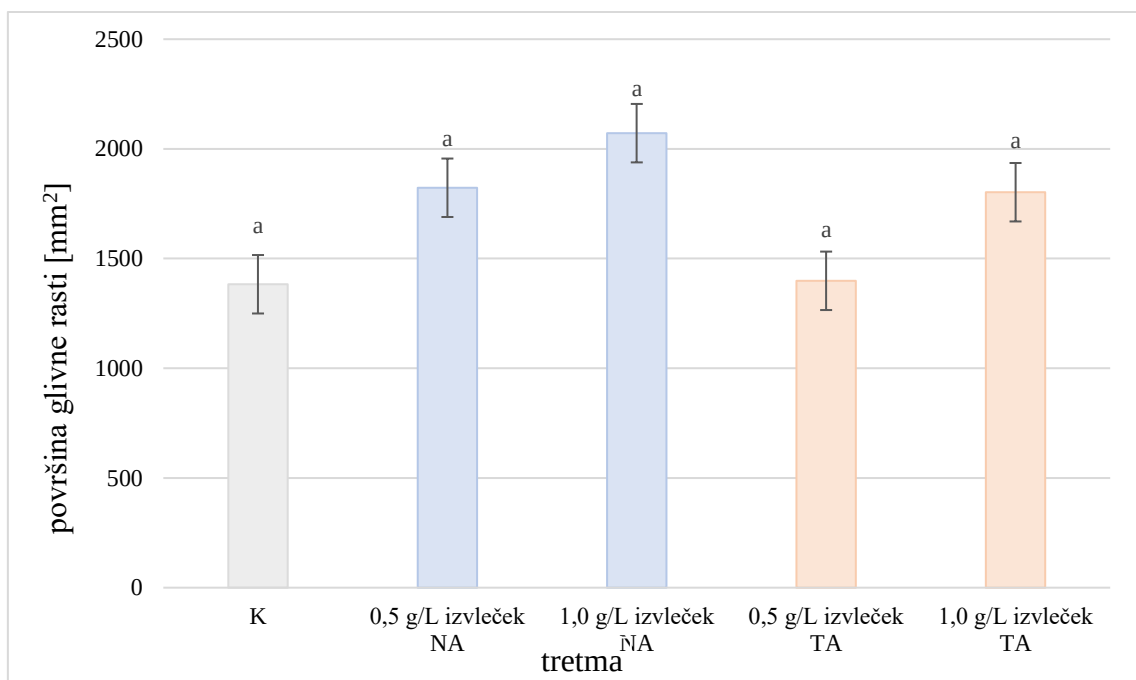


Sl. 9: Rast glive *Aspergillus flavus* na kontrolnem gojišču in na gojiščih z dodanimi različnimi koncentracijami izvlečka luščin navadne ajde (NA) in tatarske ajde (TA). Prikazane so povprečne vrednosti in standardne napake (n=5). Različne črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami ($p < 0,05$, enosmerna ANOVA, Tukey-ev post hoc test).

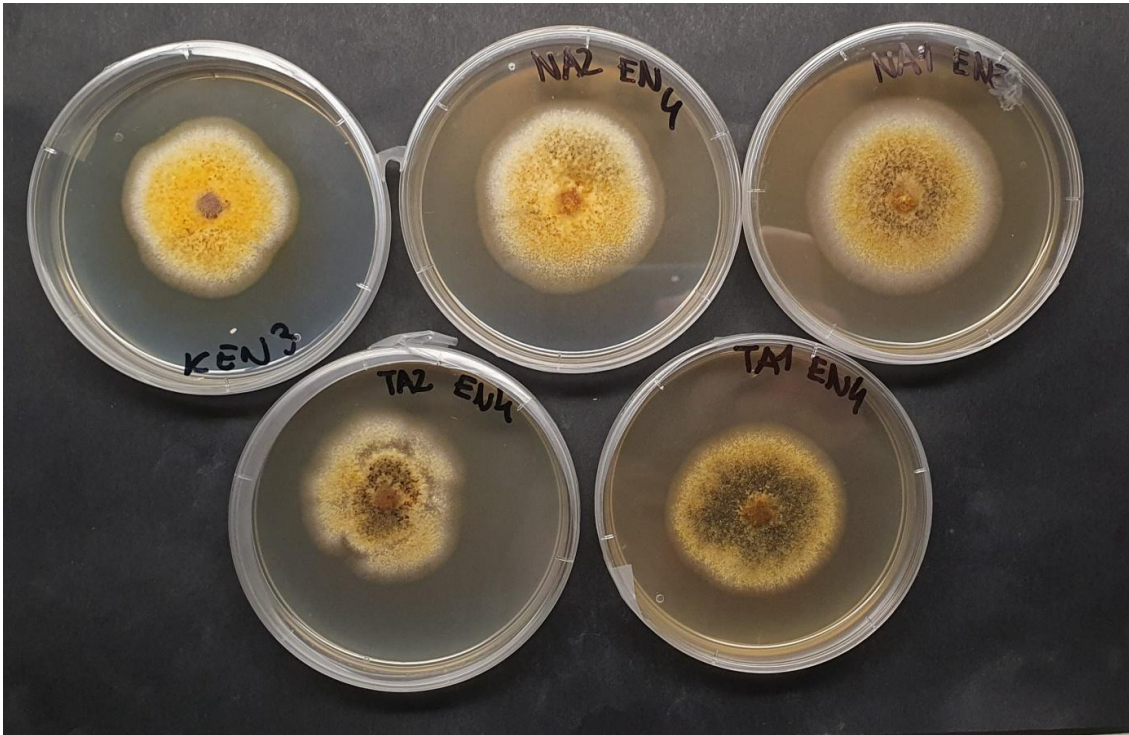


Sl. 10: Reprezentativni prikaz rasti glive *Aspergillus flavus* na kontrolnem gojišču (zgoraj levo), gojišču z dodanim izvlečkom navadne ajde v koncentraciji 0,5 g/L (zgoraj sredina), gojišču z dodanim izvlečkom navadne ajde v koncentraciji 1,0 g/L (zgoraj desno), gojišču z dodanim izvlečkom tatarske ajde v koncentraciji 0,5 g/L (spodaj levo) in gojišču z dodanim izvlečkom tatarske ajde v koncentraciji 1,0 g/L (spodaj desno). Avtor: Anej Cunk, 2023.

Glive *Epicoccum nigrum* izvleček luščin v gojiščih ni zaviral, kar je razvidno iz slike 11. Smo pa predvsem v primerih gojenja glive na izvlečkih luščin TA opazili nekoliko spremenjeno morfologijo kolonij – te so bile bolj temno obarvane v primerjavi s kontrolo (Sl. 12). Gliva *E. nigrum* je nasploh ena izmed najbolj pogostih endofitov semen rastlin [27], iz tega sklepamo, da je prilagojena na mnoge rastlinske sekundarne metabolite (tudi fenole oz. flavonoide) in zato ti verjetno na njeno rast nimajo bistvenega vpliva.

