Wiadomości Botaniczne **36**(3/4): 17–25; 1992

TECHNIKI BADANIA ALLELOPATII

Experimental methods for the research of allelopathy

Wiesław OLESZEK

Summary. Increasing interest in advantageous and disadvantageous effects of allelopathy generates a necessity for the development of modern, simple and reliable techniques for their research. This paper describes in short the methods used for exploration of this phenomenon. Moreover, some biotests, most often used for the determination of allelopathic potential of plant natural products are presented. Alphabetically arranged list of newest literature positions cited, gives an outlook into methodological trends in this science area.

Key words: allelopathy, exudates collection, bioassays, technics

Doc. dr hab. Wiesław Oleszek, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa, Osada Pałacowa, 24–100 Puławy

WSTĘP

Wzrost i rozwój roślin w naturalnych i kształtowanych ekosystemach jest często modyfikowany przez procesy fizyczne i chemiczne wynikłe z sąsiedztwa innych roślin. Typowym procesem fizycznym jest konkurencja o środowiskowe czynniki wzrostowe takie jak woda, składniki pokarmowe lub światło. Występuje ona przede wszystkim wtedy, gdy zasoby te są ograniczone. W agroekosystemach zjawisko to może być częściowo kontrolowane przez zwalczanie konkurentów roślin uprawnych (zabiegi agrotechniczne, stosowanie pestycydów) bądź przez uzupełnianie deficytowych składników wzrostowych (nawożenie, nawadnianie). W naturalnych ekosystemach konkurencja prowadzi do dominacji gatunków o których mówimy, że są silnymi konkurentami.

Obok tego czysto fizycznego zjawiska między roślinami można zaobserwować oddziaływania chemiczne. Polegają one na tym, że roślina-donor wydziela do środowiska substancje chemiczne wpływające ujemnie lub dodatnio na rozwój organizmów sąsiadujących – akceptorów. Substancje te przedostają się do środowiska poprzez wymywanie związków z powierzchni liści przez deszcz lub krople mgły i rosy, poprzez wydzielanie przez system korzeniowy do gleby, uwalnianie lotnych substancji z powierzchni całej rośliny lub też poprzez uwalnianie w wyniku rozkładu substancji organicznej. Obejmują one szeroką gamę związków chemicznych należących głównie do metabolizmu wtórnego (terpenoidy, fenole, alkaloidy, glukozydy cyjanogenne, glukozynolany itp.), ale również niektóre związki metabolizmu podstawowego (aminokwasy, polisacharydy).

Na chemiczną naturę tego zjawiska wskazał De Candole w 1832 r [6], natomiast Molish [14] nadał mu nazwę allelopatia, wywodząc ją z dwóch słów greckich „allelon" (wzajemny) i „pathos" (cierpieć, szkodzić).

Od czasów Molisha zainteresowanie allelopatią ciągle wzrastało i w ostatnim okresie obserwuje się szybki wzrost liczby prac oryginal-

nych, opracowań syntetycznych oraz podręczników [12, 26, 27, 30, 31, 33, 39, 40]. Zainteresowanie to ma swoje głębokie uzasadnienie, ponieważ allelopatia, obok znaczenia teoretycznego, może mieć olbrzymie znaczenie praktyczne [30, 31]. Roślinne substancje chemiczne mogą zmieniać wysokość plonów współrzędnie lub następczo uprawianych roślin, jak również mogą mieć wpływ na jakość wyprodukowanej masy roślinnej. Mogą również wykazywać zróżnicowane działanie w czasie i stąd są obiektem zainteresowania teoretyków i praktyków pracujących nad zagadnieniami „zmęczenia gleby", zmianowań i płodozmianów [15, 16, 19, 20, 43–47]. Olbrzymie znaczenie ma również możliwość wykorzystania oddziaływań allelopatycznych do biologicznego zwalczania chwastów [4, 28, 30], a samych allelozwiązków jako naturalnych pestycydów, co przy ciągłym wzroście cen środków ochrony roślin, jak również postępującym zanieczyszczeniu środowiska byłoby bardzo pożądane. Zagadnienia te zostały ostatnio w piśmiennictwie polskim częściowo omówione w kilku opracowaniach [21, 22, 42].

Szybki rozwój tej dziedziny nauki wynika również z ciągłego udoskonalania technik badawczych, co pozwoliło przejść od metody obserwacyjno-opisowej do metod pełnej identyfikacji allelozwiązków. Rozwój metod chromatografii cienkowarstwowej, kolumnowej i cieczowej, elektroforezy, spektrometrii masowej i spektrometrii magnetycznego rezonansu jądrowego umożliwił identyfikację małych ilości związków chemicznych, biorących udział w oddziaływaniach allelopatycznych.

