

Determination of allelopathy *Centaurea cyanus* seeds by using bioassays

Wykrywanie potencjału allelopatycznego nasion *Centaurea cyanus* za pomocą biotestów

Katarzyna Marczevska-Kolasa, Tomasz Sekutowski, Marcin Bortniak

Summary

The aim of the studies was to determine (by using two types of test) the allelopathic effect of *Centaurea cyanus* achenes on *Triticum aestivum* and *Secale cereale* germination, seedling growth and plant development. A modified test PhytotoxkitTM was used for the experiments. Research objects were assay plates with *C. cyanus* seeded in the number of 5, 10 and 15 pieces per each cereal grain. On the control plates only cereal grains were seeded.

The same experimental design was used in the case of using traditional bioassay to determine the influence of different amount of cornflower seeds in plant height and fresh weight of crops. Both tests were carried out in three separate experimental series, each in three replications. The obtained results showed that neighbourhood of *C. cyanus* seeds differentiated root length, height and fresh weight of aboveground parts of *T. aestivum* and *S. cereale* plants. Cornflower achenes decreased fresh weight of winter wheat by 16–20% in comparison to the control. A stimulating effect of the tested weed species on growth and development of rye plants was stated. Winter wheat was a more sensitive species to the neighbourhood of *C. cyanus* seeds than rye.

Key words: allelopathy, achene, *Centaurea cyanus*, winter wheat, winter rye

Streszczenie

Celem badań było określenie, za pomocą dwóch biotestów, wpływu niełupek *Centaurea cyanus* znajdujących się w bliskim sąsiedztwie ziarniaków *Triticum aestivum* i *Secale cereale* na ich zdolność kiełkowania, wzrost korzeni zarodkowych oraz późniejszy rozwój roślin. W doświadczeniu użyto zmodyfikowanego testu PhytotoxkitTM. Obiekty badawcze stanowiły płytki testowe z wysianymi nasionami *C. cyanus* po 5, 10 i 15 sztuk na każdy ziarniak *T. aestivum* i *S. cereale*. Na obiekcie kontrolnym wysiano tylko ziarniaki zbóż. Taki sam układ doświadczenia przeprowadzono metodą tradycyjnego biotestu, w którym określano wpływ różnej ilości nasion *C. cyanus* na wysokość i świeżą masę roślin uprawnych. Oba testy przeprowadzono w 3 niezależnych seriach, każda w 3 powtórzeniach. Uzyskane wyniki badań wykazały, że sąsiedztwo nasion *C. cyanus* różnicowało długość korzeni oraz wysokość i masę części nadziemnych *T. aestivum* i *S. cereale*. Sąsiedztwo nasion chabra wpłynęło istotnie na redukcję świeżej masy części nadziemnych *T. aestivum*. Pszenica ozima okazała się gatunkiem bardziej wrażliwym na sąsiedztwo niełupek *C. cyanus* niż żyto. Zaobserwowano stymulujący wpływ niełupki *C. cyanus* na wzrost i rozwój roślin żyta.

Słowa kluczowe: allelopatia, niełupka, *Centaurea cyanus*, pszenica ozima, żyto

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
Zakład Herbologii i Technik Uprawy Roli
Orzechowa 61, 50-540 Wrocław
k.marczevska@iung.wroclaw.pl

Wstęp / Introduction

W fitocenozie zjawisko wzajemnego oddziaływania (pozytywnego lub negatywnego) w postaci wydzielania do środowiska związków chemicznych o charakterze allelopatyn jest bardzo rozpowszechnione. Rośliny potrafią oddziaływać na inne gatunki roślin poprzez związki chemiczne zwane kolinami, które w sposób inhibicyjny lub stymulujący wpływają na ich kiełkowanie oraz wzrost i rozwój (Biały i wsp. 1990; Ohno i Doolan 2001; Majchrzak 2007). Najzasobniejszymi w allelopatyny organami roślin wyższych są liście, w następnej kolejności korzenie, a najmniej allelozwiązków zawierają nasiona (Gniazdowska i wsp. 2004). Jednak w ostatnich latach pojawiło się wiele doniesień literaturowych wskazujących na istotną rolę (inhibicyjną lub stymulacyjną) allelopatyn uwalnianych do środowiska glebowego przez nasiona (Suman i wsp. 2002; Majchrzak 2007; Marczevska-Kolasa i wsp. 2010).

