

VPLIV AGRONOMSKIH PARAMETROV NA GOSTOTO IN DOLŽINO LISTNIH REŽ PRI AMERIŠKEM SLAMNIKU (*ECHINACEA PURPUREA* (L.) MOENCH)

THE INFLUENCE OF AGRONOMIC PARAMETERS ON THE DENSITY AND LENGTH OF LEAF STOMATA IN PURPURE CONEFLOWER (*ECHINACEA PURPUREA* (L.) MOENCH)

Darja KOLAR¹, Igor VIRANT¹, Samo KREFT^{1,*}

<http://dx.doi.org/10.3986/fbg0044>

IZVLEČEK

Vpliv agronomskih parametrov na gostoto in dolžino listnih rež pri ameriškem slamniku (*Echinacea purpurea* (L.) Moench)

Pripravki ameriškega slamnika (*Echinacea purpurea*) se zaradi svojih imunostimulativnih učinkov zelo pogosto uporabljajo predvsem pri prehladih in gripi. Uporaba in popularnost teh pripravkov je v zadnjih letih zelo narasla, kar dokazujejo tudi vedno večja ponudba na trgu. Številne raziskave so bile narejene na področju gojenja, kvantifikaciji aktivnih učinkovin, učinkovitosti in varnosti.

Ugotavljali smo, kakšna je gostota listnih rež na zgornji in spodnji strani listov ter merili dolžino listnih rež na spodnji strani listov ameriškega slamnika pri 213 vzorcih.

Vzorci so se razlikovali po načinu gojenja rastlin. Gostote in dolžine rež smo merili z mikroskopiranjem odtisov epiderme, ki smo jih naredili s prozornim lakom. Preverili smo vpliv velikosti lista in vpliv pozicije na listu, kjer smo izvajali meritve. Ugotovili smo, da se gostote in dolžine listnih rež med lokacijami po širini lista značilno razlikujejo. Zato smo v nadaljevanju poskusa merili reže na določenem mestu na sredini med osrednjo žilo in listnim robom.

Najbolj izrazit in signifikanten vpliv na lastnosti listnih rež ima sezona žetve. Pri jesenski žetvi v primerjavi s poletno je bila gostota rež zgornje strani listov 66 % večja ($p < 0,001$), dolžina rež spodnje strani pa 11 % večja ($p < 0,001$). Pri proučevanju vplivov agronomskih dejavnikov (namakanje, starost rastlin, lokacija njive) nismo našli signifikantnih vplivov na lastnosti listnih rež. Opazili smo tudi signifikantno negativno korelacijo med gostoto in dolžino rež ter pozitivno korelacijo med gostoto rež spodnje in zgornje strani lista. Večje rastline so imele daljše listne reže in manjšo gostoto listnih rež v primerjavi z manjšimi rastlinami. Ta vpliv je bil statistično signifikanten, vendar majhen. Rastline z večjim odstotkom suhe mase v požeti biomasi (manjša vsebnost vode) so imele večjo gostoto rež in manjšo

ABSTRACT

The influence of agronomic parameters on the density and length of leaf stomata in purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench)

Herbal preparations from *Echinacea purpurea* (purple coneflower) are often used in common cold and flu because of their immune stimulatory effects. The popularity of these products has grown considerably in recent years, and there is increasing market supply. Numerous studies have been made investigating the cultivation, quantification of active ingredients, safety and efficacy of *Echinacea purpurea*.

In this study we determined the density of the leaf stomata on the lower and upper sides of the leaves and the length of the leaf stomata on the lower side of leaves in 213 samples of *E. purpurea* plants, which differed in the cultivation parameters. Density and length were measured with the microscopic examination of the imprint of the epidermis, which we made with clear nail varnish. We checked the effect of the size of the leaf and the influence of the measuring position on the leaf. We found that the densities and the length of the stomata were significantly different across the width of the leaf. Therefore, we carried out measurements at a constant position in the middle between the central vein and the leaf edge.

The most pronounced parameter influencing the stomata properties was season of harvesting. In the autumn harvest compared to summer, the density of the stomata of the upper side was 66% higher ($p < 0.001$) and the stomata length on the lower side was 11% higher ($p < 0.001$). We did not find significant effects of any of the studied agronomical parameters (irrigation, age of plants and location of plantation) on the properties of leaf stomata. We also observed a significant negative correlation between the stomata density and stomata length and a positive correlation between the stomata density of the lower on the upper side of the leaf. We observed that larger plants had longer stomata and lower stomata density compared to smaller plants. This effect was statistically

¹ Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, SI-1000 Ljubljana, Slovenija

* Corresponding author: samo.kreft@ffa.uni-lj.si

dolžino listnih rež, vendar so povezave signifikantne le pri poletni žetvi. Med koncentracijami cikorne in kaftarne kisline in gostoto ter dolžino listnih rež ni signifikantnih korelacij.

Gljučne besede: listne reže, *Echinacea purpurea*, ameriški slamnik

significant but small. Plants with a higher percentage of dry mass in harvested biomass (lower water content) had a higher stomata density and smaller stomata lengths, but the correlation was significant only in summer harvest. There are no significant correlations between chicoric and caftaric acids concentrations and the stomata density or length.

Key words: leaf stomata, *Echinacea purpurea*, purple coneflower

1 UVOD

Ameriški slamnik (rod *Echinacea*) spada v družino nebinovk (Asteraceae) in izvira iz Severne Amerike. Rod *Echinacea* vsebuje devet vrst. Od teh se v medicini uporabljajo tri vrste: *Echinacea purpurea* (škrlatni ameriški slamnik), *E. pallida* (bledi ameriški slamnik) in *E. angustifolia* (ozkolistni ameriški slamnik) (PERCIVAL 2000, SCHULZ ET AL. 2001).

Pri raziskavi smo se osredotočili na škrlatni ameriški slamnik, ki je trajnica, visoka od 60 do 180 cm. Steblo je pokončno, razvejano, blago dlakavo ali golo. Pritlični listi so ovalni do ovalnosuličasti, šilasti in grobo ali ostro nazobčani. Listni pecelj je dolg do 25 cm, listna ploskev pa je do 20 cm dolga in 15 cm široka. Pri osnovi je naglo zožena, pogosto srčaste oblike in ima 2 do 5 žil. Stebelni listi so spodaj pecljati, zgoraj pa sedeči, od 7 do 20 cm dolgi ter od 1,5 do 8 cm široki, v celoti grobo nazobčani in hrapavi na obeh straneh. Ovojčkovi listi so ravnosuličasti, zoženi, celorobi, dlakavi na zunanji strani in robu. Cvetni košek je škrlatne barve, dolg od 1,5 do 3 cm in od 5 do 10 mm širok. Cevasti cvetovi so dolgi od 4,5 do 5,5 mm. Pelodna zrna so rumena in v premeru merijo od 19 do 21 μm . Vrsta ima 11 kromosomov v haploidni fazi (BAUER 1997).

Rastlino so uporabljali že ameriški Indijanci ob različnih infekcijah ran, kačjih ugrizih, krčih, zobobolih, bolečinah v črevesju, prehladih, rakavih obolenjih ter za krepitev odpornosti bolnega organizma (GRIMM & MÜLLER 1999, KREFT & GLAVAČ KOČEVAR 2013, SCHULZ ET AL. 2001). Danes pa se ameriški slamnik uporablja predvsem kot imunomodulator za zdravljenje in tudi preventivno proti prehladam, kašlju ter vnetju zgornjega in spodnjega respiratornega sistema (KREFT 2014, GRIMM & MÜLLER 1999, KREFT & GLAVAČ KOČEVAR 2013, PERCIVAL 2000).

Iz ameriškega slamnika je bilo izoliranih veliko snovi. Najpomembnejše lahko razdelimo v tri večje skupine in sicer v fenolne spojine (derivati kavne kisline), v skupino nenasičenih alifatskih spojin (alkilamidi, ketoalkeni, ketoalkini, maščobne kisline in alkani) in v skupino polisaharidov. Poleg omenjenih snovi vse-

buje ameriški slamnik tudi eterična olja in pirolizidinske alkaloidne (KREFT & RAZINGER 2014).

V literaturi najdemo veliko študij, ki obravnavajo stimulatívne učinke pripravkov ameriškega slamnika na imunske celice živali in ljudi. Narejene so bile številne *in vitro* študije, kjer so spremljali fagocitno aktivnost človeških granulocitov ter *in vivo* študije na poskusnih živalih in ljudeh. Stimulativni učinki na imunske celice so bili dokazani za različne pripravke iz posameznih delov ameriškega slamnika, kot tudi za izolirane frakcije in čiste substance, pridobljene iz različnih delov rastline. Znano je, da derivati kavne kisline ščitijo kolagen v koži pred superoksidnimi in hidroksilnimi radikali, ter imajo protivirusno in imunostimulativno aktivnost (BINNS ET AL. 2002, PERCIVAL 2000).

