

Univerza v Mariboru
Fakulteta za naravoslovje in matematiko
Oddelek za biologijo

MAGISTRSKO DELO

Jasmina Ramšak

Maribor, 2017

Ramšak, J.: Rast in razvoj treh ekotipov plazee zelene (*Apium repens* (Jacq.) Lag.) v tkivni kulturi. Magistrsko delo, Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Oddelek za biologijo, 2017.

Univerza v Mariboru
Fakulteta za naravoslovje in matematiko
Oddelek za biologijo

Jasmina Ramšak

Rast in razvoj treh ekotipov plazee zelene (*Apium repens* (Jacq.) Lag.) v tkivni kulturi

Growth and development of different creeping marshwort (*Apium repens* (Jacq.) Lag.)
ecotypes in tissue culture

MAGISTRSKO DELO

Mentorica: doc. dr. Jana Ambrožič Dolinšek

Maribor, 2017

IZJAVA O AVTORSTVU IN ISTOVETNOSTI TISKANE IN ELEKTRONSKE OBLIKE MAGISTRSKEGA DELA

Ime in priimek študentke: Jasmina Ramšak

Študijski program: 2. stopnja Biologije in ekologije z naravovarstvom

Naslov zaključnega dela: Rast in razvoj treh ekotipov plazeče zelene (*Apium repens* (Jacq.) Lag.) v tkivni kulturi

Mentorica: doc. dr. Jana Ambrožič Dolinšek

Podpisana študentka Jasmina Ramšak

- izjavljam, da je zaključno delo rezultat mojega samostojnega dela, ki sem ga izdelala ob pomoči mentorice
- izjavljam, da sem pridobila vsa potrebna soglasja za uporabo podatkov in avtorskih del v magistrskem delu in jih v magistrskem delu jasno in ustrezno označila;
- na Univerzo v Mariboru neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki, pravico reproduciranja ter pravico ponuditi zaključno delo javnosti na svetovnem spletu preko DKUM; sem seznanjena, da bodo dela deponirana/objavljena v DKUM dostopna široki javnosti pod pogoji licence Creative Commons BY-NC-ND, kar vključuje tudi avtomatizirano indeksiranje preko spleta in obdelavo besedil za potrebe tekstovnega in podatkovnega rudarjenja in ekstrakcije znanja iz vsebin; uporabnikom se dovoli reproduciranje brez predelave avtorskega dela, distribuiranje, dajanje v najem in priobčitev javnosti samega izvirnega avtorskega dela, in sicer pod pogojem, da navedejo avtorja in da ne gre za komercialno uporabo;
- dovoljujem objavo svojih osebnih podatkov, ki so navedeni v magistrskem delu in tej izjavi, skupaj z objavo zaključnega dela;
- izjavljam, da je tiskana oblika zaključnega dela istovetna elektronski obliki zaključnega dela, ki sem jo oddala za objavo v DKUM.

Datum in kraj:

Podpis študentke:

IZVLEČEK

Po vsej Evropi velja plazeča zelena (*Apium repens* (Jacq.) Lag.) za kritično ogroženo vrsto, ki številčno zelo nazaduje. V Sloveniji že od leta 1997 niso najdena nova ali potrjena obstoječa rastišča. Za ponovno naselitev *A. repens* na slovenska tla bi bilo potrebno rastlinski material pridobiti z nam najbližjih lokalno prilagojenih in ekološko podobnih okolij. Namen naloge je bil vzpostaviti tkivno kulturo iz rastlin *A. repens*, pridobljenih na izviru reke Slunjščice na Hrvaškem ter ga morfološko in fiziološko primerjati z rastlinskim materialom, pridobljenim iz botaničnega vrta Kew, Velika Britanija, ter iz Španije, ki že raste v tkivni kulturi. Uporabili smo trdno Murashige in Skoog (MS) gojišče brez in z rastnim regulatorjem, BAP v koncentracijah 2 μ M in 5 μ M. Ugotavljali smo, na katerem gojišču poganjki vseh treh ekotipov najbolj uspevajo, jih primerjali med seboj in ugotavljali, ali gre za podobne ali različne ekotipe te vrste. Tekom rasti in razvoja posameznega ekotipa *A. repens* smo spremljali rastne parametre: višino poganjkov, število stolonov, število brstov, dolžino korenin in število korenin ter merili fotokemično učinkovitost posameznega ekotipa. Glede na to, da je *A. repens* rastlina močvirnatih tal, smo ovrednotili vpliv delne potopitve na zgoraj omenjene morfološke in fiziološke parametre. Vsi trije ekotipi *A. repens* so najbolj uspevali na osnovnem MS gojišču brez rastnih regulatorjev. Rast in razvoj španskega ekotipa je po vseh izmerjenih parametrih značilno izstopal. Poganjki so zrastle najvišje, razvilo se je največ stolonov, brstov, korenine so bile najdaljše in najštevilnejše, rastlinski material je izgledal robustno. Delna potopitev na morfološke in fiziološke parametre ni bistveno vplivala.

Ključne besede: *Apium repens*, plazeča zelena, *Apiaceae*, kobulnice, ekotip, tkivna kultura, morfološki znaki, fiziološki znaki, renaturacija

ABSTRACT

All over Europe, the creeping marshwort (*Apium repens* (Jacq.) Lag.) is known as a critically endangered species whose numbers are decreasing considerably. In Slovenia, no new habitats have been found and no existing habitats have been attested already since 1997. In order to populate the Slovenian ground with *A. repens* again, the plant material would have to be obtained from the closest locally adjusted and ecologically similar areas. The aim of my work was to establish a tissue culture from the plants of *A. repens* obtained at the source of the river Slunjščica in Croatia and to compare it morphologically and physiologically with the plant material acquired from the Royal Botanic Gardens, Kew, United Kingdom, and with the plant material from Spain which had already been growing in the tissue culture. I used the solid Murashige and Skoog (MS) growth medium with and without the growth regulator BAP in concentrations of 2 and 5 μM . I tried to establish in which growth medium the plant shoots of the three ecotypes grew most successfully, I compared the ecotypes among themselves and tried to establish whether they were similar or different ecotypes of the species *A. repens*. During the growth and the development of an individual ecotype of *A. repens*, I measured the following growth parameters: the height of the shoots, the number of stolons, the number of buds, the length and the number of roots. I also measured the photochemical efficiency of an individual ecotype. Since *A. repens* is a swamp plant, I evaluated the influence of its partial immersion in water on the above mentioned morphological and physiological parameters. All three ecotypes of *A. repens* grew most successfully on the basic MS growth medium without added growth regulators. According to all of the measured parameters, the growth and the development of the Spanish ecotype stood out distinctly. The plant shoots grew tallest, the number of stolons and buds was largest, the roots were longest and most numerous, the plant material looked robust. The partial immersion in water did not have a significant influence on the morphological and physiological parameters.

Keywords: *Apium repens*, creeping marshwort, *Apiaceae*, *Umbelliferae*, ecotype, tissue culture, morphological parameters, physiological parameters, renaturation

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	Namen magistrske naloge.....	2
1.2	Cilji	2
1.3	Raziskovalne hipoteze	2
2	<i>APIUM REPENS</i> (JACQ.) LAG.	3
2.1	Opis in biologija vrste.....	4
2.2	Habitatne zahteve	8
2.3	Razširjenost	9
3	EKOTIPI	10
3.1	Koncept ekotipov.....	11
3.2	Uporabnost ekotipov pri obnovi populacij vrst	14
4	MATERIALI IN METODE	16
4.1	Rastlinski material	16
4.2	Priprava gojišč za namnoževanje materiala in poskuse.....	17
4.3	Namnoževanje materiala	18
4.4	Poskus primerjave rastnih parametrov med ekotipi in zbiranje rezultatov	20
4.5	Poskus vpliva potopitve <i>A. repens</i> in zbiranje podatkov.....	21
4.6	Obdelava podatkov	22
5	REZULTATI.....	23
5.1	PRIMERJAVA RASTNIH PARAMETROV RAZLIČNIH EKOTIPOV, GOJENIH NA GOJIŠČIH Z ALI BREZ RASTNIH REGULATORJEV.....	23
5.1.1	Velikost poganjkov različnih ekotipov, gojenih na gojiščih z ali brez rastnih regulatorjev.....	23
5.1.2	Število stolonov različnih ekotipov, gojenih na gojiščih z ali brez rastnih regulatorjev.....	25
5.1.3	Število brstov različnih ekotipov, gojenih na gojiščih z ali brez rastnih regulatorjev.....	26
5.1.4	Dolžina korenin različnih ekotipov, gojenih na gojiščih z ali brez rastnih regulatorjev.....	28
5.1.5	Ocena števila korenin različnih ekotipov, gojenih na gojiščih z ali brez rastnih regulatorjev.....	30
5.2	FIZIOLOŠKI PARAMETRI	35