Badania allelopatycznego oddziaływania roślin obejmują kilka etapów. Krokiem wyjściowym jest obserwacja zjawiska w ekosystemie, a w dalszej kolejności wyodrębnienie, identyfikacja i określenie struktury chemicznej czynnika allelopatycznego. Końcowym etapem jest synteza chemiczna zidentyfikowanego związku i ewentualne praktyczne zastosowanie go jako naturalnego pestycydu. Uproszczony schemat postępowania przedstawia się następująco:

I. Obserwacja w ekosystemie:
   – roślina donorowa → roślina akceptorowa – *biotest*
II. Wyodrębnianie substancji allelopatycznej:
   – wydzieliny (kultury wodne, kamery mgłowe, krążenie pożywki w układzie zamkniętym, pułapki na adsorbentach, obmywanie powierzchni części nadziemnych); *biotest*
   – substancje lotne (maceracja, pułapki); *biotest*
   – ekstrakcja (zimna lub gorąca woda, rozpuszczalniki organiczne); *biotest*
III. Identyfikacja związków o aktywności allelopatycznej:
   – frakcjonowanie (ekstrakcja ciecz-ciecz lub na fazach stałych, chromatografia); *biotest*
   – oczyszczanie (chromatografia cienkowarstwowa i cieczowa, krystalizacja); *biotest*
   – identyfikacja (spektrometria MS, UV, NMR, IR); *biotest*
IV. Synteza zidentyfikowanych związków.
V. Zastosowanie w praktyce (pestycyd → roślina akceptorowa)

Rozwój odpowiednich technik badawczych i biotestów jest podstawą do uzyskiwania miarodajnych wyników. Potrzeba stosowania biotestów wynika z dwóch powodów. Po pierwsze, są one niezbędne do określenia czy interakcje roślina-roślina mają charakter chemiczny. Po drugie, biotesty pomagają określić związki powodujące te interakcje.

WYODRĘBNIANIE SUBSTANCJI ALLELOPATYCZNYCH

Wyciągi. Często stosowanym sposobem wykazania chemicznego charakteru interakcji roślina-roślina jest badanie fitotoksycznej aktywności wyciągów z rośliny donorowej [8, 9, 34]. Wyciągi takie uzyskuje się poprzez ekstrakcję za pomocą zimnej lub gorącej wody, albo przy użyciu rozpuszczalników organicznych. Zastosowanie zimnej wody, jakkolwiek uważane za postępowanie najbardziej zbliżone do warunków naturalnych, pozwala wyekstrahować głównie polarne związki metabolizmu podstawowego (cu-

kry, aminokwasy, kwasy organiczne, białka). Allelozwiązki należą w przeważającej liczbie do metabolizmu wtórnego i są to przeważnie związki hydrofobowe. Ich ekstrakcja wymaga zastosowania rozpuszczalników organicznych np. chloroformu, chlorku metylenu, acetonu lub metanolu. I tak na przykład, Duer [8] badając wpływ niektórych chwastów na rośliny zbożowe stwierdziła, że wodne ekstrakty (zimna i gorąca woda) z gwiazdnicy pospolitej (*Stellaria media*) nie wykazywały różnic w aktywności allelopatycznej i w stężeniu mniejszym niż 1% stymulowały wzrost siewek pszenicy. W przeciwieństwie do nich ekstrakty etanolowe z tej samej rośliny hamowały wzrost siewek już w stężeniu 0.25%. Zastosowanie rozpuszczalników organicznych umożliwia ekstrakcję związków hydrofobowych, pozwala poza tym zdezaktywować enzymy hydrolityczne, które w przypadku ekstrakcji zimną wodą mogą prowadzić do powstania związków pochodnych, nie występujących naturalnie w materiale roślinnym lub glebowym.

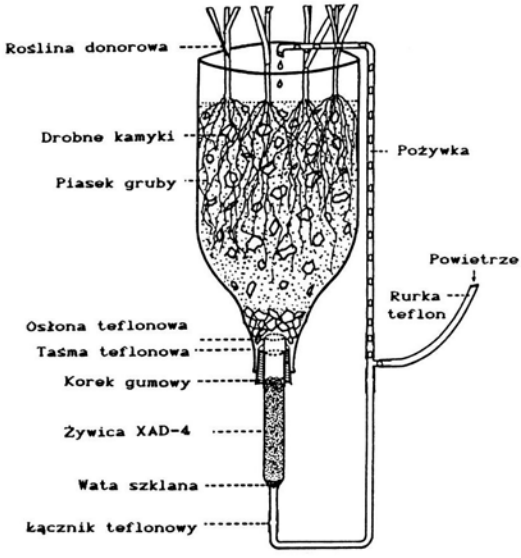
Stwierdzenie, że wyciągi z rośliny hamują lub stymulują wzrost innych roślin nie jest jednakże dowodem, że zawarte w nich substancje chemiczne o działaniu allelopatycznym odgrywają rolę w ekosystemie. W stosunku do wielu substancji zaliczanych do allelozwiązków brak jest dowodów na ich znaczenie ekologiczne i jest to w chwili obecnej największa luka w nauce o allelopatii. Poznanie składu chemicznego substancji wydzielanych z żywej rośliny wymaga stosowania bardziej wyszukanych technik i dlatego kierunek ten nie jest tak szeroko reprezentowany w literaturze [31].