Raziskovalci so proučevali tudi vpliv različnih očiščenih frakcij vrste *E. purpurea* na podganje alveolarne makrofage in pokazali signifikanten vpliv alkilamidne frakcije na fagocitno aktivnost in fagocitni indeks (GOEL ET AL. 2002). Polisaharidna frakcija in cikorna kislina nista povečali aktivnosti alveolarnih makrofagov. Pri tej raziskavi so funkcijo makrofagov spremljali tudi prek izločanja dušikovega oksida (NO) in TNF- α po *in vitro* stimulaciji z lipopolisaharidi. Signifikanten vpliv (povečano izločanje) so dokazali le za alkilamidno frakcijo medtem ko vplivov polisaharidne frakcije in cikorne kisline na izločanje NO in TNF- α niso uspeli dokazati.

Mnoge študije na miših so pokazale stimulatívne učinke očiščenih polisaharidov (pridobljenih iz rastlinskih celičnih kultur ameriškega slamnika) na imunske celice v kulturi ali injiciranih intraperitonealno v miši. Ti učinki vključujejo povečano fagocitozo, kemotakso in oksidativni izbruh makrofagov in nevtrofilcev. Peritonealni makrofagi so proizvajali večje količine TNF, IL-1, IL-6 in IL-10. Bili so sposobni ubijati tumorske celice in celice inficirane z bakterijo *Leishmania enrietti* ali *Candida albicans* (GRIMM & MÜLLER 1999, PERCIVAL 2000). Na celjenje ran naj bi vplival polisaharid, imenovan ehinacin B, z antihialuronidaznim delovanjem. Predpostavljen mehanizem je

tvorba kompleksa hialuronska kislina – polisaharid, ki preprečuje napad hialuronidaze. Vodni ekstrakt vrste *E. purpurea* je močan aktivator citotoksičnosti naravnih celic ubijalk (NK), ki igrajo pomembno vlogo pri imunskem odgovoru na virusne infekcije (GAN ET AL. 2003). Pokazali so tudi, da ekstrakt vpliva na povečano število konjugatov NK-tarčne celice. Narejenih je bilo tudi več kliničnih študij učinkovitosti pripravkov ameriškega slamnika iz soka ali izvlečka rastline (KREFT & RAZINGER 2014, SCHULZ et al. 2001). Večina so spremljali infekcije zgornjih dihal in za to indikacijo so dobili tudi najboljše rezultate. Omenjene študije so bile podobno izpeljane (placebo-nadzorovane, randomizirane) in v večini primerov so pokazale signifikantno izboljšanje simptomov gripe in prehladov. V enem primeru pa so dokazali tudi skrajšan čas trajanja bolezni v primerjavi s placebo skupino. Ti rezultati veljajo za primere, kjer so pacienti začeli z zdravljenjem ob pojavu prvih simptomov prehlada (bolečine v okončinah, letargija, glavobol, rinitis, kašelj, bolečina in rdečina v žrelu), torej kurativno. V primerih študij preventivnega zdravljenja pa rezultati kažejo, da jemanje zdravil iz ameriškega slamnika bistveno ne zmanjša števila in jakosti prehladnih obolenj. V literaturi ni zaslediti posebnih opozoril glede varnosti jemanja pripravkov ameriškega slamnika. Omenja se primer asimptomatske levkopenije v povezavi z daljšim jemanjem ameriškega slamnika (KEMP & FRANCO 2002). Ker je ameriški slamnik imunostimulant, ga ne priporočamo pri bolnikih z avtoimunskimi boleznimi, multiplo sklerozo, tuberkulozo in tistih, ki so na terapiji z imunosupresivi. Kronična uporaba pripravkov ameriškega slamnika, ki traja 8 tednov ali dlje, ni priporočljiva zaradi možnih imunosupresivnih učinkov (KEMP & FRANCO 2002, KREFT & RAZINGER 2014). Kemijska sestava ekstraktov ameriškega slamnika je precej podobna med posameznimi vrstami z manjšimi variacijami v količini aktivnih substanc. Nihanja v količini in sestavi aktivnih snovi v ameriškem slamniku so tudi posledica geografske lege, stopnje razvoja (starost rastline), časa žetve in razmer, v katerih je bila rastlina pridelana. Sestava ekstraktov korenin in ekstraktov nadzemnih delov rastline pa se precej razlikuje. V koreninah je več alkilamidov, eteričnega olja in pirolizidinskih alkaloidov kot v nadzemnih delih, kjer so glavne aktivne učinkovine polisaharidi in derivati kavne in ferulne kisline (BINNS et al. 2002, WILLS & STUART 1999).

Ugotavljali smo gostoto listnih rež spodnje in zgornje strani lista ter dolžino listnih rež spodnje strani lista škrlatnega ameriškega slamnika (*Echinacea purpurea*). Ugotavljali smo ali dejavniki rastišča (starost in nadmorska višina nasada, regija, namakanje in

sezona) vplivajo na gostoto ter dolžino listnih rež. V nalogi smo preverili tudi morebitno povezavo med morfološkimi ter fitokemijskimi značilnostmi rastlin in gostoto ter dolžino listnih rež. Na podlagi ugotovljenih povezav bi lahko z merjenjem gostote listnih rež ocenili avtentičnost izvora rastline in njeno kakovost.

1.1 Lastnosti listnih rež

Listne reže (stome) so pore v epidermi lista, skozi katere poteka izmenjava plinov med listi in atmosfero. Listne reže nastajajo zgodaj v razvoju lista in so v večini primerov popolnoma razvite, ko list doseže 10–60 % svoje končne velikosti. Z odpiranjem in zapiranjem listnih rež se rastlina hitro odziva na dražljaje iz okolja (ROYER 2001).

Listne reže najdemo pri skoraj vseh višjih rastlinah in pri večini nižjih (mahovi in praprotnice). Število in porazdelitev listnih rež po površini lista je precej spremenljiva in je odvisna od vrste rastline, pozicije lista, plojnosti in rastišča (HOPKINS 1995).

Porazdelitev listnih rež po površini lista je večinoma naključna. Izjemo predstavljajo enokaličnice s paralelnimi listnimi žilami, kjer so listne reže urejene v linearne vrste med žilami. Listne reže so lahko na zgornji (adaksialni) in/ali spodnji (abaksialni) strani lista. Hiperstomatni listi imajo prisotne listne reže le v zgornjem epidermisu, kar je značilno za plavajoče vodne rastline (npr. lokvanj *Nymphaea* sp.). Hipostomatne vrste nimajo rež na zgornji strani lista. Ta porazdelitev je značilna za veliko število drevesnih vrst (npr. *Tilia europea*, *Quercus robur*, *Olea europea*). Amfistomatni listi pa imajo listne reže na spodnji in zgornji strani in so značilni za zeliščne dvokaličnice. Pri teh rastlinah je število listnih rež navadno večje na spodnji strani lista. Ta terminologija pa se ne uporablja dosledno, saj nekateri avtorji kot »amfistomatne« vrste označujejo tiste, ki imajo na zgornji in spodnji strani približno enako število listnih rež. Kot »hipostomatne« imenujejo tiste, ki imajo več listnih rež na spodnji strani, in kot »hiperstomatne« tiste z večjim številom listnih rež na zgornji strani (BOSABALIDIS & KOFIDIS 2002).

Za prikazovanje števila listnih rež uporabljamo dva parametra, to sta gostota listnih rež in indeks listnih rež. Gostoto listnih rež izražamo s številom stom na mm². Običajno je gostota listnih rež med 20 in 400 stom/mm², čeprav je lahko tudi večja kot 1000/mm². Gostota listnih rež je funkcija števila listnih rež in velikosti epidermalnih celic. Tako na gostoto listnih rež vpliva iniciacija listnih rež (trenutek v razvoju lista, ko se nediferencirana celica usmeri v razvoj celice zapi-

ralke) in rast epidermalnih celic. Indeks listnih rež pa je parameter, ki normalizira učinke gostote epidermal-

nih celic in je definiran kot število listnih rež na 100 celic, izračunamo pa ga po naslednji formuli:

$$\text{indeks listnih rež (\%)} = \frac{\text{gostota listnih rež}}{(\text{gostota listnih rež} + \text{gostota epidermalnih celic})} \times 100$$

kjer listna reža predstavlja poro in pripadajoči celici zapiralke. Prevodnost listnih rež je odvisna od odprtosti pore, dolžine pore, gostote listnih rež. Isti dejavniki, ki vplivajo na gostoto listnih rež, vplivajo tudi na velikost reže oziroma prevodnost: to so svetloba, temperatura, vlažnost zraka, vodni status rastline in CO₂ (WAGNER et al. 1996). Na gostoto listnih rež različni dejavniki iz okolja vplivajo le v času nastajanja listnih rež in rasti lista. Na gostoto listnih rež torej poleg genotipa vplivajo tudi dejavniki, ki nadzirajo razvoj lista. Kot naraven viri variiranja gostote in indeksa listnih rež se poleg že naštetih omenjajo še stopnja razvitosti lista (mladi, polno razviti), pozicija lista na rastlini, spol (pri dvodomnih rastlinah) in nadmorska višina (CHEN et al. 2001, KOFIDIS et al. 2003).