Centaurea cyanus jest gatunkiem bardzo często zachwaszczającym rośliny zbożowe, o dużej produktywności nasion wynoszącej od 700 do 1600 sztuk z jednej rośliny. Cechą charakterystyczną tego taksonu jest fakt, że jego nasiona znajdujące się w glebie zachowują zdolność kiełkowania nawet przez okres 5–10 lat. Ponadto, niełupki będące się w glebie w bliskim sąsiedztwie ziarniaków zbóż, kiełkują niemal równocześnie, przez co już w początkowym okresie rozwoju konkurują z nimi o przestrzeń życiową.

Powszechnie występujące zjawisko allelopatii wśród roślin wymaga ciągłego poszukiwania uniwersalnych i prostych sposobów jego identyfikacji, które powinny sprawdzać się zarówno w przypadku badań z użyciem wyciągów roślinnych, jak i nasion. Powstaje pytanie, czy test PhytotoxkitTM oraz tradycyjny biotest będą metodami przydatnymi w identyfikacji oddziaływań allelopatycznych nasion roślin?

Celem badań była ocena przydatności dwóch biotestów do wykrywania oddziaływań allelopatycznych nasion *C. cyanus* na wzrost i rozwój *Triticum aestivum* i *Secale cereale*.

Materiały i metody / Materials and methods

Doświadczenie przeprowadzono przy użyciu zmodyfikowanego testu kiełkowania i wczesnego wzrostu roślin – PhytotoxkitTM oraz tradycyjnego testu doniczkowego.

W bioteście PhytotoxkitTM płytki testowe wypełniono piaskiem o średnicy 0,6–0,8 mm i nasączono 25 ml wody destylowanej. Następnie płytki przykryto papierowym filtrem i wysiano ziarniaki *T. aestivum* (odmiana Bogatka) oraz *S. cereale* (odmiana Walet), w ilości 5 szt./płytke. Obiektami badawczymi były płytki testowe z wysianymi niełupkami *C. cyanus* zawierającymi po 5, 10 i 15 sztuk na każdy ziarniak zboża. Obiekt kontrolny stanowiły płytki, na których wysiano tylko pszenicę ozimą i żyto. Tak przygotowane testy inkubowano w pozycji pionowej, w temperaturze 25°C, bez dostępu światła, przez okres 72 godzin. Rejestracji obrazu dokonano przy pomocy aparatu cyfrowego. Oceniano zdolność kiełkowania ziarniaków *T. aestivum* i *S. cereale* oraz wykonano pomiary długości korzeni za pomocą programu analizy obrazu Image Tools.

Analogiczny układ doświadczenia przeprowadzono metodą tradycyjnego biotestu. Do doniczek o średnicy 10 cm wysiano ziarniaki zbóż w ilości 5 szt./doniczkę oraz zależnie od obiektu po 5, 10 i 15 sztuk niełupek *C. cyanus* na każdy ziarniak. Obiekt kontrolny stanowiły doniczki zawierające same ziarniaki *T. aestivum* i *S. cereale*. Doniczki wypełniono glebą pobraną z wierzchniej warstwy pola uprawnego, o pH 5,5 i zawartości próchnicy 1%. Biotest przeprowadzono w warunkach szklarniowych, w temperaturze 25°C.

Po upływie 7 dni od siewu określano wpływ różnej ilości niełupek *C. cyanus* na wschody roślin uprawnych, a po upływie 4 tygodni dokonano pomiarów wysokości i świeżej masy części nadziemnych *T. aestivum* i *S. cereale*.

Każdy z testów przeprowadzono w 3 niezależnych seriach, po 3 powtórzenia w serii. Wyniki opracowano statystycznie, określając istotność różnic testem Tukeya, przyjmując poziom istotności $\alpha = 0,05$.