Wydzieliny. Pomimo trudności, istnieje szereg metod badawczych pozwalających śledzić zjawiska allelopatii w warunkach mniej lub bardziej zbliżonych do naturalnych. Jedną z nich jest hodowla roślin w kulturach wodnych, a następnie badanie aktywności i składu chemicznego roztworu wzrostowego. Metoda ta została po raz pierwszy zastosowana przez Bonnera i Galstona [3], a następnie rozwinięta przez Martina [13], który wykazał, że korzenie owsa (*Avena sativa*) zanurzone w wodzie destylowanej wydzielały 121.9 µg skopoletyny, natomiast zanurzone w pożywce wydzieliły w tym samym czasie 3.8 µg tego związku. Wyniki te wskazują, że w metodzie kultur wodnych zarówno skład pożywki oraz jej pH, jak i warunki tlenowe mogą mieć istotny wpływ na skład chemiczny wydzielin.

Inną z metod jest technika kamer mgłowych [41]. Polega ona na tym, że korzenie roślin zwisają swobodnie w kamerze i są okresowo opłukiwane rozpyloną pożywką. Jednakże sam autor stwierdza, że „warunki w kamerze mgłowej są zbyt sztuczne i nie dają informacji o tym co dzieje się w glebie".

Można sądzić, że bardziej naturalną i wiarygodną techniką jest pobieranie gleby z obszaru przykorzeniowego i ekstrakcja z niej substancji allelopatycznych. Za pomocą tej metody stwierdzono obecność związków fenolowych w glebie pod kukurydzą oraz wykazano, że ich stężenie było większe w obszarze rizosfery, niż w glebie oddalonej od korzeni [23]. Technika ta ma jednak również swoje ograniczenia. Bardzo trudno jest oddzielić glebę od drobnych korzeni i ekstrakt może zawierać zarówno związki z roztworu glebowego jak i z korzeni. Ponadto, nie można jednoznacznie stwierdzić czy obecne w ekstrakcie substancje są wydzielinami korzeniowymi czy też są produktami wytworzonymi przez mikroflorę ryzosfery.

Wydaje się, że te ograniczenia eliminuje metoda CRETS (continuous root exudate trapping system), zaproponowana przez Tanga i Younga [38]. Schemat systemu CRETS przedstawia ryc. 1. W metodzie tej rośliny rosną w pojemniku wypełnionym piaskiem i są w sposób ciągły podlewane pożywką. Wyciek z pojemnika wzrostowego przechodzi przez kolumnę wypełnioną adsorbentem stałym. Zadaniem tego adsorbentu jest przepuszczenie składników pożywki i związków hydrofilnych (związków nieorganicznych, cukrów, białek), a zatrzymanie substancji częściowo lub całkowicie hydrofobowych. Do takich adsorbentów należą żywice XAD-2, XAD-4 oraz fazy odwrócone (RP) po-



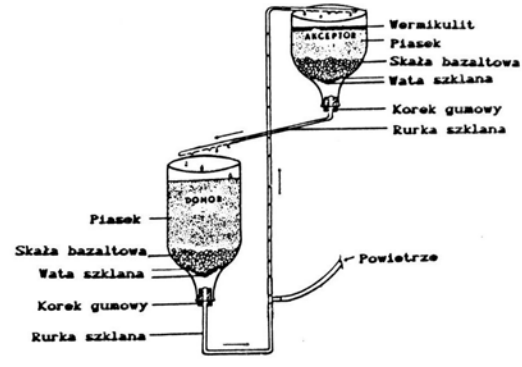
Ryc. 1. Schemat układu do wychwytywania wydzielin korzeniowych (CRETS) [Tang i Young, 1982].

Fig. 1. The root exudate trapping system (CRETS) [Tang and Young, 1992].

chodne żelu krzemionkowego (C-8, C-18, CN itp.). Po określonym czasie kolumnę adsorbentu odłącza się od układu, a zaadsorbowane związki wymywa się rozpuszczalnikiem organicznym – najczęściej metanolem, etanolem lub acetonitrylem i analizuje jakościowo i ilościowo. Aby wyeliminować zmiany jakościowe powodowane przez mikroorganizmy glebowe, eksperymenty CRETS można przeprowadzać w warunkach sterylnych. W warunkach niesterylnych ewentualne metabolity pochodzenia mikrobiologicznego można odróżnić przeprowadzając doświadczenie kontrolne z samą glebą, bez rośliny donorowej. Pope i in. [24] rozbudowali system CRETS do kilkunastu plastikowych wazonów połączonych równolegle, co pozwoliło zebrać znaczne ilości wycieków w stosunkowo krótkim czasie.