5.2.1	FOTOKEMIČNA UČINKOVITOST	35
5.3	PRIMERJAVA RASTNIH PARAMETROV RAZLIČNIH EKOTIPOV, GOJENIH NA OSNOVNEM MS GOJIŠČU BREZ IN Z ZALITJEM Z VODO	36
5.3.1	Velikost poganjkov različnih ekotipov, gojenih na osnovnem MS gojišču brez in z zalitjem z vodo	36
5.3.2	Število stolonov različnih ekotipov, gojenih na osnovnem MS gojišču brez in z zalitjem z vodo	38
5.3.3	Število brstov različnih ekotipov, gojenih na osnovnem MS gojišču brez in z zalitjem z vodo	39
5.3.4	Dolžina korenin različnih ekotipov, gojenih na osnovnem MS gojišču brez in z zalitjem z vodo	40
5.3.5	Ocena števila korenin različnih ekotipov, gojenih na osnovnem MS gojišču brez in z zalitjem z vodo	42
5.4	FIZIOLOŠKI PARAMETRI	43
5.4.1	FOTOKEMIČNA UČINKOVITOST	43
6	DISKUSIJA.....	45
7	POVZETEK	51
8	ZAHVALA.....	53
9	LITERATURA.....	54

KAZALO SLIK

Slika 1: <i>A. repens</i> v naravnem okolju	4
Slika 2: Cvetovi (A) in plodovi <i>A. repens</i> z nezrelimi (B) in zreliimi semeni (C).....	5
Slika 3: Skica <i>A. repens</i>	5
Slika 4: Skica <i>A. nodiflorum</i>	6
Slika 5: Hrvaški ekotip <i>A. repens</i> na izviru reke Slunjščice	16
Slika 6: Nabrane rastline <i>A. repens</i> z izvira reke Slunjščice	17
Slika 7: Brezprašna komora za sterilno delo (laminarij).....	19
Slika 8: Rast poganjkov <i>A. repens</i> v rastni komori	19
Slika 9: Tkivne kulture hrvaškega, španskega in angleškega ekotipa <i>A. repens</i> v gojitvenih kazarčkih	20
Slika 10: Velikost poganjkov različnih ekotipov <i>A. repens</i> , pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na MS gojiščih brez in z rastnimi regulatorji (2 μ M BAP, 5 μ M BAP).....	23
Slika 11: Število stolonov različnih ekotipov <i>A. repens</i> , pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na MS gojiščih brez in z rastnimi regulatorji (2 μ M BAP, 5 μ M BAP).....	25
Slika 12: Število brstov različnih ekotipov <i>A. repens</i> , pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na MS gojiščih brez in z rastnimi regulatorji (2 μ M BAP, 5 μ M BAP).....	26
Slika 13: Dolžina korenin različnih ekotipov <i>A. repens</i> , pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na MS gojiščih brez in z rastnimi regulatorji (2 μ M BAP, 5 μ M BAP).....	28
Slika 14: Ocena števila korenin različnih ekotipov <i>A. repens</i> , pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na MS gojiščih brez in z rastnimi regulatorji (2 μ M BAP, 5 μ M BAP).....	30
Slika 15: Poganjki različnih ekotipov <i>A. repens</i> , pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na MS gojiščih brez in z rastnimi regulatorji (2 μ M BAP, 5 μ M BAP) po štirih tednih kulture.	32
Slika 16: Koreninski sistem različnih ekotipov <i>A. repens</i> , pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na MS gojiščih brez in z rastnimi regulatorji (2 μ M BAP, 5 μ M BAP) po štirih tednih kulture.....	34
Slika 17: Potencialna fotokemična učinkovitost (Fv/Fm) različnih ekotipov <i>A. repens</i> , pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na osnovnem MS gojišču.	35
Slika 18: Velikost poganjkov različnih ekotipov <i>A. repens</i> , pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na MS gojišču brez (MS) in z zalitjem z vodo (MS + voda).....	36
Slika 19: Število stolonov različnih ekotipov <i>A. repens</i> , pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na MS gojišču brez (MS) in z zalitjem z vodo (MS + voda)..	38

Slika 20: Število brstov različnih ekotipov *A. repens*, pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na MS gojišču brez (MS) in z zalitjem z vodo (MS + voda).. 39

Slika 21: Dolžina korenin različnih ekotipov *A. repens*, pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na MS gojišču brez (MS) in z zalitjem z vodo (MS + voda).. 40

Slika 22: Ocena števila korenin različnih ekotipov *A. repens*, pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na MS gojišču brez (MS) in z zalitjem z vodo (MS + voda)..... 42

Slika 23: Potencialna fotokemična učinkovitost (Fv/Fm) različnih ekotipov *A. repens*, pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR) na MS gojišču brez (MS) in z zalitjem z vodo (MS + voda)..... 43

KAZALO TABEL

Tabela 1: Priprava osnovnega gojišča MS in gojišča MS z dodatkom 2 μ M ali 5 μ M BAP.... 18

SIMBOLI IN OKRAJŠAVE

BAP	sintetični citokinin 6-benzilaminopurin
MS	Murashige in Skoog gojišče, klasično osnovno gojišče
M	molarna raztopina oz. molarnost, izražena kot množina topljenca (število molov raztopljenih snovi) v določenem volumnu raztopine, n/V ; enota: $\text{mol/m}^3 = 10^{-3} \text{ mol/dm}^3 = 10^{-3} \text{ mol/L} = 10^{-3} \text{ M} = 1 \text{ mM}$
μ M	mikromolarna koncentracija; tisočinka M

1 UVOD

Plazeča zelena (*Apium repens* (Jacq.) Lag.) je predstavnica rodu *Apium* L. (Martinčič in sod., 2010) iz družine kobulnic (Apiaceae), ki je bila v Sloveniji nazadnje domnevno najdena leta 1997 južno od Središča ob Dravi (Jogan, 2004). Velja za kritično ogroženo vrsto, ki številčno zelo nazaduje (Jogan, 2004). Kljub temu, da so jo večkrat neuspešno iskali (podatki niso prikazani), od 1997 do sedaj niso bila najdena nova ali potrjena obstoječa rastišča. Z namenom, da bi vrsto bolje spoznali in bi jo lahko kasneje ponovno naselili na slovenska tla, smo jo poskušali pridobiti od drugod. Semena *A. repens* smo pridobili iz zelo oddaljenih populacij z izvorom v Španiji (Savič, 2007) in v Veliki Britaniji (Bašič, 2014) ter vzpostavili protokol za mikropropagacijo *A. repens* (Savič 2007; Bašič, 2014). Obe vrsti na Oddelku za biologijo Univerze v Mariboru *ex situ* ohranjamo v stalni *in vitro* zbirki rastlin. V letu 2014 smo pridobili še rastline iz rastišča na Hrvaškem, katere izvor je z nam najbližje populacije rastlin.

Rastline iz vseh treh pridobljenih populacij so se v razmerah tkivne kulture (*in vitro*) morfološko nekoliko razlikovale med seboj, zato smo sklenili raziskati te *in vitro* razlike v rasti in razvoju rastlin. Predvidevali smo, da gre pri rastlinah, ki izvirajo iz tako geografsko oddaljenih populacij, za različne ekotipe te vrste. Vse tri populacije, gojene v tkivni kulturi, smo želeli morfološko primerjati in ugotoviti, ali gre za podobne ali različne ekotipe te vrste. Na osnovi rezultatov bomo lahko ocenili primernost angleških, španskih in hrvaških ekotipov za renaturacijo v naravno okolje v Sloveniji. Naši rezultati bodo osnova za nadaljnje genetske raziskave in raziskave na terenu.

1.1 Namen magistrske naloge

Namen magistrske naloge je bil vzpostaviti tkivno kulturo iz rastlin *A. repens*, ki smo jih pridobili na izviru reke Slunjščice na Hrvaškem, in ga primerjati z rastlinskim materialom, pridobljenim iz botaničnega vrta Kew, Velika Britanija (Bašič, 2014) ter iz Španije (Savič, 2007), ki že raste v tkivni kulturi. Predvidevali smo, da rastlinski material iz vseh treh virov pripada različnim ekotipom. Rastlinski material smo primerjali med seboj ter ugotavljali, ali so posamezni ekotipi podobni ali se med seboj razlikujejo. Primerjali smo morfologijo in fiziologijo hrvaškega, španskega in angleškega ekotipa *A. repens*. Na osnovi rezultatov smo predvideli, kateri ekotip bi bil najbolj primeren za renaturacijo v naravno okolje v Sloveniji.

1.2 Cilji

V skladu z našim namenom smo si zastavili naslednje cilje:

- ugotoviti, na katerem gojišču najbolje uspevajo poganjki posameznih ekotipov;
- izvesti meritve morfoloških in fizioloških parametrov poganjkov med ekotipi *A. repens*;
- primerjati vse tri ekotipe med sabo;
- glede na to, da je *A. repens* rastlina močvirnatih tal, želimo ovrednotiti vpliv delne potopitve na morfološke in fiziološke parametre;
- zbrane podatke statistično obdelati in ovrednotiti.

1.3 Raziskovalne hipoteze

- predpostavljamo, da se bodo ekotipi iz Anglije, Španije in Hrvaške morfološko razlikovali med seboj v vseh izmerjenih rastnih parametrih;
- predvidevamo, da bodo poganjki različno dobro uspevali na različnih gojiščih: MS, 2 μ M BAP in 5 μ M BAP;
- predvidevamo, da delna potopitev ne bo vplivala na rast in razvoj poganjkov.

2 *APIUM REPENS* (JACQ.) LAG.

Z uporabo morfoloških in palinoloških metod ter analize anatomije ploda je bila opravljena taksonomska revizija evropskih predstavnikov *Apium*. Vanj spada sedem evropskih vrst: *graveolens*, *nodiflorum*, *repens*, *inundatum*, *crassipes*, *bermejoi* in *leptophyllum*. Rezultati molekularnih filogenetskih raziskav kažejo, da je *Apium* polifiletska skupina (Ronse in sod., 2010).

