

1. BEVEZETÉS

Hazánk mezőgazdaságát leginkább veszélyeztető gyomnövények többsége neofiton, kozmopolita faj, melyek elleni sikeres küzdelem – a környezet addicionális terhelése nélkül – csak az integrált gyomszabályozás keretein belül valósítható meg. Ezért elsődleges szempont a nagy abundanciájú fajok térfoglalásának felmérése és a terjedés irányának, sebességének nyomon követése, mely *Ujvárosi Miklós* kezdeményezésének köszönhetően az országos gyomfelvételezések keretén belül megvalósult.

Az invazív gyomok elleni védekezés szempontjából szükségszerű térhódításuk okainak ismerete. Gyakran vizsgált tényező a fajok kompetíciós képessége és a herbicidrezisztencia, ritkább azonban az allelopátia számbavétele, bár a IV. Országos Gyomfelvételezés eredménye alapján a rangsorban az első tíz fajból hat bizonyítottan allelopátiás potenciállal rendelkezik. A kutatás nehézségei abból adódnak, hogy természetes körülmények között az allelopátiát nehéz kiragadni az interferencia egyéb megnyilvánulási formái közül, így a vizsgálat minden esetben laboratóriumhoz kötött, költségigényes munka.

A növények közötti kémiai kölcsönhatás nemcsak az elterjedés okaként, hanem az integrált gyomszabályozás egyik elemeként is figyelmet érdemel. Spanyolországban és az Egyesült Államokban külön program keretén belül foglalkoznak növényi eredetű biopeszticidek előállításával és alkalmazásával, emellett nem ismeretlen az allelopátiás tulajdonságú fajok közvetlen – pl. mulchként, takarónövényként történő – alkalmazása sem. Ilyen megközelítésből az eddig kizárólag károsnak ítélt gyomnövények, más szervezeteket (mikroorganizmusokat, rovarokat) gátló, esetleg serkentő tulajdonságuk révén a növényvédelemben pozitív szerephez juthatnak.

Az elmúlt években, hazánkban, de Európa más részeiben is az ürömlevelű parlagfű (*Ambrosia artemisiifolia* L.) elsősorban egészségügyi szempontból a figyelem középpontjába került. Kapáskultúrákban, ruderaliákon és gabonatarlókon fordul elő leggyakrabban. Szántókon az 1996 és 1997 között végzett felmérések alapján a legnagyobb borítással rendelkező gyom, mely, az eddigi ismeretek szerint, erős kompetitív képességére és herbicidrezisztens biotípusának megjelenésére vezethető vissza, ugyanakkor – előzetes kutatásokra alapozva – az allelopátia szerepe sem zárható ki.

A dolgozat célja a parlagfű európai terjedésének irodalom alapján történő felmérése, valamint az,

hogy a bizonyítandó allelopátiás tulajdonság lehetséges oka-e a nagymértékű térfoglalásnak. Az allelopátia növényvédelemben betöltött gyakorlati jelentőségének megvilágítása érdekében mikrobiológiai vizsgálatokra is sor került.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A PARLAGFŰ ELTERJEDÉSE

2.1.1. Előfordulása Európában

Az *Ambrosia artemisiifolia* L. (Asteraceae) Észak-Amerikában őshonos, ahonnan *Meusel* és *Jäger* (1992) szerint 1865-ben került az Ókontinensre (1. ábra). Európa északi, északnyugati területein csak átmenetileg jelenik meg, mivel az ottani klíma nem kedvez a termés beérésének.

Nagy-Britanniában az 1860-as évek óta tartják számon. Kikötők mentén, személtlerakó helyeken, baromfigazdaságokban fordul elő leggyakrabban. Az USA-ból madáreleségnek szánt köles szállítmányokkal hurcolták be évről évre, de megtelepedni 2-3 évnél tovább nem tudott a fent leírtak miatt (egyetlen esetben figyelték meg, hogy Jerseyben egy szántón hat évig fennmaradt). Ez az oka annak, hogy a Szigetországban végzett 1970 előtti illetve 1970 és 1990 közötti felmérések nem mutatnak nagy különbséget (*Rich* 1994).

Franciaországban a parlagfű terjedésével, palynológiai vonatkozásaival kapcsolatban az AFEDA (Association Française d'Etudes Des Ambrosies) készített felmérést, mely szerint a Rhone-Alpes tartományban Lyon központtal található meg és terjed dél-nyugat felé (*Déchamp* 1997).

Olaszországban Piemonte-ban és Lombardiában találtak parlagfűvel fertőzött területeket. Trieszt környékén elsősorban a pollenkoncentráció meghatározása érdekében végeztek florisztikai felméréseket, melyek szerint a parlagfű terjedésében antropogén tényezők játszanak szerepet, mivel a várostól észak-nyugatra az autópálya megépítését követően kezdett megjelenni (*Heindl* 1992, *Sauli et al.* 1992, *Déchamp* 1997).

Kelet- és Nyugat-Németországban 1945, illetve 1949 előtt az *Ambrosia artemisiifolia* csak szórványosan fordult elő. *Haeupler* és *Schönfelder* (1988) valamint *Benkert et al.* (1998) közleményeiből ismert, hogy a növény főleg az ország déli területein már általánosan megtalálható.

Ries (1992) szerint Ausztriában 1970 előtt csak elvétve jelent meg, egyedül Burgenlandban, 1952-ben egy tarlón bukkant fel tömegesen. Jelenleg főleg ruderaliákon gyakori.

Csehország és Szlovákia adventív flórájának kialakulását három irányból történő invázió határozta meg: a keleti útvonalon keresztül főleg a Szovjetunióból gabonaszállítmányokkal kerültek be gyomnövények, pl. *Artemisia sieversiana*, *Bunias orientalis*; az Elbán keresztül

észak-amerikai fajok szójaimport révén juthattak a területre, pl. *Ambrosia artemisiifolia*, *Setaria faberi*; míg Magyarországról és Romániából a pannon útvonalon át kertészeti termékek kísérőjeként hurcoltak be gyomfajokat. A parlagfű terjedése az Elba felől és pannon területről egyaránt kiindulhatott (*Jehlík és Hejny 1974*). *Jehlík (1998)* és *Eliás (1987)* szerint Szlovákia délnyugati sík területein, illetve Csehország középső és Lengyelországgal határos részein fordul elő leggyakrabban.

Szerbiában 1980 előtti felvételezések szerint csak a Vajdaságban találták meg a parlagfüvet, újabban a vasút illetve a közutak mentén dél felé terjeszkedik (*Igre 1987, Vasić 1988*).

A parlagfű összefüggő foltokban Ukrajna déli területein jelent meg és csak 1976-tól figyeltek fel rá Kiev környékén (*Mariyushkina 1983*).

Lengyelországban csak délen honosodott meg északabbra csak átmeneti jelenlétéről számoltak be (*Tacik 1971 cit. Gudžinskas 1993*). Litvániában, 1884-ben észlelték először, majd 1988 és 1992 között végzett flórakutatás során 85 helyen regisztrálták (*Gudžinskas 1993*).

2.1.2. Előfordulása és jelentősége Magyarországon

Thaisz szerint az *Ambrosia artemisiifolia* 1888-ban egy budapesti kísérleti telepen jelent meg először (*Priszter 1960*). Az első hivatalos adat azonban *Jávorka* nevéhez fűződik, aki 1910-ben bukkant rá a Krassó-Szörény megyei Orsován a vasúti töltés mellett, ugyaninnen 1908-ban *Scholz* is gyűjtött egy példányt a Magyar Nemzeti Múzeum herbáriumára (*Jávorka 1911*). *Boros Zala*, Somogy és Veszprém megyében írta le a parlagfüvet 1924-ben, mely szerinte: „...veszedelmes gyommá előreláthatólag nem fog válni...”, ugyanakkor *Pleidell (1931)* lucernában, lóherében való előfordulása miatt irtását szorgalmazta. Ezzel szemben *Jávorka (1943)* a parlagfű takarmányozási hasznáról ír, melyről Rumi Imréné tájékoztatta: „Zsenge korában szívesen eszi a tehén, juh, sertés, száraz állapotban előszeretettel torkoskodik belőle a ló”.

A Csepel-szigeten *Moesz (1926)* találta meg elsőként az *Ambrosia artemisiifoliát*. A parlagfű „hódító útjáról” *Tímár (1955)* ad áttekintést: megfigyelései szerint 1950-ben a Duna-Tisza közén gyakori, 1954-től Szegeden is előfordul. Az egész országra kiterjedő részletes adatokat *Priszter (1960)* szolgáltat (2. ábra).

A parlagfű szántóföldi kultúrákban betöltött szerepe a négy országos gyomfelvételezés segítségével

követhető nyomon. 1950-ben, a rangsorban 29. volt, 1970-től a 10 legveszélyesebb gyomnövény közé tartozik (Ujvárosi 1973). Az 1997-es felmérések szerint nyáreleji búza- és nyárutói kukorica állományok átlagában a legnagyobb borítású faj (3. ábra) (Szentei 1998).

2.2. AZ ALLELOPÁTIA FOGALMÁNAK ÉRTELMEZÉSE

Az allelopátiával kapcsolatos megfigyelések több mint kétezer éves múltra tekintenek vissza, melyekből kiderül, hogy a jelenség a természetben kizárólag a kölcsönhatások többi formájával együtt, az interferencia részeként értelmezhető. Ez a felismerés szükségessé tette a fogalom tágabb értelmezését, mely a növények közti közvetlen kölcsönhatástól elszakadva a talaj és a mikroorganizmusok hatásmódosító szerepét is figyelembe veszi. A gátló, illetve serkentő folyamatokban résztvevő szekunder (gyakran speciális) metabolitok izolálása lehetővé teszi az allelopátia biológiai védekezésbe történő bevonását. Az aktív vegyületeket termelő gének lokalizálása transzgenikus növények gyomszabályozásban betöltött szerepét vetíti előre.

2.2.1. Korai szakasz

A mezőgazdaságot több mint tízezer – ha a növények domesztikációjától számítjuk, akkor egymillió – éves történelmében az agrártudomány részeként a növények illetve a növények és környezetük közti kölcsönhatások vizsgálata mindvégig elkísérte.

A magasabb rendű növények kölcsönhatásaival kapcsolatos első feljegyzéseket több mint kétezer évvel ezelőtt rögzítette *Theophrastos* (Kr. e. 300). Megfigyelte, hogy a *Cicer arietinum*, szemben a többi hüvellyessel, nem javítja a talajt, hanem kimeríti, valamint rámutat gyomelnyomó hatására is, mely a *Tribulus terrestris* esetében a legszembetűnőbb, továbbá beszámol a libatop lucerna fejlődésére gyakorolt negatív hatásáról is (Chou 1999, Rice 1984).

Démokritosz görög filozófus a fitotoxikus növényi anyagok gyomirtásban való alkalmazását szorgalmazza, rámutatva az allelopátiás tulajdonságú fajok gyakorlati hasznára (Aliotta et al. 1999). *Plinius Secundus* (Kr. u. I. sz.) munkáiból ismert, hogy a *Cicer arietinum*, a *Hordeum vulgare*, a *Trigonella foenum-graecum* és a *Vicia ervilia* „perzseli” a gabonaterületeket. Elsőként utal az allelopátia területén klasszikus példának számító *Juglans nigra* emberre, növényre egyaránt káros árnyékára (az árnyék jelentése összetett: kifejezi a fény és tápanyagok elvonása, valamint a növények által termelt vegyületek okozta kárt). Megfigyeléseit a következőképpen

foglalja össze: „Némely növényből származó illat elegy vagy présnedv, ha nem is halálos, de veszélyes... például a retek és a babér árt a szőlőnek” (*Plinius Secundus* 1. sz. cit. *Rice* 1984).

A 18. és 19. sz. allelopátia kutatásának meghatározó alakja a svájci *deCandolle*. Elhalt növények szervesanyagainak komposztálódását vizsgálva kimutatja, hogy a szabadban elbomló növényi részek hatástalanok a következő növényállomány fejlődésére, míg a talajban degradálódó szerves – oldható anyagokkal gyarapítva a talajt – hasznos illetve káros hatást fejthetnek ki a vetésciklusban, monokultúrában szereplő fajokra. Példaként említhető a búza egymást követő állományainál tapasztalható termésveszteség (*deCandolle* 1832 cit. *Willis* 1996, *Seigler* 1996).