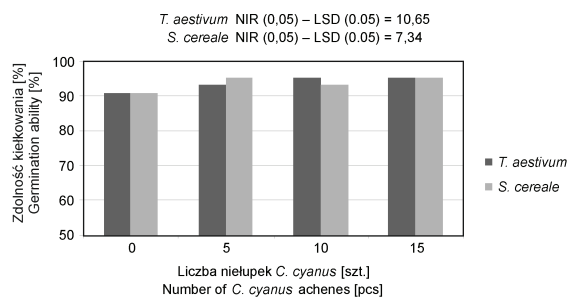
Wyniki i dyskusja / Results and discussion

1. Mikrobiotest PhytotoxkitTM

Podstawowym przeznaczeniem testu PhytotoxkitTM są badania ekotoksykologiczne różnych ksenobiotyków znajdujących się w glebie lub osadach. Polega on na pomiarach zdolności kiełkowania nasion roślin testowych i szybkości wzrostu korzeni. Dużą zaletą tego testu jest szybkość uzyskania wyników (nawet już po upływie 3 dni od wysiania nasion) oraz łatwość wykonywania pomiarów dzięki wykorzystaniu metody analizy obrazu (Phytotoxkit 2004). Badania z użyciem testu PhytotoxkitTM pozwalają dodatkowo na wykrywanie pozostałości herbicydów w glebie (Sekutowski i Sadowski 2009) oraz na ocenę ewentualnych zależności allelopatycznych między roślinami (Sekutowski i Bortniak 2009). Wyniki badań przeprowadzonych tą metodą wskazują, że sąsiedztwo niełupek *C. cyanus* nie powodowało istotnych różnic w zdolności kiełkowania ziarniaków *T. aestivum* i *S. cereale*, niezależnie od stopnia zagęszczenia nasion chabra. Obie rośliny testowe wykazały podobną zdolność kiełkowania wynoszącą około 95%. Najniższą wartość (91%) uzyskano na obiekcie kontrolnym (rys. 1).

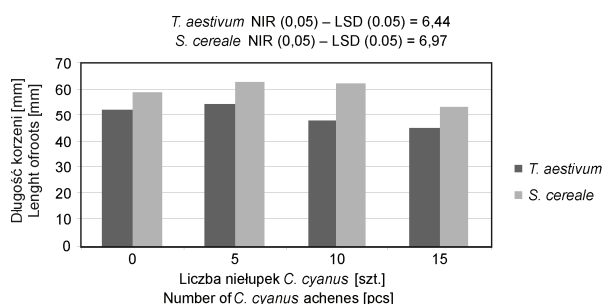
Obecność nasion *C. cyanus*, nie wpłynęła istotnie na wzrost korzeni *T. aestivum* w porównaniu do siewu czystego, niezależnie od liczebności niełupek. Istotne różnice w długości korzeni zaobserwowano jedynie pomiędzy obiektami, na których wysiano po 5 i 15 szt. niełupek/ziarniak pszenicy. Długość korzeni na tych obiektach wynosiła odpowiednio 54,3 i 44,7 mm.

Odminną reakcję na sąsiedztwo niełupek *C. cyanus* zaobserwowano w przypadku *S. cereale*. Pomiary długości korzeni wykazały niewielką stymulację wzrostu na obiektach, na których wysiano 5 i 10 szt. niełupek/ziarniak żyta. Długość korzeni wynosiła odpowiednio 63,1 mm i 61,9 mm, jednak nie były to statystycznie istotne różnice w odniesieniu do obiektu kontrolnego (58,8 mm). Największe zagęszczenie niełupek chabra (15 szt./ziarniak) powodowało zahamowanie wzrostu korzeni *S. cereale* do 53,6 mm (rys. 2).