A. repens ima kompleksno taksonomsko zgodovino. Leta 1775 jo je prvič opisal Joseph von Jacquin v Flori Avstrija pod imenom *Sium repens*. Obe imeni, latinsko *Apium* in staro grško *Sium*, je sicer Carl Linnaeus uporabljal že od leta 1754, prvo omenjeno za zeleno in peteršilj, slednjo za ostale velike vodne kobulnice. Leta 1821 je Mariano Lagasca y Segura zaradi domnevne ožje sorodstvene povezave z *Apium graveolens* L. ime spremenil v zdajšnje, *Apium*, ki pa je obveljalo do leta 1824 s Kochovim opisom novega rodu *Helosciadium*. Koch je vanj prestavil vse evropske vrste *Apium*, vključno z *A. repens* (McDonald in Lambrick, 2006), razen *A. graveolens* (Ronse in sod., 2010). *A. repens* je bil za kratek čas obravnavan tudi kot podvrsta *Helosciadium repens* in prestavljen v rodova *Helodium* ter *Selinum*. Še danes uporabljeno ime *Apium repens* (Jacq.) Lag. je leta 1867 dokončno oblikoval Reichenbach z uvrstitvijo rodu *Helosciadium* nazaj v rod *Apium* (McDonald in Lambrick, 2006).

Zaradi podobnosti *A. repens* nekaterim drugim vrstam kobulnic, kot sta *Apium nodiflorum* in *Berula erecta*, identifikacija ni vedno lahka in lahko prihaja do napak pri določanju.

Grassly in sod. (1996) so taksonomski položaj angleške populacije domnevne *A. repens* iz Port Meadowa ocenili s primerjavo analize metode naključno pomnožene polimorfne DNK (RAPD). Primerjali so jo z *A. repens* iz Frankfurta, Švice, Maroka ter *A. nodiflorum* iz dveh populacij v Angliji, eno prav tako iz Port Meadowa. Ugotovili so, da populacijo iz Port Meadowa sestavlja prava *A. repens*, podobna tisti iz Frankfurta in Švice, ki je hkrati tudi zelo podobna *A. nodiflorum*, ki je fenokopija *A. repens*. Fenokopija je fenotip, ki je posledica dejavnikov okolja, vendar se ne da ločiti od tistega, povzročenega z mutacijo (Slovenski medicinski slovar, 2012). Vzrok takšne podobnosti med vrstama *A. repens* in *A. nodiflorum* bi lahko bila fenotipska plastičnost ali hibridizacija, čeprav dokazov o obstoju hibridov ni. McDonald (2011) navaja, da še posebej na močno pašenih območjih *A. nodiflorum* in *A. repens* lahko izgledata podobno, kar sovпада z izrabo zemljišča v Port Meadowu, kjer je paša konj in goveda znana že iz druge polovice 11. stoletja.

2.1 Opis in biologija vrste

A. repens je zelnata trajnica s 5-30 cm dolgim plazečim, votlim stebлом, ki se na kolencih ukoreninja. Liste ima enkrat pernato sestavljene z grobo nazobčanimi jajčastimi lističi. So blede rumeno-zelene barve (Jogan, 2004) in prijetnega okusa, ki spominjajo na peteršilj, brez rahlo pekočega okusa kot pri vodni kreši (Grassly in sod., 1996). Zalistni kobuli so pecljati in sestavljeni (Jogan, 2004), imajo 2-6 listno ogrinjalo (McDonald in Lambrick, 2006) in 4-6 listno ogrinjalice, listi ogrinjala in ogrinjalice niso suhokožnato obrobljeni (Jogan, 2004). Cveti od junija (McDonald in Lambrick, 2006) do septembra (Burmeier in Jensen, 2008), iz Port Meadowa poročajo, da celo do novembra, lahko pa po več let ne cveti (McDonald in Lambrick, 2006). Cvetovi so petštevni z zelenkasto do belimi široko narobejajčastimi venčnimi listi, ki niso izrobljeni in so brez kljunca, čašni listi so zakrneli (Jogan, 2004).



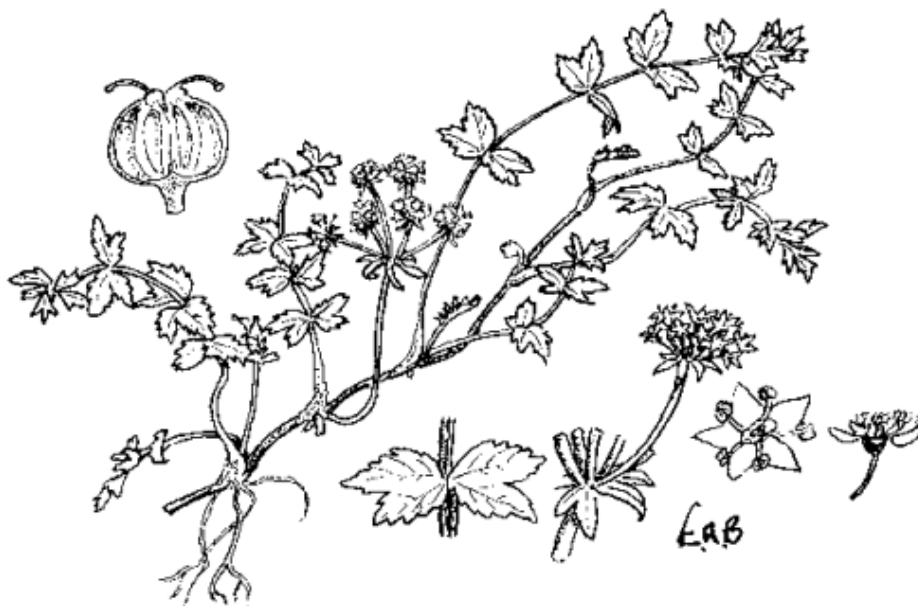
Slika 1: *A. repens* v naravnem okolju (Dublić in sod., 2008)

Plod je kroglast z ozkimi svetlejšimi vzdolžnimi rebri, bolj širok kot dolg. V zrelosti po šivu razpade v dva enosemenska plodiča (Jogan, 2004) - dve okrogli do ovalni semeni (Burmeier in Jensen, 2008). Spolno razmnoževanje s semeni, ki se razširjajo jeseni, prevladuje na kopnem, vegetativno razmnoževanje s stoloni pa prevladuje v vodnem okolju. Slednje jo označuje na motnje prilagojeno gverilno vrsto (Rosenthal in Lederbogen, 2007). Lahko pride do obeh načinov širjenja hkrati (Jensen in sod.).



Slika 2: Cvetovi (A) in plodovi *A. repens* z nezrelimi (B) in zreliimi semeni (C) (S. Burmeier)

Od sorodne vrste *A. nodiflorum* jo je težko razlikovati. Pri *A. repens* se steblo večina ukoreninja na vseh kolencih (Jogan, 2004), listni peclji so pri listnem dnu manj napihnjene (McDonald in Lambrick, 2006). Lističi so jajčasti, manjši in bolj nazobčani, zareza v tretjem paru lističev od spodaj navzgor je še posebej globlja od ostalih, po čemer jo je najlažje ločiti od *Apium nodiflorum* (McDonald in Lambrick, 2006) s sicer jajčasto suličastimi lističi ter razločno večjim in pogosto trikrpim končnim lističem (Jogan, 2004). *A. repens* ima razmeroma dolge peclje kobulov (Jogan, 2004) in bolj razvito ogrinjalo, 2- do 6- listno (McDonald in Lambrick, 2006), listi ogrinjalca niso suhokožnato obrobljeni (Jogan, 2004). *A. nodiflorum* ima kobule kratkopecljate do skoraj sedeče, ogrinjalo je največ 2-listno, listi ogrinjalca so belo obrobljeni (Jogan, 2004). Plod je pri *A. repens* širši kot daljši, pri *A. nodiflorum* daljši kot širši (McDonald in Lambrick, 2006).



Slika 3: Skica *A. repens* (McDonald in Lambrick, 2006)



Slika 4: Skica *A. nodiflorum* (vir: <http://www.tela-botanica.org/bdtx-nn-31557-illustrations>)

Burmeier in Jensen (2008) sta v raziskavi ugotovila, da ima *A. repens* visok kalitveni uspeh pri različnih abiotičnih pogojih. Za kalitev potrebuje ali svetlobno ali hladno-mokro stratifikacijo semen, na obvezno prilagajanje nihanjem temperatur ne kaže. Med kalitvijo prenaša širok temperaturni razpon, le zelo visoka temperatura kalitev zavira (med 5 °C in 30 °C je bila kaljivost med 79 % in 94 %; med 30 °C in 35 °C je bila kaljivost 36 %). Pozitivno odzivanje na svetlobo med kalitvijo nakazuje, da bi lahko ustvarjanje umetnih svetlobnih vrzeli v jeseni, ko pomanjkanje hladne stratifikacije zavira kaljivost semen v temi, vzpodbudilo dodatno jesensko kaljivost naravnih populacij in služilo kot dodatni način, ki spodbuja razširjanje *A. repens* populacij.

