

**EXPERIMENTAL APPROACHES TO TEST ALLELOPATHY
RELATIONSHIPS IN PLANT COMMUNITIES
I. CARRIERS OF ALLELOCHEMICALS UNDER LABORATORY
CONDITIONS FOR OPTIMAL DEVELOPMENT OF TEST PLANTS²**

Assoc. Prof. Dimitria Ilieva, PhD

Department of Agricultural Machinery
“Angel Kanchev” University of Ruse, Bulgaria
Tel.: +359 888 294 063
E-mail: dilieva@uni-ruse.bg

Assoc. Prof. Plamen Marinov-Serafimov, PhD

Institute of Forage Crops – Pleven, Bulgaria
Tel.: +359 882 260 540
E-mail: plserafimov@abv.bg

Assoc. Prof. Irena Golubinova, PhD

Institute of Forage Crops – Pleven, Bulgaria
Tel.: +359 885 411 432
E-mail: golubinova@abv.bg

Chief. Assist. Prof. Svetlana Stoyanova, PhD

Institute of Agriculture and Seed Science “Obraztsov chiflik” - Rousse, Bulgaria
Tel.: +359 882 119 785
E-mail: sv_stoianova@mail.bg

Abstract: During the period 2020 - 2021 in the Institute of Forage Crops, Pleven a laboratory experiment was performed to establish the influence of three allelopathic carriers (distilled water, 50% ethyl alcohol (after evaporation) and 0.75% agar-gel) on germination, growth in accessions of annual and perennial cereal forage crops (*Sorghum sudanense* Piper Stapf., *Sorghum bicolor* (L.) Moench, *Sorghum bicolor* x *S. bicolor* var. *sudanense*, *Sorghum vulgare* var. *technicum*, Korn), *Lolium perenne* L., *Agropyron desertorum* Fisch. *Festuca arundinacea* Schreb.). It was found that the allelopathic carriers included in the study did not have a statistically significant effect on laboratory germination, growth of test plants. The use of agar-gel as a carrier of allelochemicals and development medium has a sufficient water supply and is well compacted to maintain and optimally develop the accessions included in the experiment. The carriers of allelochemicals used (agar-gel 0.75% and ethyl alcohol 50%) and development medium (agar-gel 0.75% and deionized water) are suitable for biological analysis and screening in laboratory experiments to determine the allelopathic potential. and/or allelopathic interference in *Sorghum* species and perennial cereals of the genus *Lolium*, *Agropyron* and *Festuca*.

Keywords: allelopathy, inhibition, carriers of allelochemicals.

ВЪВЕДЕНИЕ

Отрицателните взаимодействия между растенията в растителните съобщества се определят от два биологични феномена: интерспецифичната конкуренция по отношение основните вегетационни фактори на средата (светлина, вода или хранителни вещества, ареал и др.) и химически взаимодействия между растенията (алелопатия) (Rice, E., 1983; Macías, J.

² Докладът е представен на онлайн сесията на секция „Земеделска техника и технологии, аграрни науки и ветеринарна медицина“ на 29 октомври 2021 г. с оригиналното заглавие на български език: ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПОДХОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АЛЕЛОПАТИЧНИТЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ В РАСТИТЕЛНИТЕ СЪОБЩЕСТВА I. НОСИТЕЛИ НА АЛЕЛОХИМИКАЛИ ПРИ ЛАБОРАТОРНИ УСЛОВИЯ ЗА ОПТИМАЛНО РАЗВИТИЕ НА ТЕСТ РАСТЕНИЯТА

et al., 2003). По своята химична същност алелохимикалите могат да бъдат витамини, ферменти, алкалоиди, хинони, танини, етерични масла, органични киселини, нуклеотиди, глюкозиди, терпентиноиди, стероиди и други органични съединения (Olofsdotter, M. et al., 2002; Qasem, J., 2010; Кънева, Х. и кол., 2017). Според Rice, E. (1983) алелопатичното взаимодействие е форма на химическа конкуренция между растителните видове при която „донорът“ синтезира и отделя вторични метаболити (алелохимикали), а „реципиентът“ реагира полифакторно, изразяващо се в намаляване и/или инхибиране кълняемостта на семената, потискане на нарастването, промяна във фотосинтезата и други биохимични процеси в растителния организъм. Биохимичните взаимодействия основани на алелохимикали отделяни от растенията в растителните съобщества могат да предизвикат и стимулиращ ефект в системата „донор-акцептор“. Според Almeida, L. et al. (2007) най-често стимулиращият ефект под въздействие на алелохимикалите се изразява в удължаване на корените и стеблата при тест растенията, което при полски условия оказва влияние върху репродуктивността на културите (Kohli, R. et al., 1997; Baziar, M. et al., 2014; Peng, X., 2019; Findura, P. et al., 2020).

Понастоящем към алелопатията има нарастващ интерес в земеделието, тъй като това явление би могло да предложи перспективни алтернативни методи за борба с плевелите, да спомогне за намаляване вложенията на синтетични хербициди, поради нарастващият интерес към биологични продукти в ЕС и света (Afridi, R., & Khan, M., 2014; Hussain, S., 2015; Iqbal, N. et al., 2020; Li, J. et al., 2021). Независимо, че алелохербицидите са подходящи заместители на синтетичните хербициди, съществуват редица ограничения за приложението им, свързани с изолирането им, сложната химична природа и специфичността на много алелохимикали (Bhadoria, P., 2011). Според Latif, S. et al. (2017) идентифицирането на вторичните растителни метаболити, включително и алелохимикалите, е предпоставка за синтезиране на биологично базирани пестициди, въпреки, че на сегашния етап в земеделската практика не може да се игнорира използването им, но тяхната употреба може да бъде редуцирана, чрез използване на алелопатичния потенциал на растителните видовете, като алтернативно средство за регулиране степента на заплевеляване в обработваемите площи, с крайна цел намаляване на вложението на пестициди, акумулирането им в околната среда и осигуряване на ефективни методи за устойчиво развитие на селскостопанското производство и екологичните системи (Jabran, K. et al., 2015).