*Plinius Secundus*hoz hasonlóan *Stickney és Hoy* (1881 cit. *Rice* 1983) beszámolnak arról, hogy a *Juglans nigra* alatt illetve közelében a gazdasági növények nem, vagy csak lassan növekednek. Ennek oka a csapadék által a levelekből kimosódó toxikus anyag, ugyanakkor nem zárják ki annak lehetőségét sem, hogy a dió jelentős tápanyagszükséglete kimeríti a talajt, lehetetlenné téve más fajok megjelenését. A szerzők a vegyületek hatásán túl számolnak a kompetíció lehetőségével is. Ez utóbbi kölcsönhatás figyelmen kívül hagyása miatt az elmúlt évek allelopátia kutatását (melynek során *in vitro* eredményekből közvetlenül következtek a természetes körülmények között fennálló interakciókra) gyakran érte kritika (*Harper* 1977, *Watkinson* 1998).

2.2.2. Az allelopátia fogalmának kialakulása

Az allelopátia definiálása Hans *Molisch*tól, bécsi növényélettan professzortól származik az allelon (=kölcsönös, egymás) és a pathos (=ártalmas, elszenvedni) szóösszetétel eredményeként. Eredetileg, rövideje miatt az „allopathie” kifejezést tartotta célszerűnek, de ezt a szakirodalomban a „homöopathie” ellentétéként alkalmazták (*Molisch* 1937). Növények közti kölcsönhatások kutatására gyakorlati megfigyelések késztették. Korai érésű almát és körtét később érőkkel együtt tárolva ez utóbbiak is korábban váltak fogyasztásra alkalmassá. Kísérleteiben gyümölcsökből (alma, körte, mandarin, citrom, narancs, kajszi- és őszibarack) illetve földbeni szervekből származó exhalátumok hatását elemezte hüvelyes csíranövényeken (vetési bükköny, borsó, lencse) valamint baktériumokon. A narancson kívül valamennyi gyümölcs gátolta a csírázást. Az etilénkoncentráció csökkentése a kísérleti növények fejlődésének gyorsulását eredményezte. Ezen kísérletek alapján – melyek egy részéről hazánkban *Rapaics* (1939) számolt be – érthető, hogy *Molisch* a növények „befolyásáról” beszél (*Der Einfluß einer Pflanze auf*

die andere), mivel serkentést és gátlást egyaránt tapasztalt, bár az általa javasolt szó eredetét tekintve negatív interakcióra utal.

Molisch kutatásaival párhuzamosan Angliában *Pickering* kísérleti telepet hozott létre az allelopátia vizsgálata céljából. Megfigyelte, hogy a magról kelő gyümölcsfák növekedését a területen lévő fűfajok hátráltatják. Eredményei alapján kezdődött meg Indiában a *Sorghum vulgare* alkaloidjainak kutatása, melyek a gyapot fejlődését gátolták illetve autotoxikus tulajdonságúak voltak. Az Egyesült Államokban, ebben az időben *Schreiner* vegyületeket izolált, melyek közül a pikolin-karboxilsav és a dehidroxi-sztearinsav mutatkozott különösen aktívnak 100 illetve 50 mg/kg-os koncentrációban (*Willis* 1997).

Grümmer (1955) és *Willis* (1994) tanulmányából ismert, hogy az allelopátia kifejezést többen elvetették, helyette mást javasoltak (allelobiology, teletoxy), mivel hasonlít a genetikában használatos, de jelentésében teljesen eltérő „allelomorph” illetve „allele” szavakhoz.

Grümmer (1955) átfogó tanulmányt jelentetett meg „Die gegenseitige Beeinflußung höherer Pflanzen – Allelopathie” címmel. A könyv bevezetőjében tisztázza a növények és mikroorganizmusok kölcsönhatásában már bevált kifejezéseket. Az antibiotikumok mellett megkülönböztet fitoncideket, marazminokat és kolinokat.

- fitoncid: latin illetve görög szóösszetétel; magasabb rendű növények mikroorganizmusokkal szemben toxikus anyagcseretermékei. (*Waksman* 1937 cit. *Grümmer* 1955).
- marazmin: görög szó, jelentése hervadás. *Gäumann* (1946 cit. *Grümmer* 1955) mikroorganizmusok magasabb rendű növényekre gyakorolt gátló hatásának leírására használja.
- kolin: *Grümmer* (1955) javasolja a kifejezést magasabb rendű növények fitotoxikus tulajdonságú anyagcseretermékeinek megjelölésére. A fogalmat a növényélettanban használatos blasztokolinból (csírázásgátló anyag) vezeti le.

Az említett kölcsönhatások és az azokért felelős anyagcseretermékek arra utalnak, hogy az allelopátia nem pusztán magasabb rendű növények, hanem mikroorganizmusok közti kapcsolat. Míg *Molisch* az allelopátia fogalmát az etilén hatására korlátozza, *Grümmer* a levelekből esővízzel kimosódó vegyületeket és a gyökérexudátumokat is figyelembe veszi. Rámutat a monokultúra veszélyeire, a talajuntság okaira, valamint az irodalom alapján összefoglalja az allelopátia jelentőségét a mezőgazdaság szempontjából.

A növények kölcsönhatásában résztvevő vegyületek csoportosításánál *Grodzinszkij* (1965)

különbséget tesz illó és vízdoldható valamint élő és elhalt növényi szervből származó exkrétumok között (4. ábra).

Az alábbi kategóriákat javasolja:

- fitogénikus anyagok: intakt növényből származó illékony vegyületek,
- fitoncidek: sérült növényből a környezetbe jutó illékony vegyületek,
- miazminok: elhalt növényi részből származó illékony vegyületek,
- aktív exkrétumok: növény által kiválasztott vízdoldható vegyületek,
- passzív exkrétumok: élő növényből vízzel kimosódó vegyületek,
- szaprolinok: növény bomlása során felszabaduló vegyületek.

Grodzinszkij túlmutat az allelopátia azon értelmezésén, mely dóziszfüggő, általánosan ható kémiai mediátorok hatásán alapul. A növények „kölcsonös felismerő” képességét kémiai jelzővegyületekkel magyarázza, melyek hatása a koncentrációtól független és a szomszédos növény pozitív vagy negatív fejlődési zavarában nyilvánul meg (*Grodzinszkij* 1981).

Átfogóan a populációk közti kölcsönhatásokat *Odum* (1959) csoportosítja. Tíz kategóriát állít fel pozitív illetve negatív interakciókból, melyek interferencia néven foglalhatók össze (*Radosevich és Holt* 1984). Míg *Muller* (1974) szerint az interferencia magasabb rendű növények egymás növekedésére gyakorolt káros hatása, addig *Radosevich és Holt* (1984) definíciójában „a növények szomszédainak környezetére kifejtett hatása”. Az allelopátiát is ide sorolják, mint a növények másodlagos anyagcseretermékeinek szelektív toxikus tulajdonságát (*Holzner* 1973, *Liu és Lovett* 1993, *Levi-Minzi et al.* 1994). Ebben a megfogalmazásban az allelopátia alternatívájaként említik a „chemical interference” kifejezést (*Seigler* 1996, *Smith és Martin* 1994, *Waller és Einhellig* 1999, *Weidenhamer* 1996), mely talán szerencsésebb, mert jelentése nem zárja ki a növények és környezetük közti pozitív kapcsolatrendszerét valamint utal arra, hogy az allelopátia nem választható el természetes körülmények között a kölcsönhatások többi formájától, elsősorban a kompetíciótól! *Rademacher* (1959) munkája ez utóbbi szempontból is kiemelkedő.

A „Gegenseitige Beeinflussung” kifejezést – ami az interferenciának felel meg – konkurenciára és allelopátiára osztja. Az előbbi a környezeti forrásokért folytatott küzdelem, míg az utóbbi az élő és elhalt növényből származó anyagcseretermékek hatása. *Grümmer* az allelopátiát pozitív hatásként is értékeli, ugyanakkor az általa javasolt kolin kifejezés kizárólag gátlásra utal. *Rademacher* e helyett a semleges „Allelopathica” megnevezést tartja célszerűnek, melyre az

akceptor nem egész élete során fogékony, hanem bizonyos szakaszokban, pl. csírázás, virágzás. Rámutat arra, hogy a másodlagos anyagcseretermékek befolyásolhatják a társulások kialakulását, bár ez a konkurenciától természetes körülmények között nem választható el (Csonotos 1994, Dierschke 1994, Fekete 1981, Gopal és Goel 1993, Holzner 1973, Laterra 1997, Nilsen et. al 1999, Padisák 1985, Robles et. al 1999, Ubrizsy 1942ab, Walker 1994, Wardle et al. 1996, 1998). 1974-be Elroy L. Rice „Allelopathy” címmel monográfiát jelentetett meg, melyben *Molischra* hivatkozva az allelopátiát egyik növény (beleértve a mikroorganizmusokat is) másokra gyakorolt közvetlen vagy közvetett káros hatásaként értékeli, melyért a növényből környezetébe jutó vegyületek felelősek (Rice 1984). Megfigyelések szerint számos allelokémiai anyag kisebb koncentrációban serkent, míg nagyobb töménységben gátol (Rademacher 1959). Ez alapján a könyv második kiadásában (Rice 1984) a növények közti pozitív kölcsönhatás is szerepel a megfogalmazás részeként. Ez az irodalomban gyakran hivatkozott definíció hiányos, mivel a „környezetbe jutó vegyületek” akár gyökér által kiválasztott szénhidrátok, akár sérült gyökérből származó anyagok is lehetnek, melyek befolyásolhatják a talajban élő mikroorganizmusokat illetve a másik növény fejlődését, de ez nem tekinthető allelopátiának (Watkinson 1998). Evenari (1961) kizárja a tápanyagok szerepét az allelopátiában: „Our definition of allelopathy excludes nutritional relations between different organisms...”. Kétségtelen azonban, hogy a serkentő folyamatok esetében nehéz különbséget tenni a tápanyagok és a ténylegesen stimuláló anyagok között.

Harper (1977) rámutat, hogy a toxin elmélet viszonylag egyszerű bizonyítéka a növények közti kölcsönhatásnak, azonban az esetek nagy részében irreleváns, és a ténylegesen ható biotikus és abiotikus környezeti tényezők alaposabb kutatására ösztökél. Vizsgálatai és irodalmi összefoglalója alapján kiderül, hogy bár léteznek a hatásért felelősnek vélt toxikus anyagok, nem minden esetben valós okai a megfigyelt jelenségnek. Példaként említi a *Salvia leucophylla* kaliforniai előfordulását. A faj körül 60-90 cm-es gátlási zónát figyeltek meg, melynek okaként a növényből származó fitotoxikus illékony terpéneket jelölték meg. Kísérletek bizonyították, hogy a *Salvia* cserjék alatti mikroklíma kisemlősök számára kedvező, így a táplálékfelvétel (növényi részek, magvak, termések) elsősorban erről a területről történt, ennek következtében a növényzet kipsztult.

2.2.3. Az allelopátia jelenlegi definíciója és értelmezése

1999-ben Thunder Bay-ben (Canada) a II. Allelopátiás Világkongresszuson a fenti kritikák figyelembevételével megfogalmazták az allelopátia jelenlegi definícióját: „Minden olyan folyamat, amelyben növények (algák, baktériumok gombák, vírusok) által termelt szekunder metabolitok befolyásolják a mezőgazdasági és biológiai rendszert. Az allelopátia tanulmányozása során vizsgálni kell a másodlagos anyagcseretermékeket, valamint ezek szerepét a biológiai szerveződésben és a különböző (növény-növény, növény-mikroorganizmus, növény-talaj-növény) kölcsönhatásokban” (*IAS Newsletter*, 1999).