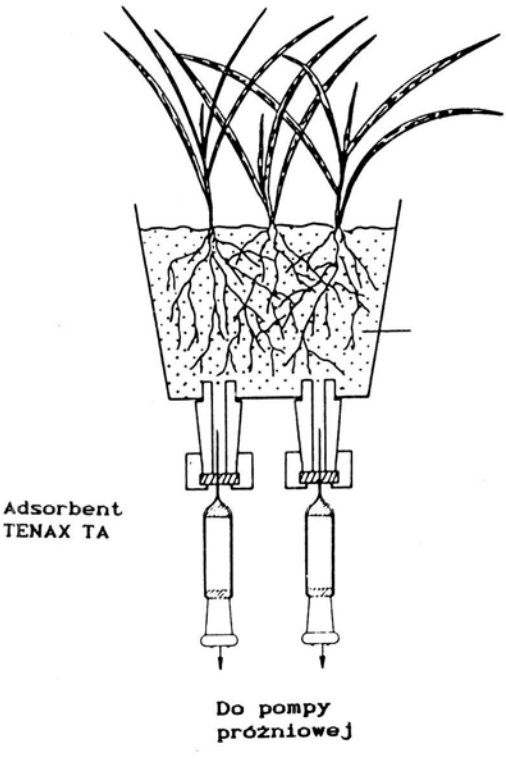
Odmianą systemu CRETS jest RERS (root exudate recirculating system) (ryc. 2), w którym roślinę akceptorową podlewa się wyciekami z pojemnika z rosnącą rośliną donorową [37]. Miarą wpływu allelopatycznego rośliny donorowej jest pomiar wzrostu rośliny akceptora. Metoda ta wskazuje na istnienie zjawiska, ale nie pozwala na zidentyfikowanie czynnika allelopatycznego – jest to więc typowa odmiana biotestu.

Substancje lotne. Szczególnie duże trudności metodyczne sprawia badanie allelopatycznych właściwości związków lotnych. Oznaczenie stężeń tych związków i odpowiadających im efektów biologicznych jest utrudnione z uwagi na fakt, że brak jest metod do ilościowego wychwytywania ich z otoczenia i zagęszczania. Próbę oznaczenia składu mieszaniny związków lotnych wydzielanych ze strefy korzeniowej dwóch odmian jęczmienia podjęli Stenhagen i in. [36]. Zastosowana metoda jest podobna do systemu CRETS z tą różnicą, że adsorbent-pułapka zatrzymuje związki lotne zawarte w wysysanym z gleby powietrzu glebowym (ryc. 3). Adsorbentem w tym przypadku był bardzo porowaty i termostabilny polimer TENAX TA. Zaadsorbowane na polimerze związki uwalniano poprzez podgrzanie adsorbentu i następnie analizowano metodą chromatografii gazowej.



Ryc. 2. Schemat systemu do badania allelopatycznej aktywości wydzielin korzeniowych (RERS). [Stevens i Tang 1987].

Fig. 2. The root exudate recilculating system (RERS). [Stevens i Tang 1987].



Ryc. 3. Schemat urządzenia do pobierania prób substancji lotnych [Stenhagen i in., 1987].

Fig. 3. Assembly for sampling of volatiles [Stenhagen i in., 1987].

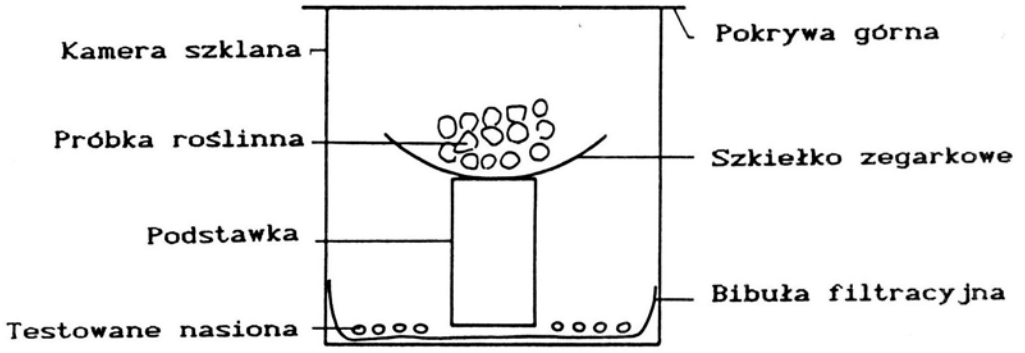
Najczęściej spotykaną techniką badania allelopatycznego oddziaływania związków lotnych jest metoda zamkniętej kamery, w której nasiona rośliny testowej są przestrzennie izolowane od substancji lotnych donora. Schemat takiej kamery, zastosowanej do badania wpływu allelopatycznego roślin krzyżowych na kiełkowanie sałaty, chwastnicy i pszenicy [17], przedstawia rysunek 4.