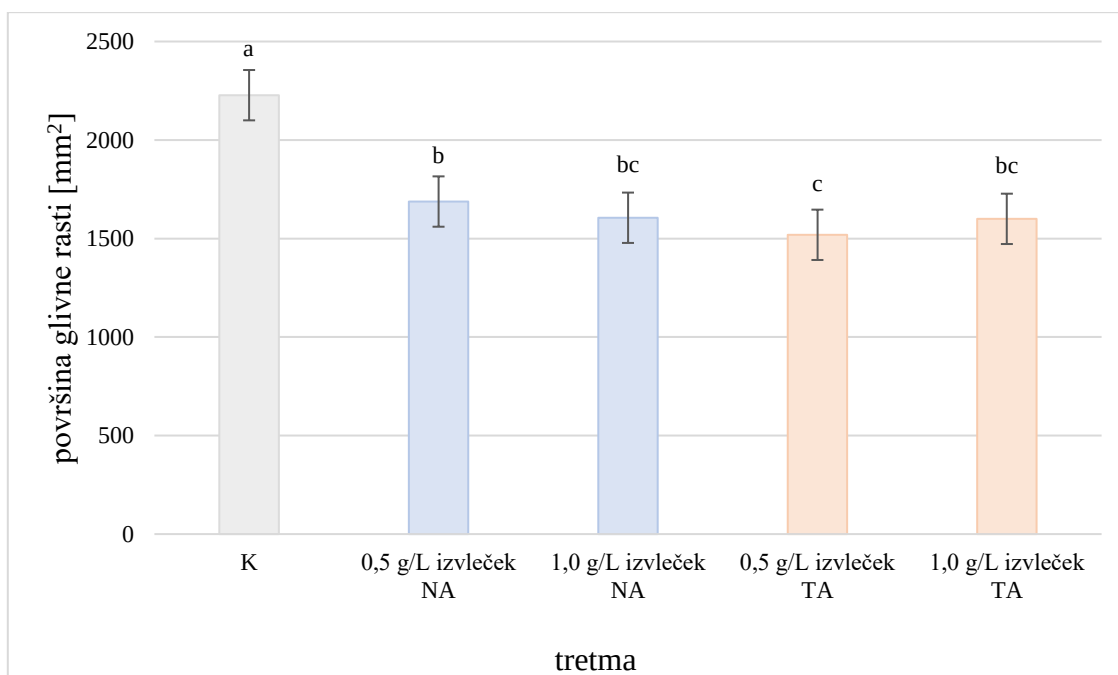


Sl. 11: Rast glive *Epicoccum nigrum* na kontrolnem gojišču in na gojiščih z dodanimi različnimi koncentracijami izvlečka luščin navadne ajde (NA) in tatarske ajde (TA). Prikazane so povprečne vrednosti in standardne napake (n=5). Različne črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami ($p < 0,05$, enosmerna ANOVA, Tukey-ev post hoc test).

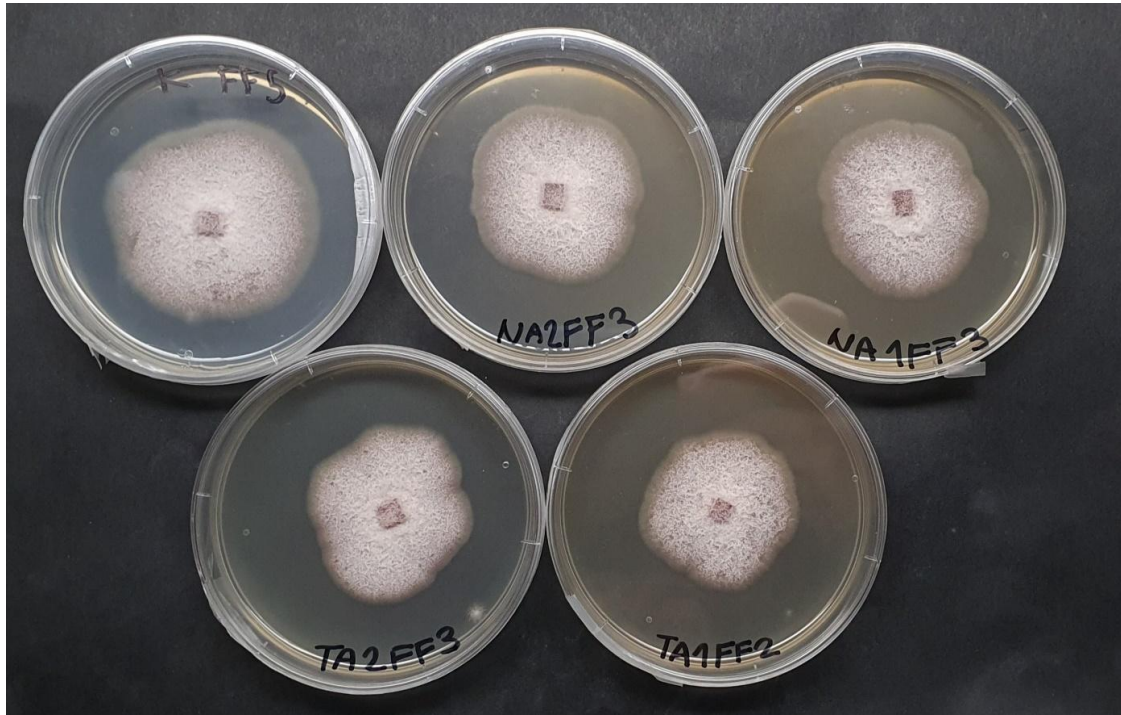


Sl. 12: Reprezentativni prikaz rasti glive *Epicoccum nigrum* na kontrolnem gojišču (zgoraj levo), gojišču z dodanim izvlečkom navadne ajde v koncentraciji 0,5 g/L (zgoraj sredina), gojišču z dodanim izvlečkom navadne ajde v koncentraciji 1,0 g/L (zgoraj desno), gojišču z dodanim izvlečkom tatarske ajde v koncentraciji 0,5 g/L (spodaj levo) in gojišču z dodanim izvlečkom tatarske ajde v koncentraciji 1,0 g/L (spodaj desno). Avtor: Anej Cunk, 2023.

Rast glive *Fusarium fujikuroi* so vsi izvlečki v gojiščih zavirali in sicer za približno 27 – 35 %, kar je razvidno iz slike 13. Statistično značilne razlike pa smo opazili le med manj koncentriranim izvlečkom NA (0,5 g/L) in manj koncentriranim izvlečkom TA (0,5 g/L). Razen razlike v velikosti kolonij, pa sprememb v morfologiji gliv nismo zaznali, kot je opazno na sliki 14. Ob pregledu literature nismo našli nobene raziskave, ki bi potrjevala zaviranje omenjene glive z izvlečkom luščin ajde. Smo pa v raziskavi, ki so jo opravili Mravlje in sod. [28] opazili, da je glivo *F. fujikuroi* zaviral hidrolat rožmarina, iz česar lahko sklepamo, da lahko rast te glive relativno dobro zaviramo z različnimi rastlinskimi izvlečki.