2.2.3.1. Szekunder metabolitok

A kölcsönhatásokban résztvevő speciális anyagcseretermékek csoportosítása *Mizutani* (1999), *Seigler* (1996), *Szabó* (1984, 1997ab), *Waller et al.* (1999a) munkái alapján ismert. A növény és környezete közti kapcsolatban szerepet játszó leggyakrabban izolált hatóanyagcsoportok a fenoloidok (fenolsavak, polifenolok, kumarinok, naftokinonok, antrakinonok) (*Aliotta et al.* 1994, *Anaya et al.* 1992, *Baziramakenga et al.* 1995, *Blum* 1996, 1997, *Chaves és Escudero* 1997, *Kushima et al.* 1997, *Levi-Minzi et al.* 1994, *Macías et al.* 1997a, *Mahmood et al.* 1999, *Mallik et al.* 1994, *Pellissier* 1994, *Reigosa et al.* 1999a, *Yu és Matsui* 1993), a terpenoidok (mono- diterpének, triterpenoid szaponinok, szeszkviterpén laktonok) (*Anaya* 1995a, *Jiménez-Estrada et al.* 1996, *Macías et al.* 1994, 1996, 1997b, 1998; *Massanet et al.* 1997, *Robles és Garzino* 1998, *Tongma et al.* 1997, *Waller et al.* 1999b), azotoidok (alkaloidok, kromoalkaloidok, cianogén glikozidok) (*Lovett és Hoult* 1998, *Wink és Latz-Brüning* 1995, *Wink et al.* 1999, 1998) és glikozinolátok (izotiocianátok) (*Anaya et al.* 1990, *Calera et al.* 1995, *Gardiner et al.* 1999, *Vaughn és Berhow* 1999). Az allelokémiai anyagok termelését környezeti tényezők, stressz erősen befolyásolhatja (*Dakshini et al.* 1999, *Einhellig* 1996, *Reigosa et al.* 1999b, *Weidenhamer* 1996). Megfigyelések szerint a *Neotyphodium lolii* gombával fertőzött angolperje erősebben gátolta a fehér here fejlődését, mint az egészséges növény (*Sutherland et al.* 1999). *Springer* (1996) vizsgálataiban hasonló eredményeket kapott *Acremonium coenophialum* fajjal fertőzött *Festuca arundinacea* esetében. Az allelokémiai anyagok pontos hatásmehanismusa nem, vagy csak részben ismert (pl.

aktív fehérjék agglutinálása, légzés inhibitorai, fotoszintézis gátlók) (*Wink et al.* 1998, *Waller et al.* 1999b, *Reigosa et al.* 1999b, *Wübert et al.* 1996). Az aktív vegyületek hatását a tesztnövényen látható és mérhető morfológiai, fiziológiai változással jellemzik, pl. csírázás és csíranövény fejlődés gátlása, merisztémákban keletkező elváltozás (*Chiapusio et al.* 1997, *Einhellig* 1995).

2.2.3.2. Kölcsönhatások

A kölcsönhatásokban allelopátiát feltételezhetünk, ha a következő pontok teljesülnek:

- a vizsgált faj másik növényre (mikroorganizmusra) gyakorolt gátló hatásának megnyilvánulási formája (természetes körülmények között) megfigyelhető,
- a hatásért felelősnek vélt faj toxikus anyagot termel,
- a toxikus anyag szabadba jutása biztosított,
- a környezetben lehetőség van a toxikus anyag transzportjára és/vagy felhalmozódására,
- a célnövény képes a toxikus anyag felvételére,
- a hatás nem magyarázható abiotikus vagy biotikus tényezőkkel (kompetíció, kártevők, kórokozók jelenléte).

A kritériumok teljesülése nem jelenti az allelopátia bizonyítását, csak azt, hogy a megfigyelt jelenség oka nagy valószínűséggel az allelopátiával magyarázható (*Willis* 1985 cit. *Blum et al.* 1999b).

In vitro körülmények között a donor növényből kivont kemikáliát közvetlenül juttatjuk az akceptor szervezethez lehetőleg kizárva minden olyan körülményt (fény, oxigén), mely a vizsgált vegyület bomlásához vezethetne. Ebben az esetben az anyag közvetlen hatást fejt ki a tesztorganizmusra. Ezek a kísérletek allelopátiás potenciál, készség megállapítására alkalmasak, azonban ebben a formában in vivo nem érvényesülnek.

2.2.3.3. Növény-talaj-növény kölcsönhatás

A természetes viszonyok között párolgással, kimosódással, bomlás során illetve gyökérexudációval szabadba jutó vegyület (*Reigosa et al.* 1999b) számos „akadályon” keresztül jut el a célszervezethez. A veszteség egyik oka lehet a csapadékkal való kimosódás, melynek során az aktív anyag felhígul, a talaj mélyebb rétegeibe mosódik (ezért az allelopátia

megnyilvánulása arid illetve szemiárid viszonyok között szembetűnőbb (Fekete, 1981). A másikkal a talajrészecskéken történő megkötődés és a mikroorganizmusokkal lejátszódó reakció. Blum (1998) és Blum *et al.* (1999ab) vizsgálataiból kiderül hogy steril talajban (annak jellemzőitől függően) a bejuttatott fenoloidok (ferulasav) 29%-a irreverzibilisen, 8%-a reverzibilisen kötődött a talajrészecskékhöz, 63%-a talajoldatban volt. Dalton (1999) szerint a reverzibilis megkötésnek nagy szerepe van az aktív vegyület mikrobiális bontásának megakadályozásában, így a hatás nagyobb valószínűséggel megnyilvánulhat. A vegyületek hozzáférhetősége szempontjából az utóbbi két csoportnak van jelentősége (Foy 1999), de gombahifák tevékenysége révén az irreverzibilisen kötött fenoloid is felvehetővé válhat (Novak *et al.* 1995 *cit.* Foy 1999). A talajból kinyerhető fenoloidok vizsgálata rámutat arra, hogy külön-külön mért koncentrációjuk nem fitotoxikus, kombinációjuk azonban igen (Blum 1996, Lehman *et al.* 1994). Ugyanezen vegyületek mikrobiális bontását vizsgálva Rajbanshi és Inubushi (1998) megállapítja, hogy a komposztálás nem feltétlenül eredményezi a növényi rész illetve a vizsgált talaj hatásvesztését. Ezt az indokolja, hogy a mikroorganizmusok például a ferulasavat és a p-kumársavat az aromás gyűrű megbontása előtt vanillin-, p-hidroxibenzol- illetve protokatehusavvá bontják (Blum, 1998), melyek allelopátiás potenciálja bizonyított (Kil és Lovett 1999, Kushima *et al.* 1997, Yu és Matsui 1994).

Nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a mikroorganizmusok az előzőekben említett hatóanyagok iránt lényegesen nagyobb affinitást mutatnak, mint a növények. Ennek oka, hogy az általában szén-limitált mikroszervezetek nagyenergiájú molekulákat (pl. fenoloidokat) az aromás gyűrű megbontásával képesek szénforrásként felhasználni. A detoxifikáció ezen módja ellenére tapasztalható a tesztnövény gyengébb fejlődése, aminek az a magyarázata, hogy a megnövekedett szénforrás jelenlétében a – növényi gyökerekhez képest nagyobb terület/térfogat aránnyal rendelkező – mikroorganizmusok elvonják a nitrogént a növényektől, tehát azok kompetítorai (Schmidt és Lay 1999).

A mikroorganizmusok és a talaj módosító szerepét bizonyítja a *Tithonia diversifolia*-val végzett kísérletsorozat. Párhuzamosan beállított vizsgálatok szerint steril talajban a növény vizes kivonata erősebben gátolja a tesztfajok fejlődését, mint természetes (mikroorganizmusokat tartalmazó) közegben (Tongma *et al.* 1998). Ito *et al.* (1998) *Solidago altissima* aktív vegyületének mennyiségét elemezte talajban. A dehidromatricaria-észtert intakt talajban tíz nap után már nem lehetett kimutatni, mikrobiális bomlás áldozata lett, illetve irreverzibilisen

megkötődött a talajrészecskéken.

A gátló vagy serkentő folyamatokban szerepet játszó vegyület – ha át is jutott a donor és akceptor növény mikroorganizmusokban gazdag rhizoszféráján és nem kötődött meg a talajrészecskéken – hatása nem feltétlenül nyilvánul meg. A növények különböző fogékonyságot mutatnak az allelokémiai anyagokkal szemben, amely nem magyarázható pusztán morfológiai különbséggel (pl. kutikula fenoloidokkal szembeni permeabilitása). *Golovko és Kovalenova* (1992 cit. *Schulz és Friebe* 1999) alaktanilag hasonló növényeknél kémiai mediátorokkal szemben eltérő affinitást tapasztaltak. A herbicidrezisztenciában ismert detoxifikációhoz hasonlóan (*Hunyadi és Pölös* 1988) a növények allelokémiai anyagokat oxidációval, szénhidrát konjugációval, egyéb konjugációval képesek átalakítani, esetleg hasznosítani (pl. az uborka a külső forrásból származó ferulasavat a ligninszintézis prekursoraként hasznosíthatja), illetve a vakuólumban tárolni és kiválasztani (*Schulz és Friebe* 1999).

2.2.3.4. Növény-mikroorganizmus kölcsönhatás

A mikroorganizmusok korábbiakban leírt szerepén túl megfigyeléseket végeztek fitopatogén gombákkal, szimbiota baktériumokkal és algákkal kapcsolatban is. *Lacey és Mercadier* (1998) különböző – allelopátiás szempontból aktív – anyagok (tomatin, szolanin, kamptotecin, xantotoxin, tanninsav) hatását vizsgálta *Paecilomyces fumosoroseus* konídiumcsírázására: 50-100 mg/l koncentrációban valamennyi tesztvegyület gátolt. *Oliva et al.* (1999) *Ruta graveolens* extraktumok komponenseinek fungicid hatásáról közöl eredményeket. *Winder* (1997) vizsgálataiban a *Calamagrostis canadensis* növényi maradványainak kivonata *Colletotricum* fajok szaporodását lassította. *Gross et al.* (1994, 1996) és *Nakai et al.* (1996) *Myriophyllum spicatum* fenoloidjainak algicid tulajdonságát tapasztalta. *Mallik és Tesfai* (1987, 1988, 1990) in vitro kísérletek alapján beszámol a *Chenopodium album* és a *Setaria viridis* kivonatainak *Bradyrhizobium japonicum* szaporodását serkentő hatásáról. *Barazani és Friedman* (1999ab) valamint *Ruixia et al.* (1997) a monokultúrából fakadó termésesökkenés egyik okaként említi a nem patogén, de allelopátiás potenciállal rendelkező baktériumok (*Streptomyces hygroscopicus*, *S. viridochromogenes*) jelenlétét a rhizoszférában. *Actinomycetesek* a *Laccaria laccata* és a *Hebeloma crustuliniforme* gombák szaporodását gátolják megakadályozva a *Pseudotsuga menziesii* újratelepítését, mellyel az említett fajok mikorrhizás kapcsolatban vannak. *Yu*

(1999) kísérletében paradicsom közé vetett *Allium tuberosum*-ot. Megfigyelte, hogy kevert állományokban a *Pseudomonas solanacearum* előfordulása ritkább, mint azokban a parcellákban, ahová csak paradicsomot ültettek, mivel az *A. tuberosum* gyökérexudátumai gátolták a baktérium szaporodását.