BIOTESTY

Do badania allelopatycznego oddziaływania związków chemicznych uwalnianych podczas rozkładu masy roślinnej (resztki pożniwne, słoma itp.) stosuje się doświadczenia wazonowe. Zmielony lub rozdrobniony materiał roślinny miesza się dokładnie z glebą lub umieszcza na jej powierzchni (mulczowanie). Nasiona rośliny testowej wysiewa się bezpośrednio po założeniu doświadczenia lub po określonym czasie inkubacji gleby. Inkubując glebę i wysiewając nasiona w odpowiednich odstępach czasu można śledzić dynamikę zanikania aktywności fitotoksycznej [15, 16]. Tego typu doświadczenia są zatem formą biotestu przeprowadzonego w glebie.

Oddzielną grupę biotestów stanowią te, które pozwalają określić potencjał allelopatyczny ekstraktów, wydzielin lub pojedynczych oczyszczonych związków dla celów porównawczych lub te, które pomagają lokalizować aktywne frakcje w procesie wyodrębniania i charakteryzowania allelozwiązków. W tego typu biotestach istotny jest zarówno parametr wzrostowy stosowany do oznaczania aktywności biologicznej jak i odpowiedni dobór gatunku rośliny użytej do testowania. W literaturze można zauważyć dużą dowolność zarówno co do wyboru rośliny testowej, jak i stosowanych stężeń badanych substancji oraz warunków przeprowadzania biotestu (temperatura, oświetlenie, warunki tlenowe, potencjał osmotyczny) [31]. W celu maksymalnego wyeliminowania skutków tych czynników, wyniki podaje się najczęściej w procentach w odniesieniu do kontroli rosnącej w tych samych warunkach, ale bez dodatku testowanego preparatu. Najczęściej testy przeprowadza się w szalkach Petriego wyłożonych bibułą filtracyjną lub w piasku. Ważnym elementem jest dobranie odpowiedniej rośliny testowej. Nasiona roślin zbożowych kiełkują w sposób wyrównany i stosując je, łatwo można zaobserwować efekty hamowania kiełkowania lub wzrostu, natomiast bardzo trudno zauważyć wpływ stymulacyjny. Do obserwacji wpływów stymulacyjnych bardziej nadają się nasiona chwastów, ponieważ zwykle kiełkują one słabo i nierównomiernie, dlatego każde polepszenie warunków sprzyjających kiełkowaniu jest natychmiast widoczne [35].

Ważna jest również wielkość nasion testowanego gatunku. Zazwyczaj gatunki o nasio-



Ryc. 4. Schemat kamery do badania aktywności allelopatycznej substancji lotnych [Oleszek 1987].

Fig. 4. Schematic representation for allelopathic activity of volatiles [Oleszek 1987].

nach drobnych są bardziej wrażliwe na obecność allelozwiązków niż te, które mają nasiona duże [31].

Istotnym zagadnieniem w tych biotestach jest zarówno sposób wprowadzenia testowanego roztworu na bibułę filtracyjną, jak i przygotowanie użytych nasion. Wprowadzając roztwór badanej substancji na bibułę należy ją zwilżać w wielu miejscach, w przeciwnym przypadku na skutek jej właściwości sorpcyjnych następuje zagęszczenie allelozwiązku w jednym obszarze (tzw. efekt chromatograficzny), podczas gdy pozostałe obszary są zwilżone czystym rozpuszczalnikiem. Prowadzić to może do bardzo dużych rozrzutów otrzymywanych wyników. Zjawisko to ma szczególnie duże znaczenie przy badaniu aktywności allelopatycznej związków nierozpuszczalnych w wodzie. W takim przypadku związek rozpuszcza się w rozpuszczalniku organicznym i nanosi na podłoże z bibuły filtracyjnej lub z piasku. Po odparowaniu rozpuszczalnika podłoże zwilża się wodą destylowaną i przeprowadza test [2, 7].

Ponadto, duże różnice we wzroście poszczególnych siewek mogą wynikać ze zróżnicowanej witalności pojedynczych nasion. Aby tego uniknąć, niektórzy autorzy zalecają wstępne skiełkowanie nasion w wodzie destylowanej i następnie przeniesienie siewek wykazujących zbliżoną dynamikę kiełkowania i wzrostu do roztworów testowanych związków [7]. W efekcie takie postępowanie pozwala uzyskać wyniki bardziej wyrównane, o mniejszej wariancji, co jest istotne głównie przy pomiarze potencjału allelopatycznego związków. Nie jest to natomiast postępowanie słuszne, jeśli chcemy uzyskać informację jak zachowuje się gatunek rośliny w obecności określonego allelozwiązku. W tym przypadku jest bardziej wskazane stosowanie nasion nie selekcjonowanych.