Burmeier in Jensen (2008) poročata, da je bila *A. repens* sposobna kaliti, ko so bila semena prekrita z vodo več dni. Najvišja kaljivost je bila pri semenih, ki so bila potopljena 14 dni ali pa sploh ne potopljena, kar kaže, da je kaljivost uspešnejša pri stalnem vodnem režimu, z ali brez potopitve. Semena, zaščitena pred padavinami (testirana v topli gredi), so bila zmožna plavati tudi več kot 50 dni, vmes so nekatera že kalila, kar je omejilo maksimalni plavajoči čas in s tem vplivalo na razdaljo razširitve. Ta omejitev je bila ublažena, saj so tudi sadike še nekaj časa plavale. Zaradi plavnosti semen *A. repens* kaže potencial za lokalno razširjanje s pomočjo

vode, sploh kot dodatno sredstvo razširjanja po obsežnih poplavih habitata po daljšem deževju. Vendar pa je večina testnih semen v zunanjih razmerah po hudih padavinah potonila v roku enega dneva, tako da lahko takšni dogodki drastično zmanjšajo potencial razširjanja z vodo.

Vzorci semenske banke so pokazali, da so nekaj semen našli tudi v globinah tal do 10 cm, kar kaže, da je vrsta sposobna ustvariti vsaj kratkoročno obstojno semensko banko v tleh. Gostota semen je bila relativno visoka, tako da lahko semenska banka veliko prispeva k regeneraciji populacije po motnji tal, če seveda semena v prsti ostanejo vitalna dovolj časa (Burmeier in Jensen, 2008), kar je odvisno od temperature, poplav, razpoložljivosti kisika in hranilnih snovi v tleh (McDonald in Lambrick, 2006).

Savičeva (2007) in Bašičeva (2014) sta kalili španska in angleška semena *A. repens*.

Savičeva (2007) je imela na razpolago semena *A. repens* iz Španije, nabrana leta 2004. Preizkusila je različne načine prekinitve dormance semen, da bi pospešila njihovo kalitev. Semena je najprej stratificirala, tako da jih je 3 tedne hranila v hladilniku pri 4 °C, sledila je imbibicija v hladilniku. Semena je nato dodatno stratificirala, skarificirala in sterilizirala v različnih kombinacijah. Kalila jih je v petrijevkah, delno zatesnjenih s parafilmom, na mostičkih iz filtrirnega papirja, omočenih z destilirano vodo. To je potekalo v rastni komori 38 dni oz. 31 dni za semena, ki jih je dodatno stratificirala. Najbolje so kalila sterilizirana semena brez mehanske skarifikacije ali dodatne stratifikacije, vendar zaradi majhnega števila semen rezultati niso bili statistično značilni. Povprečna kaljivost vseh tretmajev je bila 31 %.

Bašičeva (2014) je imela na razpolago 365 semen *A. repens* iz Španije, nabranih leta 2001 in 26 semen *A. repens* iz Velike Britanije, nabranih leta 2013. Semena je najprej sterilizirala in nato kalila v petrijevkah na gojišču MS, ki mu je dodala dva različna strjevalca gojišč v treh različnih kombinacijah: ½ MS in agar, ½ MS in phytigel, phytamax (agar in phytigel). Semena iz Španije so kalila samo na gojišču ½ MS in phytigel, semena iz Velike Britanije pa na gojiščih ½ MS in agar ter ½ MS in phytigel. Ugotovila je, da s starostjo semen upada njihova živost, saj je od 365 semen iz Španije iz leta 2001 uspelo vzkliti le dvema (3 %), od 26 britanskih semen iz leta 2013 pa jih je vzklilo 9 (35 %).

2.2 Habitatne zahteve

A. repens je svetlobno zelo zahtevna vrsta (Rosenthal in Lederbogen, 2007). Uspeva na s hranili bogatih odprtih svetlih pionirskih rastiščih (McDonald in Lambrick, 2006), vlažnih do mokrih, občasno poplavljenih, z dokaj pogostimi in intenzivnimi motnjami, ki vzdržujejo vegetacijo na primerno nizki višini (Burmeier in Jensen, 2008). Tla so lahko organska, šotna, muljasta ali peščena. Nevtralna do nekoliko alkalna. Tolerira precej visoko stopnjo dušika in rahlo slane pogoje (McDonald in Lambrick, 2006). Primarni habitati so brežine jezer, plitve izvirske vode in nizka barja, sekundarne habitate pa zagotavljajo poplavna pašna travišča (Rosenthal in Lederbogen, 2007). Uspeva lahko tudi v podobnih ekoloških razmerah na od človeka motenih rastiščih (Jogan, 2004), kjer antropogene motnje posnemajo naravne motnje, katerim je *A. repens* prilagojena, na primer v kampih in ob obalah jezer s plavalci (Burmeier in Jensen, 2009). Za obstoj populacije je nujna dinamika (Jogan, 2004). Za cvetenje in obnavljanje semenske banke potrebuje vroča in sušna poletja z občasnimi poplavami v maju in juniju. Zimske poplave vrsta tolerira, saj voda ščiti rastline pred pozebo (McDonald in Lambrick, 2006). V Port Meadowu so *A. repens* našli predvsem na območjih, kjer površinske vode ostanejo do maja (Gowing in Youngs, 2005). Ne prenaša pa zgodnjepoletnih poplav, saj zaradi anoksije, pomanjkanja kisika v prsti, na kateri se dalj časa zadržuje stoječa voda, pride do hitrega propada tkiv *A. repens*. Zaradi poplav vrsta nima direktne koristi, vendar te motnje negativno vplivajo tudi na njene kompetitorje, kar zmanjša vpliv konkurence. S poplavami se poveča tudi obseg golih tal, primernih za kalitev *A. repens*, kjer se vrsta lahko obnovi iz semenske banke. Če se to zgodi v zaporednih letih, se *A. repens* obnaša kot ruderalna vrsta, vendar preveč teh dogodkov lahko osiromaši semensko banko. Rastline, ki so poplavljene med poletjem, pa zaradi slabšega zakoreninjenja lahko izplavajo na površje in v vodotokih s hitrimi vodnimi tokovi in tako dobro preskrbljenimi s kisikom, preživijo ter najdejo primernejša rastišča, kjer se ponovno zakoreninijo (McDonald in Lambrick, 2006).

Poleg občasnih zgodnjepoletnih poplav in anoksije, ki zagotavljajo primerna mesta za kalitev, pa tudi košnja in paša oz. teptanje črede s kopiti, ki vzdržuje primerno nizko vegetacijo in s tem dovolj svetlobe, zagotavlja optimalni režim motenj za dolgoročno obstojnost vrste. Tako se ustvari optimalni habitat, mozaik zaplat, ki zahteva učinkovito, hitro strategijo ponovne invazije, da zasede ugodne vrzeli in izkoristi razpoložljive vire (Rosenthal in Lederbogen, 2007). V tem primeru se *A. repens* obnaša kot klonalna rastlina, trajnica s hitrim širjenjem poleglega stebela - stolona, ki se na kolencih ukoreninja in poganja ramete (McDonald in

Lambrick, 2006). Klonalne rastline s široko razmaknjenimi rameti zasedejo široko območje in so zato bolj uspešne pri iskanju in zasedanju teh vrzeli v heterogenem in nepredvidljivem okolju, kot neklonalne rastline. Omenjeno je *A. repens* v prid, saj je kompetitivno slabša vrsta. Propad ramet se pojavi naključno, ponovno invazijo pa je mogoče predvideti na podlagi razmer v okolici (Rosenthal in Lederbogen, 2007). Intenzivnost in smer odziva populacije *A. repens* je odvisna predvsem od oddaljenosti ramet do novega primerne območja za naselitev. Bližje je, večja je možnost kolonizacije. Rosenthal in Lederbogen (2007) iz raziskave poročata, da je bila pri oddaljenosti 7 cm do neposeljenega območja v 4-6 tednih verjetnost kolonizacije kar 50 %, sicer pa je bila največja možna razdalja za uspešno kolonizacijo 14,5 cm. Če velikost motnje presega razdaljo širjenja stolonov in frekvenca motenj presega odzivni čas (rekolonizacijo), bo *Apium* izključen (Rosenthal in Lederbogen, 2007).

Brez motenj bi ta območja zasedle in oblikovale vmesne, vendar obstojne sukcesijske faze, visoke vrste s svetlobo absorbirajočimi krošnjami (C-strategi), kot sta *Juncus inflexus* in *Mentha longifolia* (Rosenthal in Lederbogen, 2007). Grožnjo ji predstavljajo tudi invazivne vrste, kot je *Crassula helmsii* (McDonald in Lambrick, 2006). Po motnji pa na dolgi rok, nekaj let, s povečanjem vegetacije, odvisno predvsem od sposobnosti obnavljanja visoko rastlih konkurentov, postopno pride nazaj do kompetitivnih pogojev (sekundarna sukcesija), ki izpodrinejo *A. repens*, zato je dinamika motenj pomembna (Rosenthal in Lederbogen, 2007).

Obstojnost *A. repens* je tako rezultat zmožnosti, da preživi uničenje velikega dela svoje nadzemne biomase, medtem ko njena nizka toleranca na senčne razmere in omejena zmogljivost razširjanja ne prispevata k boljšemu položaju vrste (Rosenthal in Lederbogen, 2007).

2.3 Razširjenost

A. repens je porazdeljena po vzhodni in južni Evropi ter z izoliranimi populacijami v severni Afriki, na masivu Visoki Atlas v Maroku (McDonald in Lambrick, 2006).