2.2.3.5. Növény-növény kölcsönhatás

Kultúrnövények közti kapcsolat vizsgálatát a vetésforgóban tapasztalt negatív hatások valamint a monokultúra során fellépő termésveszteség teszik szükségessé. Fontos hangsúlyozni azonban, hogy az allelopátia ebben az esetben sem kizárólagos indok, figyelembe kell venni a kártevők, kórokozók, illetve az adott kultúrához legjobban alkalmazkodó évelő és egyéves gyomnövények felszaporodását is (Berzsenyi 1988), melyekkel együtt értelmezendő a növényből származó szekunder metabolitok hatása. Miller (1996) vizsgálataiból kiderül, hogy a lucerna újratelepítésének nehézségeit részben az autotoxicitás okozza. Ells és McSay (1991) szerint, a lucernalevél-kivonattal öntözött uborka nem csírázik. Chou et al. (1995) 10-25%-os termés kieséssel járó autotoxicitást figyelt meg *Vigna radiata*-nál, melyet szaponinok okoznak. Spárga újratelepítésnél és cukornád monokultúrában, a talajban felhalmozódó fenolszarmazékok okoznak hozamcsökkenést (Chou 1999). Ben-Hammouda et al. (1995) *Sorghum bicolor* hibridek allelopátiás hatását vizsgálta búza csírázására és fejlődésére. A hibridek közti különbség a búza gyököcskefejlődésében nyilvánult meg szignifikánsan. Taiwanban a második rizsvetés hozama 25%-kal kisebb, mint az első. Chou (1992) kimutatta, hogy a rosszul szellőző elárasztott területeken az első termés betakarítását követően a szántóföldön hagyott rizsszalmából fitotoxikus fenolsavak oldódnak ki. A lecsapolt szántókon hozamcsökkenést nem tapasztalt, ami abból következik, hogy jól szellőző művelt területen az allelokémiai anyagok termelése és felhalmozódása kisebb mértékű, mint oxigén szegény körülmények között. A vetésforgónál illetve monokultúrában akkor tapasztalható allelopátiás jelenség, ha egy naptári évben több kultúra termesztésére kerül sor, és a betakarítást követően a növényi maradványok a talajon maradnak („stubble mulch farming”). Ebben az esetben a komposztálódó növényi részekből szabadba jutó aktív vegyületek nem mosódnak le a mélyebb rétegekbe, és csak részben válnak mikrobiális bomlás áldozatává (Narwal 1994). A „conservation tillage” eljárások szerepe a búzatermesztésben 1971 és 1985 között 15%-kal nőtt. Előnyei mellett (talajnedvesség megőrzés, üzemanyag megtakarítás) árnyoldalai a hagyományos műveléssel („conventional tillage”)

szemben a terméshozam változékonysága, mely a kórokozók, kártevők felszaporodására és az allelokémiai anyagok felhalmozódására vezethető vissza (Waller *et al.* 1987). A takarmánykeverékek vetésénél Chung és Miller (1995), Halsall *et al.* (1995), Leigh *et al.* (1995), Norrington-Davies és Buckeridge (1994) valamint Smith és Martin (1994) megfigyelték, hogy a fűfajok (*Festuca arundinacea*, *Lolium multiflorum*, *Hordeum pusillum*, *Sorghum bicolor* *Bromus inermis*, *Dactylis glomerata*, *Phleum pratense*, *Agrostis alba*, *Phalaris arundinacea*, *P. aquatica*) extraktumai a lucerna, illetve a földbentermő here (*Trifolium subterraneum*) csíranövény fejlődését hátráltatják.

A gyomnövények mezőgazdasági szempontból számontartott kártételi formái mellett (termőhely elfoglalás, a talaj víz- és tápanyagkészletének csökkentése, árnyékoló hatás, kártevők és kórokozók köztesgazdái) (Ujvárosi 1973) allelopátiás tulajdonságuk is említésre méltó. Az *Abutilon theophrasti*, az *Amaranthus retroflexus*, a *Setaria glauca*, a *Cyperus esculentus*, a *Sorghum halepense*, a *Chenopodium album* és az *Echinochloa crus-galli* kivonatai hatására a kukorica, a szója és a napraforgó rosszabbul csírázott, illetve a vegetatív szervek fejlődése elmaradt a kontrollcsoportétól (Bhowmik és Doll 1982, 1983, Drost és Doll 1980, Kazinczi *et al.* 1991, Mallik *et al.* 1994, Mikulás 1981). A gyom-kultúrnövény kapcsolaton belül több irodalom is említést tesz a rét-legelő művelésben gondot okozó invazív fajok térhódításáról. Ausztráliában a takarmányozási szempontból értéktelen *Vulpia myuros* és *V. bromoides* elterjedése jelent nehézséget. An *et al.* (1996, 1997ab) kísérleteiben bizonyítja, hogy a *V. bromoides* a vizsgálatba vont növények (búza, lucerna, kanáriköles) csírázását és a vegetatív szervek növekedését hátráltatta. Hasonló eredményeket közöl Ahmed és Wardle (1994) az Új-Zélandban előretörő *Senecio jacobea*-val kapcsolatban. A virágzó növényi részek valamint kivonatok a legelőalkotó fajok közül főleg a hüvelyesek (*Trifolium repens*, *T. pratense*, *T. subterraneum*, *Medicago sativa*) voltak érzékenyek, az angolperje azonban ellenállónak mutatkozott. Japánban a rétgazdálkodás egyik fő problémája az *Anthoxanthum odoratum*, mely – akár tiszta állományokat létrehozva – elnyomja az endemikus *Zoysia japonica*-t. A jelenség egyik oka a borjúpázsit magas kumarintartalma, mely már 10 mg.kg⁻¹ koncentrációban gyököcskehossz csökkenést eredményezett (Yamamoto 1995, Yamamoto *et al.* 1997).

2.2.4. Az allelopátia alkalmazásának lehetőségei

Az allelopátia gyakorlati jelentősége az integrált gyomszabályozásban, kórokozók, kártevők elleni

védekezésben lehet (Chou et al. 1998, Cruz-Ortega et al. 1998, Gonzales et al. 1997, Liu és Christians 1994, 1996, Liu et al. 1994, Narwal 1994, Solymosi és Gimesi 1993, Solymosi 1994, Swanton és Murphy 1996).

Jelenleg 232 gyomfaj herbicidrezisztens biotípusát ismerjük (Hartmann 1998, Hartmann et al. 1999, 2000, Heap 2000), melyek ellen egyre nehezebb védekezni a környezet addicionális terhelése nélkül, ezért számba kell venni minden olyan lehetőséget, mely a herbicidhasználat csökkentésére, illetve a hatékonyságának fokozására irányul. Az allelopátiás potenciállal rendelkező növények mulchként való felhasználásán túl (Hoffman et al. 1996, Moyer és Huang 1997, Narwal 1994, Weston 1996), a gyomok, a kórokozók és a kártevők elleni védekezés legcélszerűbb formájának tűnik, ha maga a kultúrnövény gyomelnyomó tulajdonságú. Gonzales et al. (1997) ez irányú vizsgálataiból kiderül, hogy a paprika lomblevelének fenolszármazékai gátolják az *Amaranthus retroflexus*, a *Chenopodium album*, a *Plantago lanceolata* és a *Solanum nigrum* fejlődését. A *Ruta graveolens* aktív vegyületei (5-metoxipszoralen, 8-metoxipszoralen, kvercetin) késleltetik a *Portulaca oleracea* kelését (Aliotta et al. 1996). Dudai et al. (1999) terpenoidokat mutatott ki *Origanum syriacum*, *Mycromeria fruticosa*, *Cymbopogon citratus* fajokból, melyek 20-80 mg.kg⁻¹ koncentrációban *Amaranthus* magok csírázását gátolták.

Macías kutatóprogramot indított „Natural Product Models as Allelochemicals” címmel, melynek célja különböző növényfajokból izolált hatóanyagok vizsgálata gyomirtó hatás szempontjából. Gyommagokat napraforgóból származó terpenoidokkal kezelve azok vontatott csírázását tapasztalta (Macías 1995, 1997c). Anaya et al. (1996) *Psacalium decompositum* cserjéből két szeszkviterpént izolált (cacalol, cacalon), melyek bioherbicidként való alkalmazása, az *Echinochloa crus-gallira* gyakorolt hatásuk alapján, megfontolandó. *Sorghum bicolor*ból valamint *S. bicolor* x *S. sudanese* hibridből (*Sudex*) extrahált sorgoleon gyomnövényekkel szemben allelopátiás tulajdonságú. Érdemes kiemelni, hogy ez az aktív vegyület a talajban is stabil, a kémiai bomlásnak ellenáll (Weston et al. 1999)!

Említésre méltó néhány olyan példa, mely során gyomok közti kölcsönhatást vizsgáltak. Anaya et al. (1990, 1995b) valamint Pereda-Miranda és Mata (1993) szerint az *Ipomoea tricolor* alkaloidjai és glikozidjai gyomokkal szemben hatásosnak mutatkoztak. A növénynek ezt a tulajdonságát Mexikóban cukornádültetvényeken széles körben használják. Lydon et al. (1997) az *Artemisia annua*-val kapcsolatban megállapítja, hogy a növényből kivont artemisinin gátolja az *Amaranthus retroflexus* és a *Chenopodium album* csírázását. A jelenség főleg az apróbb magvaknál/terméseknél tapasztalható, a

kukorica és a szója kelését nem, vagy csak kismértékben késleltette. Thaiföld rizsvetéseit veszélyeztető *Sphenoclea zeylanica* a talajba forgatva más kártékony fajok csírázását befolyásolja, a rizsét azonban nem, ha a vetésre a talajművelést követően 3-4 héttel kerül sor. Kísérletekből kiderül, hogy a *Leptochloa chinensis* és az *Eclipta thermalis* különösen érzékenyek a *S. zeylanica* aktív vegyületeire (Premasthira és Zungsontiporn 1996ab). Ismail és Mah (1993) hasonló tapasztalatokat közöl *Mikania micrantha* valamint *Asystasia intrusa*, *Chrysopogon aciculatus* és *Paspalum conjugatum* kölcsönhatása kapcsán.

Külön említést érdemelnek azok a törekvések, melyek allelopátiás tulajdonságú fajták elemzésére irányulnak. Ilyen megfontolásból kezdődtek a Fülöp-szigeteken rizszel kapcsolatos kutatások. Olofsdotter et al. (1996, 1999) rizsfajták allelopátiás készségét vizsgálta laboratóriumban, valamint meghatározta gyomelnyomó képességüket is szántóföldön. A mesterséges és természetes körülmények között mért allelopátiás potenciál (amit az *Echinochloa crus-galli* gyököskehossza reprezentált) és interferencia alapján a *Lubang Red* fajta bizonyult gyomszabályozás céljából a legalkalmasabbnak. Burgos et al. (1999) és Wu et al. (1999) összefoglalják a gabonafélékben rejlő allelopátiás potenciál alkalmazásának lehetőségeit. Kimutatják, hogy a különböző aktív vegyületek (pl. DIBOA (2,4-dihidroxi-1,4-benzoxazin-3-on), DIMBOA (2,4-dihiroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-on)) koncentrációja növényfajonként és fajtánként eltérő, ezen túl az egyed kora is meghatározó (Friebe et al. 1995, Schulz et al. 1994). Olofsdotter (1995) rámutat, hogy az allelokémiai anyagok termelése poligénikus tulajdonság, amely gyengén korrelál a terméssel és más – a mezőgazdaság szempontjából fontos – mutatóval. Mégis az integrált gyomszabályozás jövője szempontjából az allelopátiás tulajdonságú fajták termesztése járható utat jelent. Hatékony alkalmazásuk feltétele az aktív vegyületek termeléséért felelős gének lokalizálása és jelenleg is termesztett fajtákba történő átültetése, mely gyors megoldással kecsegtet szemben a növénytermesztésben hagyományos szelekcióval (Wu et al. 1999).

Összegzésképpen megállapítható, hogy (1) az allelopátia természetes körülmények között nem különíthető el a kölcsönhatások többi formájától, hanem kizárólag az interferencia részeként értelmezhető; (2) in vitro vizsgálatokban allelopátiás potenciál megállapítására kerülhet sor; (3) nem pusztán növények közti közvetlen kölcsönhatást jelent, hanem növény-talaj-növény illetve növény-mikroorganizmus kapcsolatot is; (4) az allelopátiás hatást kiváltó vegyületek izolálása illetve a termelésért felelős gének ismerete lehetőséget teremt az allelopátiás tulajdonságú növények gyomszabályozásban és biológiai védekezésben történő felhasználására.

2.3. AZ *AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA* ALLELOPÁTIÁS TULAJDONSÁGA

A parlagfű allelopátiás hatásával kapcsolatban kevés szakirodalom áll rendelkezésre.

Hazánkban *Béres* (1981, 1983, 1994) a friss hajtásból és gyökérből készített desztillált vizes és etanolos kivonatokkal kezelt tesztnövények csírázásánál nem tapasztalt szignifikáns eltérést a kontrollhoz képest. A parlagfű gyökérexudátmának és elbomló növényi maradványainak vizsgálata során sem mért allelopátiás aktivitást.