Najprostszym, najczęściej stosowanym biotestem jest kiełkowanie roślin. Jest to test szybki i łatwy do wykonania, ale mało czuły. Bardziej czułym biotestem jest pomiar parametrów wzrostowych siewek, takich jak długość systemu korzeniowego i koleoptyla lub świeżej i suchej masy roślin [11, 26]. Korzenie siewek wykazują zwykle większą wrażliwość na obecność allelozwiązków niż koleoptyle i w określonym przedziale ich wzrost jest proporcjonalny do stężenia substancji [35]. Po przekroczeniu stężenia progowego mogą wystąpić zniekształcenia, a nawet zamieranie obszarów merystematycznych i w efekcie całkowite obumieranie systemu korzeniowego [16]. Pomiary długości systemu korzeniowego i koleoptyli są bardzo czasochłonne, dlatego też często stosuje się pomiar świeżej i suchej masy siewek. Według Lathera i Einhelliga [10] biotest polegający na pomiarze masy jest o rząd wielkości bardziej czuły niż biotest oparty na kiełkowaniu nasion, a pięciokrotnie bardziej czuły niż oparty na pomiarze wzrostu siewek.

Pewnym ograniczeniem biotestów opartych na pomiarze kiełkowania i parametrów wzrosto-

wych jest stosunkowo duża ilość badanej substancji, wymagana do ich przeprowadzenia. Dysponując niewielkimi ilościami wydzielin, ekstraktów lub związków otrzymywanych w trakcie frakcjonowania, oczyszczania i identyfikacji, konieczne jest stosowanie specjalnych technik wymagających małych ilości preparatu. Jedną z nich jest technika polegająca na przeprowadzeniu rozdziału chromatograficznego preparatu na bibule chromatograficznej lub płytce do chromatografii cienkowarstwowej, a następnie rozmieszczeniu nasion rośliny testowanej na całej powierzchni chromatogramu [1]. Chromatogram można też opryskać zawiesiną kultur odpowiednich grzybów lub bakterii i wtedy może on służyć do testowania aktywności związków w stosunku do mikroorganizmów. Do dalszych badań wybiera się tylko te strefy z chromatogramu, w których nastąpiło zahamowanie lub stymulacja kiełkowania i wzrostu [11].

Inną techniką pozwalającą określić aktywność allelopatyczną bardzo małych ilości związków – na przykład otrzymywanych z rozdziału metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) – jest metoda opracowana przez Dornbosa i Spencera [7]. W metodzie tej płytki szklane pokrywa się kilkumilimetrową warstwą agaru. Po zestaleniu agaru wycina się w nim 2–3 milimetrowe zagłębienia. Badany związek, rozpuszczony w odpowiednim rozpuszczalniku, wprowadza się do zagłębienia. Po odparowaniu rozpuszczalnika w zagłębieniu umieszcza się napęczniałe nasienie. Po kilku dniach dokonuje się pomiaru kiełkowania i parametrów wzrostowych.

Do pomiaru aktywności allelozwiązków, zwłaszcza tych o znaczeniu herbicydowym, stosuje się często biotest polegający ma pomiarze wzrostu elongacyjnego fragmentów koleoptyli pszenicy [5]. W tym celu z etiolowanych siewek pszenicy wycina się 4 milimetrowe fragmenty i umieszcza się je w pożywce zawierającej badaną substancję. Po 18 godzinach wzrostu mierzy się wydłużenie fragmentu w stosunku do kontroli. Biotest przeprowadza się w świetle zielonym 540 nm.

IDENTYFIKACJA ZWIĄZKÓW

Wydzieliny i ekstrakty roślinne są mieszaninami zawierającymi wiele związków chemicznych. W celu wydzielenia z nich substancji aktywnych i następnie określenia ich struktury chemicznej stosuje się szereg metod fizykochemicznych. W pierwszym etapie ekstrakt frakcjonuje się na prostsze, kilkuskładnikowe mieszaniny, za pomocą ekstrakcji ciecz-ciecz lub przez frakcjonowany rozdział na sorbentach stałych [18, 25]. Frakcję wykazującą aktywność biologiczną, sprawdzoną za pomocą biotestu rozdziela się na pojedyncze związki za pomocą chromatografii cinkowarstwowej (TLC) lub cieczowej (HPLC) dobierając warunki rozdziałów do specyfiki związków. Strukturę wydzielonych związków określa się metodami fizykochemicznymi takimi jak: reakcje barwne, pomiar temperatury topnienia, spektrometria masowa (MS), spektrometria magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR), spektrometria w świetle UV i podczerwieni (IR). Dzięki postępowi jaki dokonał się w ostatniej dekadzie w rozwoju tych metod, możliwa jest obecnie identyfikacja związków otrzymywanych w ilościach miligramowych.

SYNTEZA

Ustalenie pełnej struktury chemicznej pozwala podjąć próbę przeprowadzenia syntezy tej substancji w warunkach laboratoryjnych, aczkolwiek jest to zadanie bardzo trudne gdyż wiele związków posiada strukturę wysoce skomplikowaną [21, 31]. Jeśli zsyntezowany związek również wykazuje wymaganą aktywność allelopatyczną, można go bezpośrednio zastosować jako naturalny pestycyd albo też wykorzystać jego strukturę jako model do syntezy związków pochodnych, które częstokroć mogą wykazywać wyższą aktywność niż związek wzorcowy. Opracowanie syntezy nie zawsze kwalifikuje związek do praktycznego zastosowania z uwagi na koszty; powszechnie uważa się, że z tysiąca związków allelopatycznie aktywnych tylko jeden ma szansę na praktyczne zastosowanie.