Въпреки вниманието, което се отделя на алелопатията от страна на еколози, биолози и херболози, усложнените взаимоотношения конкуренция-алелопатия, в системата „плевел-културно растение“, не е напълно изяснена. Получените резултати са противоречиви, потвърждавайки в различна степен инхибиращият или стимулиращ ефект на различните плевелни видове върху покълването на семената и първоначалното развитие на тест растенията при определяне алелопатичната интерференция (Chon, S., & Nelson, C., 2010; Cheng, F., & Cheng, Z., 2015; Hickman, D. et al., 2021). Затрудненията в тази насока се дължат на конкретни обединителни експериментални методи, които от една страна да моделират и консолидират лабораторните опити, и от друга да се разграничат алелопатичните от конкурентните взаимоотношения в растителните съобщества (Cruz-Silva, C. et al., 2015; Fernandez, C. et al., 2016; Singh, A. et al., 2021). Според Wu, H. et al. (2000a), Lau, J. et al. (2008) и Qasem, J. (2010) за разграничаване на алелопатичните от конкурентните взаимоотношения е използването на активния въглен, като утвърден метод за абсорбиране на наличните алелохимикали в хранителните среди при извеждане на лабораторни и оранжерийни експерименти, което позволява да се използва, като метод за диференциране между наличието на потенциално алелопатичен агент и/или конкурентни взаимоотношения в растителните съобщества.

Според Rice, E. (1983) природата на алелопатични взаимоотношения в агрофитоценозите се определят от множество фактори. Най-често използвани скринингови методи за доказване на алелопатичните взаимоотношения в растителните съобщества е установяване стимулиращият или инхибиращ ефект на екстрахиран растителен материал с различни носители - дестилирана вода (Al-Tawaha, A., & Odat, N., 2010; Hussain, M. et al., 2021), органични разтворители (етилов, метилов алкохол, етер, хлороформ и др.) (Kato-Noguchi, K. et

al., 1994; Xing, Y., et al., 2014; de Oliveira, G. et al., 2019; Hartmann, K., et al., 2019) или използване на агар-гел (Fujii, Y., et al., 2005; Wu, H., et al., 2000b; Valcheva, E. et al., 2017; Marinov-Serafimov, P. et al., 2017; 2018; 2019), които се извършват при лабораторни условия.

При екстрахирането на растителните материали не се взема под внимание, че използваните органични разтворители могат да увеличат дифузията на липофилните и по-слабо хидрофилните алелохимикали, както и отделянето на такива, които е напълно възможно да не са налични в агроценозите при полски условия (Ervin, G., & Wetzel, R., 2003; Kong, C. et al., 2018). Според Whitehead, J. et al. (2018) използването на дестилираната или дейонизираната вода при лабораторни изследвания, не е подходящ носител на алелохимикали, тъй като повечето от тях са липофилни с потенциално по-дълго време на задържане на активните вещества в почвата, в сравнение с водоразтворимите алелохимикали. Прилагането на агар-гел, като носител на алелохимикали и среда за развитие на тест растенията е сравнително нов метод при извършване на лабораторни изследвания, свързани с доказване на алелопатичната интерференция, който се доближава значително до естествените условия в агрофитоценозите. Според обобщените проучвания на Wu, H., et al. (2000b), независимо от безспорните предимства на агар-гела, като носител на алелохимикали, варирането в експерименталните резултати се дължи на използваната концентрация на агара, температурата на имбибиране, водопоглъщателната им способност, процентното съдържание на протеини, както и от големината на семената (Golubanova, I., & Vasilevska-Ivanova, R., 2007; Marinov-Serafimov, P. et al., 2007; Marinov-Serafimov, P., 2010; Mali, A., & Kanade, M., 2014; Storozhyk, L., et al., 2021).

ИЗЛОЖЕНИЕ

Проучването е проведено през 2020-2021 година при лабораторни условия в Институт по фуражните култури – Плевен. Проучвани са два фактора: Фактор А – видове и образци от едногодишни и многогодишни житни фуражни култури: а₁ – Суданка [*Sorghum sudanense* (Piper) Staf.], мутантна форма М-200/86; а₂ – Суданка – мутантна форма № 300/43; а₃ – Сорго за зърно [*Sorghum bicolor* (L.) Moench], хибридна линия № 1643; а₄ – Сорго за фураж, хибрид, Биомас 133; а₅ – Техническо сорго (метла) [*Sorghum vulgare* var. *technicum* (Körn.)], местна популация, М116N; а₆ – Техническо сорго (метла), сорт Szegedi 1023; а₇ – Пасищен райграс (*Lolium perenne* L.), сорт Хармония; а₈ – Пасищен райграс, сорт Тетрани; а₉ – Пустинен житняк (*Agropyron desertorum* (Fisch) Schult.), сорт Моравя; а₁₀ – Гребенчат житняк (*Agropyron cristatum* (L.) Gaertn.), сорт Свежина и а₁₁ – Тръстиковидна власатка (*Festuca arundinacea* Schreb.) - сорт Албена. Фактор В – носители на алелохимикали и среда за развитие на тест образците: b₁ – Между филтърна хартия с дестилирана вода (Nasr, M., & Mansour, S., 2005; Moskalyk, H. et al., 2021); b₂ – Между филтърна хартия и пипетиране на 30,0 ml 50% етилов алкохол и след изпаряването му е добавена дейонизирана вода (Einhellig, F., & Souza, I., 1992) и b₃ – 0,75% агар-агар (Valcheva, E. et al., 2017). При всички използвани носители на алелохимикали е използван 1 g/L⁻¹ тимол (C₁₀H₁₄O), като консервант (Marinov-Serafimov, P., & Golubanova, I., 2015). Повърхността на семената е стерилизирана с 5,0% воден разтвор на натриев хипохлорид (NaClO) за 5 минути, след което са петкратно промити с дестилирана вода и просушени във вакуум с Бюхнерова фуния.

За да се оцени ефекта на използваните носители на алелохимикали върху покълването и първоначалното развитие на семената на включените в изследването образци, в петриевы блюда с диаметър (200 mm) в зависимост от фактор В, са поставяни по 100 броя семена, съгласно фактор А. Дестилираната и дейонизирана вода е пипетирана в зависимост от водопоглъщателната способност на семената (Marinov-Serafimov, P. et al., 2007; Golubanova, I., & Vasilevska-Ivanova, R., 2008). Така подготвените петриевы блюда са запечатани с „Парафилм М“ (лабораторно тиксо) за предотвратяване замърсяването им и загуба на наличната влага на алелопатичните носители, след което са инкубирани в термостат при температура 22 ± 2 °C в продължение на седем дни. Всеки вариант е залаган в осем повторения.