Rys. 1. Wpływ liczebności niełupek *C. cyanus* na zdolność kiełkowania *T. aestivum* i *S. cereale* przy użyciu Phytotoxkit™

Fig. 1. Influence of *C. cyanus* achenes number on germination ability of *T. aestivum* and *S. cereale* by using Phytotoxkit™



Rys. 2. Wpływ liczebności niełupek *C. cyanus* na długość korzeni *T. aestivum* i *S. cereale* przy użyciu Phytotoxkit™

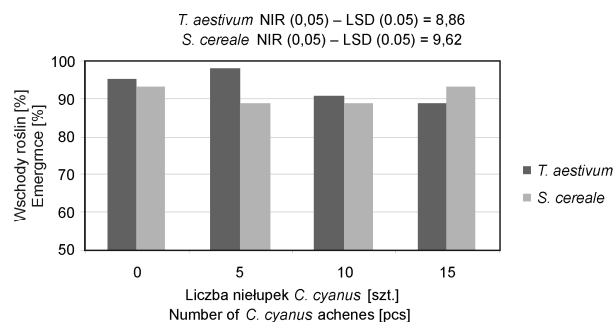
Fig. 2. Influence of *C. cyanus* achenes number on length of *T. aestivum* and *S. cereale* roots by using Phytotoxkit™

2. Tradycyjny test biologiczny (doniczkowy)

Klasyczny test biologiczny jest najbardziej popularną i uniwersalną metodą pozwalającą określić bezpośredni wpływ różnych czynników stresowych na wzrost i rozwój roślin. Biotest jest wykorzystywany między innymi w badaniach skuteczności herbicydów w niszczeniu chwastów oraz do identyfikacji odporności chwastów na herbicydy (Rola i wsp. 2006). Umożliwia on oszacowanie reakcji rośliny na różne substancje aktywne herbicydów poprzez pomiary wysokości roślin, czy ubytek świeżej lub suchej masy części nadziemnych. Metodę tę można również wykorzystać w badaniach zależności allelopacyjnych między roślinami (Sekutowski i Bortniak 2011).

Doświadczenie przeprowadzone metodą tradycyjnego testu biologicznego nie potwierdziło wpływu niełupek *C. cyanus* na wschody *T. aestivum* i *S. cereale*. W przypadku pszenicy ozimej na obiekcie kontrolnym uzyskano wschody na poziomie 95% roślin, a na obiektach badanych od 89% (15 szt. nasion chabra/ziarniak pszenicy) do 98% (5 szt./ziarniak). *S. cereale* charakteryzowało się bardziej wyrównanymi wschodami wynoszącymi od 89% do 93% (rys. 3).

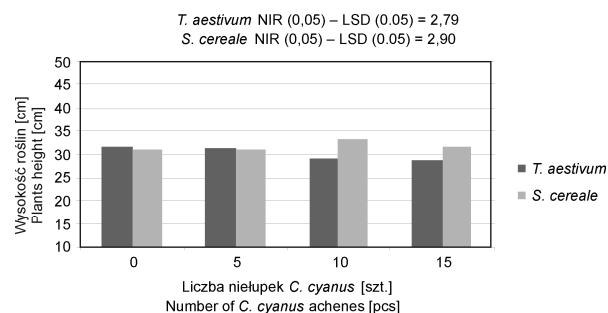
Wysokość roślin testowych rosnących w obecności *C. cyanus* nie różniła się istotnie w porównaniu do obiektu kontrolnego (rys. 4). Rośliny *T. aestivum* rosnące bez obiektów badanych, wraz ze zwiększeniem liczebności obecności *C. cyanus* osiągnęły wysokość 31,5 cm. Na niełupek chabra przypadających na ziarniak pszenicy, zaobserwowano zahamowanie wzrostu rośliny testowej do



Rys. 3. Wpływ liczebności niełupek *C. cyanus* na kiełkowanie *T. aestivum* i *S. cereale* przy użyciu testu biologicznego

Fig. 3. Influence of *C. cyanus* achenes number on germination ability of *T. aestivum* and *S. cereale* by using bioassays

28,8 cm (przy 15 szt. niełupek/ziarniak). Wysokość roślin *S. cereale* była bardziej zróżnicowana. Zagęszczenie 5 szt. nasion chabra/ziarniak nie wpłynęło istotnie na zahamowanie wzrostu rośliny testowej, a żyto osiągnęło wysokość zbliżoną do roślin kontrolnych (30,9 cm). W porównaniu do tych obiektów, zwiększanie liczebności niełupek *C. cyanus* spowodowało niewielką stymulację wzrostu żyta do około 33 cm – przy zagęszczeniu wynoszącym 10 szt./ziarniak (rys. 4).