Pri nekaterih rastlinah (npr. *Ambrosia cordifolia*) intenziteta svetlobe vpliva na to ali bo rastlina razvila hipostomatne ali amfistomatne liste. Pri svetlobi nizke intenzitete se razvijejo tanjši in hipostomatni listi, pri močnejši svetlobi pa se razvijejo debelejši in amfistomatni listi (MURRAY 1997).

Tako rdeča kot modra svetloba povečata odprtost rež in s tem prevodnost, vendar so celice zapiralke bolj občutljive na modro svetlobo. Pomembna je tudi intenziteta svetlobe.

Vodni stres je pri arašidih (*Arachis hypogaea*) povečal gostoto listnih rež za vsaj 28 %, predvsem na račun manjših celic, saj je indeks listnih rež ostal nespremenjen. Podobno so pri oljki (*Olea europea*) ob pomanjkanju vode dokazali signifikantno večjo gostoto listnih rež ob hkratnem zmanjšanju dolžine in širine listnih rež, ter manjših celicah zapiralok (BOSABALIDIS & KOFIDIS 2002). Poročajo tudi o manjših epidermalnih celicah. Spremljanje maksimalne prevodnosti listnih rež

tekem celega leta pri treh mediteranskih grmih: *Juniperus communis*, *Myrtus communis* in *Erica arborea* jepri vseh treh vrstah pokazalo dva minimuma, v februarju in avgustu, ko je najmanj padavin (TOGNETTI et al. 2000). Ob vsaki spremembi vodnega statusa rastline lahko pričakujemo učinke na odprtost listnih rež. Celice zapiralke so v stiku z atmosfero in izgubljajo vodo z izhlapevanjem. Kadar je izguba vode večja, kot je dotok iz sosednjih epidermalnih celic, celicam pade turgor, postanejo ohlapne in zaprejo listno režo. Govorimo o hidropasivnem zapiranju listnih rež. Pri hidroaktivnem zapiranju rež pa rastlina zazna pomanjkanje vode zaradi suše in sproži specifičen mehanizem zapiranja. Pri tem sodelujejo številni hormoni, med katerimi ima najpomembnejšo vlogo abscizinska kislina (ABA), saj se v rastlinskih tkivih v času vodnega stresa poveča koncentracija ABA za več kot 40-krat (HOPKINS 1995).

Za izgubo vode s transpiracijo je pomembna temperatura in z njo povezan parcialni tlak vodne pare. Večja kot je razlika med parcialnimi tlaki znotraj listov in atmosfero, večja je izguba vode s transpiracijo. Rastlina se na povečano izgubo vode odziva z zmanjšanjem prevodnosti listnih rež.

Za vpliv nadmorske višine na gostoto listnih rež ni splošnega pravila. Pri rastlini *Saturea horvatii* gostota listnih rež na abaksialni (spodnji) strani lista pada z naraščajočo nadmorsko višino, medtem ko pri origanu (*Origanum vulgare*) gostota listnih rež z nadmorsko višino narašča (KOFIDIS et al. 2003).

V strokovni literaturi je izmed različnih dejavnikov zagotovo najbolj proučevan vpliv CO₂ na gostoto in prevodnost listnih rež. V večini primerov velja, da povečana koncentracija CO₂ negativno korelira z gostoto listnih rež.

2 MATERIALI IN METODE

Vzorci škrlatnega ameriškega slamnika (*Echinacea purpurea* (L.) Moench.) so bili pridobljeni iz vseh 27 nasadov pri vseh 15 pridelovalcih v različnih delih Slovenije, ki so leta 2002 pridelovali to rastlino. Po 5 ali 10 poganjkov je bilo vzeti z 20 nasadov v času poletne žetve in z 19 nasadov v času jesenske žetve. Nekateri nasadi so bili zasajeni šele spomladi istega leta, zato se na njih poleti še ni opravila žetev in tudi mi nismo pobirali vzorcev.

Nekatere starejše nasade so pridelovalci po poletni žetvi preorali, zato na njih nismo mogli pridobiti jesenskih vzorcev. Nasadi so se razlikovali po regiji, nadmorski višini, tipu zemlje in opremljenostjo s sistemom za namakanje (glej Preglednico 1). Zbiranje podatkov o nasadih, določitev morfoloških značilnosti rastlin obeh žetev in fitokemijskih značilnosti rastlin poletne žetve so bile teme predhodnih raziskovalnih del (KREFT 2005).

Preglednica 1: Podatki o nasadih, s katerih pridobili vzorce ameriškega slamnika**Table 1: Information on the plantations from which the samples of the purple coneflower were obtained**

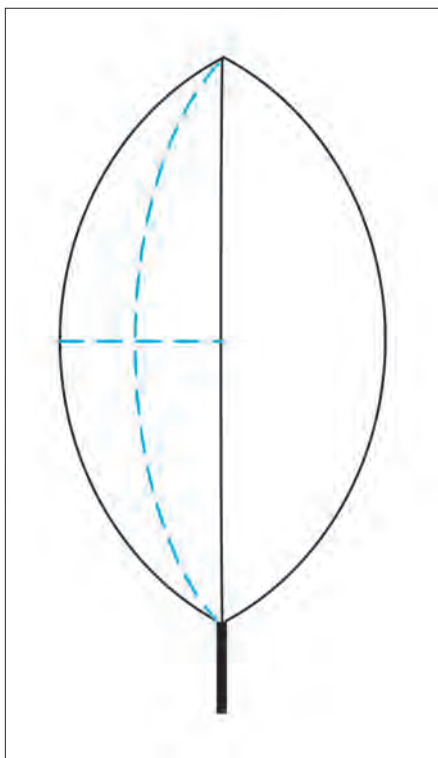
NASAD	STAROST NASADA (leta)	REGIJA	GOSTOTA NASADA [sadik/ar]	NAMAKANJE	NADMORSKA VIŠINA [m]
A	4	PTUJ	450	Da	215
B	5	PTUJ	425	Ne	215
C	1	PTUJ	500	Da	215
Č	5	PTUJ	360	Ne	215
D	6	MENGEŠ	425	Ne	310
E	4	MENGEŠ	425	Ne	310
F	0	MENGEŠ	400	Ne	310
G	4	PTUJ	360	Da	215
H	1	PTUJ	445	Da	215
I	0	PTUJ	400	Da	210
J	2	MENGEŠ	400	Ne	310
K	1	MENGEŠ	400	Da	310
L	4	KRŠKO	500	Ne	150
M	0	KRŠKO	650	Da	300
N	4	KRŠKO	430	Ne	150
O	0	KRŠKO	460	Da	150
P	2	MENGEŠ	500	Ne	310
Q	4	CELJE	/	Ne	/
R	4	CELJE	480	Ne	240
S	2	ŽUŽEMBERK	433	Ne	300
Š	0	ŽUŽEMBERK	415	Ne	300
T	5	CELJE	450	Ne	240
U	1	CELJE	450	Da	240
V	4	MENGEŠ	400	Ne	310
Z	0	CELJE	440	Da	240
Ž	0	SEČOVLJE	400	Da	0

Za vsak poganjek so bile izmerjene naslednje morfološke značilnosti: biomasa cvetov, biomasa listov, biomasa stebel, dolžina poganjka, število cvetov na poganjku, odstotek odprtih cvetov, masa suhih cvetov, masa suhih listov in masa suhih stebel. Iz teh morfoloških značilnosti smo izračunali: odstotek suhe mase cvetov, odstotek suhe mase listov in odstotek suhe mase stebel. V posameznih delih poganjka (cvet, steblo in listi) poletne žetve, so bile v predhodno objavljeni raziskavi določene koncentracije kaftarne in cikorne kisline (KREFT 2005).