Определяни са следните показатели: Процент покълнали семена (%); Дължина на първичния кълн (корен + хипокотил), cm;

За установяване влиянието на различни носители на алелохимикали върху покълването и първоначалното развитие на едногодишните и многогодишни житни фуражни култури са използвани следните математико-статистически индекси:

Индекс на инхибиране (*IR*) по Hsu, C. et al. (2007):

$$R = \left(\frac{C - T}{C} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

където: *C* – лабораторна кълняемост, нарастване на кълна в дестилирана вода; *T* – при носители на алелопимикали - 50% етилов алкохол, дейонизирана вода и 0,75% агар-гел.

Скорост на нарастване на кълна (*K_{cm/d}*):

$$K_{cm/d} = \left(\frac{N_t}{t} \right) \quad (2)$$

където: *N_t* - дължина (cm) на кълна в зависимост от използваните алелопатични носители и среди на развитие на тест растенията; *t* – продължителност, дни.

Жизненост на кълна (*SVI*) е определян по формулата на Abdul-Baki, A., & Anderson, J. (1973):

$$SVI = \left(\frac{SL_{cm.GP\%}}{100} \right) \quad (3)$$

където: *LS_{cm}* – дължина на кълна (cm); *GP%* – процент покълнали семена.

Индекс на развитие (*GI*) по Gariglio, N. et al. (2002):

$$GI = \left[\left(\frac{G}{G_0} \right) \cdot \left(\frac{L}{L_0} \right) \right] \cdot 100 \quad (4)$$

където: *G* – процент покълнали семена в зависимост от използваните носители на алелохимикали и *G₀* в дестилирана вода; *L* – дължина на кълна в зависимост от използваните носители на алелохимикали (50% етилов алкохол, дейонизирана вода и 0,75% агар-гел, %); *L₀* – дължина на кълна в дестилирана вода, приет за 100%;

Процентът покълнали семена за всички варианти на опита е определян след предварително трансформиране по формулата на Anant, K. (1996):

$$Y = \arcsin \sqrt{\left(\frac{x\%}{100} \right)} \quad (5)$$

Получените резултати са обработени математико-статистически, като са използвани софтуерните продукти Statgraphics Plus for Windows Ver. 2.1 и Statistica Ver. 10.

Използваните насители на алелохимикали и среда за развитие в лабораторни условия оказват значително влияние върху покълването на семената и първоначалното развитие на включените в експеримента образци (Таблица 1). Лабораторната кълняемост на семената варира в широк диапазон от 5,7 до 77,6% в приетия за стандарт вариант с дестилирана вода, което показва, че използваните семена са с високи посевни и физиологични качества с изключение на пустинния (*Agropyron desertorum* Fisch) и гребенчат житняк (*Agropyron cristatum* L.). Най-висок процент покълнали семена са отчетени при образците от суданка (*Sorghum sudanense* (Piper) Staf.) (77,1%), следвана от техническо сорго (метла) (*Sorghum vulgare* var. *technicum* (Körn.) (52,7%), сорго за зърно (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) (52,3%), тръстиковидна власатка (*Festuca arundinacea* Schreb.) (45,0%), пасищния райграс (*Lolium perenne* L.) (30,0%) и относително най-нисък при пустиненния (*Agropyron desertorum* Fisch) и гребенчат житняк (*Agropyron cristatum* (L.) Gaertn.) (6,9%). Това от една страна вероятно се дължи на различното количество резервни хранителни вещества натрупани в семената, и от друга страна – от сортовата или от биологичната особеност културите (Таблица 1).

Таблица 1. Влияние на различни носители на алелохимикали върху покълването на семената при тест растенията, %

Фактор		Видове и сортове	a ₁	a ₂	a ₃	a ₄	a ₅	a ₆	a ₇	a ₈	a ₉	a ₁₀	a ₁₁
Носители на алелохимикали	b ₁	Дестилирана вода	77,1c	77,1a	71,6b	50,8a	53,7a	71,6a	12,9a	45,0a	8,1a	5,7a	45,0b
		Етилов алкохол	63,4a	77,1a	60,0a	63,4b	71,6b	71,6a	26,6b	45,0a	26,6c	12,9	26,6a
	b ₂	IR	17,8	0,00	16,2	-0,25	-33,3	0,00	-106	0,00	-228	-126	40,9b
		Агар	63,4b	77,1a	71,6b	67,2c	53,7a	71,6a	26,6c	71,6b	22,8b	33,2c	50,8
	b ₃	IR	17,8	0,00	0,00	-32,3	0,00	0,00	-157	-12,9	-182	-426	-26,2

Легенда: a₁ – Суданка - мутантна форма М-200/86; a₂ – Суданка – мутантна форма № 300/43; a₃ – Сорго за зърно, хибридна линия № 1643; a₄ – Сорго за фураж - „Биомас 133“; a₅ – Техническо сорго (метла) - местна популация, М116N; a₆ – Техническо сорго (метла) - сорт „Szegedi 1023“; a₇ – Пасищен райграс - сорт „Хармония“; a₈ – Пасищен райграс - сорт „Тетрани“; a₉ – Пустинен житняк - сорт „Морава“; a₁₀ – Гребенчат житняк - сорт „Свежина“; a₁₁ – Тръстиковидна власатка - сорт „Албена“; Стойностите на IR с „+“ знак имат инхибиращ, а „-“ стимулиращ ефект върху кълняемостта на семената; a, b, c - статистически доказани разлики при LSD_{P=0.5}.