V Evropi spada v zahodno sredozemsko-subatlantsko območje. Z redkimi rastišči sega na severu do Anglije, na jugu do Portugalske, Španije in severne Italije, na vzhodu do Madžarske in Poljske, na zahodu do Kanarskih otokov (Jogan, 2004). Po vsem evropskem območju v splošnem velja za redko vrsto (Burmeier in Jensen, 2008).

V Sloveniji je bilo potrjeno le eno nahajališče južno od Središča ob Dravi na vlažnih peščenih tleh na prodiščih, najdeno leta 1997 (Jogan in sod., 1999). Pred to najdbo več kot stoletje njeno pojavljanje ni bilo zabeleženo. Jogan (2004) navaja, da še edina *A. repens* ustrezna rastišča lahko najdemo na prodiščih na delu Drave med Obrežjem in Središčem, kjer pa je do danes še niso našli. Kljub temu, da so jo večkrat neuspešno iskali (podatki niso prikazani), od 1997 do sedaj niso bila najdena nova ali potrjena obstoječa rastišča.

3 EKOTIPI

Organizmi niso pasivno podrejeni ekološkim dejavnikom, ampak se jim prilagajajo na ravni vrste, populacije in zlasti učinkovito na ravni združbe ter njenega ekosistema, v katerem se organizmi uravnesijo z danimi okoljskimi dejavniki (Lovrenčak, 2003). Populacije iste vrste pogosto uspevajo v različnih okoljskih pogojih, bodisi gre za razlike v vsebnosti vlage, sestavi tal, dolžini rastne sezone, vrstah in številčnosti herbivorov, pri rastlinah, opršenih s pomočjo živali, tudi spremembe v sestavi opraševalcev. Prilagajanje je še posebej opazno pri vrstah s širokim območjem pojavljanja, katere se tudi srečujejo s širšim razponom okoljskih pogojev, te pa vodijo k različnim morfološkim, fiziološkim in vedenjskim značilnostim vrst (Smith in Smith, 2003). Te razlike lahko povzročijo različne selekcijske pritiske po območju razširjenosti vrst, kar se kaže v genetski diverziteti med populacijami (Fenster in Stenøien, 2001). Tako dejstvo, da dva osebka pripadata isti vrsti, ne pomeni, da se bosta enako odzvala na ekološke faktorje (Smith in Smith, 2003). Vrste se adaptirajo z različnimi oblikami rasti, potrebami po temperaturi, svetlobi, hranilih, vlagi v tleh, z dolžino rastne sezone, dobo zorenja, z reproduktivnim sistemom, načinom razširjanja semen ipd. (Lovrenčak, 2003). Da pa se okoljsko pogojene lastnosti lahko gensko stabilizirajo, fiksirajo, mora biti populacija izpostavljena okoljskim pogojem, ki nenehno producirajo fenotip, kateri kaže večji fitnes v tem danem okolju zaradi selekcijskega pritiska (Nosil, 2012). Fenotipski odgovor okoljskim razmeram pomaga gensko neadaptiranim populacijam preživeti toliko časa, da akumulira variante (skozi mutacije, rekombinacije, imigracije) in se nato adaptira gensko. Znotraj populacij mora tako biti dovolj genskih variacij, da se ta določen fenotip uveljavi (Nosil, 2012). Tako se lahko izoblikujejo osebki z gensko določenimi morfološkimi in fiziološkimi lastnosti, ki jim omogočajo življenje v danem okolju. To so ekološki tipi oz. ekotipi (Lovrenčak, 2003). Gre torej za različne genotipe oz. populacije iste vrste, ki so se adaptirale na lokalne okoljske pogoje in se lahko križajo z drugimi ekotipi iste vrste (Hufford in Mazer, 2003).

Kako hitro lahko vrste razvijejo ekotipe, tako temelji na količini genetskih variacij znotraj populacij in zmožnost novih mutacij, ki prispevajo k prilagajanju sprememb (Fenster in Stenøien, 2001).

3.1 Koncept ekotipov

Do koncepta ekotipov je vodilo zanimanje švedskega botanika Göte Turessona za mehanizme nastanka sprememb v morfologiji med različnimi populacijami iste rastlinske vrste (Lowry, 2012). Turesson je želel določiti, ali so razlike med populacijami rastlinskih vrst (rastlinskimi ekotipi) v celoti pogojene različnim okoljskim pogojem ali so zaradi različnih okoljskih pogojev med populacijami genske razlike (Manuel in Molles, 2010).

Za testiranje populacijskih razlik na genski osnovi je vzpostavil eksperiment skupnega vrta. S presajanjem vrst je začel leta 1916 v svoj domači vrt na jugu Švedske. Zaradi prostorske stiske je leta 1918 vse kulture prestavil na inštitut v Åkarpu. Zbiral je rastline, ki so pogoste in se pojavljajo v klimatsko in talno različnih habitatih, sprva po južni Švedski (Turesson, 1992b), nato tudi po širši Evropi, zahodni S. Ameriki (Turesson, 1925) in Aziji (Turesson, 1930), pri čemer so bile zastopane značilne oblike rasti vrst, rastoče pri različnih okoljskih pogojih (Manuel in Molles, 2010). Posamezni osebki vrst iz določenega habitata so bili izbrani naključno (Turesson, 1922b). Do leta 1925 je iz območij med severno Švedsko in Karpati na JV Evrope presadil že okoli 10.000 posameznih vrst na skupni eksperimentalni vrt (Manuel in Molles, 2010). Največ rastlin je bilo iz južne obale Švedske (Turesson, 1922b). Rastline so bile previdno izkopane, oštevilčene in dane v vrečo. V čim krajšem času so bile posajene na eksperimentalni skupni vrt. Material iz bolj oddaljenih območij pa je bil v skupni eksperimentalni vrt prenesen v obliki semenske zbirke (Turesson, 1922b). Tako so bile rastline izpostavljene enakim razmeram, enotnemu okolju.

Skupni vrtovi kot eksperiment presaditve so uporabni za določanje genskih razlik med populacijami in za opredelitev okoljskih dejavnikov, ki lahko povzročijo lokalne prilagoditve. Tako razlike, izražene skozi njihov fenotip, temeljijo na osnovi razlik v genih in ne na osnovi okolja (What are plant ecotypes?, 2010).

Ena od Turessonovih mnogih poskusnih vrst je bila *Campanula rotundifolia*. Leta 1925 je poročal o njeni rasti na skupnem vrtu z devetih lokacij – od Abiska v gorah S. Švedske do Feldberga v gorah JZ Nemčije. Posamezni osebki *Campanule* iz omenjenih lokacij so se močno razlikovali po višini, številu cvetov in velikosti. Vsaka populacija je bila na skupnem vrtu

zastopana s 6 do 16 posameznimi osebki. Zanimalo ga je, ali se bodo razlike med ekotipi pri *Campanuli* ohranile pri rasti v skupnem okolju. Z ugotovitvijo, da razlike med ekotipi *Campanule* iz teh devetih lokacij v večina primerih ostajajo kljub rasti pri istih okoljskih pogojih, je dokazal genske razlike med ekotipi zaradi naravne selekcije v smeri prilagoditve na lokalne okoljske pogoje (Manuel in Molles, 2010). Njegove študije so pokazale, da ima velik delež fenotipskih razlik med populacijami gensko osnovo, nastalih kot prilagoditev na specifične okoljske razmere, ki habitat definirajo (Lowry, 2012). Na rastlinah iz različnih lokacij Evrope in iz različnih vrst habitatov, ki jih je združil na enem enotnem vrtu, je dokazal obstoj različnih vrst podnebnih/klimatskih ras oz. ekotipov. V mnogih vrstah je odkril obmorske in celinske, nižinske, predalpske in alpske ekotipe, severne in južne, nizko ležeče in visoko ležeče oblike vrst (Hiesey in sod., 1942).

Prvo definicijo tērmina ekotip je predlagal leta 1922 kot ekološko enoto, ki je rezultat genotipskega odgovora ekovrste na določen habitat (Turesson, 1992a). Besedo ekovrsto je uporabil za razširjen nabor ekotipov iste vrste z gensko podobnimi lastnostmi. Ekotipe je tako videl kot ekološke podenote ekovrste (Lowry, 2012). Najprej je ekotipe opisal kot toge abstraktne entitete, kasneje pa jih je videl kot nenehno spreminjajoče se skupine, produkte naravne selekcije (Lowry, 2012). Od takrat se je opredelitev večkrat spremenila, pri čemer se polemika vrti okoli vprašanja speciacije. Se ta odvije hitro na lokalni ravni ali postopoma s formacijo geografsko razširjenih ekotipov kot prekurzorjev razvijajočih se vrst? (Lowry, 2012).

Turessonove raziskave niso bile prve, ki so izpostavile razlike med lokalnimi populacijami s spreminjanjem okolja, bile pa so prve, ki so dokazale, da imajo ta geografska razlikovanja gensko osnovo. Turesson je prvi prepoznal lokalne populacije kot enote evolucije in predvidel pomembnost izolacije pri diferenciaciji populacij vrst v različnih habitatih in tudi znotraj njih (Núñez-Farfán in Schlichting, 2001). Bil pa je omejen le na en eksperimentalni vrt, na ene okoljske pogoje. Naslednji korak je bila kombinacija presaditve vrst na več poskusnih eksperimentalnih vrtov, kar so storili rastlinski ekologi na zahodu severne Amerike, Jens Clausen, William Hiesey in David Keck.