LITERATURA

[1] BARNES J. P., PUTNAM A. R., BURKE B. A., AASEN A. J. 1987. Isolation and characterization of allelochemicals in rye herbage. *Phytochemistry.* **26**: 1385–1390.

[2] BIAŁY Z., OLESZEK W., LEWIS J., FENWICK G. R. 1990. Allelopathic potential of glucosinolates (mustard oil glycosides) and their degradation products against wheat. *Plant and Soil.* **129**: 277–281.

[3] BONNER J., GALSTON A. W. 1944. Toxic substances from the culture media of guayule which may inhibit growth. *Bot. Gaz.* **106**: 185–198.

[4] CHARUDATTAN R., WALKER H. L. 1982. Biological control of weeds with plant pathogens. Willey Interscience, New York.

[5] CUTLER H. G. 1986. Isolating, characterising and screening mycotoxins for herbicidal activity. W: A. R. PUTNAM, C. S. TANG (red.), *The science of allelopathy.* John Willey and Sons Inc., New York, ss. 147–170.

[6] DE CANDOLLE M. A. P. 1932. Physiologie vegetale. III. Bechet Jeune. *Lib. Fac. Med.* Paris. ss. 1474–1475.

[7] DORBONS D. L., SPENCER G. F. 1989. Natural products phytotoxicity. A bioassay suitable for small quantities of sligtly water-soluble compounds. *J Chem Ecol.* **15**: 287–294.

[8] DUER I. 1988. Allelopatyczny wpływ niektórych gatunków chwastów na wzrost roślin zbożowych. *Pamiętnik Puławski.* **93**: 85–99.

[9] GUENZI W. D., MCCALLA T. M. 1966. Phenolic acids in oats, wheat, sorgum and corn residues and their phytotoxicity. *Agron. J.* **58**: 303–304.

[10] LEATHER G. R., EINHELLIG F. A. 1985. Mechanism of allelopathic action in bioassay. Amer. CheM. Soc. Symposium Series 330. ss. 197–205.

[11] LEATHER G. R., EINHELLIG F. A. 1986. Bioassays in the study of allelopathy. W: A. R. PUTNAM, C. S. TANG (red.), *The science of allelopathy.* John Willey and Sons Inc. New York. ss.133–145.

[12] Le BARON H. M. 1987. Status and overview of biotechnology in agricultural chemistry. W: *Proc. ACS Symp. ser. 334 „Biotechnology in agricultural chemistry"* Washington, D. C. ss. 1–15.

[13] MARTIN P. 1957. Die Abgabe von organishen Verbindungen insbesondere von Scopoletin aus den Keimwurzeln des Hafers. *Z. Bot.* **45**: 475–506.

[14] MOLISH H. 1937. Der Einfluss einer Pflanze auf die andere-Allelopathie. Fischer, Jena.

[15] OLESZEK W. 1986. Saponiny jako czynnik determinujący wartość przedplonową lucerny. *Postępy Nauk Roln.* **6**: 15–22.

[16] OLESZEK W., JURZYSTA M. 1987. The allelopathic potential of alfalfa root medicagenic acid glycosides and their fate in soil environment. *Plant and Soil.* **98**: 67–80.

[17] OLESZEK W. 1987. Allelopathic effects of volatiles from some Cruciferae species on lettuce, barnyard grass and wheat growth. *Plant and Soil* **102**: 271–273.

[18] OLESZEK W. 1988. Solid-phase extraction-fractionation of alfalfa saponins. *J. Sci. Food Agric.* **44**: 43–49.

[19] OLESZEK W. 1990. Saponiny korzeni lucerny siewnej (*Medicago sativa* L.) budowa chemiczna, aktywność biologiczna, oznaczanie. Wyd. IUNG. R(273), ss. 1–73.

[20] OLESZEK W., JURZYSTA M., GÓRSKI P. 1992. Alfalfa saponins – the allelopathic agents. W: S. J. H. RIZVI, V. RIZVI (red.), *Allelopathy: Basic and applied aspects.* Chapman and Hall, London.

[21] OLESZEK W. Allelopatia. W: L. S. JANKIEWICZ (red.), *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin i możliwości ich stosowania w ogrodnictwie, rolnictwie i leśnictwie.* PWN Warszawa (w druku).

[22] OLESZEK W. 1989. Chemiczna broń roślin. *Problemy.* **6**: 13–17.

[23] PAREEK R. P., GUAR A. C. 1973. Organic acids in the rhizosphere of *Zea mays* and *Phaselous aureus* plants. *Plant and Soil* **39**: 441–444.