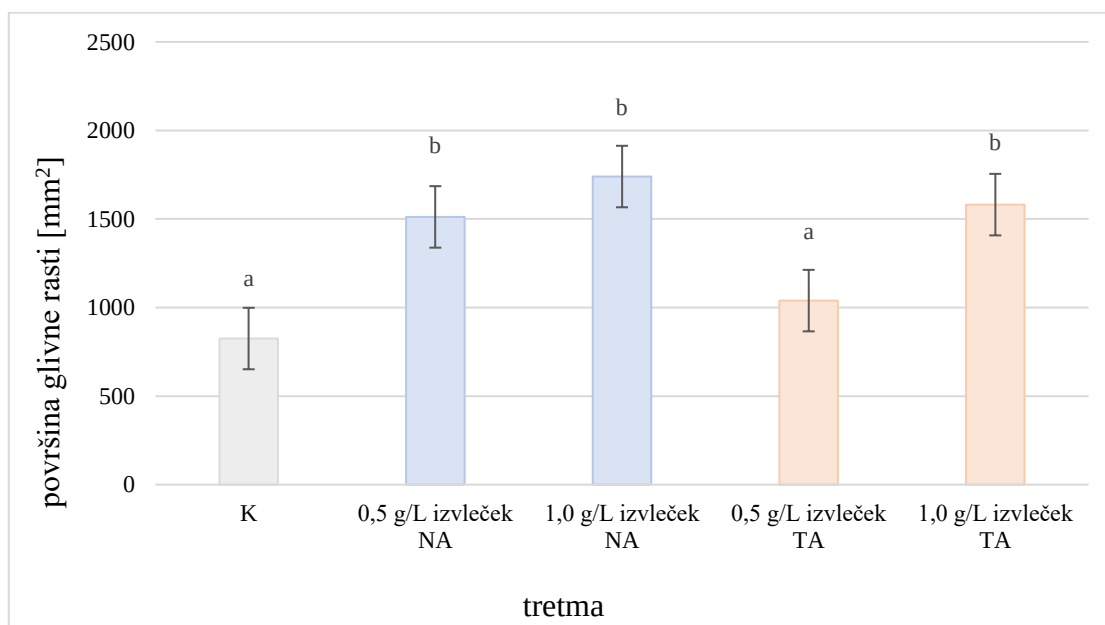


Sl. 13: Rast glive *Fusarium fujikuroi* na kontrolnem gojišču in na gojiščih z dodanimi različnimi koncentracijami izvlečka luščin navadne ajde (NA) in tatarske ajde (TA). Prikazane so povprečne vrednosti in standardne napake (n=5). Različne črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami ($p < 0,05$, enosmerna ANOVA, Tukey-ev post hoc test).

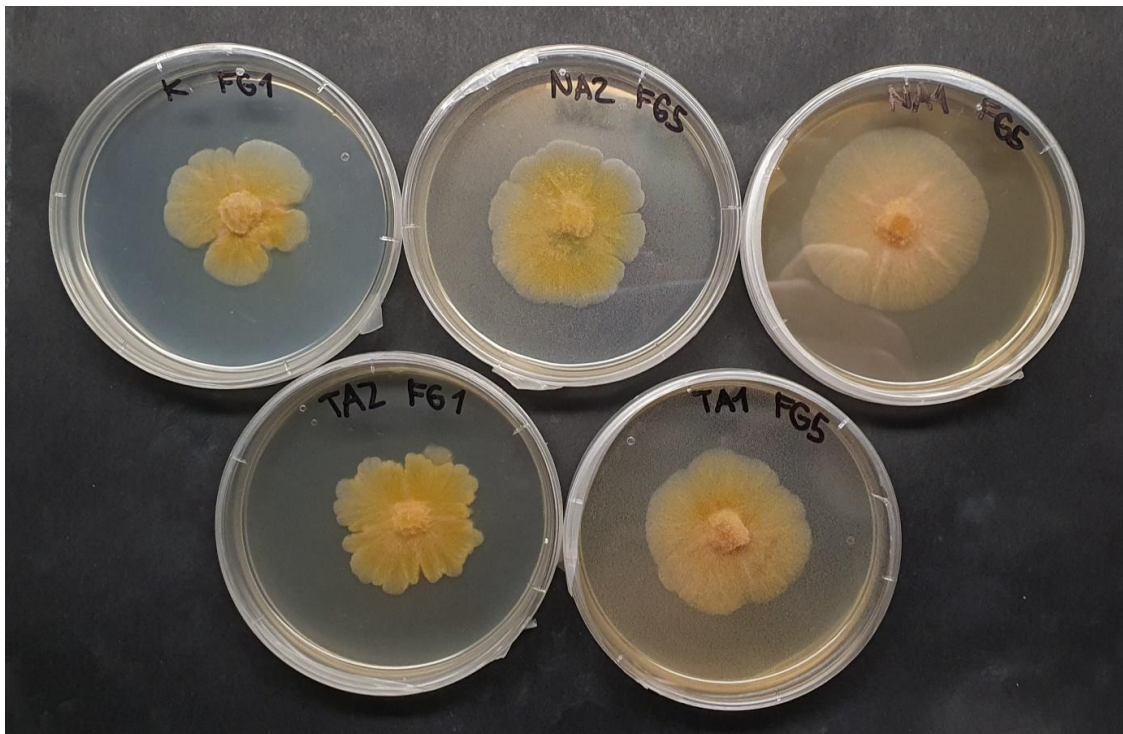


Sl. 14: Reprezentativni prikaz rasti glive *Fusarium fujikuroi* na kontrolnem gojišču (zgoraj levo), gojišču z dodanim izvlečkom navadne ajde v koncentraciji 0,5 g/L (zgoraj sredina), gojišču z dodanim izvlečkom navadne ajde v koncentraciji 1,0 g/L (zgoraj desno), gojišču z dodanim izvlečkom tatarske ajde v koncentraciji 0,5 g/L (spodaj levo) in gojišču z dodanim izvlečkom tatarske ajde v koncentraciji 1,0 g/L (spodaj desno). Avtor: Anej Cunk, 2023.

V nasprotju pa glive *Fusarium graminearum* dodatek izvlečka v gojiščih ni zaviral, v večini primerov je bila rast celo večja glede na kontrolo, kar je razvidno iz slike 15. Oba izvlečka luščin NA (1,0 g/L in 0,5 g/L) sta povzročila skoraj dvakrat hitrejšo rast v primerjavi s kontrolo, prav tako tudi bolj koncentriran izvleček TA (1,0 g/L), kar je tudi že na videz opazno na sliki 16. Gliva *F. graminearum* velja za glivo, ki je odporna proti marsikateremu umetnemu ali naravnemu fungicidu. Gliva je prav tako prisotna po vsem svetu, kar ji je omogočilo učinkovite prilaganje skozi njeno evolucijo [29]. Prav tako je prisotnih ogromno sevov te glive, z različnimi lastnostmi, ki še dodatno otežujejo njeno zaviranje [30]. Po navajanju M. Xu in sod. [31], bi lahko to glivo omejili oziroma iztrebili z pridelka le z identifikacijo genov za odpornost (v na primer pšenici) in vzgojo sort, ki so odporne proti boleznim, ki jih ta gliva povzroča.