Posušene liste posameznih poganjkov smo namakali v vodi 3-4 ure. Liste smo nato popivnali s papirnatobrisačo. Na sredino lista (med centralno žilo lista in robom ter med pecljem in vrhom) (slika 1) smo nanесли tanek sloj prozornega laka za nohte in pustili 10-15 minut, da se posuši. Z lepilnim trakom smo tanek film ločili od lista in ga prilepili na objektno steklo. Odtise

smo vzeli z obeh strani lista, vendar večinoma ne z istega lista.

Gostoto in dolžino listnih rež smo ugotavljali z optičnim mikroskopom (Olympus BX50, Nemčija) opremljenim s kamero (Sony DXC-950P) ter s pomočjo programa AnalySIS (Soft Imaging Systems GmbH). Za oceno gostote listnih rež na spodnji strani lista je bilo pregledanih 5 vidnih polj velikosti 0,0746 mm² pri 400-kratni povečavi. Listno režo smo šteli, če je bila cela na vidnem polju. Pri tem smo izmerili dolžine vseh listnih rež na vidnem polju. Na zgornji strani lista smo prav tako pregledali 5 vidnih polj velikosti 0,2986 mm² pri 200-kratni povečavi. Dolžin listnih rež na zgornji strani nismo merili. Pridobljene podatke smo statistično obdelali s programom SPSS (SPSS Inc., ZDA). Pri tem smo uporabljali naslednje statistične metode: t-test, analiza variance, korelacija – linearna regresija.



Slika 1: Presečišče modrih črtkanih črt prikazuje točko, kjer smo jemali odtise epiderme za meritve gostote in dolžine listnih rež.

Figure 1: The intersection of the blue dotted lines shows the point where we took epidermis prints for the measurements of density and the length of the leaf stomata.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

3.1 Optimizacija metode merjenja listnih rež

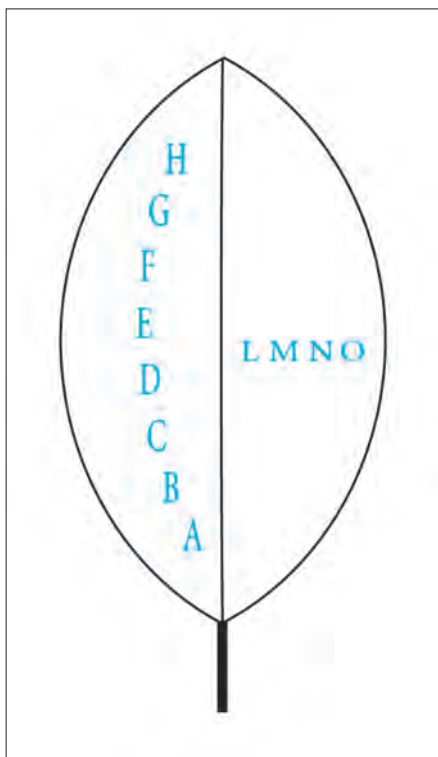
Metoda ugotavljanja gostote listnih rež ali indeksa listnih rež z jemanjem odtisov epiderme s prozornim lakom za nohte je zelo preprosta in poceni. V literaturi poleg omenjene metode zasledimo tudi druge, ki zajemajo fiksacijo lista z glutaraldehidom za 24 ur. Fiksacija je pomembna pri raziskavah, kjer se spremlja odprtost listnih rež, ki so posledica trenutnih razmer, pa tudi druge morfološke značilnosti lista. Vzorci listov, iz katerih smo izhajali, so bili posušeni. Poskus z odtisi suhih listov se ni posrečil, saj so listi namreč preveč krhki in se pri rokovanju zdrobijo. Za zmeščanje le-teh smo uporabili vodo ali metanol in jih namakali 15-30 minut. Ugotovili smo, da se učinek zmeščanja z namakanjem listov v metanolu po 30 minutah zmanjša, medtem ko se učinek zmeščanja z namakanjem listov v vodi povečuje. Z namakanjem listov v vodi od 3 do 4 ure, so bili odtisi bolj kakovostni. Zelo pomemben vpliv na kakovost odtisa in s tem na boljšo oceno gostote listnih rež ima nanos, sušenje in gostota oziroma viskoznost laka. Ko se lak suši, se suši tudi list. Pri tem se list krči, kar naguba lak na površini in zmanjša kakovost odtisa. Pri pregledu takega odtisa lahko določimo večjo

gostoto listnih rež od dejanske, ali pa jih zaradi deformacije ne prepoznamo. Zato je dobro, da je nanos laka tanek, kar skrajša čas sušenja. Slabša kakovost odtisa je tudi, posledica uporabe laka, katerega steklenička je odprta že dlje časa. Lak namreč postane bolj viskozen in reliefa v epidermi ne zalije dobro. Redčenje laka z acetonom sicer zmanjša njegovo viskoznost, hkrati pa zmanjša elastičnost filma, ki ga tvori posušeni lak. Posušen, z acetonom razredčen lak, je namreč bolj krhek in pri jemanju odtisa z lepilnim trakom poka.

V splošnem velja, da so listne reže enakomerno razporejene po površini lista, vendar pa lahko v literaturi zasledimo, da gostota listnih rež pri nekaterih vrstah ni enakomerna po površini lista, zaradi različnih dejavnikov, ki vplivajo na iniciacijo listnih rež in rast lista (HOPKINS 1995). Pri ameriškem slamniku smo to preverili tako, da smo na abaksialni (spodnji) strani izmerili gostoto in dolžino listnih rež na različnih pozicijah na listu (Slika 2). Na posamezni lokaciji smo pregledali 5 vidnih polj ($0,0746 \text{ mm}^2$). Analiza varianca (ANOVA) ni pokazala signifikantnih razlik med različnimi lokacijami po dolžini lista. Gostote in dolžine listnih rež pa se signifikantno razlikujejo med različnimi lokacijami po širini lista (Preglednica 2).

Na gostoto listnih rež vpliva sama rast lista (HOPKINS 1995), zato smo preverili, ali obstajajo razlike v gostoti in dolžini listnih rež med listi različnih velikosti. V ta namen smo vzeli odtise spodnje in zgornje epi-

derme s štirih listov (2 manjših in 2 večjih) iste rastline in izmerili gostoto in dolžino listnih rež. Gostote listnih rež na zgornji in spodnji strani pri različno velikih listih se niso signifikantno razlikovale. Dolžina listnih rež na



Slika 2: Lokacije po dolžini in širini lista, kjer smo ugotavljali gostoto in dolžino listnih rež.

Figure 2: Locations by length and width of the leaf, where the density and length of the leaf stomata were determined.

Preglednica 2: Prikaz povprečnih dolžin listnih rež in gostot listnih rež petih vidnih polj posameznih lokacij po dolžini in širini lista.

Table 2: The average lengths and densities of leaf stomata at individual locations over the length and width of the leaf.

		Povprečna dolžina ± SD [μm]	Gostota listnih rež ± SD [mm ⁻²]
Lokacija na listu	A	26,0 ± 0,8	160,9 ± 21,2
	B	24,8 ± 1,6	160,9 ± 26,8
	C	25,8 ± 0,8	155,5 ± 12,0
	D	25,0 ± 1,2	150,2 ± 38,4
	E	25,2 ± 1,5	144,8 ± 17,5
	F	25,2 ± 1,5	158,2 ± 19,9
	G	25,1 ± 1,9	136,8 ± 22,0
	H	26,2 ± 1,4	142,1 ± 27,8
p (ANOVA)		0,421	0,665
Lokacija na listu	L	27,0 ± 2,4	147,5 ± 13,4
	M	27,4 ± 0,5	190,4 ± 29,1
	N	28,7 ± 1,2	169,0 ± 22,4
	O	26,8 ± 2,1	144,8 ± 22,0
p (ANOVA)		0,001	0,018

spodnji strani se med različno velikimi listi ni signifikantno razlikovala, je pa bila na večjih listih signifikantno večja dolžina listnih rež zgornje strani lista (manjši list 20,8 μm , večji listi 24,0 μm , $p=0,025$). Gastota listnih rež je na zgornji strani več kot 5-krat manjša v primerjavi s spodnjo stranjo (zgoraj 30 rež/ mm^2 , spodaj 168 rež/ mm^2 , $p<0,001$), medtem ko se dolžine listnih rež med zgornjo in spodnjo stranjo ne razlikujejo signifikantno (zgoraj 22,9 μm , spodaj 22,5 μm , $p=0,591$). Zaradi majhnega števila listnih rež na vidnem polju pri 400-kratni povečavi smo v nadaljevanju na zgornji strani lista pregledovali 4-krat večja vidna polja, in sicer pri 200-kratni povečavi. Dolžin listnih rež na zgornji strani lista zaradi premajhne povečave zato nismo merili.