Bradow (1985) valamint *Fischer és Quijano* (1985) parlagfű hajtás és gyökér vizes kivonatokkal kezelt magvak esetében tapasztaltak csírázásgátlást, melyet részben ozmotikus hatásnak tulajdonítottak. Szerves oldószerekkel extrahált kivonat csak a saláta csírázását gátolta szignifikánsan.

Ohmoto et al. (1987) parlagfű pollenből, *Silva et al.* (1992) föld feletti részekből számos terpenoidot izolált elsősorban humán egészségügyi, illetve kémiai vizsgálat céljából.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. FELHASZNÁLT NÖVÉNYI ANYAGOK

3.1.1. Parlagfű gyűjtése

A vizsgálati időszak során (1997-2000) minden év augusztusában gyűjtöttünk parlagfűvet. A növényeket teljes virágzás időszakában gyökerestül ástuk ki a talajból. 25-30 °C-on direkt fénytől védett helyen szárítottuk. Ezt követően történt a növényi részek szétválasztása gyökérre, levélre és a porzós fészekvirágzatot tartalmazó hajtásra, melyeket szobahőmérsékleten jól szellőző helységben tároltunk.

Termést tartalmazó növényegyedeket minden év októberében gyűjtöttünk, melyekről a kaszatokat, a szárítást követően távolítottuk el.

3.1.2. A vizsgálatoknál használt tesztorganizmumok

3.1.2.1. Növényi magvak

A növényfajok és -fajták kiválasztásánál a hazai és nemzetközi irodalmat vettem alapul (*Anaya et al.* 1995b, *Dhawan* 1995, *Ismail és Kumar* 1996, *Szabó* 1997, *Tongma et al.* 1997, *Cruz-Ortega et al.* 1998), emellett elsődleges szempont volt a csírázási százalék, melyet a vizsgálatok előtt minden esetben ellenőriztem.

A csírázási kísérletekben használt fehér mustár (*Sinapis alba* cv. *Budakalászi sárga*) vöröshere (*Trifolium pratense* cv. *Junior*), uborka (*Cucumis sativus* cv. *Barbara*) a kereskedelemben is beszerezhető fémzárolt, csávázatlan vetőmag volt. Az étkezési amarántot (*Amaranthus hypochondriacus* cv. *Edit*) a PTE TTK Növénytani Tanszékéről kaptam (eredetileg Dr. Szócs Zoltán botanikustól származik).

3.1.2.2. Algák

A kísérletekben tesztorganizmusként *Chlamydomonas* sp. (MACC-1129; Balatonederics – kaszáló, 1998) és *Chlorella vulgaris* Beijerinck 1890 (MACC-1132; Tihany – levendulatábla, 1998) zöldalga törzseket használtunk. Előzetes vizsgálatok alapján feltételezhető (*Lepossa, ined*), hogy ezek a talajalgák magasabbrendű növények fejlődését befolyásolják, bár a kölcsönhatás pontos mechanizmusával kapcsolatban még nem állnak rendelkezésre adatok.

A törzsek fenntartása Bold szerint módosított (*Bold* 1949) 1,5% agarral szilárdított Bristol táptalajon történt 15±1 °C-on.

3.1.2.3. Fitopatogén gombák

A frakciók allelopátiás potenciáljának vizsgálatához tíz fitopatogén gombafaj tesztelésére került sor: *Alternaria alternata* Keissler (NCAIM F.00750), *Botrytis cinerea* Persoon (NCAIM F.00744), *Fusarium oxysporum* Schlechtendal (NCAIM F.00728), *Aspergillus niger* van Tieghem (NCAIM F.00071), *Aspergillus wentii* Wehmer (NCAIM F.00167), *Penicillium expansum* Link (NCAIM F.00601), *Rhizopus stolonifer* Lind (NCAIM F.00654), *Verticillium dahliae* Klebahn (NCAIM F.00747), *Trichoderma sp.* (NYME MTK Élelmiszertud. Int.), *Helminthosporium sativum* (NCAIM F.00745). A gombák fenntartása burgonyakivonat glükóz agaron (PDA; pH 7,0) történt 26 °C-on (Földes et al. 2000).

1. ábra Az *Ambrosia artemisiifolia* elterjedése a Földön

2. ábra A parlagfű areája (1960)

4. ábra A növények kölcsönhatásban résztvevő anyagok, és a veszteségek forrása (Grodzinszkij 1965) (1) miazminok, (2) fitoncidek, (3) fitogénikus anyagok, (4) aktív exkrétumok, (5) passzív exkrétumok, (6) szaprolinok, (7) donornövény, (8) akceptornövény, (9) átalakulás a talajban, (10) heterotróf szervezetek átalakító tevékenysége, (11) párolgási veszteség

5. ábra A kivonatok és frakciók analizisének vázlata

3.1.2.4. Szimbióta baktériumok

Az allelopátia közvetett hatásnak modellezésére (növény-mikroorganizmus-növény) a talajalgák mellett a magasabbrendű növényekkel szimbiózisban élő nitrogénkötő baktériumok vizsgálatát is elvégeztük. A kísérletekben *Rhizobium japonicum* és *R. phaseoli* törzsek (NYME MTK Élelmiszertud. Int. Törzsgyűjtemény) tesztelésére került sor.

3.2. KIVONATOK KÉSZÍTÉSE

Az allelopátiás potenciál bizonyítása során az első lépés a vizes extraktumok vizsgálata. A vizes kivonatok csírázásra gyakorolt hatása támpontot nyújt ahhoz, hogy természetes körülmények között fennáll-e az allelopátiás anyagok kimosódásának lehetősége. Ennek függvényében

szükséges mérlegelni, vajon érdemes-e a vizes extraktum tisztítását és az ezzel párhuzamos folyamatos tesztelését elvégezni (5. ábra).

Valamennyi kivonást – beleértve a frakcionálást is – legalább két alkalommal megismételtünk és külön-külön csírázási kísérleteket állítottunk be, melyek eredményeit csak akkor fogadtuk el megbízhatónak, ha azok szignifikáns különbséget nem mutattak.

A frakciók esetében a csíráztatást kizárólag amaránt magvakkal végeztem el. Ennek az a magyarázata, hogy a tisztítási folyamat végén század- illetve ezred gramm anyagmennyiséget kaptam, amellyel nem kivitelezhető több növényfajt átfogó kísérletsorozat. Figyelembe véve a frakcionálásonkénti szükségszerű két ismétlést a vegyszer és anyagköltség így is tetemes volt.

Az *Amaranthus hypochondriacus*-t gyors és egyenletes csírázása miatt választottam ezekhez a vizsgálatokhoz tesztnövénynek.

A virágzatból készült oldatok kizárólagos frakcionálásának oka részben a költségkímélés, másrészt az a tény, hogy a három vizsgált növényi rész közül ennek a vizes kivonata eredményezte a legerősebb gátló hatást.

3.2.1. Vizes kivonatok készítése

A vizes kivonatok készítésénél Szabó (1997) módszerét követtük. Körülbelül 1 mm nagyságú részekre felaprított légszáraz levél, porzós fészekvirágzat illetve termés 5-5 g-jából 1 órás, 100 ml desztillált vízben történő ráztatás (60 min^{-1}) során, centrifugálást (4000 min^{-1} ; Sigma 3K12) és szűrést követően kaptuk a kísérletekben alkalmazott extraktumot. Az oldat szárazanyag-tartalmát liofilezés (Flexy-Dry μP) után ezred gramm pontossággal határoztuk meg. A mért koncentrációnak megfelelő mannit ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$) oldat készült az ozmotikus hatásból eredő, félrevezető eredmények kiküszöbölése érdekében.

A pH különbségek miatt felmerülő csírázási, fejlődési rendellenességek kiszűrése érdekében a kivonatok pH értékét minden esetben ellenőriztük.

A kivonatokat törzsoldat valamint kétszeres, ötszörös és tízszeres hígítás formájában, a mannitot tartalmazó kontrollt $10, 5, 2, 1 \text{ mg.ml}^{-1}$ töménységben használtuk fel a kísérletekben.

3.2.2. Frakcionálás

3.2.2.1. Normál fázison végzett frakcionálás

3.2.2.1.1. Kloroformos kivonat készítése

A kivonatok Botz (1996) útmutatásai alapján készültek. 40 g légszáraz őrölt növényi mintát tízszeres mennyiségű, 4:1 = etanol:desztillált víz eleggyel homogenizáltuk 2 percig turboextrakcióval (Euroturax 27000 min^{-1} ; $T < 38 \text{ }^\circ\text{C}$). Centrifugálást (4000 min^{-1}) és szűrést (MN

640 w) követően a szűrletet kb. 1/10 térfogatra töményítettük be rotációs vákuumbepárlón (Bibby RE 100, $T < 38\text{ °C}$), majd a szűrletet 2M-os kénsavval 2 pH értékre állítottuk be. Háromszori kloroformmal történő kirázás és nátrium-szulfáton (Na_2SO_4 , vízmentes) történő vízmentesítés adta a teljes betöményítés ($T < 38\text{ °C}$) után a mérsékelt poláris kivonatot, melyet felhasználásig meghatározott mennyiségű kloroformban feloldva zárt edényben tároltunk 4 °C -on.

3.2.2.1.2. *Kloroformos virágzat-kivonat alacsony nyomású oszlopkromatográfiás (LVCC) elválasztása*

A 3.2.2.1.1. pontban leírt kloroformos virágzat-kivonatot 6 frakcióra bontottuk n-hexán (C_6H_{14}) és metilén-klorid (CH_2Cl_2) 100:0; 80:20; 60:40; 40:60; 20:80; 0:100 arányú elegyével.

Kromatográfiás oszlopba (25x180 mm, üvegfrittel) 10 g szilikagél (Merck, Cat.No. 1.10601.) töltetet helyeztünk, amit metilén-kloriddal nedvesítettünk át. 0,5 g virágzat extraktot 1 ml kloroformban feloldottunk és 1 g szilikagéllal összekevertünk, melyet az oldószer elpárolgása után helyeztünk az oszlopra. A töltet felkeveredését üveggyapot felhelyezésével akadályoztuk meg. A fent leírt oldószerkevegyekből 50 ml-rel vákuum alatt mostuk az oszlopot.

A frakciókat, teljes bepárlást követően ($T < 38\text{ °C}$), etanol és kloroform 1:1 arányú elegyében feloldva, $0,1\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ koncentrációban alkalmaztuk a vizsgálatok során.

3.2.2.1.3. *A normál fázison nyert frakciók analitikai HPLC vizsgálata*

A kloroformos virágzat-kivonatból nyert hat frakció folyadékkromatográfiás elválasztására két kísérletet tettünk. Az általunk alkalmazott paraméterek mellett (*I. táblázat*) csak az I. frakcióban voltak csúcsok kimutathatók, ugyanakkor gátlást az I. a II. és a III. frakcióknál egyaránt tapasztaltuk. Ezeket a vizsgálatokat a későbbiekben nem folytattuk, további frakcionálásra, tisztításra nem került sor. Ennek két oka volt: (i) a metilén-klorid az alacsony hullámhosszú sugarakat elnyeli, így a kromatogramon csúcsok nem láthatók; (ii) a frakcionáláshoz és elválasztáshoz szükséges szerves oldószerek magas költsége.

3.2.2.2. Fordított fázison végzett frakcionálás

3.2.2.2.1. *Desztillált vizes virágzat-kivonatok készítése*

Turboextrakciós eljárással 5 g szárított parlagfű virágzatot 100 ml desztillált vízzel homogenizáltunk, melynek a tisztáját – centrifugálást követően (5000 min^{-1} , 30 min) – leöntöttük, a maradékot ismét centrifugáltuk. A feltárás tökéletesítése érdekében a centrifugálás során

leülepedett növényi részekkel a fenti eljárást megismételtük, további 100 ml desztillált víz hozzáadásával.

3.2.2.2.2. Desztillált vizes virágzat-kivonatok analitikai HPLC vizsgálata

A feltárást követően a vizes kivonatból mintát vettünk amit magas nyomású folyadékkromatográfiás eljárással elemeztünk. A kromatogram tájékoztatást nyújt a virágzat-kivonat összetételéről, a szennyező, és aktív anyagok retenciós idejéről. A frakcionálással nyert oldatok analitikai HPLC-vel felvett kromatogramjait összehasonlítva a vizes kivonat kromatogramjával – a biotesztek eredménye alapján – tervezhető a további elválasztás.