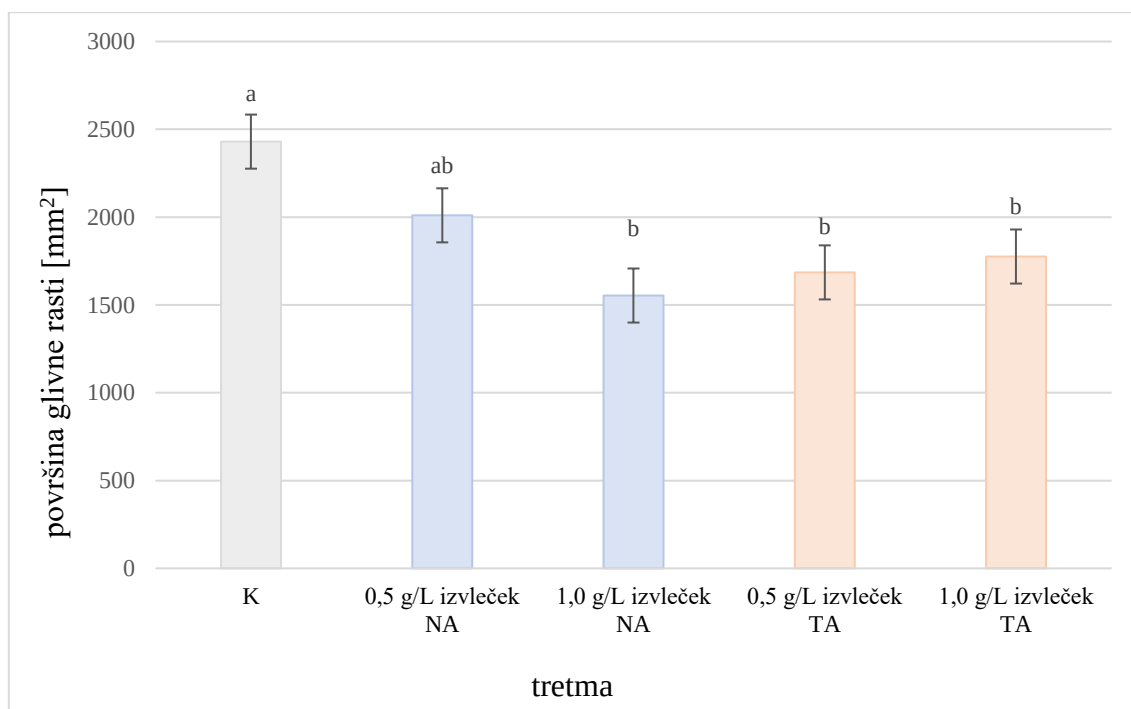


Sl. 15: Rast glive *Fusarium graminearum* na kontrolnem gojišču in na gojiščih z dodanimi različnimi koncentracijami izvlečka luščin navadne ajde (NA) in tatarske ajde (TA). Prikazane so povprečne vrednosti in standardne napake (n=5). Različne črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami ($p < 0,05$, enosmerna ANOVA, Tukey-ev post hoc test).

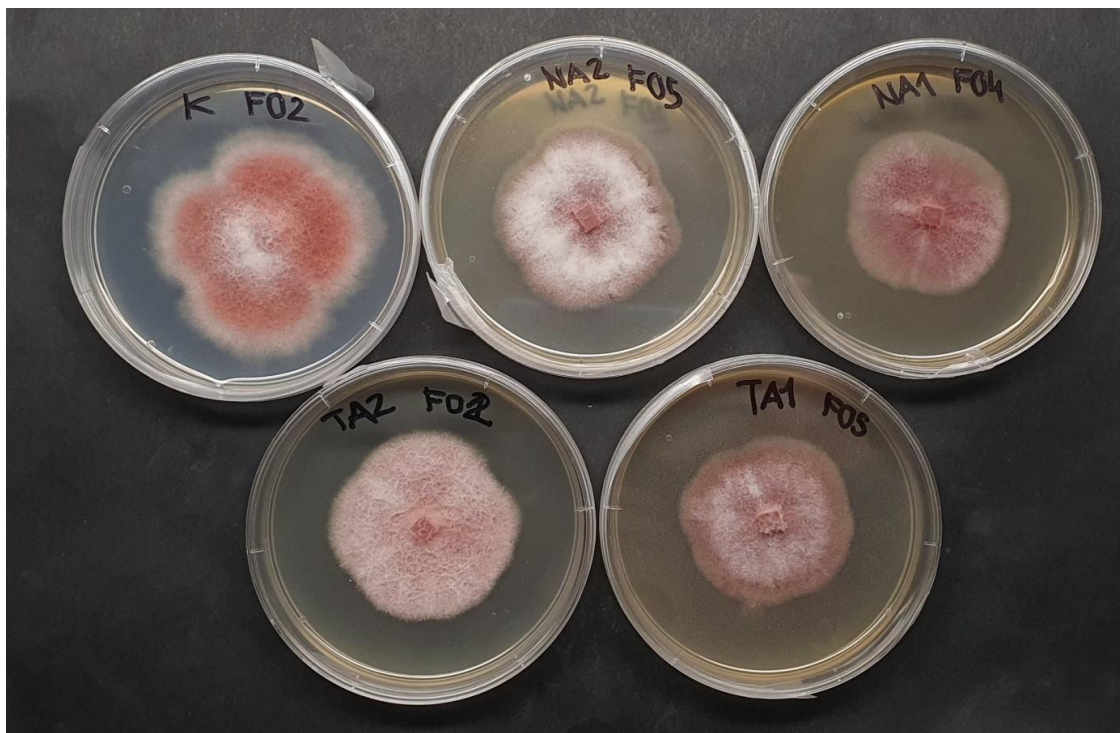


Sl. 16: Reprezentativni prikaz rasti glive *Fusarium graminearum* na kontrolnem gojišču (zgoraj levo), gojišču z dodanim izvlečkom navadne ajde v koncentraciji 0,5 g/L (zgoraj sredina), gojišču z dodanim izvlečkom navadne ajde v koncentraciji 1,0 g/L (zgoraj desno), gojišču z dodanim izvlečkom tatarske ajde v koncentraciji 0,5 g/L (spodaj levo) in gojišču z dodanim izvlečkom tatarske ajde v koncentraciji 1,0 g/L (spodaj desno). Avtor: Anej Cunk, 2023.

Na rast glive *Fusarium oxysporum* pa so vsi izvlečki, razen manj koncentriranega izvlečka NA (0,5 g/L) delovali zaviralno (Sl. 17). So pa vsi izvlečki nekoliko vplivali na morfologijo rasti glive *F. oxysporum*. V primeru manj koncentriranih izvlečkov (0,5 g/L) smo opazili nekoliko svetlejšo obarvanost kolonije, medtem ko je bila ta pri obeh bolj koncentriranih izvlečkih (1,0 g/L) bolj temno obarvana in manj puhasta (Sl. 18). Poleg izvlečka luščin ajde so Wang in sod. [32] izpostavili, da lahko glivo *F. oxysporum* potencialno zatiramo tudi preko vključevanja fitohormonov, ki imajo pomembno vlogo v obrambnem odzivu rastline ter preko receptorskih proteinov in drugih ligandov, ki so vključeni v zaznavanje patogenov.