3.2 Vpliv sezone žetve

Sliki 3 in 4 prikazujeta porazdelitev vrednosti gostot in dolžin listnih rež za 114 poganjkov poletne in 99 poganjkov jesenske žetve. Ugotovili smo, da sezona žetve signifikantno vpliva na gostoto listnih rež zgornje strani ($p<0,001$) in dolžino rež na spodnji strani ($p<0,001$), medtem ko se gostota rež spodnje strani

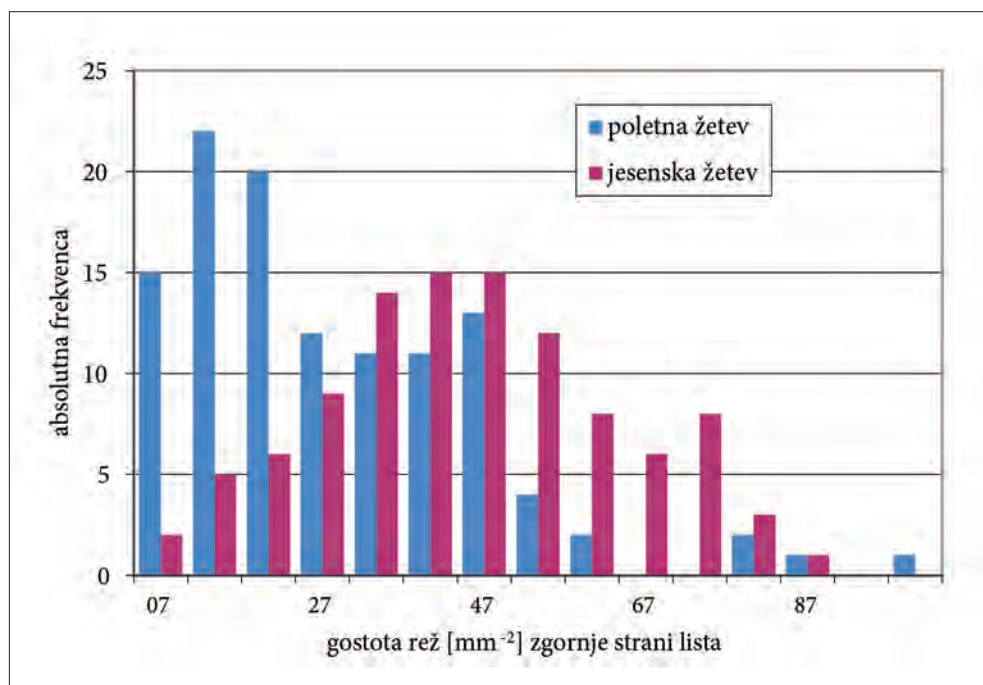
med poletno in jesensko žetvijo signifikantno ne razlikuje ($p=0,277$).

Gostota rež zgornje strani je jeseni 66 % večja kot poleti ($p<0,001$), podobno velja za dolžine rež spodnje strani, ki so bile jeseni 11 % večje kot poleti ($p<0,001$). Pri poletni žetvi lahko opazimo trimodalno porazdelitev na obeh straneh lista, ki je pri jesenski žetvi na obeh straneh lista manj izrazita.

Zgornja stran listov je poleti zaradi neposredne izpostavljenosti sončnim žarkom bolj izpostavljena velikemu izhlapevanju vode, zaradi česar je očitno nekatero, z vodo slabše preskrbljene rastline, poleti na zgornji strani lista razvijejo še posebno malo listnih rež.

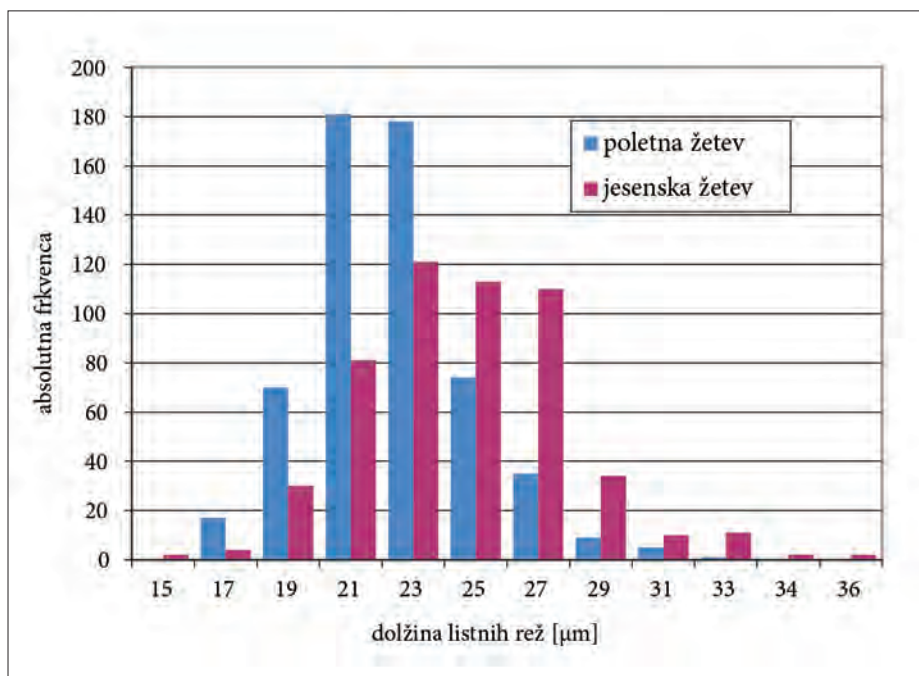
3.3 Vpliv namakanja, starosti rastlin in nadmorske višine nasada

Naši rezultati so pokazali, da namakanje signifikantno ne vpliva na lastnosti listnih rež, kar je na videz v nasprotju z ugotovitvami nekaterih raziskovalcev, ki pravijo, da vodni stres poveča gostoto listnih rež (HOPKINS 1995). Pri istih raziskavah pomanjkanje vode ni vplivalo na indeks listnih rež. Povečana gostota listnih



Slika 3: Porazdelitve gostot listnih rež zgornje strani lista pri poletni in jesenski žetvi. Absolutna frekvenca predstavlja število vzorčenih vidnih polj, ki zaradi gostote rež pripadajo določenemu razredu.

Figure 3: Distribution of densities of leaf stomata on the upper and lower side of the leaf during summer and autumn harvest. The absolute frequency represents the number of sampled visual fields that, due to the density of the slits, belong to a certain class



Slika 4: Porazdelitev dolžin listnih rež spodnje strani lista pri poletni in jesenski žetvi. Absolutna frekvenca predstavlja število listnih rež, ki zaradi dolžine pripadajo določenemu razredu.

Figure 4: Distribution of the length of leaf stomata on the lower side of the leaf during summer and autumn harvest. The absolute frequency represents the number of stomata that, due to their length, belong to a certain class.

rež pri rastlinah, izpostavljenih vodnemu stresu, je bila posledica manjših epidermalnih celic in celic zapiralk. Pri večini nasadov brez namakanja verjetno ni bilo sušnih razmer, saj se za postavitev namakalnih sistemov pridelovalci odločajo predvsem na sušnih njivah. To je verjetno razlog, da namakanje ni vplivalo na listne reže.