V dvajsetletnem obdobju so Clausen, Hiesey in Keck preučevali adaptivne razlike številnih rastlinskih vrst, pri čemer so namesto eksperimenta skupnega vrta izvajali vzajemne presaditvene poskuse, tako da so rastline iste vrste z *in situ* populacij po Kaliforniji presadili in preučevali na transektu treh *ex situ* višinskih točk in ekoregij Kalifornije. Te eksperimentalne točke so bile na univerzi Stanford blizu obale na višini 30 m, v gorskem okolju Mather na višini

1400 m in v alpskem okolju Timberline na višini 3050 m (Lowry, 2012), ki so se izrazito razlikovale v klimatskih pogojih in v sestavi vrst (Clausen, 1951).

Okolje Kalifornije je zelo različno od severne in srednje Evrope, od koder je največ rastlin, ki jih je obravnaval Turesson. Ima tudi več klimatskih pasov, ki se hitro menjujejo od notranjosti proti oceanu (Clausen in sod., 1940). Tako so lahko poleg določanja dedljivosti fenotipskih lastnosti primerjali še morfološke, fiziološke in fitnes odzive različnih populacij iz ekoregij (Lowry, 2012).

Najbolj znani so po delu s kloni večih ekotipov *Potentilla glandulosa*, ki so jih presadili na tri eksperimentalne vrtove. Srednje višinski in alpski ekotipi so zrastle najvišje na srednje višinski lokaciji, nižinski ekotipi so zrastle najvišje na nižinski lokaciji. Na lokacijah, najbližje njihovi prvotni nadmorski višini, so srednje višinski in alpski ekotipi imeli več cvetov kot nižinski. Vendar nižinski ekotipi niso na nobeni lokaciji imeli največ cvetov. Nižinskih ekotipov naravno na alpskih lokacijah ni, zato jih je večina med prvo zimo propadlo, tisti preživeli so med prihajajočim poletjem cveteli, plodovi pa niso dozoreli. Tudi srednje višinski ekotipi so na alpskih lokacijah slabo preživeli in plodovi pogosto niso dozoreli. Alpski ekotipi so slabo preživeli na nižinskih lokacijah, v zimi so prešli v dormantno stanje, medtem ko so nižinski ekotipi ostali aktivni. Te razlike med ekotipi kažejo na genske razlike in adaptacijo ekotipov njihovemu naravnemu okolju med populacijami *P. glandulosa*. S preučevanjem rastlinskih odgovorov na okoljske pogoje v nižinskih, na srednje višinskih in alpskih okoljih so tako še dodatno podprli Turessonovo hipotezo, da so genske razlike rezultat naravne selekcije zaradi lokalnega okolja (Manuel in Molles, 2010).

Clausen jih je namesto ekotipe poimenoval ekološke rase. Kot produkt procesov lokalnega prilagajanja in delno reproduktivno izolirane skupine na poti speciacije jih je videl kot glavne elemente evolucije, vendar pa nastanka vrst ni videl kot zaključka procesa speciacije. Menil je, da ekološke rase lahko propadejo na območju simpatričnosti, če niso močne reproduktivne bariere že vzpostavljene (Clausen, 1951). Tako Turesson z uporabo termina ekotip ter Clausen, Keck in Hiesey termina ekološke rase pa so vsi imeli v mislih obstoj geografsko razširjenih skupin znotraj vrst in da so te skupine prekurzorji novih vrst (Lowry, 2012). Če ima ekotip napredne značilnosti, ki omogočajo, da razširi območje razširjanja vrste, lahko privede do nastanka nove vrste in je posledično ena od faz v procesu speciacije (Mathew in George, 2013).

3.2 Uporabnost ekotipov pri obnovi populacij vrst

Pri restavratorskih projektih se postavlja vprašanje, ali bo na novo vzpostavljena populacija preživela in se razmnoževala, ter ali bo obnovljena populacija enaka prvotni, bo vzdrževala naravno genetsko strukturo (McKay in sod., 2005). Zaradi prehajanja med populacijami, prilagojenimi na različna okolja, lahko pride pri obnovi do genske kontaminacije, saj so izolirane populacije rastlinskih vrst najbolj ranljive pri premeščanju na dolge razdalje, gre za potencialno neprimerno prilagojen genski material (McKay in sod., 2005). Osebki lahko izražajo fenotipe, ki niso optimalni za dane lokalne pogoje, kar lahko zmanjša sposobnost preživetja populacije zaradi večjega deleža neprimerno prilagojenih osebkov (McKay in sod., 2005). Na drugi strani pa uspeh invazivnih vrst kaže, da lahko nelokalni genotipi uspevajo in tekmujejo v novih okoljih brez večjih genskih diferenciacij (McKay in sod., 2005).

Da pa bi se čim bolj izognili obnavljanju populacij z nizko gensko raznolikostjo in omejenimi možnostmi prilagoditve podnebno spreminjajočemu se okolju, je priporočljivo upoštevati določena priporočila:

1. Območje zbiranja virov naj bi bilo blizu območja obnove za večjo gotovost genske podobnosti med lokalnimi in nelokalnimi (tujimi) populacijami. Ker pa so genske razlike med populacijami posledica prostorske okoljske heterogenosti, le razdalja med populacijami ni najboljši indikator populacijske genske podobnosti. Ujemati se morajo genski viri tako abiotskih kot biotskih dejavnikov, kot so nadmorska višina, lastnosti tal, podnebni režim, patogeni in predatorji. Te značilnosti niso porazdeljene naključno po celotnem območju vrst, predvsem abiotski dejavniki se pojavljajo v tako imenovanih ekoregijah (Lowry, 2012). Gre za geografska območja s podobno geologijo, podnebjem, vegetacijo, tlemi in hidrologijo. Znotraj njih se lahko rastlinski material prosto prestavlja, pri čemer je le malo možnosti zmanjšanemu lokalnemu prilagajanju in motnjam v genskih vzorcih. Predvsem v regijah z malo topografskimi in klimatskimi raznolikostmi so lahko uporabne za določanje mej prenosa semen.
2. Upoštevati je potrebno izolacijo in s tem potencialno gensko oplojevanje v ožjem sorodstvu, zakar pride do siromašenja genskega fonda (What are plant ecotypes?, 2010). Cone prenosa semen bodo večje za vrste, ki se križajo z osebki iz različnih populacij (nesorodstveno križanje različnih populacij), med katerimi je večji genski pretok.
3. Ko je območje semen omejeno, naj bo zbirka iz dovolj velikega števila posameznih osebkov v izogib pojavu ozkega grla (Hufford in Mazer, 2003).

4. Za dolgoročni uspeh obnove je potrebno zagotoviti tudi zadosten začetni nivo genske diverzitete (pestrosti), ki znotraj populacij predstavlja osnovo za prihodnje adaptacije in zmanjša možnost inbridne (znotraj-vrstno, sorodstveno križanje) depresije ter ta nivo vzdrževati. Znotraj-populacijska genetska diverziteta (pestrost) bo sprva namreč potrebna za vzpostavitev populacije in dalje tudi za dolgoročni evlucijski potencial obnovljene populacije (McKay in sod., 2005). Pri tem je treba upoštevati, da večje populacije nimajo nujno večje genske raznolikosti glede na manjše populacije (Gustafson, 2005).
5. Priporočljivo je določiti razmnoževalni sistem obnovljenih vrst, kar je lahko pomembna determinanta stopnje genskega pretoka (Hufford in Mazer, 2003).
6. Potrebno je paziti, da se ne uvede genotipov s ploidnostjo različno od genotipov avtohtonih populacij (Hufford in Mazer, 2003).

4 MATERIALI IN METODE

4.1 Rastlinski material

Razpolagali smo s tremi ekotipi *A. repens* iz Anglije, Španije in Hrvaške. Prva dva omenjena na Oddelku za biologijo Univerze v Mariboru *ex situ* ohranjamo v stalni *in vitro* zbirki rastlin (Savič 2007, Bašič 2014). V letu 2014 smo pridobili še rastline iz rastišča na Hrvaškem.

Linije angleškega in španskega ekotipa so bile vzgojene iz plodov *A. repens*. Vsako kaleče seme je bila osnova za eno linijo tkivne kulture *A. repens*. Iz semen španskega ekotipa *A. repens*, nabranih na naravnem rastišču na nadmorski višini 680 m v provinci Castellín oktobra 2004, je Savičeva (Savič, 2007) vzgojila kalice in vzpostavila tkivno kulturo. Tkivno kulturo iz semen, pridobljenih iz botaničnega vrta Kew v Londonu, Anglija novembra 2013, je vzpostavila Bašičeva (Bašič, 2014). V letu 2014 sta docentka Jana Ambrožič Dolinšek in strokovna sodelavka Terezija Ciringer iz Fakultete na naravoslovje in matematiko v Mariboru v sodelovanju z Vido Posavec Vukelić in Igorjem Boršičem iz Državnega zavoda za varstvo narave na Hrvaškem nabrali 5 rastlin hrvaškega ekotipa *A. repens* neposredno v naravi na izviru reke Slunjščice. Pridobljen svež rastlinski material je bil osnova za vzpostavitev tkivne kulture.



Slika 5: Hrvaški ekotip *A. repens* na izviru reke Slunjščice (doc. dr. Jana Ambrožič Dolinšek)



Slika 6: Nabrane rastline *A. repens* z izvira reke Slunjščice (doc. dr. Jana Ambrožič Dolinšek)

Na voljo smo imeli 4 linije angleškega ekotipa, 2 liniji španskega ekotipa in 12 linij hrvaškega ekotipa.