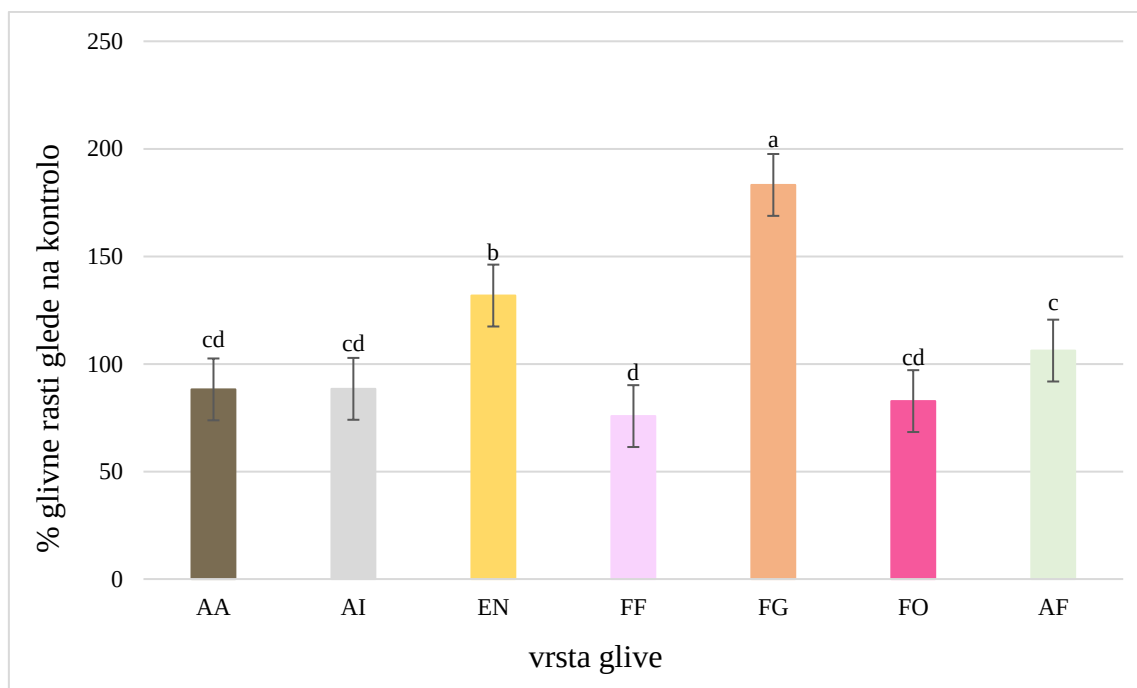
Sl. 17: Rast glive *Fusarium oxysporum* na kontrolnem gojišču in na gojiščih z dodanimi različnimi koncentracijami izvlečka luščin navadne ajde (NA) in tatarske ajde (TA). Prikazane so povprečne vrednosti in standardne napake (n=5). Različne črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami ($p < 0,05$, enosmerna ANOVA, Tukey-ev post hoc test).



Sl. 18: Reprezentativni prikaz rasti glive *Fusarium oxysporum* na kontrolnem gojišču (zgoraj levo), gojišču z dodanim izvlečkom navadne ajde v koncentraciji 0,5 g/L (zgoraj sredina), gojišču z dodanim izvlečkom navadne ajde v koncentraciji 1,0 g/L (zgoraj desno), gojišču z dodanim izvlečkom tatarske ajde v koncentraciji 0,5 g/L (spodaj levo) in gojišču z dodanim izvlečkom tatarske ajde v koncentraciji 1,0 g/L (spodaj desno). Avtor: Anej Cunk, 2023.

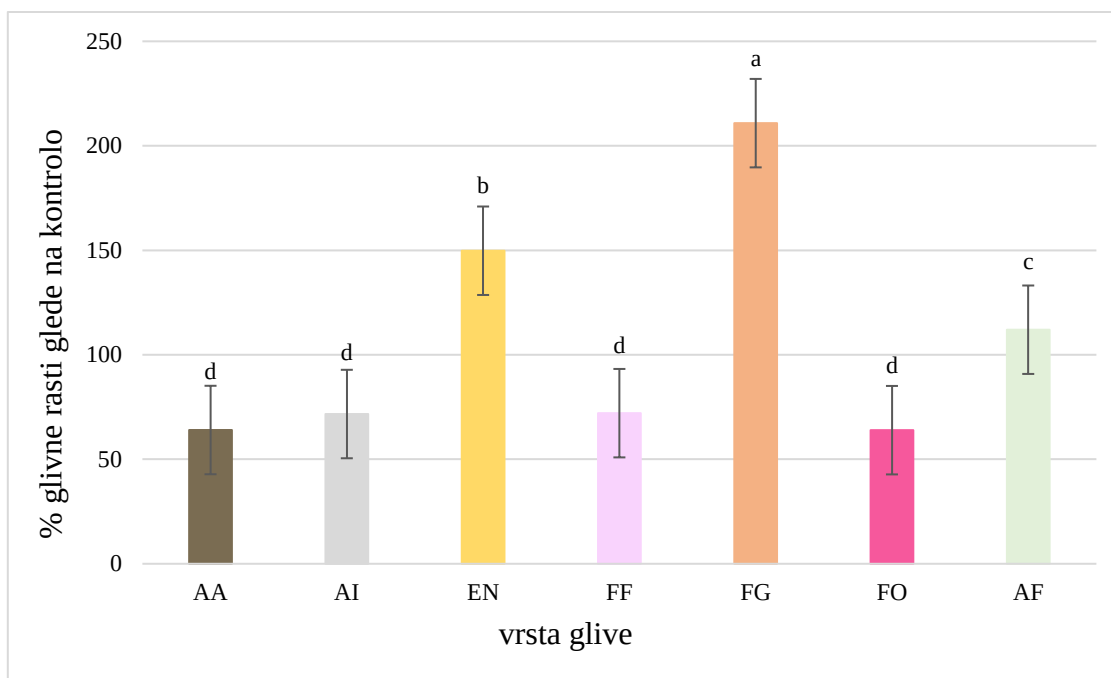
4.2 Primerjava rasti različnih gliv glede na izvleček

Nižja koncentracija izvlečkov luščin NA (0,5 g/L) je v povprečju slabše zavirala rast gliv (Sl. 19). Ta izvleček je zaviral le rast glive *F. fujikuroi*. V nasprotju, pa je celo pospeševal rast glive *F. graminearum*, in sicer za približno 80 %. To bi lahko bila posledica več prisotnih hranilnih snovi v izvlečku luščine NA. Z našo metodo ekstrakcije smo namreč poleg fenolov (flavonoidov) verjetno izločili tudi druge v etanolu topne snovi, ki se nahajajo v luščinah ajde. Prav tako pa je za glivo *F. graminearum* je značilno, da je skozi svojo evolucijo postala odporna na številne umetne in naravne fungicide [29], zato predstavlja enega izmed najbolj pogostih rastlinskih patogenov v zmernem in subtropskem pasu. Učinka na rast drugih vrst gliv pa v primeru 0,5 g/L izvlečka luščin NA nismo opazili.