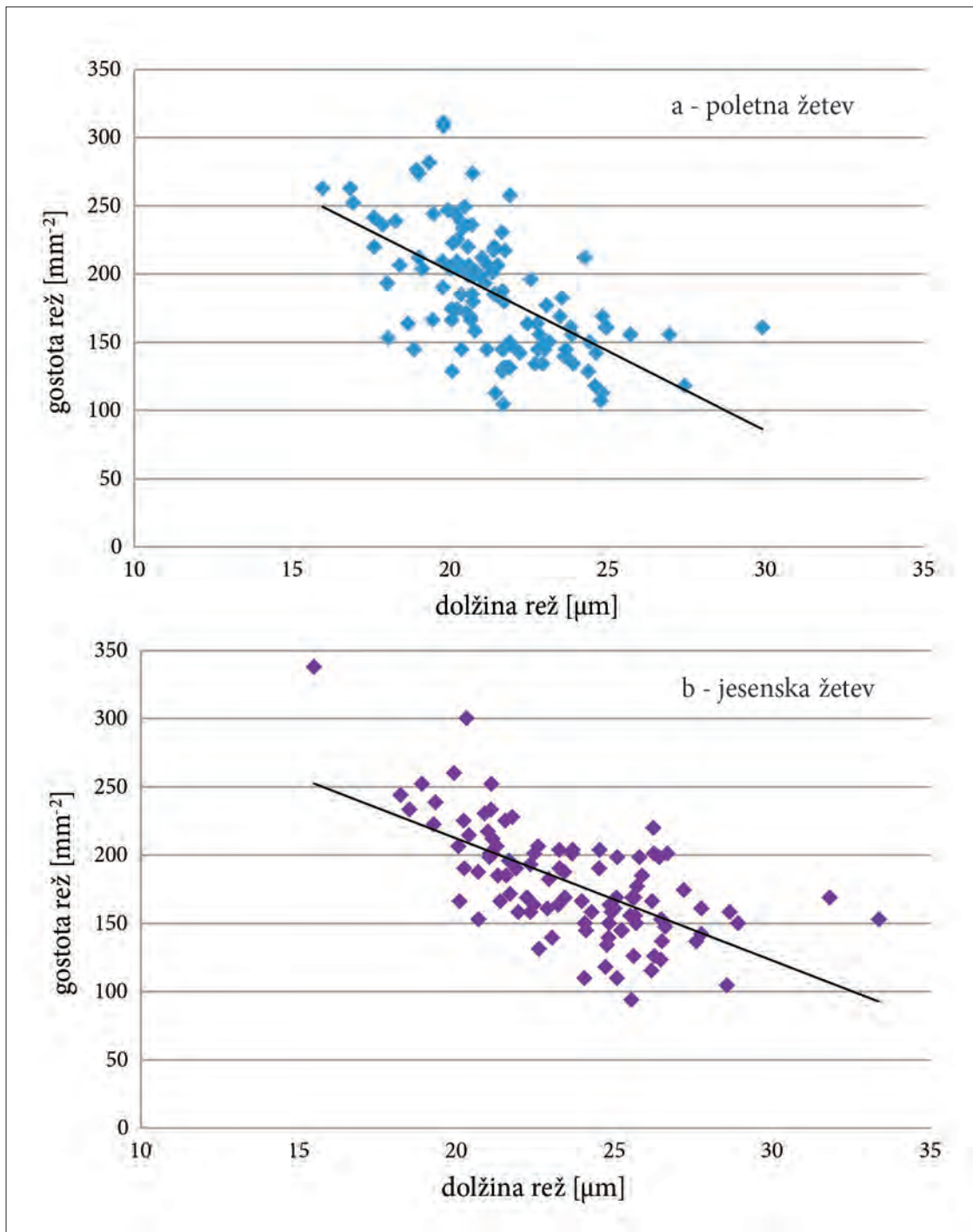
Tudi regija ni vplivala signifikantno na lastnosti listnih rež. Ne signifikanten vpliv na gostoto listnih rež in dolžino rež na spodnji strani lista pa smo opazili tudi pri različnih nadmorskih višinah. Razpon nadmorskih višin (0-314 m) je verjetno premajhen, da bi se razlike izrazile. V literaturi, kjer so proučevali vpliv nadmorske višine na gostoto listnih rež, je bil razpon višin 200-1760 m (KOFIDIS et al. 2003) ali 280-1540m (HOPKINS 1995).

S starostjo nasada se povečuje gostota listnih rež spodnje in zgornje strani lista pri poletni žetvi. Naraščanje gostote je še posebej izrazito na zgornji strani (2x večja gostota pri 5 let starih nasadih v primerjavi z 1 leto starimi ter linearen trend vmes). Pri jesenski žetvi gostote listnih rež nekoliko padajo s starostjo nasadov, vendar ta povezava ni signifikantna. Starejši nasadi imajo verjetno razvite globlje korenine in so zato rastline bolj preskrbljene z vodo in posledično ni potrebe po zmanjšanju gostote listnih rež v poletnem obdobju.

3.4 Korelacije med lastnostmi rež

Gostota in dolžina listnih rež sta v zelo močni signifikantni negativni korelaciji tako pri poletni ($R=-0,582$; $p<0,01$) kot pri jesenski žetvi ($R=-0,683$; $p<0,01$) (Slika 5). Z ekološkega stališča je to nekoliko presenetljivo, saj bi v razmerah sušnega stresa, ko rastlina tvori manj rež, pričakovali da bodo reže tudi manjše. Je pa to naše opažanje v skladu z drugimi raziskavami, ki so pokazale, da manjši sušni stres povzroči povečanje gostote rež in zmanjšanje velikosti rež, medtem ko šele večji sušni stres povzroči zmanjšanje gostote rež, velikost rež pa se še naprej zmanjšuje (XU & ZHOU 2008). Rastline v naši raziskavi torej verjetno niso bile v večjem sušnem stresu.

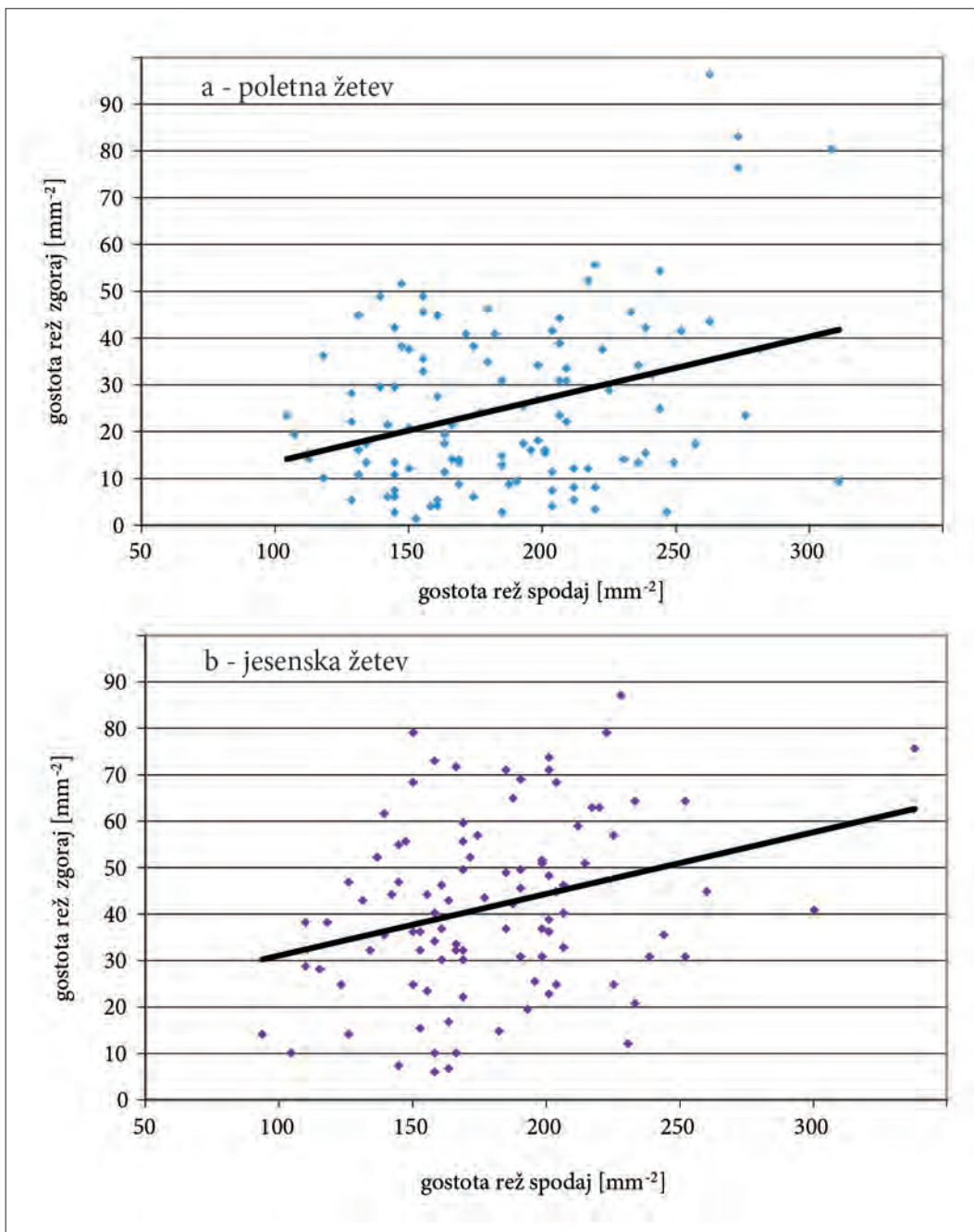
Korelacije med gostotami in dolžino listnih rež in morfološkimimi značilnostmi rastline so predstavljene s Pearsonovimi korelacijskimi koeficienti v Preglednici 3. Večje rastline so imele daljše listne reže in manjšo gostoto listnih rež v primerjavi z manjšimi rastlinami. Dolžina listnih rež poleti in jeseni je v pozitivni korelaciji z vsemi parametri velikosti rastline (dolžina stebela, število cvetov, biomasa cvetov, listov in stebel ter suha masa cvetov, listov in stebel). Pri poletni žetvi je korelacija z vsemi temi parametri razen z številom cve-



Slika 5: Povezava med gostotami listnih rež in njihovo dolžino pri poletni (a) in jesenski žetvi (b).