4.2 Priprava gojišč za namnoževanje materiala in poskuse

V poskusih smo kot osnovno gojišče uporabili MS medij (Murashige in Skoog, 1962). Vodo, očiščeno z napravo za reverzno osmozo, smo segreli v čaši na kuhalniku. Tik pred vretjem smo dodali agar in saharozo ter med kuhanjem ves čas mešali, da se je MS gojišče zbistrilo in ni bilo sledu agarja. Odpipetirali smo mikro- in makro- elemente ter vitamine, po potrebi dodali 2 μM BAP (sintetični citokinin 6-benzilaminopurin) ali 5 μM BAP (Savič, 2004) in dolili vodo do ustreznega volumna. V poskusih smo uporabili osnovno MS gojišče brez rastnih regulatorjev in MS gojišče z dodanim 2 μM ali z dodanim 5 μM BAP. Pri temperaturi gojišča 55-56 $^{\circ}\text{C}$ smo uravnali pH na 5.7-5.8 z dodajanjem kisline (0.1M HCl) ali baze (0.1M NaOH). Gojišče smo razlili v gojitvene kozarčke in avtoklavirali 15 minut pri temperaturi 121 $^{\circ}\text{C}$ in tlaku 1,2 kg/cm². Količino agarja in saharoze, mikro- in makro- elementov ter BAP smo prilagajali glede na količino gojišča, ki smo ga potrebovali, po spodnji preglednici.

Tabela 1: Priprava osnovnega gojišča MS in gojišča MS z dodatkom 2 μ M ali 5 μ M BAP

Nalij destilirano vodo	500 mL	1000 mL	1200 mL	1500 mL	2000 mL	2500 mL
Označi menisk in odlij 1/3 (v mL)	300 mL	700 mL	800 mL	1000 mL	1500 mL	1700 mL
Agar 8 g/l	4 g	8 g	9,6 g	12 g	16 g	20 g
Saharoza 30 g/l	15 g	30 g	36 g	45 g	60 g	75 g
OR 1	50 mL	100 mL	120 mL	150 mL	200 mL	250 mL
OR 2	5 mL	10 mL	12 mL	15 mL	20 mL	25 mL
OR 3	0,5 mL	1 mL	1,2 mL	1,5 mL	2 mL	2,5 mL
OR 4	5 mL	10 mL	12 mL	15 mL	20 mL	25 mL
OR 5	0,5 mL	1 mL	1,2 mL	1,5 mL	2 mL	2,5 mL
2 μ M BAP	1 mL	2 mL	2,4 mL	3 mL	4 mL	5 mL
5 μ M BAP	2,5 mL	5 mL	6 mL	7,5 mL	10 mL	12,5 mL
Dopolni do meniska	500 mL	1000 mL	1200 mL	1500 mL	2000 mL	2500 mL

4.3 Namnoževanje materiala

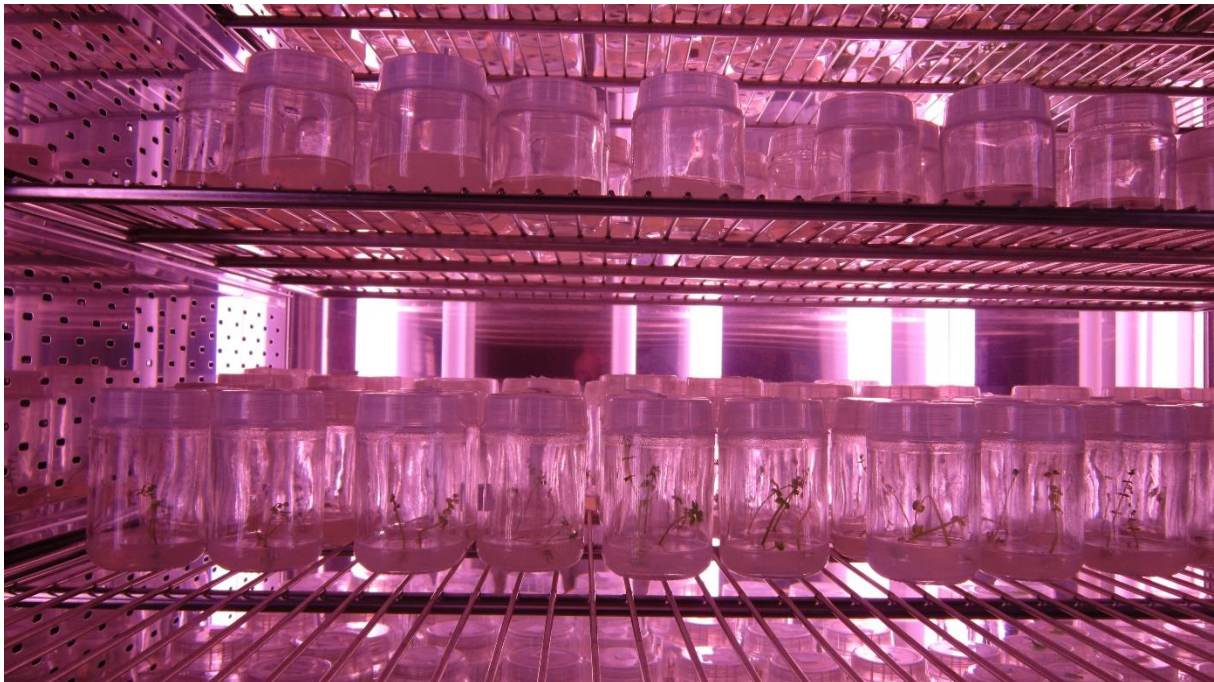
Linije hrvaškega ekotipa so bile v kulturo vnesene zadnje, niso se še prilagodile na pogoje gojišča in razmer v komori, zato je bilo potrebno pred začetkom poskusa linije vseh treh ekotipov prilagoditi na gojenje v tkivni kulturi. Ko se rast novih poganjkov ustali in se več ne spreminja, pravimo, da so rastline habituirane na razmere v kulturi. Razmnoževanje linij vseh treh ekotipov je potekalo aseptično v brezprašni komori na trdnem gojišču MS (Murashige in Skoog, 1962) z dodanim 2 μ M BAP, ki je nekoliko upočasnil razvoj poganjkov. Poganjke na osnovnem brstu ali na stolonih vseh treh ekotipov *A. repens* smo razrezali s skalpelom in jih prestavili na sveža gojišča. Po štirih do petih tednih rasti v rastni komori s fotoperiodo 16 ur in temo 8 ur pri temperaturi 23 °C na svetlobi in 21 °C v temi so se razvili novi poganjki, ki smo

Ramšak, J.: Rast in razvoj treh ekotipov plazeče zelene (*Apium repens* (Jacq.) Lag.) v tkivni kulturi. Magistrsko delo, Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Oddelek za biologijo, 2017.

jih prestavili na sveža gojišča. Celoten postopek razmnoževanja smo ponovili trikrat, da so se predvsem hrvaške linije *A. repens* habituirale na rast v razmerah tkivne kulture.



Slika 7: Brezprašna komora za sterilno delo (laminarij)



Slika 8: Rast poganjkov *A. repens* v rastni komori

4.4 Poskus primerjave rastnih parametrov med ekotipi in zbiranje rezultatov

Skuhali smo osnovno MS gojišče brez rastnih regulatorjev, MS z dodanim 2 μM BAP in MS z dodanim 5 μM BAP. Gojišča smo razlili v kozarčke po približno 30 mL v vsakega in ustrezno označili. V brezprašni komori smo poganjke *A. repens* aseptično cepili v gojitvene kozarčke. Uporabili smo po dve dobro rastoči liniji vsakega ekotipa: liniji 1 in 2 (L1 in L2) angleškega ekotipa, liniji 10 in 11 (L10 in L11) španskega ekotipa, liniji 20 in 21 (L20 in L21) hrvaškega ekotipa. Za posamezno obravnavo (tretma) smo poganjke obeh linij posameznega ekotipa vcepili v 5 kozarčkov po 2 vcepka.

V enotedenskih zamikih smo naslednje štiri tedne opazovali rast in razvoj tkivne kulture ter beležili rastne parametre tako, da smo merili višino poganjkov, določali število stolonov, število brstov, dolžino korenin in ocenjevali število korenin. Število korenin smo ocenjevali z ocenami od 1-5, pri čemer je ocena ena pomenila pojav posameznih korenin, ocena dve je pomenila do dvajset korenin, ocena tri je pomenila še števno število korenin, ocena štiri je pomenila skoraj nepregleden koreninski sistem, ocena pet je pomenila nepregleden, zaraščen koreninski sistem.



Slika 9: Tkivne kulture hrvaškega, španskega in angleškega ekotipa *A. repens* v gojitvenih kozarčkih

Po koncu poskusa smo poganjkom iz treh kozarčkov pri vsakem posameznem ekotipu na dveh lističih pri obeh dveh poganjkih znotraj enega kozarčka s fluorometrom (Handy PEA,

Hansatech, Kings Lynn, UK) izmerili potencialno fotokemično učinkovitost (razmerje F_v/F_m), ki nam pove, kako dobro rastlina izkoristi dano svetlobo.

$$F_v/F_m = F_m - F_0/F_m$$

F_0 in F_m : minimalna in maksimalna fluorescenca temotno adaptiranega vzorca

F_v : variabilna fluorescenca, razlika med F_m in F_0

Pred merjenjem smo na lističe pritrdili ščipalke za temotno adaptacijo. Po 10 minutah adaptacije, ki zadošča za oksidacijo prejemnikov elektronov FS II, smo list osvetlili s saturacijskim pulzom bele svetlobe ($8000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 0.8 s). Na aparatu smo odčitali vrednost potencialne fotokemične učinkovitosti, ki je sorazmerna potencialni neto fotosintezi.