Използването на етилов алкохол и дейонизирана вода, като носител на алелохимикали статистически доказано (LSD_{P=0.05}) увеличава лабораторната кълняемост на семената при техническото сорго (метла) при местна популация М116N (IR -33.3%), следвана от пасищен райграс сорт Хармония (IR -106%) и включените в изследването пустинен (IR -228%) и гребенчат житняк (IR -126%), докато при суданка мутантна форма М-200/86, хибридна линия № 1643, сорго за зърно и тръстиковидната власатка се установява статистически доказано намаляване на лабораторната им кълняемост от 16,2 до 40,9%. Най-висока лабораторна кълняемост на семената са отчетени при соргото за фураж и включените в експеримента многогодишни житни треви при използване на носителя на алелохимикали и среда за развитие – агар-гел, в сравнение с приетия за стандарт вариант с дестилирана вода. Изключение от описаната зависимост се установява при соргото за фураж и техническото сорго (метла), сорт Szegedi 1023, където лабораторната кълняемост на семената е константна и не се променя под влияние на използвания носител на алелохимикали, а разликите са статистически недоказани в сравнение с контролните варианти. Установена е линейна функция между лабораторната кълняемост на семената в контролния вариант (дестилирана вода) и използвания носител на алелохимикали, която може да бъде обяснена с подобрения воден потенциал и благоприятна среда за покълване на семената от тестваните образци. Подобни резултати се съобщават от Ghashghaie, J. et al. (1991). Според авторите, с увеличаване концентрацията на агар-гела скоростта на нарастване на растенията се увеличава при *in vitro* условия.

Анализирайки експерименталните резултати по отношение лабораторната кълняемост на семената в зависимост от използваните носители на алелохимикали и среди за развитие на растенията при *in vitro* условия, включените в изследването образци се различават значително по отношение проучвания показател. Следователно, етиловият алкохол, като носител на алелохимикали и дейонизираната вода, като среда за развитие на растенията успешно може да се прилага при техническо сорго (метла), пасищен райграс и при пустинния и гребенчат житняк, като не се установяват сортови и генотипни различия. Използването на агар-гел е подходящ носител на алелохимикали и среда за покълване на семената при суданка – мутантна форма № 300/43, соргото за зърно и фураж, техническо сорго (метла) и включените в изследването многогодишни житни треви. Получените експериментални резултати са в унисон с публикуваните от Krzyzanowski, F. et al. (2004). Според авторите, ако степента на инхибиране при покълването на семената е ≤10%, в сравнение с контролния вариант, методът може да бъде препоръчан за използване при определяне лабораторната кълняемост на семената в *in vitro* условия.

Данните от биометричните измервания върху дължината на нарастване на корена, стеблото и кълновете, позволяват обективно да се оценят разликите в първоначалните етапи

от развитието на тест растенията в зависимост от вида на използваните носители на алелохимикали и среда за развитието им (Таблица 2).

Таблица 2. Влияние на различни носители на алелохимикали върху нарастването на корена, стеблото и кълна при тест растенията, см

Варианти		Видове и сортове										
Носители на алелохимикали		a ₁	a ₂	a ₃	a ₄	a ₅	a ₆	a ₇	a ₈	a ₉	a ₁₀	a ₁₁
Корен												
Дестилирана вода	b ₁	4,2a	7,4b	8,1b	4,2a	4,3a	5,0a	0,5a	3,1b	0,5a	0,5a	2,7
Етилов алкохол	b ₂	4,7b	4,8a	4,9a	5,9b	4,3a	5,9b	1,6b	4,0c	1,3b	3,0c	1,2
IR		11,9	35,1c	39,5	-40,5	0,00	-18,0	-220	-29,0	-160	-500	55,6
Агар	b ₃	6,5c	11,4	10,4c	5,7b	7,5b	4,7a	1,1b	1,8a	2,3c	1,3b	2,9
IR		-54,8	-54,1	-28,4	-35,7	-74,4	6,0	-120	-41,9	-360	-160	-7,41
Хипокотил												
Дестилирана вода	b ₁	2,0a	5,0b	5,2b	3,5a	5,8a	5,2a	1,0a	2,8b	0,0a	0,0a	1,7b
Етилов алкохол	b ₂	6,1b	3,9a	4,0a	4,5b	6,1a	5,7a	2,1b	1,6a	1,4b	3,0c	0,4a
IR		-205	22,2	23,1	-28,6	-5,2	-9,6	-110	42,9	-	-	76,5
Агар	b ₃	8,7c	6,8c	11,4c	10,1c	8,4b	8,0b	1,3a	2,5b	3,7c	1,0b	2,3c
IR		-335	-36,0	-124	-189	-44,8	-53,8	-30,0	10,7	-	-	-35,3
Кълн												
Дестилирана вода	b ₁	6,2a	12,4b	13,3b	7,7a	10,1a	10,2a	1,5a	5,9b	0,5a	0,5a	4,4b
Етилов алкохол	b ₂	10,8b	8,7a	8,9a	10,4b	10,4a	11,6b	3,7c	5,6b	2,7b	6,0c	1,6a
IR		-74,2	29,8	33,1	-35,1	-3,0	-13,7	-147	5,1	-440	-1100	63,6
Агар	b ₃	15,2c	16,7c	21,8c	15,8c	15,9b	12,7b	2,4b	4,3a	6,0c	2,3b	5,2c
IR		-145	-34,7	-63,9	-105	-57,4	-55,9	-60,0	27,1	-1100	-360	-18,2

Легенда: a₁ – Суданка - мутантна форма М-200/86; a₂ – Суданка – мутантна форма № 300/43; a₃ – Сорго за зърно, хибридна линия № 1643; a₄ – Сорго за фураж - „Биомас 133“; a₅ – Техническо сорго (метла) - местна популация, М116N; a₆ – Техническо сорго (метла) - сорт „Szegedi 1023“; a₇ – Пасищен райграс - сорт „Хармония“; a₈ – Пасищен райграс - сорт „Тетрани“; a₉ – Пустинен житняк - сорт „Морава“; a₁₀ – Гребенчат житняк - сорт „Свежина“; a₁₁ – Тръстикovidна власатка - сорт „Албена“; a, b, c - статистически доказани разлики при LSD_{P=0.5}.

Нарастването и развитието на кълновете, както и по отношение на корена и хипокотила на включените в изследването образци от едногодишни и многогодишни житни култури са повлияни значително от използваните носители на алелохимикали и среда за развитието им. Кълновете развиващи се в агар-гела формират статистически доказано по-голяма дължина от 1,3 до 2,5 пъти при едногодишните, докато при многогодишните житни култури нарастват от 1,2 до 12,0 пъти в сравнение с използвания за стандарт вариант с дестилирана вода. Аналогични са и получените резултати при проследяване индексът на инхибиране (IR) по отношение нарастването на кълновете, определящ стимулиращ ефект върху проучвания показател (Таблица 3).