Figure 5: Correlation between densities and length of leaf stomata in summer (a) and autumn harvest (b).

Signifikantno in pozitivno korelacijo opazimo med gostotami listnih rež zgornje in spodnje strani (Slika 6). Razmerje gostot listnih rež zgornje in spodnje strani je pri jesenski žetvi skoraj dvakrat večje, kar je posledica že ugotovljene manjše gostote listnih rež zgornje strani pri poletni žetvi in približno enakih gostot listnih rež spodnje strani med poletno in jesensko žetvijo.



Slika 6: Povezava med gostotami listnih reŝ zgornje in spodnje strani pri poletni (a) in jesenski (b) ŝetvi.
 Figure 6: Correlation between the leaf stomata density on the upper and lower sides in autumn (a) and summer harvest (b).

tov tudi statistično signifikantna. Gostota rež pri poletni žetvi pa je obratno v negativni korelaciji z vsemi velikostnimi parametri (na spodnji strani je ta korelacija z vsemi parametri signifikantna, na zgornji strani pa samo z nekaterimi).

Rastline z večjim odstotkom suhe mase v požeti biomasi (manjša vsebnost vode) so imele večjo gostoto

rež in manjšo dolžino listnih rež, vendar so povezave signifikantne le pri poletni žetvi. Ta rezultat je lahko posledica fiziološkega dogajanja v rastlini, lahko pa je tudi posledica eksperimentalne napake. Svežo biomaso smo namreč tehtali nekaj ur po nabiranju rastlin na njivi in pri rastlinah z večjo gосто rež bi lahko prišlo do večje izgube vode.

Preglednica 3: Prikaz korelacijskih koeficientov med gostotami in dolžino listnih rež in morfološki značilnostmi rastlin pri poletni in jesenski žetvi. * Korelacija je signifikantna pri $\alpha=0,05$ (2-stranski Pearsonov test signifikantnosti korelacije)

Table 3: Correlation coefficients between densities and length of leaf stomata and morphological characteristics of plants for summer and autumn harvest. * Correlation is significant for $\alpha = 0.05$ (2-sided Pearson correlation test)

Žetev	Dolžina rež spodaj		Gostota rež spodaj		Gostota rež zgoraj	
	poletje	jesen	poletje	jesen	poletje	jesen
Dolžina stebela	0,289*	0,094	- 0,252*	-0,09	- 0,213*	-0,18
Število cvetov	0,051	0,08	-0,14	0,065	-0,01	0,081
% odprtih cvetov	0,228*	0,317*	-0,09	- 0,299*	- 0,241*	-0,02
Biomasa cvetov	0,322*	0,269*	- 0,259*	-0,04	- 0,186*	0,108
Biomasa listov	0,215*	0,107	- 0,286*	0,039	-0,04	0,097
Biomasa stebel	0,260*	0,061	- 0,270*	0,035	-0,1	0,003
Suha masa cvetov	0,307*	0,227*	- 0,237*	-0,04	-0,16	0,096
Suha masa listov	0,205*	0,102	- 0,252*	0,072	-0,02	0,107
Suha masa stebel	0,220*	0,098	- 0,202*	0,018	-0,11	0,006
% suhe mase cvetov	- 0,202*	-0,04	0,227*	-0,08	0,228*	-0,03
% suhe mase listov	- 0,218*	-0,08	0,342*	0,175	0,149	0,104
% suhe mase stebel	- 0,202*	0,125	0,246*	-0,03	0,021	0,08

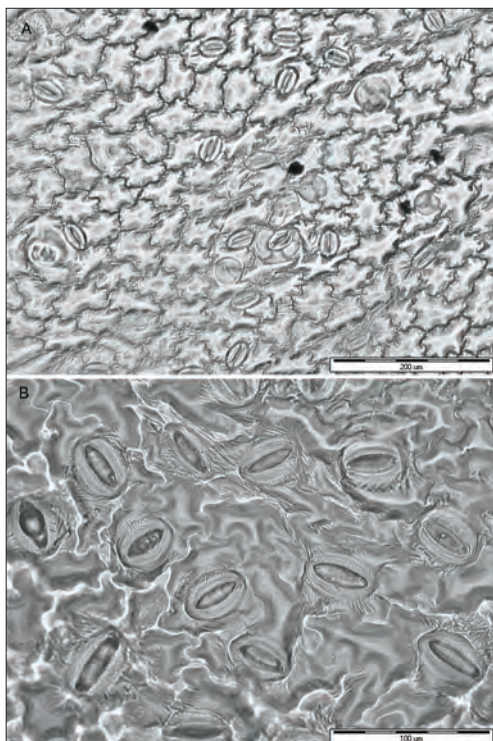
Morfološko fiziološko je razumljiva negativna korelacija med biomaso listov in gostoto listnih rež. Kot je znano iz literature, na gostoto listnih rež močno vpliva tudi rast epidermalnih celic in lista v celoti, to pa je v razumljivi korelaciji z biomaso (HOPKINS 1995). Ostale signifikantne korelacije verjetno niso neposredne ampak so posledica povezave med parametri. Dolžina listnih rež je torej z vsemi izmerjenimi morfološki parametri v pozitivni, obe gostoti pa večinoma v negativni korelaciji. Skoraj pri vseh povezavah je naklon regresijske premice večji pri poletni žetvi.

Izračunali smo tudi korelacijo med lastnostmi listnih rež in fitokemijskimi značilnostmi rastline (Tabela 4). Ugotovili smo, da je velja pozitivna korelacija med dolžino rež in koncentracijami cikorne in kaftarne kisline v vseh delih rastline. Povezava je signifikantna le med kaftarno kislino v stebelu in dolžino rež. Povezave med gostotami rež tako spodnje kot zgornje strani lista s koncentracijami cikorne in kaftarne kisline so šibke in večinoma nesignifikantne. Po listnih režah torej ne moremo ugotavljati kakovosti rastline.

Preglednica 4: Korelacijski koeficienti med gostotami in dolžino listnih rež in fitokemijski značilnostmi rastlin pri poletni žetvi. * Korelacija je signifikantna pri $\alpha=0,05$ (2-stranski Pearsonov test signifikantnosti korelacije)

Table 4: Correlation coefficients between the leaf stomata density and length and phytochemical characteristics of plants at summer harvest. * Correlation is significant for $\alpha = 0.05$ (2-sided Pearson correlation test)

	CVET		LIST		STEBLO	
	Cikorna kislina	Kaftarna kislina	Cikorna kislina	Kaftarna kislina	Cikorna kislina	Kaftarna kislina
Dolžina rež spodaj	0,051	0,141	0,166	0,108	0,068	0,229*
Gostota rež spodaj	- 0,078	- 0,115	- 0,056	- 0,038	0,017	- 0,078
Gostota rež zgoraj	- 0,037	- 0,160	0,015	- 0,058	0,009	- 0,042



Slika 7: Mikroskopski sliki odtisov epiderme: zgornja A (200-kratna povečava), spodnja B (400-kratna povečava).
 Figure 7: Microscopic image of epidermis: upper side A (200x enlargement), lower side B (400x enlargement).