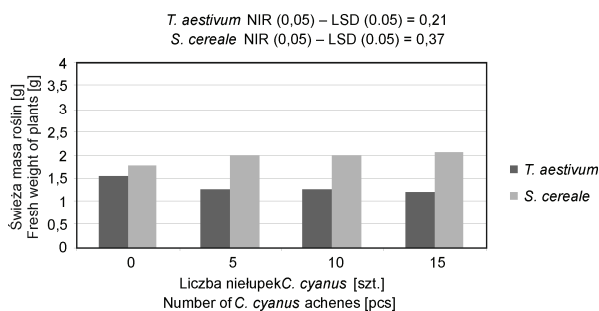
Rys. 4. Wpływ liczebności niełupek *C. cyanus* na wysokość roślin *T. aestivum* i *S. cereale* przy użyciu testu biologicznego

Fig. 4. Influence of *C. cyanus* achenes number on height of *T. aestivum* and *S. cereale* plants by using bioassays

Obecność nasion chabra bławatka w większym stopniu wpłynęła na późniejszy wzrost *T. aestivum* niż *S. cereale*, co uwidoczniło się w redukcji świeżej masy części nadziemnych roślin testowych (rys. 5). Niezależnie od liczebności nasion chabra przypadających na ziarniak pszenicy ozimej, zaobserwowano istotne zmniejszenie świeżej masy rośliny testowej do 1,22–1,28 g, w porównaniu do obiektu kontrolnego (1,54 g).

Przeprowadzone badania potwierdziły natomiast stymulujący wpływ niełupek *C. cyanus* na świeżą masę części nadziemnych *S. cereale*. Sąsiedztwo nasion chabra powodowało wzrost świeżej masy roślin o około 14%, w porównaniu do roślin w siewie czystym (rys. 5).

Od wielu lat zwraca się uwagę na istnienie chemicznych interakcji pomiędzy roślinami. Podkreśla się, że substancje pochodzące z resztek chwastów wpływają na kiełkowanie i wzrost roślin uprawnych (Purvis i wsp. 1985;



Rys. 5. Wpływ liczebności niełupek *C. cyanus* na świeżą masę roślin *T. aestivum* i *S. cereale* przy użyciu testu biologicznego

Fig. 5. Influence of *C. cyanus* achenes number on fresh weight of *T. aestivum* and *S. cereale* plants by using bioassays

Duer 1995). Wielu autorów w swoich badaniach stwierdziło również inhibitoryjny wpływ nasion chwastów *Alopecurus myosuroides*, *Avena fatua* czy *Festuca rubra* na wzrost i rozwój roślin uprawnych (Majchrzak 2007; Marczevska-Kolasa i wsp. 2010). Zaproponowane w badaniach metody testu Phytotoxkit™ oraz tradycyjnego testu biologicznego nie pozwalają jednoznacznie określić oddziaływań allelopacyjnych niełupek *C. cyanus* na kiełkowanie, wzrost i rozwój *T. aestivum* oraz *S. cereale*. Prezentowane wyniki badań wykazały niewielki inhibitoryjny wpływ nasion chabra na długość korzeni, wysokość roślin oraz świeżą masę pszenicy ozimej, a stymulujący wpływ na wymienione parametry żyta ozimego. Majchrzak (2007) wykazał w swoich badaniach, że sąsiedztwo owsa

głuchego hamowało długość koleoptylu i korzeni pszenicy ozimej, a żyto okazało się bardziej wrażliwe na sąsiedztwo kostrzewy czerwonej niż owsa głuchego. Na inhibitoryjny wpływ chwastów wskazuje również Oleszek (1992), podkreślając jednak, że większy potencjał występuje u chwastów dwuliściennych, w porównaniu z gatunkami jednoliściennymi.