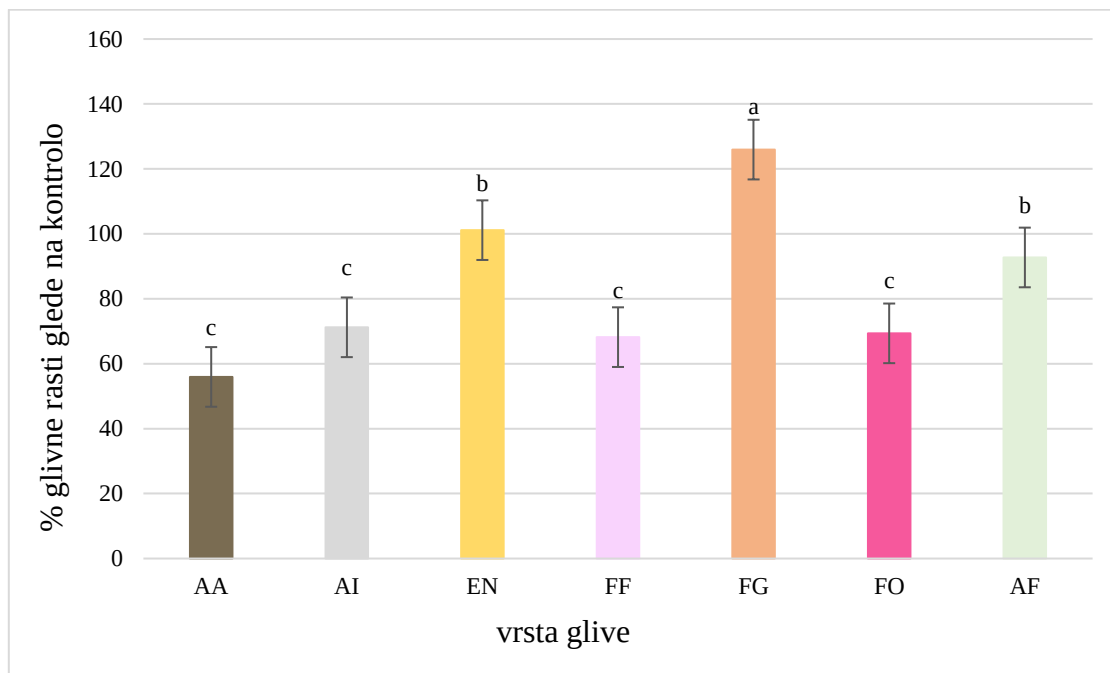
Sl. 19: Primerjava relativne rasti gliv glede na njihove kontrole na manj koncentriranem (0,5 g/L) izvlečku navadne ajde. AA – *Alternaria alternata*; AI – *Alternaria infectoria*; EN – *Epicoccum nigrum*; FF – *Fusarium fujikuroi*; FG – *Fusarium graminearum*; FO – *Fusarium oxysporum* in AF – *Aspergillus flavus*. Prikazane so povprečne vrednosti in standardne napake (n=5). Različne črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami ($p < 0,05$, enosmerna ANOVA, Tukey-ev post hoc test).

Višja koncentracija izvlečka luščin NA (1,0 g/L) je v povprečju bolje zavirala rast gliv kot nižja (0,5 g/L), saj je zavrla rast gliv *A. alternata*, *A. infectoria*, *F. fujikuroi* in *F. oxysporum* in sicer v vseh primerih za okoli 30 % (Sl. 20). Učinka pa nismo zaznali pri vrsti *A. flavus*, prav tako pa je bila, podobno kot v primeru manj koncentriranega izvlečka luščin NA (0,5 g/L) rast glive *F. graminearum* izboljšana, in sicer za več kot 100 % v primerjavi s kontrolo.



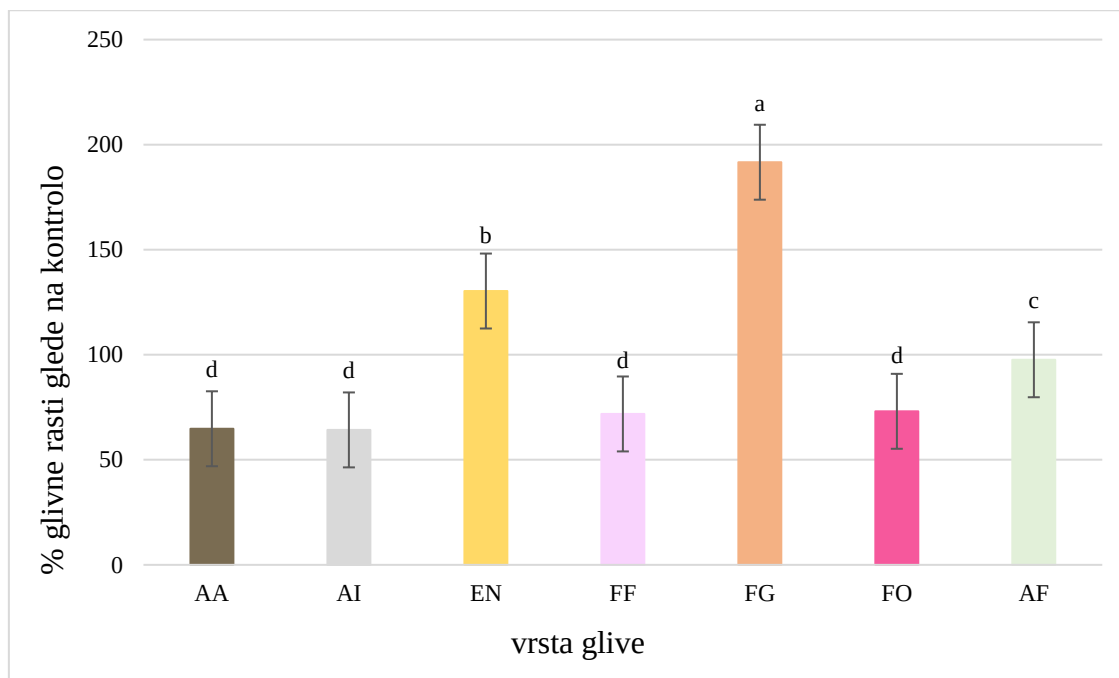
Sl. 20: Primerjava relativne rasti gliv glede na njihove kontrole na bolj koncentriranem (1,0 g/L) izvlečku navadne ajde. AA – *Alternaria alternata*; AI – *Alternaria infectoria*; EN – *Epicoccum nigrum*; FF – *Fusarium fujikuroi*; FG – *Fusarium graminearum*; FO – *Fusarium oxysporum* in AF – *Aspergillus flavus*. Prikazane so povprečne vrednosti in standardne napake (n=5). Različne črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami ($p < 0,05$, enosmerna ANOVA, Tukey-ev post hoc test).

Nižja koncentracija izvlečkov luščin TA (0,5 g/L) je v povprečju slabše zavirala rast gliv, kot višja koncentracija (1,0 g/L) (Sl. 21). Izvleček je vplival na rast gliv *A. alternata*, *A. infectoria*, *F. fujikuroi* in *F. oxysporum*. Njihovo rast je izvleček zaviral za približno 60 – 70 %. Učinka izvlečka luščin TA z nižjo koncentracijo (0,5 g/L) pa nismo zaznali pri glivah *E. nigrum*, *A. flavus* in *F. graminearum*.