[24] POPE D. F., THOMPSON A. C., COLE A. W. 1985. Phytotoxicity of root exudates and leaf extracts of nine plant species. W: A. C. THOMPSON (red.), *The chemistry of allelopathy.* ACS, Washington, D. C. ss. 219–234.

[25] PRICE K. R., CURL C. L., FENWICK G. R. 1987. Flash chromatography – a simple technique of potencial value to food chemist. *Food Chem.* **25**: 145–153.

[26] PUTNAM A. R., DUKE W. B. 1978. Allelopathy in agroecosystems. *Ann. Rev. Phytopath.* **16**: 431–451.

[27] PUTNAM A. R. 1983. Allelopathic chemicals. Nature's herbicides in action. *Chem. Eng. News.* **61**: 34–36.

[28] PUTNAM A. R., DeFRANK J. 1983. Use of phytotoxic plant residues for selective weed control. *Crop protection.* **2**: 173–181.

[29] PUTNAM A. R., TANG C. S. 1986. The science of allelopathy. John Willey and Sons Inc. New York.

[30] RICE E. L. 1983. Pest control with nature's chemicals. Univ. of Oklahoma Press, Norman O. K.

[31] RICE E. L. 1984. Allelopathy. Academic Press Inc., New York.

[32] RICHARDS B. N. 1972. Introduction to the soil ecosystem. Longmans, Harlow.

[33] RIZVI S. J.H., RIZVI V. 1991. Allelopathy: basic and applied aspects. Chapman and Hall, London.

[34] SHILLING D. G., JONES L. A., WORSHAM A. D., PARKER C. E., WILSON R. F. 1986. Isolation and identification of some phytotoxic compounds from aqueous extracts of rye (*Secale cereale* L.). *J. Agric. Food Chem.* **34**: 633–638.

[35] SHILLING D. G., YOSHIKAWA F. 1987. A rapid seedling bioassay for the study of allelopathy. Amer. Chem. Soc. Symposium Series 330. ss. 334–342.

[36] STENHAGEN G., ALBORN H., LUNDBORG T. 1987. Variation of root microflora rhizosphere exudates in genotypes of barley. W: G. R. WALLER (red.), *Allelochemicals: role in agriculture and forestry.* ACS, Washington, D. C. ss. 76–88.

[37] STEVENS G. A., TANG C. S. 1987. Inhibition of crop seedling growth by hydrophobic root exudates of the weed *Bidens pilosa*. *J. Trop. Ecol.* **3**: 91–94.

[38] TANG C. S., YOUNG C. C. 1982. Collection and identification of allelopathic compounds from the undisturbed root system of bigalta limpograss (*Hemiarthria altissima*). *Plant Physiology*. **69**: 155–160.

[39] THOMPSON A. C. 1985. The chemistry of allelopathy, biochemical interactions among plants. ACS Symposium Series, Washington, DC.

[40] WALLER G. R. 1987. Allelochemicals: Role in agriculture and forestry. ACS Symposium Series, Washington D. C.

[41] WENT F. W. 1957. The experimental control of plant growth. Chronica Botanica Co., Waltham, MA. ss. 79–81.

[42] WÓJCIK-WOJTKOWIAK D. 1987. Rola allelopatii w rolniczych ekosystemach. *Post Nauk Roln.* **1/2**: 37–55.

[43] WÓJCIK-WOJTKOWIAK D. 1990. Powstawanie substancji biologicznie aktywnych w glebach monokultur glebowych. W: *Badania monokultur zbożowych*. Wyd. SGGW-AR, Warszawa. ss. 107–135.

[44] WÓJCIK-WOJTKOWIAK D., POLITYCKA B., SCHNEIDER M., PERKOWSKI J. 1990. Phenolic substances as allelopathic agents arrising during the degradation of rye (*Secale cereale*) tissues. *Plant and Soil*. **124**: 143–147.

[45] WÓJCIK-WOJTKOWIAK D., KACZMAREK W., KIEŁCZEWSKI M., POLITYCKA B. 1990. Powstawanie i właściwości substancji fenolowych oraz ich rola w ograniczaniu produkcji upraw w monokulturach. W: L. RYSZKOWSKI i in. (red.), *Ekologiczne procesy w monokulturowych uprawach zbóż*. Wyd. UAM, Poznań. ss. 167–185.

[46] WÓJCIK-WOJTKOWIAK D., KACZMAREK W., KIEŁCZEWSKI M., POLITYCKA B. 1990. Powstawanie i właściwości substancji fenolowych oraz ich rola w ograniczaniu produkcji upraw w monokulturze. W: Ryszkowski L. i in. (red.) *Ekologiczne procesy w monokulturowych uprawach zbóż*. UAM, Poznań. ss. 165–185.

[47] WÓJCIK – WOJTKOWIAK D. 1991. Potencjał allelopatyczny produktów rozkładu żyta z różnych faz rozwojowych. W: *Synteza i perspektywa nauki o płodozmianach*. Mat. Sem. Płodozm. ART Olsztyn-VSZ Brno. ss. 63–68.