Таблица 3. Развитие на тест растенията в зависимост от влиянието на използваните носители на алелохимикали

Варианти		Видове и сортове											
Носители на алелохимикали		a ₁	a ₂	a ₃	a ₄	a ₅	a ₆	a ₇	a ₈	a ₉	a ₁₀	a ₁₁	\bar{x}
Скорост на нарастване на кълна (K _{cm/d})													
Дестилирана вода	b ₁	0,89	1,77	1,90	1,10	1,44	1,46	0,21	0,84	0,07	0,07	0,63	0,94
Етилов алкохол	b ₂	1,54	1,24	1,27	1,49	1,49	1,66	0,53	0,80	0,39	0,86	0,23	1,04
Агар	b ₃	2,17	2,60	3,11	2,26	2,27	1,81	0,34	0,61	0,86	0,33	0,74	1,56
Жизненост (SVI)													
Дестилирана вода	b ₁	6,2	4,78	9,56	9,52	3,91	5,42	7,30	0,19	2,66	0,04	0,03	4,34
Етилов алкохол	b ₂	10,8	6,85	6,71	5,34	6,59	7,45	8,31	0,98	2,52	0,72	0,77	5,19

Агар	b ₃	15,2	9,64	14,03	15,61	10,62	8,54	9,09	0,64	3,08	1,37	0,76	8,05
Индекс на развитие (GI)													
Етилов алкохол	b ₂	143,4	70,2	56,1	168,8	137,2	113,7	507,1	94,9	1764	2702	21,5	525,3
Агар	b ₃	192,5	94,2	139,1	275,1	98,4	106,0	1114	131,9	840,8	3450	197,9	603,6

Легенда: a₁ – Суданка - мутантна форма М-200/86; a₂ – Суданка – мутантна форма № 300/43; a₃ – Сорго за зърно, хибридна линия № 1643; a₄ – Сорго за фураж - „Биомас 133“; a₅ – Техническо сорго (метла) - местна популация, М116N; a₆ – Техническо сорго (метла) - сорт „Szegedi 1023“; a₇ – Пасищен райграс - сорт „Хармония“; a₈ – Пасищен райграс - сорт „Тетрани“; a₉ – Пустинен житняк - сорт „Морава“; a₁₀ – Гребенчат житняк - сорт „Свежина“; a₁₁ – Тръстиковидна властатка - сорт „Албена“.

Индексът на инхибиране (*IR*) при видовете от род *Sorghum* варира в диапазона от -18,2 до -145,2 и от -18,2 до -1100,0 при многогодишните житни култури. Въпреки, че се установяват значителни генотипни различия при използвания носител на алелохимикали - етилов алкохол и дейонизирана вода, са отчетени значителни разлики при нарастването на кълновете (Таблица 2). Етилов алкохол е подходящ носител на алелохимикали, а дейонизирана вода е подходяща среда за развитие на тест образците при извършване на алелопатични проучвания при пасищния райграс сорт „Хармония“ (*IR* -147,0) и гребенчат житняк (*IR* -1100,0), както и при суданка мутантна форма М-200/86 (*IR* -74,2) и сорго за фураж (*IR* -35,1). Анализирайки показателя, отчетен при техническо сорго (метла) местна популация М116N и сорт Szegedi 1023 използвания носител на алелохимикали предизвиква незначително увеличаване дължината на кълновете от 3,0 до 13,7%, спрямо контролния вариант (с дестилирана вода), който условно може да ги определи като индеферентни на използвания носител и среда за развитие.

Нарастването на корена и стеблото на включените в изследването образци, следват установените зависимости по отношение нарастването на кълна, с тази разлика, че те са по-ясно изразени при многогодишните житни треви в сравнение с видовете от род *Sorghum*.

Формираната по-голяма дължина на корена, хипокотила и кълна в ага-гела може да се обясни с поддържане на константното водно съдържание по време на експеримента, който създава благоприятни условия за покълване и първоначално развитие на включените в изследването образци от едногодишни и многогодишни житни култури, спрямо биологичните им изисквания. Аналогични и са и получените резултати в експерименталната работа на Mishra, S. et al. (2018) и Nagel, K. et al. (2020). Според авторите, използването на хидрофилни полизахариди (Aziz, A. et al., 2020), както е агарът, създават оптимални условия и константно задържане на влага с което създават оптимални условия за развитието на тест растенията.

Използваните носители на алелохимикали и среди за развитие оказват съществено влияние върху скоростта на нарастването на кълновете на включените в експеримента образци. От анализа на данните е видно, че относително най-слаба скорост на нарастване на тест растенията се отчита във варианта с дестилираната вода ($K_{\text{средно}}$ 0,94 cm/d), следвана от етилов алкохол с дейонизирана вода ($K_{\text{средно}}$ 1,04 cm/d) и най-висока в агар-геловата средата ($K_{\text{средно}}$ 1,56 cm/d), които са в положителна корелационна зависимост от използваната дестилирана вода, съответно при дейонизираната вода r е 0,707, докато при агар-гела r е 0,890. Установяват се и значителни различия между тестваните видове. Най-висока скорост на нарастване на кълна е отчетена при видовете от род *Sorghum* – от 1,81 до 3,11 cm/d (средно 2,37 cm/d), докато при многогодишните житни треви, независимо от интезивното им нарастване, спрямо дестилираната вода, скоростта на нарастване е в диапазона от 0,33 до 0,86 cm/d (средно 0,58 cm/d), което може да се обясни с биологичните особености на културите и от интегралното въздействие на използваните носители на алелохимикали и среди за развитието на тест растенията. Подобни са и получените резултати при определяне жизнеността на кълновете (*SVI*) в зависимост от приложените носители на алелохимикали и среди за развитието им. Жизнеността на кълновете е значително повлияна от използваните носители на алелохимикали. Относително най-ниска жизненост на кълновете е отчетена при използване на дестилирана вода (*SVI* варира в диапазона от 0,03 до 9,56, средно 4,34) и най-висока при използване на агар-гел (*SVI* от 0,64 до 15,61, средно 7,34), докато използването на

етиллов алкохол и дейонизирана вода заема междинна позиция (*SVI* от 0,72 до 10,8, средно 4,62).