3.2.2.2.3. A desztillált vizes kivonatok LVCC elválasztása

Kromatográfiás oszlopba (25x300 mm üvegkolonna üvegfrittel) 3 g töltetet (LiChroprep RP 18 40-63 µm Merck, Cat.No. 1.13900) 30 ml ACN-lel üvegkolonnába töltöttünk, majd 20 ml ACN-lel és 50 ml desztillált vízzel kondicionáltuk. A töltet frakcionálás során bekövetkező felkeveredését üvegyapot felhelyezésével kerültük el. A kondicionálást követően a vizsgálandó kivonatot a töltetre pipettáztuk és vákuum alatt átszívattuk, ez az átfolyó rész képezte az I. frakciót. A II. frakciót 50 ml desztilláltvizes mosás adta. Erre azért volt szükség hogy a tölteten gyengén kötődő poláros molekulák lehetőleg lemosódjanak. Feltételezhető volt (amit a csírázási kísérletek a későbbiek folyamán bizonyítottak), hogy ezek az anyagok nem rendelkeznek allelopátiás aktivitással és a tölteten maradván a többi frakciót szennyeznék.

Ezt követő frakciókat 20:80, 40:60, 60:40, 80:20 és 100:0 arányú ACN–víz eleggyel kaptuk. Végül a töltetet 50 ml metilén-kloriddal, ezt követően 50 ml n-hexánnal is lemostuk (5. ábra „A”). Az I. és II. frakciókat liofilezéssel a fennmaradó hét frakciót rotációs vákuumbepárlón töményítettük be. A betöményítésre egyrészt a tárolás miatt volt szükség (I. II. vizes frakciók), másrészt a kísérletekhez az ACN-víz elegy nem alkalmas, mivel az ACN befolyásolhatja a csírázást.

A III., IV. és V. frakciókat a bepárlás után ACN-lel ultrahangos kádban (Tesla) rázattuk. Ennek ellenére az oldódás csak részlegesen ment végbe, ezért centrifugálást követően az üledéket vízzel szuszpendáltuk, amelyet ismét centrifugáltunk. Így a III., IV. és V. frakciónak ACN-ben és vízben oldott formáját kaptuk.

A VI. és VII. frakciót ACN-lel oldottuk vissza, a VIII. és IX. frakciót metilén-kloriddal, illetve n-hexánnal.

3.2.2.2.4. A fordított fázisú frakciók analitikai HPLC vizsgálata

Az oszlopkromatográfiás elválasztás során kapott frakciókat (I. és II. vizes frakciók; III., IV. V. VI. VII. ACN frakciók; VIII. metilén-klorid frakció; IX. n-hexán frakció; III., IV. és V. ACN frakciók üledékeinek vizes oldata) biotesztelésük után HPLC-vel elemeztük, az aktívnak bizonyulók közti hasonlóságok és különbözőségek kiderítése érdekében (2. táblázat). A kromatogramok alapján az LVCC-t a továbbiakban a hat különböző ACN–víz arány helyett csak kettővel végeztük (elhagytuk a n-hexános és metilén-kloridos lemosást is). A biológiailag inaktív komponensek (mátrix) az 50 ml 10 %-os ACN-lel történő mosással távoztak, az aktív komponenseket 50 ml 60 % ACN-t tartalmazó oldószer eleggyel eluáltuk (5. ábra). A továbbiakban ezt az aktív frakciót elemeztük analitikai és preparatív folyadékkromatográfiás eljárással.

3.2.2.2.5. A 60 %-os ACN frakció elválasztása preparatív HPLC-vel

Az alacsony nyomású oszlopkromatográfiás elválasztás során kapott 50 ml 60 %-os ACN frakciót teljesen bepároltuk a szárazanyag meghatározás céljából, majd 15 ml 60 %-os ACN-ben visszaoldottuk. Ebből, preparatív folyadékkromatográfiával (3. táblázat), további öt frakció elválasztására került sor, melyeket szárazanyag meghatározás céljából bepároltunk, majd, ultrahangos kádban rázatva, ACN-lel szuszpendáltunk. A centrifugálás után kapott ACN mentes üledéket vízben rázattuk és centrifugáltuk. A fenti folyamat során kapott tíz (5 ACN-es és 5 vizes) frakció $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ -es oldatát használtuk az amaránt bioteszteknel, továbbá algák, fitopatogén gombák és szimbionta baktériumok esetében az allelopátiás potenciál bizonyításához. A preparatív HPLC vizsgálat során felvett kromatogramokon az egyes komponensek elválása nem volt éles, ezért a csúcsok jobb elkülönülése érdekében analitikai HPLC vizsgálatot végeztünk (2. táblázat).

3.3. CSÍRÁZÁSI BIOTESZT

3.3.1. Vizsgálat vizes kivonatokkal

A vizsgálatokhoz minden esetben 7 cm átmérőjű üveg Petri-csészéket használtunk, melyekbe

pontosan illeszkedő szűrőpapírkorongok kerültek (MN 640 w). A 2 ml extraktummal megnedvesített szűrőpapírra a tesztnövények (amaránt, fehér mustár, vöröshere, uborka) azonos méretű és habitusú magjából 10-10 db-ot helyeztünk egyenlő távolságra. Kontrollt desztillált víz, illetve a vizsgált koncentrációnak megfelelő mannit oldat ($10,0-1,0 \text{ mg.ml}^{-1}$) képezte.

A petricsészéket lefedtük és parafilmmel lezártuk, 72 óráig, $24 \text{ }^{\circ}\text{C}$ -on, sötétben inkubáltuk, négy ismétlésben véletlen elrendezésben. Az értékelés alapját a csírázási százalék, a fejlődésnek indult csíranövény gyökerének, illetve a szikleveél alatti szárának hossza adta.

3.3.2. Vizsgálat frakciókkal

A szűrőpapírra pipettázott frakció esetében az oldószer teljes elpárolgását követően 2 ml desztillált vízzel biztosítottuk az imbibícióhoz szükséges nedvességet. A kontrollcsoportokat a 3.3.1. pontban leírt mannit oldat, a vizsgált frakció oldószere (kloroform, etanol, hexán, metilén-klorid, acetonitril) és desztillált víz képezte. Az oldószert tartalmazó kontrollok esetében a frakciókkal azonos módon jártunk el.

A kísérleti körülmények a 3.3.1. pontban leírtakkal megegyeztek. A frakciók tesztelését csak az amaránt magvakkal végeztük el, mert a vegyszerigényes elválasztás során rendkívül kis anyagmennyiséghez jutottunk.

3.4. ALGA BIOTESZT

Az algatörzsek szaporítására a kezeléseket megelőző 72 órával került sor Tamiya tápoldatban (4. táblázat) (Ördög 1981). A kísérletekben az algaszuszpenziót 550 nm -en $0,05 \text{ ABS}$ -re beállítva biztosítottuk az azonos mennyiségű kiindulási biomasszát (Aliotta et al. 1999).

A preparatív HPLC során kapott 4-es frakciót használtuk a vizsgálatokban $0,1$; $0,05$ és $0,01 \text{ mg.ml}^{-1}$ koncentrációban, oly módon, hogy a bioteszt előtt 2 nappal a koncentrált (10 mg.ml^{-1}) kivonatot a steril kémcsövekbe ($15 \times 180 \text{ mm}$) juttattuk, és az oldószert elpárologtattuk. A kontroll ez esetben tiszta ACN volt, mellyel a kivonathoz hasonlóan jártunk el. Abszolút kontrollként steril Tamiya tápoldatot alkalmaztunk. A kezeléseket során kémcsövenként 10 ml steril Tamiya tápoldatot és $0,5 \text{ ml}$ axénikus algaszuszpenziót használtunk. A steril papírvatta dugóval lezárt kémcsöveket 10 napig $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ -on $130 \text{ } \mu\text{M.cm}^{-2}.\text{s}^{-1}$ $12/12$ órás megvilágítással inkubáltuk, naponta kémcsőrázóval kevertük.

A *Chlamydomonas sp.* esetében megfigyelhető, hogy a kémcső falán képződő párán is elszaporodik, ami az értékelés során szórásnövelő tényező. Előkísérletek során megfigyeltük, hogy a frakciót tartalmazó tápoldatban nem, vagy csak gyengén szaporodó algák az üveg falán zöld, gyűrűszerű bevonatot képeztek. A klorofill-a meghatározás a kémcsövek összerázásával kezdődik a reprezentatív mintavétel érdekében, melynek során a kémcső falán elszaporodott algák is a mintába kerülnek, így az eredmények nem értékelhetők.

Ennek kiküszöbölésére a kémcsöveket szilanizáltuk. Az eljárás során a tiszta, kiizzított kémcsöveket 5 %-os dimetil-diklór-szilén toluolos oldatában áztattuk, így a felület hidrofóbbá válik. A tiszta sterilizett kémcsöveket használtuk a vizsgálat során.

Az értékelést klorofill-a koncentráció UV-spektrofotometriás (Varian Cary 50 Scan) meghatározásával végeztük (MSZ ISO 10260) forró etanolos extrakcióval.

A klorofillt tartalmazó extraktumokat 665 nm-en, illetve a zavarosság kiküszöbölésére 750 nm-en fotometráltuk. Ezt követően 5 ml mintához 0,005 ml 3 M-os sósavat adtunk és 30 percen belül ismét fotometráltunk, ezzel kiszűrve az inaktív alगतömeget és a lebomlott klorofillt. A fotometráls alapján kapott abszorbancia értékekből az alábbi összefüggés segítségével számoltuk ki a klorofill-a koncentrációt:

3.5. GOMBA BIOTESZT

3.5.1. Lyukteszt módszer

Az aktív frakció fitopatogén gombákra gyakorolt hatásának vizsgálatakor Szegi (1979) szerint jártunk el. 20 ml folyékony 45 °C-os PDA-hoz 0,5 ml konídiumszuszpenziót pipettáztunk, melyet Petri-csészébe öntve összekevertünk.

Az agar szilárdulását követően Petri-csészénként négy, 10 mm átmérőjű lyukat fűrtünk, melyből háromba 0,15 ml különböző koncentrációjú (1,0; 0,5; 0,1 mg.ml⁻¹) frakciót pipettáztunk, a negyedik lyukba ACN került.

A Petri-csészéket 72 órán keresztül 26 °C-on inkubáltuk. A kezeléseket öt ismétlésben állítottuk

be, az értékelés során a lyukak körül keletkező gátlási zónát mértük tolmérő segítségével. Az értékelést követően a Petri-csészéket még 72 órán keresztül inkubáltuk a hatás tartósságának ellenőrzése érdekében.

3.5.2. Konídiumcsíráztatásos módszer

A lyukteszt eredményei alapján a konídiumcsíráztatásos tesztet *Fusarium oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* és a *Verticillium dahliae* gombáknál végeztük el, mivel ezek esetében tapasztaltuk a lyukteszt módszerrel a legnagyobb gátlási zónát.

A 4. frakció három hígítását (1,0; 0,5 és 0,1 mg.ml⁻¹) és az ACN-es kontrollt a kezelés időpontja előtt 48 órával juttattuk az Eppendorf-csövekbe, így az oldószer elpárolgott, nem befolyásolta a konídiumok csírázását.

Az Eppendorf-csövekbe a kezelés napján 0,9 ml táplevest (1000 ml desztillált víz; 5 g kazein pepton; 5 g szójaliszt pepton; 40 g glükóz) és 0,1 ml konídiumszuszpenziót (10⁷ induló csíraszám) pipettáztunk. Az ACN-es kontroll mellett kizárólag táplevest és konídiumot tartalmazó sorozatot is beállítottunk.

A vizsgálatot négy ismétlésben, 26 °C-on 9 órás inkubációs idővel végeztük. Az értékelés során a konídiumok csírázási százalékát vettük alapul, ismétlésenként egy csepp tárgylemezre felcseppentett táplevesben 30 konídium csírázását vizsgáltuk. Az Eppendorf csöveket az értékelést követően további 72 óráig inkubáltuk. Feltételezhető volt, hogy a kisebb koncentrációk csak késleltetik a konídium csírázást, de nem gátolják teljesen. A kifejlett telepek alapján egyértelműen megállapítható a frakció hatásának mértéke.