Sl. 21: Primerjava relativne rasti gliv glede na njihove kontrole na manj koncentriranem (0,5 g/L) izvlečku tatarske ajde. AA – *Alternaria alternata*; AI – *Alternaria infectoria*; EN – *Epicoccum nigrum*; FF – *Fusarium fujikuroi*; FG – *Fusarium graminearum*; FO – *Fusarium oxysporum* in AF – *Aspergillus flavus*. Prikazane so povprečne vrednosti in standardne napake (n=5). Različne črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami ($p < 0,05$, enosmerna ANOVA, Tukey-ev post hoc test).

Opazili smo, da je višja koncentracija izvlečka luščin TA (1,0 g/L) rast glive *F. graminearum* pospešila za skoraj 100 % (Sl. 22). V nasprotju, ko pa je glive *A. alternata*, *A. infectoria*, *F. fujikuroi* in *F. oxysporum* zavirala za približni 60 oziroma 70 %. Na glivi *A. flavus* in *E. nigrum*, katerih rast je bila skoraj povsem enaka kontroli, pa višja koncentracija izvlečka luščin TA (1,0 g/L) ni delovala.



Sl. 22: Primerjava relativne rasti gliv glede na njihove kontrole na bolj koncentriranem (1,0 g/L) izvlečku tatarske ajde. AA – *Alternaria alternata*; AI – *Alternaria infectoria*; EN – *Epicoccum nigrum*; FF – *Fusarium fujikuroi*; FG – *Fusarium graminearum*; FO – *Fusarium oxysporum* in AF – *Aspergillus flavus*. Prikazane so povprečne vrednosti in standardne napake (n=5). Različne črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami ($p < 0,05$, enosmerna ANOVA, Tukey-ev post hoc test).

4.3 Analiza vsebnosti sekundarnih metabolitov v izvlečkih

V tabeli 1 so prikazane izmerjene vrednosti skupnih fenolov in flavonoidov izražene na gram suhega izvlečka. Kot lahko vidimo smo v obeh primerih, torej tako v vsebnosti skupnih fenolov in vsebnosti flavonoidov opazili razliko med izvlečkoma luščin NA in TA. Naša pričakovanja pri vsebnosti skupnih fenolov so bila do neke mere pravilna (TA vsebuje več skupnih fenolov), vendar pa je bila ta razlika relativno majhna in ne tako očitna kot smo pričakovali, saj je imel izvleček NA le približno 13 % manj skupnih fenolov od izvlečka TA.

Torej lahko torej potrdimo našo drugo hipotezo, ki pravi, da izvlečki luščin zrnja TA vsebujejo več skupnih fenolov kot izvlečki luščin zrnja NA. Podobne rezultate so v svoji raziskavi dobili tudi Luthar in sod. [33], ki so prav tako pokazali, da TA vsebuje več skupnih fenolov kot NA.

Večjo razliko med izvlečkoma pa smo opazili v vsebnosti flavonoidov, kjer je vsebnost le teh v izvlečku luščin TA bila večja za okoli 160 %. Večji delež flavonoidov v TA verjetno predstavlja prav rutin, ki ga uporabljamo tudi kot standard za spektrofotometrično določanje le teh. Podobno tudi drugi avtorji navajajo, da lahko TA vsebuje bistveno več rutina od NA.

S tem lahko potrdimo tudi našo tretjo hipotezo, da izvlečki luščin zrnja TA vsebujejo več flavonoidov kot izvlečki luščin zrnja NA. Visoko vsebnost flavonoidov v luščinah TA je navajala tudi Li [34], ki je poudarila pomembnost flavonoidov za zdravljenje bolnikov s sladkorno boleznijo.

Sprva smo mislili, da luščine zrnja TA vsebujejo bistveno več celokupnih fenolov, a temu ni tako. Opazili pa smo, da so očitno prav flavonoidi tisti, v vsebnosti katerih je bistvena razlika med luščinami zrnja obeh vrst ajde. Posledica tega bi bila lahko tudi razlika med vsebnostjo skupnih fenolov, kajti flavonoidi so le ena od skupin fenolov, ki jih najdemo v izvlečkih luščin zrnja ajde.

Tab. 1: Vsebnost skupnih fenolov in flavonoidov na gram suhega izvlečka luščin navadne (NA) in tatarske (TA) ajde. Prikazane so povprečne vrednosti in standardne napake (n=3). Različne črke nad stolpci prikazujejo statistično značilne razlike med skupinami (p<0,05, t-test).

	Skupni fenoli	Flavonoidi
Izvleček NA	143,3 ± 3 ^a	18,6 ± 4 ^a
Izvleček TA	163,3 ± 3 ^b	48,0 ± 3 ^b

5 Zaključek

- Vsi izvlečki luščin, torej obe koncentraciji izvlečka luščin NA (1,0 in 0,5 g/L) in obe koncentraciji izvlečka luščin TA so uspešno zavrli rast glive *Fusarium fujikuroi*.
- Bolj koncentriran izvleček luščin NA (1,0 g/L) in obe koncentraciji luščin TA (1,0 in 0,5 g/L), so uspešno zavrli rast gliv *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria* in *Fusarium oxysporum*.
- Na glivo *Aspergillus flavus* ni bilo nobenega učinka, razen rahlega izboljšanja rasti pri manjši koncentraciji izvlečka luščin navadne ajde (0,5 g/L), kar pripisujemo naključju.
- Prav nobenega vpliva ni bilo nobenega značilnega vpliva tudi na rast glive *Epicoccum nigrum*. Sklepamo, da je to posledica njenega tipičnega endofitskega značaja v mnogih rastlinskih vrstah.
- Gliva *Fusarium graminearum* je v večini primerov na gojiščih z dodanim izvlečkom ajd zrastle celo bolje od kontrole (za skoraj 100 %).
- Opazili smo, da je izvleček luščin TA vseboval več skupnih fenolov kot izvleček luščin NA. Prav tako je ta isti izvleček vseboval več flavonoidov.
- V večini primerov gliv, kjer smo opazili zaviranje rasti, se je ta pojavila pri bolj koncentriranem izvlečku luščin NA (1,0 g/L) in obema izvlečkoma luščin TA (1,0 in 0,5 g/L), tako da bi ta učinek v neki meri lahko pripisali tudi večji koncentraciji skupnih fenolov – predvsem flavonoidov, v samem izvlečku.
- Potrdili smo drugo in tretjo hipotezo, ki govorita o višji vsebnosti fenolov oziroma flavonoidov v TA. Deloma smo potrdili tudi našo prvo hipotezo (nekateri izvlečki iz luščin zrnja ajde so uspešno zavirali rast patogenih gliv). Prav tako smo deloma potrdili tudi našo četrto hipotezo (izvleček z večjo koncentracijo skupnih fenolov oziroma flavonoidov bo bolj učinkovito zaviral rast patogenih gliv), saj so izvlečki TA v večini primerov, ko je prišlo do zaviranja rasti bili bolj učinkoviti kot manj koncentriran izvleček NA, vendar pa večinoma ni bilo statističnih razlik med bolj koncentriranim izvlečkom NA in obema izvlečkoma TA.
- Naši izvlečki torej ne zavirajo rasti vseh gliv, lahko pa iz naših rezultatov sklenemo, da je višja koncentracija izvlečka luščin obeh ajd (1,0 g/L) v gojišču bolje zavira rast patogenih gliv, prav tako je izvleček TA deloval bolje že pri nižji koncentraciji v primerjavi z izvlečkom NA.