Следователно, покълването на семената може да се разглежда, като по-слабо чувствителен период от индивидуалното развитие на тест растенията, докато нарастването на кълна, както и по отношение на корена и хипокотила позволяват да бъдат използвани, като потенциален тест за определяне подходящи носители на алелохимикали и среди за развитие при извършване на алелопатични проучвания в *in vitro* условия. Получените експериментални данни са еднопосочни с публикуваните резултати от Kapustka, L. (1997), Karanen, A., & Itavaara, M. (2001), Camargo, C. et al. (2004), Bouhaouel, I. et al. (2016) според които ефектът от взаимодействието на семената с различни токсични вещества се проявява още при покълването им, но той е по-силно изразен върху нарастването на кълна на растенията.

Оценявайки интегралното въздействие на проучваните фактори, чрез индексът на развитие (*GI*) на растенията могат да бъдат подредени в следния възходящ ред по отношение носители на алелохимикали и лабораторна среда за развитието - етилов алкохол и дейонизирана вода ($GI_{\text{средно}} 525,3\%$) > агар-гел ($GI_{\text{средно}} 603,6\%$), а в зависимост от видовата им чувствителност: гребенчат и пустинен житняк (от 3450,0 до 840,8%, $GI_{\text{средно}} 2145,4\%$) > пасищен райграс (от 1113,8 до 131,9%, $GI_{\text{средно}} 622,9\%$) > сорго за фураж и зърно (от 275,1 до 139,1%, $GI_{\text{средно}} 207,1\%$) > тръстиковидна власатка ($GI 197,9\%$) > суданка (от 192,5 до 94,2%, $GI_{\text{средно}} 143,4\%$) > техническо сорго (метла) (от 106,0 до 98,4%, $GI_{\text{средно}} 102,2\%$), които определя силен, статистически доказан стимулиращ ефект $GI \geq 80\%$ (Zucconi, F., 1981), който може да се обясни с оптималната среда за развитие на включените в изследването образци при лабораторни условия.

Използването на агар-гела като носител на алелохимикали и среда на развитие е с достатъчен воден запас и добре уплътнен за поддържане и оптимално развитие на включените в експеримента образци. Добавянето на алелопатични субстанции (свежа или суха растителна биомаса, ризосферна почва и др.) позволяват директно да въздействат върху покълването на семената и първоначалното развитие на тест растенията.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Използването на агар-гел, като носител на алелохимикали и среда на развитие е с достатъчен воден запас и уплътнена структура за поддържане и оптимално развитие на включените в експеримента образци (GI от 94,2 до 3450, $GI > 80\%$). Добавянето на алелопатични субстанции (свежа или суха растителна биомаса, ризосферна почва и др.) позволяват директно да въздействат върху покълването на семената и първоначалното развитие на тест растенията.

Оптимални условия за покълване и първоначално развитие на едногодишните и многогодишните житни фуражни култури с доказано индеферентно въздействие е използването на дейонизираната вода с носител на алелохимикали 50% етилов алкохол с изключение при видовете *S. sudanense*, *S. bicolor* и *F. arundinacea* оказват силен депресиращ ефект върху първоначалното им развитие (GI е в диапазона от 21,0 до 75,4% $GI < 80\%$).

Използваните носители на алелохимикали (агар-гел 0,75% и етилов алкохол 50%) и среда за развитие (агар-гел 0,75% и дейонизирана вода) са подходящи за биологичен анализ и скрининг при извеждане на лабораторни опити за установяване алелопатичния потенциал и/или алелопатичната интерференция при видове от род *Sorghum* и многогодишните житни треви от родовете *Lolium*, *Agropyron* и *Festuca*.

REFERENCES

Abdul-Baki, A., and Anderson, J. (1973). Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. *Crop Science*, 13, 630-633.

Afridi, R., & Khan, M. (2014). Reduced herbicide doses in combination with allelopathic plant extracts suppress weeds in wheat. *Pakistan Journal of Botany*, 46(6), 2077-2082.

Al-Tawaha, A., & Odat, N. (2010). Use of Sorghum and Maize Allelopathic properties to inhibit germination and growth of Wild Barley (*Hordeum spontaneum*). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj*, 38(3), 124-127.

Almeida, L., Sannomiya, M., Rodrigues, C., Delachiave, M., Santos, L., Vilegas, W., & de Feo, V. (2007). In vitro allelopathic effects of extracts and amenthoflavone from *Byrsonima crassa* (Malpighiaceae). *Journal of Plant Interactions*, 2(2), 121-124.

Anant, K. (1996). *Book reviews: Hinkelman, K., and Kempthorne, O. (1994). Design and analysis of experiments, Vol. I: Introduction to experimental design*, New York: John Wiley and Sons. Inc, pp. 495.

Aziz, A., Lim, K., Rahman, B., Nurmawati, M., & Zuruzi, A. (2020). Agar with embedded channels to study root growth. *Scientific Reports*, 10, 14231.

Baziar, M., Farahvash, F., Mirshekari, B., & Rashidi, V. (2014). Allelopathic effect of ryegrass (*Lolium persicum*) and wild mustard (*Sinapis arvensis*) on barley. *Pakistan Journal of Botany*, 46, 2069–2075.

Bhadoria, P. (2011). Allelopathy: a natural way towards weed management. *American journal of experimental agriculture*, 1, 7–20.

Bouhaouel, I., Gfeller, A., Fauconnier, M., Delory, B., Amara, H., & du Jardin, P. (2016). Evaluation of the allelopathic potential of water-soluble compounds of barley (*Hordeum vulgare* L. subsp. *vulgare*) and great brome (*Bromus diandrus* Roth.) using a modified bioassay. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 20(4), 482-494.

Camargo, C., Ferreira-Filho, A., & Salomon, M. (2004). Temperature and pH of nutrient solution on wheat primary root growth. *Scientia Agricola*, 61, 313-318.

Cheng, F., & Cheng, Z. 2015. Research Progress on the use of Plant Allelopathy in Agriculture and the Physiological and Ecological Mechanisms of Allelopathy. *Frontiers in plant science*, 6, 1020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01020>

Chon, S. & Nelson, C. (2010). Allelopathy in compositae plants. A review. *Agronomy for sustainable development*. *Agronomy for Sustainable Development*, 30, 349–358.