3.6. BAKTÉRIUM BIOTESZT

A kísérletet a 3.5.1. pontban leírtak szerint végeztük a preparatív HPLC során gyűjtött 4. frakció 1,0; 0,5 és 0,1 mg.ml⁻¹ koncentrációjú oldatával. A baktérium törzsek szaporítása Allen agaron (5. táblázat) történt. A Petri-csészékbe kiöntött és megszilárdult táptalaj felületére szélesztéssel juttattuk a 10⁷ csíraszámú baktérium szuszpenziót. Ezt követően 10 mm átmérőjű lyukakba került a 0,15 ml frakció. Kontrollként tiszta ACN-t használtunk. A kezeléseket öt ismétlésben állítottuk be és 48 órás 30 °C-on történő inkubálás után, a lyukak körül kialakuló gátlási zónák mérésével határoztuk meg a baktericid hatást.

4. EREDMÉNYEK

4.1. CSÍRÁZÁSI BIOTESZTEK

4.1.1. Desztillált vizes kivonatok

4.1.1.1. Mannit oldat hatása a csírázásra

A kísérletek előtt meggyőződünk a vizes kivonatok kémhatásáról és a szárazanyag-tartalmáról (6. táblázat) az ezekből adódó félrevezető eredmények elkerülése érdekében.

A desztillált víz, a mannit oldat és a kivonatok pH értékeiben tapasztalható eltérés tesztnövények fejlődését nem befolyásolta. Az ozmotikum a csírázás megindulását nem hátráltatta, csak a csíranövények fejlődését akadályozta. Az amaránt növények radikula- és hipokotilhossza a 10 mg.ml^{-1} koncentrációjú mannitoldat hatására szignifikáns lemaradást mutatott a desztillált vizes kontrollhoz képest. Az uborka esetében még az $1,0 \text{ mg.ml}^{-1}$ töménység is 32 %-os csökkenést okozott a hipokotil megnyúlásában, ezzel szemben a gyököcskehosszban csak kismértékű pozitív illetve negatív eltérés jelentkezett a vizes kontrollhoz képest, ami azonban $P=0,001$ megbízhatóság mellett nem volt szignifikáns. Vöröshere csíranövények a 2,0 és az $1,0 \text{ mg.ml}^{-1}$ töménységű mannit oldatos kezelésre 14-19 %-os megnyúlással (gyököcske és szikközépi szár együttes hossza) válaszoltak. A mustár hipokotil csak gyenge reakciót mutatott az ozmotikumokkal szemben, a gyököcske esetében azonban ilyen mértékű változást sem tapasztaltunk.

Az eredmények értékelésénél az előbbieken leírtakat messzemenően figyelembe vettem. Allelopátiás hatást akkor tartottam bizonyítottnak, ha az adott kivonat nem csak a desztillált vizes, hanem valamennyi ozmotikus kontrollhoz képest is $P=0,001$ szinten megbízható különbséget mutatott.

A táblázatokban és az ábrákban, a zsúfoltság elkerülése végett, a mannittal kapcsolatos eredmények közlését mellőzöm, ezek a mellékletben megtalálhatók (1. melléklet).

4.1.1.2. Parlagfű kivonatok hatása a csírázásra

A tesztnövények valamennyi vizes extraktummal végzett kezelésre jól mérhető morfológiai változással reagáltak. A kivonatok a csírázásra és a csíranövények növekedésére gyakorolt gátló,

illetve serkentő hatásuk tekintetében egyaránt különböztek, ami nem magyarázható az oldatok eltérő szárazanyag-tartalmával (6. táblázat) és az ebből esetlegesen fakadó ozmotikus gátlással (melynek megléte a különböző koncentrációjú mannit oldatokkal kezelt kontrollesoportok eredménye alapján kizárható), mivel ebben az esetben a levélkivonatnak kellett volna a legintenzívebb reakciót kiváltania. Ezzel szemben minden tesztnövény esetében a gátló hatás a virágzat>levél>termés sorrend szerint alakult.

A vizsgált fajok mért jellemzőit egybevetve megfigyelhető, hogy az amaránt a legérzékenyebb a kezelésekkel szemben. A radikula fejlődését – amennyiben a csírázás megindult – valamennyi kivonat minden hígítása lassította. A többi tesztnövényvel ellentétben, az amarátnál serkenést nem tapasztaltam (6. és 7. ábra).

A fehér mustár magok csírázását a parlagfű levélkivonat törzsoldata, valamint a virágzat-kivonat két legnagyobb koncentrációja 100 %-ban gátolta a magok egyenletes duzzadása mellett (7. táblázat). A nagyobb hígítások a gyököcske méretét 19-57 %-ban, a hipokotilhosszat 18-94 %-ban csökkentették (6. és 7. ábra).

A vöröshere magok töményebb virágzat-kivonatokkal kezelve imbibált állapotba kerültek, de a gyököcske nem jelent meg.

Az uborkánál gátlást alig tapasztaltam, ellenben –főleg az alacsonyabb koncentrációknál – elsősorban a gyököcskénél 17-30 %-os szignifikáns serkentő hatás jelentkezett (6. ábra).

Rice (1984) szerint az egyébként gátló anyagok nagyon kis koncentrációban pont az ellenkező hatást, vagyis a hajtás és a gyökér gyorsabb növekedését válthatják ki. Brückner (1999) szerint a parlagfű vizes kivonatai esetében a csíranövények mért jellemzőiben bekövetkezett pozitív változás a növényből vízzel kioldódó makro- és mikroelemeknek tulajdonítható és nem az allelopátiás tulajdonságú anyagok hígulásából fakad.

A serkentés ténye különösen szembetűnő a termés vizes kivonatnál, mely az uborkán kívül a vöröshere és a mustár növekedésénél is tapasztalható. Feltehetően a parlagfű magjának endospermiumában raktározott tartaléktápanyagok jelentős része kerül a kivonatkészítés során az oldatba, melyek aránya az allelopátiás tulajdonságú anyagokéhoz képest magasabb, mint a levélben vagy a virágban.

A vizes kivonatokkal végzett kezelésekből megállapítható hogy a parlagfű allelopátiás potenciállal rendelkezik, melyre a kísérletbe vont növények eltérő erősséggel válaszolnak. A fent leírt eredmények tükrében indokoltnak tűnt a vizes extraktumok tisztítása a hatóanyagcsoport

megismerése érdekében, melynek során a csírázási biotesztekkel párhuzamosan elvégeztük a legerősebb gátló hatást mutató virágzat-kivonat kémiai analízisét is analitikai HPLC-vel (8. *ábra*). Így lehetővé vált az aktív-, és a tesztstruktúra számára közömbös, „szennyező” anyagok tökéletesebb elválasztása. A vizsgálatok támpontot nyújtottak az oszlopon történő frakcionálás tökéletesítéséhez is (pl. töltet, eluens, gradiens megválasztása).

4.1.2. A normál fázison nyert frakciók hatása a csírázásra

4.1.2.1. Kloroformos kivonatok értékelése

A csírázási biotesztek alapján kiderült, hogy a szerves oldószeres kivonat nagyobb koncentrációban, tisztább formában tartalmaz csírázásgátló anyagokat. Ezt bizonyítja, hogy a kezelések során alkalmazott legnagyobb hígítás ($0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$) is 0,1 %-os megbízhatóság mellett szignifikánsan csökkentette az amaránt radikula- és hipokotil megnyúlását, míg a vizes kivonat $0,6 \text{ mg.ml}^{-1}$ töménységben szignifikáns serkentést mutatott. A szerves oldószeres extrahálás révén a vízoldható tápelemek hatása kizárható, nem befolyásolják a csíranövények megnyúlását (9. *ábra*).

A csírázási százalék alapján megállapítható, hogy az alkalmazott két legnagyobb töménységű oldat hatására egyetlen amaránt mag sem indult fejlődésnek és a $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ töménységű kivonat is 30 %-kal csökkentette a radikula és hipokotil növekedését.

4.1.2.2. A normál fázison nyert LVCC frakciók értékelése

A csírázási kísérlet során hat frakció vizsgálatára került sor (8. *táblázat*). A $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ töménységű frakciók a kloroformos kivonat ugyanilyen koncentrációjú oldatával közel azonos hatást mutattak. Ebből arra lehet következtetni hogy az oszlopon történő elválasztás a 3.2.2.1.2. pontban leírt paraméterek mellett nem hatékony (az anyag esetleg megkötődik a tölteten), illetve több aktív komponensnek is szerepe lehet a csírázásra gyakorolt gátló hatásban, melyek külön-külön csak nagyon kis koncentrációban vannak jelen a frakciókban, vagy kevésbé hatásosak, mint együtt. Bizonyítja ezt az is, hogy a három legaktívabb frakció elegye gátolt a legerősebben.

4.1.3. A fordított fázison nyert LVCC frakciók hatása a csírázásra

A turboextrakciós eljárással készített desztillált vizes virágzat-extraktumot nem teszteltük

csírázásra, mivel a vizes kivonatok ezirányú vizsgálatára már a korábbiakban (4.1.1.2. fejezet) sor került. Különbség elsősorban a kivonás módszerében van (3.2.1. és 3.2.2.2.1. fejezet), melyet az indokol, hogy a kromatográfiai eljárásához a lehető legjobb és leggyorsabb feltárás elvégzése célszerű, hogy a növényben található aktív komponensek minél nagyobb mennyiségben legyenek jelen a vizsgálni kívánt extraktban. Az ezzel együtt nagy mennyiségben kioldódó mátrix a töltetről a vizes mosás során távozik, nem befolyásolja az elválasztás végeredményét. A csírázási bioteszteknel alkalmazott kivonatok esetében az eljárás nem alkalmazható, mert az oldat szárazanyag-tartalmát növeli és az aktív komponensek relatív mennyisége kisebb lesz.

Az LVCC eljárás során kapott frakciókkal a szárazanyag pontos meghatározása előtt tájékozódó kísérletet állítottunk be a ténylegesen aktív frakciók kiszűrése érdekében (9. táblázat). Az előkísérletet kizárólag technikai okok miatt végeztük. Vizes-ACN-es elegy bepárlása hosszadalmas, a szárazanyag meghatározást követő visszaoldás az oldószer felhasználást növeli. A csírázási bioteszt alapján a négy leghatásosabb frakció a III., a IV. és az V. ACN-es oldatok valamint az V. frakció vizes oldata. A 9. táblázat adatai egyértelműen rámutatnak arra, hogy az oszlopon történő elválasztás 3.2.2.2.3. fejezetben leírt metodikája megfelelő a vizes virágzat-kivonat tisztításához és az aktív komponensek koncentráálásához.

Ezen ismeretek birtokában a négy aktív frakciót, teljes betöményítést és a szárazanyag-tartam pontos meghatározását követően, $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ töménységben teszteltük amaránt magvak csírázásra (10. ábra). Az amaránt bioteszt eredményeképpen az aktív csírázásgátló frakciók száma kettőre szűkíthető: III. (ACN) és IV. (ACN), ugyanakkor az V. vizes frakció esetében 48 %-os serkentés tapasztalható annak ellenére, hogy a tájékozódó kísérletben teljes csírázásgátlást okozott (9. táblázat). Ez – szemben a vizes kivonatoknál leírt serkentő hatással – nem magyarázható a tápanyagok jelenlétével, mivel azok a töltetről a vizes mosás során távoztak, hanem valamely komponens nagy hígításban serkentő, kisebb hígításban gátló tulajdonságával. Ezt támasztja alá az a tény is, hogy – a felvett kromatogramok alapján – ugyanannak a frakciónak vizes illetve ACN-es oldata között – a vélhetően aktív komponensekre nézve – csak mennyiségi különbség van. Hangsúlyozom azonban, hogy erről minden kétséget kizáróan a komponens vagy komponensek izolálását és biotesztjét követően győződhetünk meg.

A további vizsgálatokhoz a 3.2.2.4. fejezet alapján az aktív komponenseket egy frakcióba gyűjtöttük. A mosást 10 %-os ACN-lel végeztük, majd az aktív komponenseket 60 % ACN-víz eleggyel eluáltuk a töltetről.