6 Viri in literatura

- [1] 24ur: Vsako minuto 250 Zemljanov več, vsak dan v Sloveniji 60 novorojenčkov <https://www.24ur.com/vsako-minuto-250-zemljanov-vec-vsak-dan-v-sloveniji-60-novorojenckov.html?bl=1> [zadnjič dostopano: 28.2. 2023, 22:18]
- [2] United Nations: Growing at a slower pace, world population is expected to reach 9.7 billion in 2050 and could peak at nearly 11 billion around 2100 <https://www.un.org/uk/desa/growing-slower-pace-world-population-expected-reach-97-billion-2050-and-could> [zadnjič dostopano: 28.2. 2023, 22:18]
- [3] KREFT, I. 1995. Ajda. Kmečki glas. Ljubljana. (str. 18, 21–22, 24–25)
- [4] ŠUMER, A. 2019. Drožomanija: Knjiga o peki kruha in peciva z drožmi. ARS VERBI. Ljubljana. (str. 40 – 41)
- [5] KREFT, I. 2020. Grenko seme tatarske ajde. Slovenska akademija znanosti in umetnosti. Ljubljana. (str. 32–34, 37–38, 42)
- [6] RUAN, J. 2020. Tartary Buckwheat: An Under-utilized Edible and Medicinal Herb for Food and Nutritional Security. Food Reviews International (str.1–15)
- [7] FAHMY N. 2018 Comprehensive review on flavonoids biological activities of Erythrina plant species. Industrlal Crops and Products.
- [8] SILVA, J. 2000. The fungal hypha. Robinson, R.; Batt, C. & Patel, P.–Encyclopedia of food microbiology. (str. 2, 850–853)
- [9] WENDLAND, J. 2001. Comparison of morphogenetic networks of filamentous fungi and yeast. Fungal Genetics and Biology. (str. 34, 63–82)
- [10] MURPHY, P. A., 2006. Food mycotoxins: an update. Journal of food science. (str. 71, R51–R65)
- [11] PLEADIN, J. 2019. Mycotoxins in food and feed. Advences in food and nutrition reasearch. (abstract)
- [12] ULGER, T. G. 2020. Genotix effects of mycotoxins. Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology. (abstract)
- [13] URBANIAK, M. 2020. *Fusarium* Cyclodepsipeptide Mycotoxins: Chemistry, Biosynthesis, and Occurrence. Toxins. (abstract)
- [14] ASAM, S. 2017. Chapter 14 - *Fusarium* Mycotoxins in Food. Science Direct. (abstract)
- [15] CHEN, A. 2021. *Alternaria* Mycotoxins: An Overview of Toxicity, Metabolism, and Analysis in Food. Journal of agriculatar and food chemistry. (abstract)
- [16] KÖHLER, J. 2017. Fungi that Infect Humans. Microbiology Spectrum. (abstract)

- [17] AMAIKE, S. 2011. *Aspergillus flavus*. Annual review of phytopathology. (abstract)
- [18] SIMONETTI, G. 2020. Antifungal Activity of Phenolic and Polyphenolic Compounds from Different Matrices of *Vitis vinifera* L. against Human Pathogens. Polyphenols and Phenolic Compounds. (chapter 3, 4)
- [19] RAGUINDIN, P. F. 2020. A systematic review of phytochemicals in oat and buckwheat. Food Chemistry. (abstract)
- [20] ARTS, I.C. 2005 Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. The American journal of clinical nutrition. (str. 317–325)
- [21] CHEPKIRUI, C. 2014. Antifungal activity of flavonoids isolated from *Monanthotaxis littoralis* against mycotoxigenic fungi from maize. Antifungal activity. (abstract)
- [22] KOVAČEC, E. 2016 Temporal changes in fungal communities from buckwheat seeds and their effects on seed germination and seedling secondary metabolism. Fungal biology. (abstract)
- [23] RUELAS, C. 2006 Changes in phenolic acid content during *Alternaria alternata* infection in tomato fruit. Journal of Phytopathology. (str. 236–244)
- [24] HERNÁNDEZ, A. 2021. Anti-fungal activity of phenolic sweet orange peel extract for controlling fungi responsible for post-harvest fruit decay. Fungal Biology. (str. 143-152)
- [25] The University of Adelaide: Mycology: *Alternaria*
<https://www.adelaide.edu.au/mycology/fungal-descriptions-and-antifungal-susceptibility/hyphomycetes-conidial-moulds/alternaria> [zadnjič dostopano: 28.2. 2023, 22:18]
- [26] NOBILI, C. 2019. Buckwheat Hull Extracts Inhibit *Aspergillus flavus* Growth and AFB1 Biosynthesis. Frontiers in Microbiology. (abstract)
- [27] LI, T. 2022. Genetic Diversity of *Epicoccum nigrum* and its Effects on *Fusarium graminearum*. Microbiology. (abstract)
- [28] MRAVLJE, J. 2022. Potential of rosemary hydrosol for effective growth inhibition of fungi isolated from buckwheat grains. Abscacta Biologica Slovenica. (str. 73)
- [29] DE CHAVES, M. A. 2022. Fungicide Resistance in *Fusarium graminearum* Species Complex. Current Microbiology. (abstract)
- [30] DEL PONTE, E. M. 2022. *Fusarium graminearum* Species Complex: A Bibliographic Analysis and Web-Accessible Database for Global Mapping of Species and Trichothecene Toxin Chemotypes. Phytopathology. (abstract)
- [31] XU, M. 2022. Combatting *Fusarium* head blight: advances in molecular interactions between *Fusarium graminearum* and wheat. BMC Phytopathology Research. (abstract)

[32] WANG, L. 2022. The *Arabidopsis thaliana*-*Fusarium oxysporum* strain 5176 pathosystem: an overview. Journal of experimental botany. (abstract)

[33] LUTHAR, Z. 2021. Tartary Buckwheat in Human Nutrition. Plants (abstract)

[34] LI, T. 2021. Flavonoids derived from buckwheat hull can break advanced glycation end-products and improve diabetic nephropathy. Food and Function. (abstract)

Zahvala

Čisto na koncu bi se rada zahvalila vsem, ki so sodelovali pri ustvarjanju raziskovalne naloge. Zahvala gre profesorici biologije na Gimnaziji Vič Evi Šajn, ki nama je sploh omogočila začetek dela in bila pripravljena biti najin mentor na tem podvigu. Zahvala gre tudi somentorju iz Biotehniške fakultete v Ljubljani iz oddelka za biologijo asist. Juretu Mravlje, ki nama je pomagal pri sestavi samega problema in organizaciji dela. S skupnimi močmi smo naredili dokaj obsežno raziskovalno nalogo in jo tudi napisali in interpretirali rezultate. V veliko pomoč je bila tudi študentka Neja Bizjak, ki je bila prisotna in nama je pomagala pri laboratorijskem delu. Poskrbela pa je tudi za izvedbo zahtevnejših tehnik.

Hvala!

Delo je bilo opravljeno v okviru programske skupine Biologija rastlin (P1-0212) in projekta Alternativni pristopi k zagotavljanju kvalitetnega in varnega mikrobioma ajde (J1-3014), ki ju financira ARRS.