Cruz-Silva, C., Matiazzi, E., Pacheco, F., & Nóbrega, L. (2015). Allelopathy of *Crotalaria juncea* L. aqueous extracts on germination and initial development of maize. *IDESIA (Chile)*, 33(1), 27-32.

de Oliveira, G., Amado, P., Ferreira, J. & dos Santos Lima, L. (2019). Allelopathic effect of the ethanol extract and fractions of the aerial parts of *Lippia alba* (Verbenaceae). *Natural Product Research*, 33(16), 2402-2407.

Einhellig, F., & Souza, I. (1992). Phytotoxicity of sorgoleone found in grain sorghum root exudates. *Journal of Chemical Ecology*, 18, 1–11.

Ervin, G., & Wetzell, R. (2003). An ecological perspective of allelochemical interference in land–water interface communities. *Plant and Soil*, 256(1), 13-28.

Fernandez, C., Monnier, Y., Santonja, M., Gallet, Ch., Weston, L., Prévosto, B., Saunier, A., Baldy, V., & Bousquet-Mélo, A. (2016). The impact of competition and allelopathy on the trade-off between plant defense and growth in two contrasting tree species. *Frontiers in Plant Science*, 7, Article, 594. www.frontiersin.org,

Findura, P., Hara, P., Szparaga, A., Kocira, Sł., Czerwinska, E., Bartoš, P., Nowak, J., & Treder, K. (2020). Evaluation of the effects of allelopathic aqueous plant extracts, as potential preparations for seed dressing, on the modulation of cauliflower seed germination. *Agriculture*, 10, 122. doi:10.3390/agriculture10040122

Fujii, Y., Furubayashi, A., & Hiradate, S. (2005). *Rhizosphere soil method: a new bioassay to evaluate allelopathy in the field*. In: Harper, J., An, M., Wu, H., & Kent, J. editors. *Proceedings of the 4th World Congress on Allelopathy*. Wagga Wagga, NSW, Australia: Charles Sturt University. 490–492.

Gariglio, N., Buyatti, M., Pillati, R., Rossa, D., & Acosta, M. (2002). Use a germination bioassay to test compost maturity of willow (*Salix* sp.) sawdust. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 30(2), 135-139.

Ghashghaie, J., Brenckmann, F., & Saugier, B. (1991). Effects of agar concentration on water status and growth of rose plants cultured in vitro. *Physiologia Plantarum*, 82(1), 73-78.

Golubanova, I., & Vasilevska-Ivanova, R. (2008). Temperature effect on seed imbibition in *Sorghum*. *Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences*, 61(11), 1491-1496.

Hartmann, K., Fortes, A., Ribeiro, V., & Spiassi, A. (2019). Phytochemical screen of extracts *brachiaria brizantha* and *megathyrus maximus* and their effects on germination and development of *parapiptadenia rigida* (benth.) Brenan. *Acta Ambiental Catarinense*, 16(1/2), 22-32.

Hickman, D., Rasmussen, A., Ritz, K., Birkett, M., & Neve, P. (2021). Allelochemicals as multi-kingdom plant defence compounds: towards an integrated approach. *Pest Management Science*, 77(3), 1121-1131.

Hsu, C., Chan, Y., & Chang, J. (2007). Antioxidant activity of extract from *Polygonum cuspidatum*. *Biological Research*, 40(1), 13-21.

Hussain, S. (2015). *Effects of allelopathic crop water extracts with low doses of herbicides on weeds and yield of rainfed wheat and groundnut*. Ph.D Thesis, Department of Agronomy Faculty of Crop and Food Sciences Pir Mehr Ali Shah Arid Agriculture University Rawalpindi, Pakistan.

Hussain, M., Danish, S., Sánchez-Moreiras, A., Vicente, Ó., Jabran, K., Chaudhry, U., Branca, F., & Reigosa, M. (2021). Unraveling Sorghum allelopathy in agriculture: Concepts and Implications. *Plants*, 10, 1795-1815.

Iqbala, N., Khaliq, Ab., & Cheema, Z. (2020). Weed control through allelopathic crop water extracts and S-metolachlor in cotton. *Information Processing in Agriculture*, 7(1), 165-172.

Jabran, K., Mahajan G., Sardana, V., & Chauhan, B. (2015). Allelopathy for weed control in agricultural systems. *Crop Protection*, 72, 57–65. 10.1016/j.cropro.2015.03.004.

Kaneva, H., Velcheva, I., & Petrova, S. (2017). *Allelopathic interactions in agroecosystems*. Ninth Student Scientific Conference "Ecology - a way of thinking" - 9, Proceedings May 13, 2017 Plovdiv, 43-61. (**Оригинално заглавие:** Кънева, Х., Велчева, И., & Петрова, С. (2017). Алелопатични взаимодействия в агроценозите. Девета студентска научна конференция „Екологията – начин на мислене” – 9, сборник с доклади 13 май 2017 г. гр. Пловдив, 43-61.)

Kapanen, A., & Itavaara, M. (2001). Ecotoxicity tests for compost applications. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49, 1-16.

Kapustka, L. (1997). *Selection of phytotoxicity tests for use in ecological risk assessments*. New York: CRC Press, p.516-548.

Kato-Noguchi, H., Kosemura, S., Yamamura, S., Mizutani, J., & Hasegawa, K. (1994). Allelopathy of oats. I. Assessment of allelopathic potential of extract of oat shoots and identification of an allelochemical. *Journal of Chemical Ecology*, 20(2), 309-314.

Kohli, R., Batish, D., & Singh, H. (1997). Allelopathy and its implications in agroecosystems. *Journal of Crop Production*, 1(1), 169–202.

Kong, C., Zhang, S., Li, Y., Xia, Z., Yang, X., Meiners, S., & Wang, P. (2018). Plant neighbor detection and allelochemical response are driven by root-secreted signaling chemicals. *Nature Communications*, 9, 3867-3876.

Krzyzanowski, F., Neto, J., & Costa, N. (2004). *Teste de hipoclorito de sódio para sementes de soja Londrina*: Embrapa. Circular Técnica, 37, ISSN: 1516-7860.