Összehasonlítva a vizes extraktum és az aktív komponenseket magában foglaló 60 %-os acetonitriles frakció (5. ábra „B”) kromatogramját, megfigyelhető, hogy a nagy hullámhosszon elnyelő, a tesztek során hatástalannak mutakozó komponensek (a 8. ábrán a 8. perc előtti csúcsok) az eluálás során csak kis mértékben kerültek át a 60 % ACN-es frakcióba (11. ábra). Ez alapján feltételezhető, hogy az aktív anyagok a 8. percet követően távoznak az oszlopról.

4.1.4. Preparatív HPLC frakciók hatása a csírázásra

A 60 % ACN-es frakciót a preparatív HPLC-n történő 4,5 percenkénti mintavétel segítségével 5 frakcióra bontottuk. A 0,1 mg.ml⁻¹ töménységű oldatok közül egyedül a 4-es gátolta teljes mértékben az amaránt magvak csírázását (12. ábra). A többi frakció – az 1-es kivételével – a magok 90 % körüli csírázása mellett a csíranövények megnyúlását csökkentette szignifikánsan.

Ez a tény a következő lehetőségeket veti fel: (i) nem csak egy aktív komponens van; (ii) az elválasztás nem tökéletes.

Az eredmények tekintetében nincs különbség az ACN-ben, illetve a vízben oldott frakciók között, ezért csak az acetonitriles frakciók adatait közlöm. (A két eluens használata pusztán technikai okokra vezethető vissza (ld. 3.2.2.2.4. fejezet), a felvett kromatogramok a csúcsok méretében különböznek, ami a frakcióban található anyagmennyiség különbségéből fakad).

A csírázási eredmények alapján az alga, gomba és baktérium bioteszteknél kizárólag a preparatív HPLC során nyert 4-es frakciót alkalmaztuk, melynek kromatogramján hat csúcs vagyis hat komponens egyértelműen elkülöníthető (13. ábra). A csúcsok a 7. perc és a 12. perc között eluálódnak a kolonnáról.

Az in vitro csírázási kísérletek feltételezik a növények közötti közvetlen, szekunder metabolitok által kiváltott kapcsolatot. Ez a közvetlen egymásra hatás a természetben feltehetően csak ritkán játszódik le ennyire egyértelműen, mégis figyelemre méltó, hogy a növény rendelkezik ennek megvalósításához szükséges potenciállal, amely adott körülmények között – az interferencia részeként – növeli versenyképességét a másik növényvel szemben.

4.2. AZ ALGA BIOTESZT ÉRTÉKELÉSE

Az alga biotesztek célja a növények közötti indirekt allelopátiás kapcsolat lehetőségének bizonyítása volt. A csírázási biotesztekből arra következtettem, hogy a parlagfű virágzatból kivont aktív anyagok befolyásolják a magasabbrendű növények fejlődését. A növények közt

fennálló interakciók tanulmányozása szempontjából hasonlóan fontos kérdés a talaj-mikroorganizmusokon keresztül kifejtett hatás. Ennek vizsgálata annál is inkább szükséges, mivel a növényből kimosódó allelokémiai anyag nem közvetlen úton jut el az akceptor növényhez, hanem a talajon, és így a mikroorganizmusokon keresztül.

A preparatív HPLC-vel nyert 4. frakció a két zöldalga szaporodását különbözőképpen befolyásolta. A kísérletek során a *Chlorella vulgaris* mutatkozott érzékenyebbnek. Valamennyi kezelés lassította az algák szaporodását (14. ábra). A 0,01 mg.ml⁻¹ koncentrációjú frakciónál kétségbe vonható a szaporodásgátlás ténye, mert ez a kezelés csak a tápoldatos kontrolltól különbözött szignifikánsan, az ACN-estől nem.

A *Chlamydomonas sp.* a kezelésekre szignifikánsan csak a 0,1 mg.ml⁻¹ töménységű frakcióra reagált; a klorofill-tartalom a kontrollnak mintegy 50 %-a volt (15. ábra). A legnagyobb hígításban ellenben serkentést tapasztaltunk, de ez nem tekinthető P=0,1 %-os szinten megbízható eredménynek.

A talajalgák vizsgálata rámutat arra, hogy in vitro az allelopátia, mint indirekt (növény–alga–növény) hatás, fennállhat. A kísérletek alapján ismerve a zöldalgák parlagfű kivonattal szembeni reakcióját, a hatás szemmel látható megnyilvánulása az alga – (kultur)növény kapcsolat szorosságán múlik.

4.3. A GOMBA BIOTESZTEK ÉRTÉKELÉSE

Fitopatogén gombák vizsgálatokor arra kerestünk választ, hogy a parlagfű csírázást- és algaszaporodást gátló aktív komponensei alkalmasak-e fitopatogén gombák elleni küzdelemben. Ez a kérdés két szempontból is figyelmet érdemel. Egyrészt a fent említett anyagok védelmet nyújtanak-e a parlagfű számára növényi kórokozókkal szemben (fennáll-e a növény (donor)-gomba (akceptor) kapcsolat), másrészt a kivont hatóanyagok felhasználhatók-e biopeszticidként a mezőgazdaságban. Ez utóbbinak eldöntéséhez természetesen nem elegendők az elvégzett vizsgálatok, azonban tájékozódáshoz feltétlen szükségesek.

4.3.1. A lyukteszt vizsgálat értékelése

A vizsgálatba vont 9 gombafaj eltérő mértékben reagált a preparatív HPLC-vel elválasztott 4. frakcióval történő kezelésekre. Gátlási zónát mértünk az *Aspergillus wentii*, a *Fusarium oxysporum*, a *Helminthosporium sativum*, a *Rhizopus stolonifer* és a *Verticillium dahliae*

esetében. A kontrollal azonos mértékben fejlődtek az *Alternaria alternata*, az *Aspergillus niger* és a *Trichoderma sp.* Serkentést kizárólag a *Penicillium expansum* mutatott (10. táblázat).

A koncentrációkkal szemben a gombák a növényekhez és az algákhoz hasonlóan viselkedtek; a nagyobb töménységű frakció kifejezettebb hatást eredményezett, a serkentés ugyanakkor a $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ -nél volt különösen szembetűnő.

A gátlási zónák mérését követő mikroszkópos vizsgálat alapján kiderült, hogy az aktív komponensek nem a micélium növekedést befolyásolják, hanem a konídiumok csírázását. Ennek szemmel látható jele, hogy a gátolt területen kívül eső konídiumokból fejlődő micéliumok az értékelést követő napokban benőtték a gátolt területet.

4.3.2. Konídiumcsírázás értékelése

A konídiumcsírázás eredményei megerősítették a lyuktesztnél tapasztaltakat, mely szerint a 4. frakció a konídiumok csírázását, és nem a micélium fejlődést gátolja. A 9 órás inkubáció után a *Fusarium oxysporum* konídiumok az $1,0 \text{ mg.ml}^{-1}$ kezelés hatására nem csíráztak, a $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ koncentráció esetében megduzzadtak és a csírázás megkezdődött, míg a legnagyobb hígítás hatására rövid hifanövekedést (10-200 μm -es tartomány) figyeltünk meg (16. ábra). A két kontrollcsoport között eltérést nem tapasztaltunk, a hifahossz 400 és 600 μm mérethatár közé esett.

A *Rhizopus stolonifer* konídiumainak csírázását a vizsgálat időpontjában valamennyi koncentráció teljes mértékig gátolta. Ebben az esetben sem tapasztaltunk eltérést az ACN-es és a tápleveses kontroll között. Mivel az értékelés során csak a kontroll csoportoknál volt mérhető hifanövekedés, nem volt szükség mérettartományok összehasonlítására.

A *Verticillium dahliae* konídiumai az inkubáció letelte után nem csíráztak sem a kontroll-, sem a kezelt táplevesben.

Az értékelést követő 72 órás inkubáció szükségessége beigazolódott. A *Fusarium oxysporum* kontrollcsoportjai és a $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ -es kezelés esetében az Eppendorf-csővekben jól fejlett narancsszínű telep alakult ki (17. ábra). A $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ -es oldat hatására a hifanövekedés megindult, de konídiumképzést nem tapasztaltunk, a gomba fehér micéliumszövedéket alkotott a táplevesben. A legnagyobb koncentrációjú kezelés a 3. napon is teljes mértékben

gátolta a konídium-csírázást.

A *Rhizopus stolonifer* esetében a kontrollok és a két nagyobb hígítás a 3. napon nem mutatott szemmel látható különbséget; összefüggő szürke telep fejlődött a tápleves felszínén. Ezzel szemben az $1,0 \text{ mg.ml}^{-1}$ töménységű frakció gátolta a konídiumképzést, fehér micéliumtömeget figyeltünk meg a táplevesben (18. ábra).

Bár a *Verticillium dahliae* esetében hifanövekedés mérésére nem volt mód, a vizuális értékelést elvégeztük. Kizárólag az $1,0 \text{ mg.ml}^{-1}$ töménységű kivonat hatására tapasztaltunk csírázásgátlást, a többi kezelésnél, illetve a kontrolloknál nem figyeltünk meg rendellenes fejlődést (19. ábra).

A fitopatogén gombákkal végzett biotesztek alapján megállapítható, hogy a növényekhez és az algákhoz hasonlóan a gombák is eltérő érzékenységet mutatnak a 4. frakció aktív anyagaival és az alkalmazott koncentrációkkal szemben.

4.4. A BAKTÉRIUM BIOTESZT ÉRTÉKELÉSE

A lyukteszt módszerrel vizsgált *Rhizobium japonicum* és *R. phaseoli* törzsek egyaránt érzékenyek voltak a 4. frakcióval szemben. A legerősebben az $1,0 \text{ mg.ml}^{-1}$ töménységű oldat gátolta a baktériumok szaporodását, a $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ koncentráció hatástalannak bizonyult (11. táblázat).

A szimbióta baktériumokkal végzett vizsgálat alapján az alga biotesztekéből levont következtetésekhez hasonló megállapításra jutottunk. A magasabbrendű növények között fennálló közvetlen kapcsolat csak része a parlagfű-allelópátia megnyilvánulásának, kiterjedtebb kölcsönhatásról van szó, melyben szerepet játszanak magasabbrendű növényekkel szimbiózisban élő baktériumok is. Ez magában hordozza az allelopátia növény-növény közti közvetett megnyilvánulásának lehetőségét. Ismételten hangsúlyozni kell, hogy a parlagfű egy tulajdonságáról van szó, mely *in vivo* megnyilvánulása biotikus és abiotikus környezeti tényezők függvénye.

Rendszer	Merck Hitachi LaChromL-7100 pumpaL-7250 automata adagolóD-700 interface modulL-7450 diódasoros detektor (190-600 nm)L-7350 kolonna termosztát
Kolonna	LiChrospher Si-60 $5 \mu\text{m}$, 125x4 mm + 4x4 mm előtétkolonna, Cat.No. 50820
Eluens	metilén-klorid (A)hexán (B)

Gradiens	5-95 % „A” 20 perc alatt
Kolonna hőmérséklet	35 °C
Injektált térfogat	10 µl
Adatgyűjtés	200-600nm
Szoftveres adatgyűjtés és feldolgozás	D-7000 HPLC System Manager 3.1

1. táblázat Analitikai HPLC vizsgálatok paramétereit (normál fázisú frakciók)

	Vizes kivonat	Frakciók
Rendszer	Merck Hitachi LaChrom L-7100 pumpa L-7250 automata adagoló D-700 interface modul L-7450 diódasoros detektor (190- 600 nm) L-7350 kolonna termosztát	
Kolonna	ApexPrep ODS 8 µm, 250x4,6 mm (Cat.No. 4M25818)	
Eluens	0,1 % TFA + ACN (A)0,1 % TFA+ víz (B)	
Gradiens	5-95 % A, 20 perc	40-70% A, 20 perc
Kolonna hőmérséklet	35 °C	
Injektált térfogat	100 µl	10 µl
Áramlási sebesség	1 ml/min	
Adatgyűjtés	200-600nm	
Szoftveres adatgyűjtés és feldolgozás	D-7000 HPLC System Manager 3.1	