4 POVZETEK

V raziskavi smo ugotavljali gostote listnih rež zgornje in spodnje strani lista ter merili dolžine rež na spodnji strani lista škrlatnega ameriškega slamnika (Slika 7). Proučevali smo vpliv dejavnikov rastišča na lastnosti listnih rež in iskali povezavo med le-temi in morfološki mi ter fitokemijskimi značilnostmi rastline. Ugotovili smo, da na določitev gostote listnih rež (z odvzemom odtisa epiderme) vpliva tudi lokacija na listu, kjer je bil odtis odvzet. Ker nam na poškodovanih listih ni vedno uspelo zagotoviti enakega mesta odvzema odtisa, so lahko nekateri vplivi in povezave parametrov z lastnostmi listnih rež manj izraziti ali zakriti. Na spodnji strani lista je bila dolžina rež v signifikantni negativni korelaciji z gostoto rež, torej večja kot je gostota listnih rež, manjša je njihova dolžina. V pozitivni signifikantni korelaciji pa sta bili gostoti rež spodnje in zgornje strani lista. Izkazalo se je, da so te povezave neodvisne od sezone. Gostota listnih rež zgornje strani je bila najbolj izrazito povezana s sezono. Pri poletni žetvi je bila gostota rež približno dvakrat manjša v primerjavi z jesensko. Pri poletni žetvi so bile dolžine rež spodnje strani

signifikantno manjše kot pri jesenski žetvi. Na gostoto rež spodnje strani lista sezona ni imela signifikantnega vpliva. S starostjo nasada se je povečevala gostota listnih rež spodnje in zgornje strani lista pri poletni žetvi. Ugotovili smo, da namakanje, regija in nadmorska višina nasada, ne vplivajo signifikantno na gostoto in dolžino listnih rež. Povezave med morfološki mi parametri in lastnostmi listnih rež so bile poletni izrazitejše kot jeseni. Pri poletni žetvi smo ugotovili veliko več signifikantnih povezav. Vse povezave so bile pozitivne: večje kot so bile dolžine listnih rež, večja je bila biomasa, suha masa ali dolžina poganjka. Gostota listnih rež zgornje in spodnje strani je bila večinoma v negativni povezavi s parametri velikosti rastline ter v pozitivni korelaciji z odstotki suhe mase cvetov, listov in stebel. Pri dolžini listnih rež pa so bile povezave z naštetimi morfološki mi parametri nasprotnega predznaka, kar izhaja iz že omenjene negativne povezave gostote rež z njihovo dolžino. Med fitokemijski mi parametri rastline in gostoto ter dolžino listnih rež ni bilo signifikantnih povezav. Iz lastnosti listnih rež se torej ne da sklepati o kakovosti rastline.

5 SUMMARY

The density of the leaf stomata on the upper and lower sides of the leaf was determined, and the length of the stomata on the lower side of the leaf of the purple American staple was measured. We examined the influence of the factors of the growing site on the properties of the leaf stomata and investigated a correlation between them and the morphological and phytochemical characteristics of the plant. We found that the location on the leaf where the imprint was taken also influenced on the determination of leaf stomata density. Due to damaged leaves, we did not always succeed in providing the same spot for the measurement. For this reason, some of the effects and correlations with leaf stomata properties can be less pronounced or hidden. On the lower side of the leaf, the length of the stomata is in a significant negative correlation with the stomata density. The greater was the density of stomata, the smaller the length. The densities of stomata in the lower and upper sides of the leaf are in significant positive correlation. These connections are independ-

ent from the season. The stomata density on the upper side was strongly influenced by the season. In the summer harvest, the stomata density is about half as low as in autumn. In the summer harvest, the lengths of the stomata on the lower side are significantly shorter than in the autumn harvest. The season does not have a significant impact on the density of stomata on the lower side of the leaf. With the age of the plantation, the density of the stomata of the lower and upper sides of the leaf increases (at summer harvest). We found that irrigation, the region and the altitude of the plantation do not significantly affect the density and length of the leaf stomata. The links between morphological parameters and leaf stomata properties are more pronounced in the summer than autumn. In the summer harvest, we found a lot more significant correlations. Longer leaf stomata were found in plants with the higher biomass, the dry weight or the length of the shoot. The density of leaf stomata on the upper and lower sides is mostly in a negative correlation with plant size param-



Slika 8: Fotografija nasada cvetočega škrlatnega ameriškega slamnika (*Echinacea purpurea*).
Figure 8: Photo of the plantation of the flowering purple coneflower (*Echinacea purpurea*).

eters and in positive correlation with the percentage of dry mass of flowers, leaves and stems. The correlations have opposite sign, because of already mentioned negative connection between the density and length of the stomata. There are no significant correlations between

the phytochemical parameters of the plants (concentrations of chicoric and caftaric acids in different plant parts) and the density and the length of the leaf stomata. Therefore, the quality of the plant can not be deduced from the properties of the leaf stomata.

6 LITERATURA

- BAUER, R., 1997: Echinacea — Pharmazeutische Qualität und therapeutischer Wert. *Z Phytother* 18: 207–214.
- BINNS, S.E., J.T. ARNASON & B.R. BAUM, 2002: Phytochemical variation within populations of *Echinacea angustifolia* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 30: 837–854. [http://dx.doi.org/10.1016/S0305-1978\(02\)00029-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0305-1978(02)00029-7).
- BOSABALIDIS, A.M. & G. KOFIDIS, 2002: Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars. *Plant Science* 163: 375–379. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00135-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00135-8).
- CHEN, L.-Q., C.-S. LI, W.G. CHALONER, D.J. BEERLING, Q.-G. SUN, M.E. COLLINSON & P.L. MITCHELL, 2001: Assessing the Potential for the Stomatal Characters of Extant and Fossil Ginkgo Leaves to Signal Atmospheric CO₂ Change. *American Journal of Botany* 88: 1309. <http://dx.doi.org/10.2307/3558342>.
- GAN, X.-H., L. ZHANG, D. HEBER & B. BONAVIDA, 2003: Mechanism of activation of human peripheral blood NK cells at the single cell level by *Echinacea* water soluble extracts: recruitment of lymphocyte–target conjugates and killer cells and activation of programming for lysis. *International Immunopharmacology* 3: 811–824. [http://dx.doi.org/10.1016/S1567-5769\(02\)00298-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1567-5769(02)00298-9).
- GOEL, V., C. CHANG, J. V. SLAMA, R. BARTON, R. BAUER, R. GAHLER & T.K. BASU, 2002: Alkylamides of *Echinacea purpurea* stimulate alveolar macrophage function in normal rats. *International Immunopharmacology* 2: 381–387. [http://dx.doi.org/10.1016/S1567-5769\(01\)00163-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1567-5769(01)00163-1).
- GRIMM, W. & H.-H. MÜLLER, 1999: A randomized controlled trial of the effect of fluid extract of *Echinacea purpurea* on the incidence and severity of colds and respiratory infections. *The American Journal of Medicine* 106: 138–143. [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9343\(98\)00406-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9343(98)00406-9).
- HOPKINS, W.G., 1995: *Introduction to Plant Physiology*. Wiley.
- KEMP, D.E. & K.N. FRANCO, 2002: Possible leukopenia associated with long-term use of echinacea. *JABFT* 15: 417–419.
- KOFIDIS, G., A.M. BOSABALIDIS & M. MOUSTAKAS, 2003: Contemporary Seasonal and Altitudinal Variations of Leaf Structural Features in *Oregano* (*Origanum vulgare* L.). *Annals of Botany* 92: 635–645. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcg180>.
- KREFT, S., 2005: Chicoric acid content and biomass production of *Echinacea purpurea* plants cultivated in Slovenia. *Pharmaceutical Biology* 43. <http://dx.doi.org/10.1080/13880200500383132>.
- KREFT, S. & N. GLAVAČ KOČEVAR, 2013: *Sodobna fitoterapija: z dokazi podprta uporaba zdravnih rastlin*. Slovensko farmacevtsko društvo.
- KREFT, S. & B. RAZINGER, 2014: Assessment report on *Echinacea purpurea* (L.) Moench., herba recens.
- MURRAY, D.R., 1997: *Carbon dioxide and plant responses*. Research Studies Press Ltd.
- PERCIVAL, S.S., 2000: Use of echinacea in medicine. *Biochemical Pharmacology* 60: 155–158. [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00413-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00413-X).
- ROYER, D.L., 2001: Stomatal density and stomatal index as indicators of paleoatmospheric CO₂ concentration. *Review of Palaeobotany and Palynology* 114: 1–28. [http://dx.doi.org/10.1016/S0034-6667\(00\)00074-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0034-6667(00)00074-9).
- SCHULZ, V., R. HÄNSEL & V.E. TYLER, 2001: *Rational Phytotherapy*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-98093-0>.
- ŠMID, D., 2003: *Vpliv morfoloških in pridelovalnih dejavnikov na vsebnost cikorne kisline v ameriškem slamniku*. Diplomsko delo, FFA, Ljubljana
- TOGNETTI, R., A. MINNOCCI, J. PEÑUELAS, A. RASCHI & M.B. JONES, 2000: Comparative field water relations of three Mediterranean shrub species co-occurring at a natural CO₂ vent. *Journal of Experimental Botany* 51: 1135–1146.
- WAGNER, F., R. BELOW, P.D. KLERK, D.L. DILCHER, H. JOOSTEN, W.M. KÜRSCHNER & H. VISSCHER, 1996: A natural experiment on plant acclimation: lifetime stomatal frequency response of an individual tree to annual

atmospheric CO₂ increase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93: 11705–11708.

WILLS, R.B. & D. STUART, 1999: Alkylamide and cichoric acid levels in *Echinacea purpurea* grown in Australia. Food Chemistry 67: 385–388. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00129-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00129-6).

XU, Z. & G. ZHOU, 2008: Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. Journal of Experimental Botany 59: 3317–3325. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ern185>.