Latif, S., Chiapusio, G., & Weston, L. (2017). Allelopathy and the Role of Allelochemicals in Plant Defence. *Advances in Botanical Research*, Chapter, 2. Charles Sturt University, Academic Press, 19-54. ISBN: 9780128016206.

Lau, J., Puliafico, K., Kopshever, J., Steltzer, H., Jarvis, E., Schwarzländer, M., Strauss, Sh., & Hufbauer, R. (2008). Inference of allelopathy is complicated by effects of activated carbon on plant growth. *New Phytologist*, 178(2), 412-423

Li, J., Chen, L., Chen, Q., Miao, Y., Peng, Z., Huang, B., Guo, L., Liu, D., & Du, H. (2021). Allelopathic effect of *Artemisia argyi* on the germination and growth of various weeds. *Scientific Reports*, 11, 4303-4317.

Macias, F., Galindo, J., & Molinillo, J. (2003). *Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals*. CRC Press. ISBN: 9780429209147.

Mali, A., & Kanade, M. (2014). Allelopathic effect of two common weeds on seed germination, root-shoot length, biomass and protein content of jowar. *Annals of Biological Research*, 5(3), 89-92.

Marinov-Serafimov, P., Dimitrova, T., & Golubinova, I. (2007). Study of water imbibing capacity of some legume crops under in vitro conditions in allelopathic research. *Herbologia*, 8(2), 29-40.

Marinov-Serafimov, Pl. (2010). Determination of Allelopathic Effect of Some Invasive Weed Species on Germination and Initial Development of Grain Legume Crops. *Pesticidi i Fitomedicina* (Belgrade), 25(3), 251-259.

Marinov-Serafimov, P., & Golubinova, I. (2015). A study of suitability of some conventional chemical preservatives and natural antimicrobial compounds in allelopathic research. *Pesticidi i Fitomedicina* (Belgrade), 30(4), 2015, 233-241.

Marinov-Serafimov, P., Golubinova, I., Ilieva, A., Kalinova, Sht., & Yanev, M. (2017). Allelopathic activity of some parasitic weeds. *Acta Agriculturae Serbica*, 22, 89-1011.

Marinov-Serafimov, P., Golubinova, I., Entcheva, V., & Kalinova, Sht. (2018). Allelopathic effect of sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) on the germination and initial development of *Lactuca sativa* L. *Field Crop Studies*, XI(2), 135-150.

Marinov-Serafimov, P., Enchev, S., & Golubinova, I. (2019). Allelopathic soil activity in the rotation of some forage and technical crops. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 25(5), 980-985.

Moskalyk, H., Leheta, U., Zhuk, A., Boruk, O., & Fedoriak, M. (2021). Ecological aspects of allelopathic interactions of energy crops. *Journal of Ecological Engineering*, 22(10), 185-191.

Mishra, S., Thombare, N., Ali, M., & Swami, S. (2018). Applications of biopolymeric gels in agricultural sector in polymer gels: Perspectives and Applications. Springer, Berlin, pp. 185-228. DOI: 10.1007/978-981-10-6080-9_8.

Nasr, M., & Mansour, S. (2005). The use of allelochemicals to delay germination of *Astragalus cyclophyllus* seeds. *Journal of Agronomy*, 4(2), 147-150.

Nagel, K., Lenz, H., Kastenzholz, B., Gilmer, F., Aversch, A., Putz, Al., Heinz, K., Fischbach, A., Scharr, H., Fiorani, F., Walter, A., & Schurr, U. (2020). The platform GrowScreen-Agarenables identification of phenotypic diversity in root and shoot growth traits of agar grown plants. *Plant Methods*, 16, 89. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00631-3>.

Olofsdotter, M., Jensen, L., & Courtois, B. (2002). Improving crop competitive ability using allelopathy - an example from rice. *Plant Breeding*, 121, 1-9.

Peng, X. (2019). Allelopathic effects of water extracts of maize leaf on three Chinese herbal medicinal plants. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47, 194-200.

Qasem, J. (2010). Differences in the allelopathy results from field observations to laboratory and glasshouse experiments. *Allelopathy Journal*, 26(1), 45-58.

Rice, E. (1983). *Allelopathy*. The University of Oklahoma, Norman, U.S.A. ISBN: 9780125870559.

Singh, A., Rajeswari, G., Nirmal, L., & Jacob, S. (2021). Synthesis and extraction routes of allelochemicals from plants and microbes: A review. *Reviews in Analytical Chemistry*, 40, 293-311.

Storozhyk, L., Mykolayko, V., & Mykolayko, I. (2021). Allelopathic potential of sugar sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) seeds. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science*, 9(1), 93-98.

Valcheva, E., Popov, V., Marinov-Serafimov *Allelopathic effect of some weed species on germination and initial development of Lactuca sativa*, P., Golubanova, I., Nikolov, B., Velcheva, I., & Petrova, S. (2017). VIII International Scientific Agriculture Symposium, "Agrosym 2017", Jahorina, Bosnia and Herzegovina, October 2017. Book of Proceedings, 2017 170-175. ISBN 9789997671813

Whitehead, J., Wittemann, M., & Cronberg, N. (2018). Allelopathy in bryophytes - a review. *Lindbergia*, 41(1), 1-7.

Wu, H., Pratley, J., Lemerle, D., & Haig, T. (2000a). Laboratory screening for allelopathic potential of wheat (*Triticum aestivum*) accessions against annual ryegrass (*Lolium rigidum*). *Australian Journal of Agricultural Research*, 51(2), 259 – 266.

Wu, H., Pratley, J., Lemerle, D., Haig, T., & Verbeek, B. (2000b). Evaluation of seedling allelopathy in 453 wheat (*Triticum aestivum*) accessions against annual ryegrass (*Lolium rigidum*) by the equal-compartment -agar method. *Australian Journal of Agricultural Research*, 51, 937–944.

Xing, Y., Li-hui, Z., Cui-ping, S., Yan, S., Jin-lin, Z., Jian-min, H., & Jin-gao, D. (2014). The extraction isolation and identification of exudates from the roots of *Flaveria bidentis*. *Journal of Integrative Agriculture*, 13(1), 105-114.

Zucconi, F. (1981). Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle*, 22(2), 54-57.