Wnioski / Conclusions

1. Metodą tradycyjnego testu biologicznego oraz testu Phytotoxkit™ nie wykazano jednoznacznie allelopacyjnego wpływu niełupek *C. cyanus* na *T. aestivum* (odmiany Bogatka) i *S. cereale* (odmiany Walet).
2. W żadnym z biotestów nie zaobserwowano istotnego wpływu *C. cyanus* na kiełkowanie *T. aestivum* i *S. cereale*.
3. Obecność niełupek *C. cyanus* spowodowała niewielką stymulację wzrostu korzeni *S. cereale* w porównaniu do roślin kontrolnych.
4. Sąsiedztwo nasion *C. cyanus* wpłynęło istotnie na redukcję świeżej masy części nadziemnych *T. aestivum*.
5. Pszenica ozima okazała się gatunkiem bardziej wrażliwym na sąsiedztwo niełupek *C. cyanus* niż żyto.

Opracowanie wykonano w ramach zadania 2.6 w programie wieloletnim Instytutu Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowego Instytutu Badawczego.

Literatura / References

- Biały Z., Oleszek W., Lewis J., Fenwick G.R. 1990. Allelopathic potential of glucosinolates (mustard oil glycosides) and their degradation products against wheat. *Plant Soil* 129: 277–281.
- Duer I. 1995. Oddziaływanie biomasy niektórych gatunków chwastów na kiełkowanie i wzrost siewek pszenicy ozimej. s. 41–55. W: „Teoretyczne i praktyczne aspekty allelopatii”. Mat. Konf IUNG, Puławy, 11–12.09.1995 (K10), 183 ss.
- Gniazdowska A., Oracz K., Bogatek R. 2004. Allelopatia – nowe interakcje oddziaływań pomiędzy roślinami. *Kosmos – Problemy Nauk Biologicznych* 53 (2): 207–217.
- Majchrzak L. 2007. Kiełkowanie zbóż w warunkach sąsiedztwa ziarniaków *Avena fatua* L. i *Festuca rubra* L. – aspekt allelopacyjny. *Ann. UMCS, Sec. E*, 62 (2): 185–192.
- Marczevska-Kolasa K., Bortniak M., Domaradzki K. 2010. Allelopacyjny wpływ *Alopecurus myosuroides* na wzrost korzeni pszenicy ozimej. *Prog. Plant Prot./Post. Ochr. Roślin* 50 (2): 820–822.
- Ohno T., Doolan K.L. 2001. Effect of red clover decomposition on phytotoxicity to wild mustard seedling growth. *Appl. Soil Ecol.* 16: 187–192.
- Oleszek W. 1992. Techniki badań allelopatii. *Wiad. Bot.* 36 (3/4): 17–25.
- PHYTOTOKKIT 2004. Seed germination and early growth microtest with higher plants. Standard Operational Procedure. Belgium. MicroBioTest Inc, 24 pp.
- Purvis C.E., Jessop R.S., Lovett J.V. 1985. Selective regulation of germination and growth of annual weed by crop residues. *Weed Res.* 25 (6): 415–421.
- Rola H., Kucharski M., Marczevska K., Gawroński S., Ciarka E., Szalacha E. 2006. Metody Identyfikacji Biotypów Chwastów Odpornych na Herbicydy z Grupy Inhibitorów Fotosyntezy fotosystemu II. Wyd. IUNG – PIB, Puławy, 17 ss.
- Sekutowski T., Bortniak M. 2009. Wykorzystanie mikrobiotestu Phytotoxkit™ w wykrywaniu potencjału allelopacyjnego mrozi trzcinowatej (*Phalaris arundinacea*). *J. Res. Appl. Agric. Eng.* 54 (4): 88–93.
- Sekutowski T., Sadowski J. 2009. Phytotoxkit™ microtest used in detecting herbicide residue in soil. *Environ. Prot. Eng.* 35 (1): 105–110.
- Sekutowski T., Bortniak M. 2011. Evaluation of the herbicide effectiveness of water extracts from *Secale cereale* after the total application with pendimethalin. *Acta Bioch. Pol.* 58 (3): 18–19.
- Suman A., Shahi H.N., Singh P., Gaur A. 2002. Allelopathic influence of *Vigna mungo* (black gram) seeds on germination and radical growth of some crop plants. *Plant Growth Regulation* 38: 69–74.