Vrednost F_v/F_m pri vitalnih rastlinah, ki rastejo v ugodnih razmerah, dosega optimalne vrednosti okoli 0,8 do 0,85. Zmanjšanje vrednosti F_v/F_m lista, ki je bil zatemnjen, je dober pokazatelj stresa pri rastlinah in motenega fotokemičnega procesa (Trošt Sedej, 2005).

Naredili smo osnovni poskus in eno ponovitev. Rezultati obeh serij so bili primerljivi, zato smo grafično prikazali le rezultate ene ponovitve poskusa.

4.5 Poskus vpliva potopitve *A.repens* in zbiranje podatkov

Za poskus vpliva potopitve smo prav tako uporabili po dve dobro rastoči liniji vsakega ekotipa (L1 in L2 angleškega ekotipa, L10 in L11 španskega ekotipa, L20 in L21 hrvaškega ekotipa). Tokrat smo vcepljali le na osnovno gojišče MS brez dodanega rastnega regulatorja BAP. Skuhali smo osnovno MS gojišče in ga razlili v kozarčke po točno 20 mL. V brezprašni komori smo aseptično cepili poganjke. Pri vsakem ekotipu za vsako linijo smo vcepili v 24 kozarčkov po dva poganjka. Pri vsakem posameznem ekotipu smo število kozarčkov razdelili na dvojice in označili, katere bomo po treh tednih zalili z avtoklavirano vodo. Po treh tednih rasti na osnovnem MS gojišču v tkivni kulturi smo poganjkom izmerili višino poganjkov, določili število stolonov, število brstov, dolžino korenin in ocenili število korenin. Število korenin smo ocenjevali z ocenami od 1-5, pri čemer je ocena ena pomenila pojav posameznih korenin, ocena dve je pomenila do dvajset korenin, ocena tri je pomenila še števno število korenin, ocena štiri je pomenila skoraj nepregleden koreninski sistem, ocena pet je pomenila nepregleden, zaraščen koreninski sistem.

V nadaljevanju poskusa smo kulturo *A. repens* zalili z avtoklavirano vodo in ugotavljali, kako potopitev vpliva na rast in razvoj rastlin v tkivni kulturi. V laminariju smo polovico kozarčkov zalili z 20 mL avtoklavirane vode. Nadaljnja dva tedna smo beležili rastne parametre, tako da smo merili višino poganjkov, določali število stolonov, število brstov, dolžino korenin in ocenjevali število korenin. Ob koncu smo pri vsaki liniji poganjkom iz dveh kozarčkov izmerili potencialno fotokemično učinkovitost (razmerje F_v/F_m).

Pri ponovitvi poskusa smo uporabili večje kozarce zaradi lažjega opazovanja in štetja, merjenja. Polovico kozarčkov smo zalili z enako količino avtoklavirane vode, kot je bilo gojišča, in sicer že po dveh tednih rasti v rastni komori. Rezultati so bili primerljivi, zato smo grafično prikazali le rezultate osnovnega poskusa.

Med poskusi je občasno prihajalo do okužb ali sušenja rastlinskega materiala. Okužb in posušenih poganjkov pri obdelavi rezultatov nismo upoštevali. Do okužb je najbrž prišlo zaradi slabe aseptične tehnike. Poganjki so se posušili, če smo pri vcepljanju poškodovali meristem ali uporabljali prevročo pinceto ali skalpel.

4.6 Obdelava podatkov

Rezultati obeh serij sta bili primerljivi, zato smo prikazali statistično obdelane rezultate le ene ponovitve poskusa.

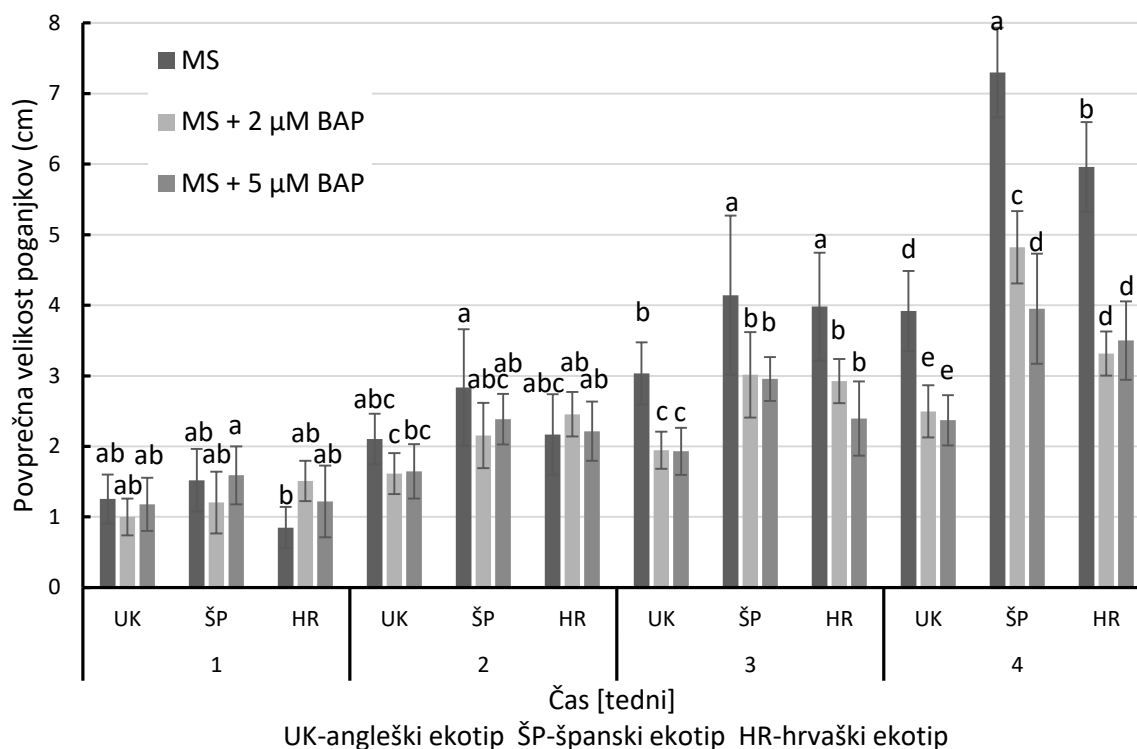
Zbrane podatke smo računalniško obdelali s statističnim programom SPSS® 24.0 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Zaradi nenormalne porazdelitve proučevanih številskih spremenljivk in neenakosti varianc smo za izračun statistično značilne razlike med spremenljivkami uporabili neparametrični Kruskal-Wallis test in posamezne spremenljivke primerjali med seboj z Dunn-Bonferroni post hoc testom. Pri grafičnem prikazovanju rezultatov meritev posameznih obravnav smo prikazali povprečne vrednosti, odstopanja pa kot standardno odstopanje ($\pm SD$). Med seboj smo primerjali posamezne ekotipe in različne obravnave (tretmaje). Vrednosti, označene z enakimi črkami, se statistično značilno niso razlikovale med seboj.

5 REZULTATI

5.1 PRIMERJAVA RASTNIH PARAMETROV RAZLIČNIH EKOTIPOV, GOJENIH NA GOJIŠČIH Z ALI BREZ RASTNIH REGULATORJEV

V enotedenskih zamikih smo štiri tedne opazovali rast in razvoj tkivne kulture različnih ekotipov *A. repens* na osnovnem MS gojišču brez rastnih regulatorjev, na MS gojišču z dodanim 2 μ M BAP in na MS gojišču z dodanim 5 μ M BAP ter spremljali rastne parametre tako, da smo merili višino poganjkov, določali število stolonov, število brstov, dolžino korenin in ocenjevali število korenin.

5.1.1 Velikost poganjkov različnih ekotipov, gojenih na gojiščih z ali brez rastnih regulatorjev



Slika 10: Velikost poganjkov različnih ekotipov *A. repens*, pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na MS gojiščih brez in z rastnimi regulatorji (2 μ M BAP, 5 μ M BAP). Prikazane so povprečne velikosti poganjkov s standardno deviacijo (\pm SD) v tedenskih intervalih tekom štirih tednov kulture. Vrednosti, označene z enakimi črkami, se statistično značilno ne razlikujejo med seboj (KW-test: $p \leq 0,05$; $N = 11-20$). Podatki so statistično primerjani med seboj po posameznem tednu.

Po prvem tednu rasti v tkivni kulturi se poganjki po velikosti niso statistično značilno razlikovali med seboj, ne na različnih gojiščih znotraj posameznega ekotipa, kot ne pri različnih ekotipih na posameznem gojišču (Slika 10).

Tudi po drugem tednu se poganjki po velikosti niso statistično značilno razlikovali med seboj. Izjema so bili poganjki angleškega ekotipa na gojišču z 2 μM BAP, ki so bili statistično značilno manjši od hrvaških poganjkov.

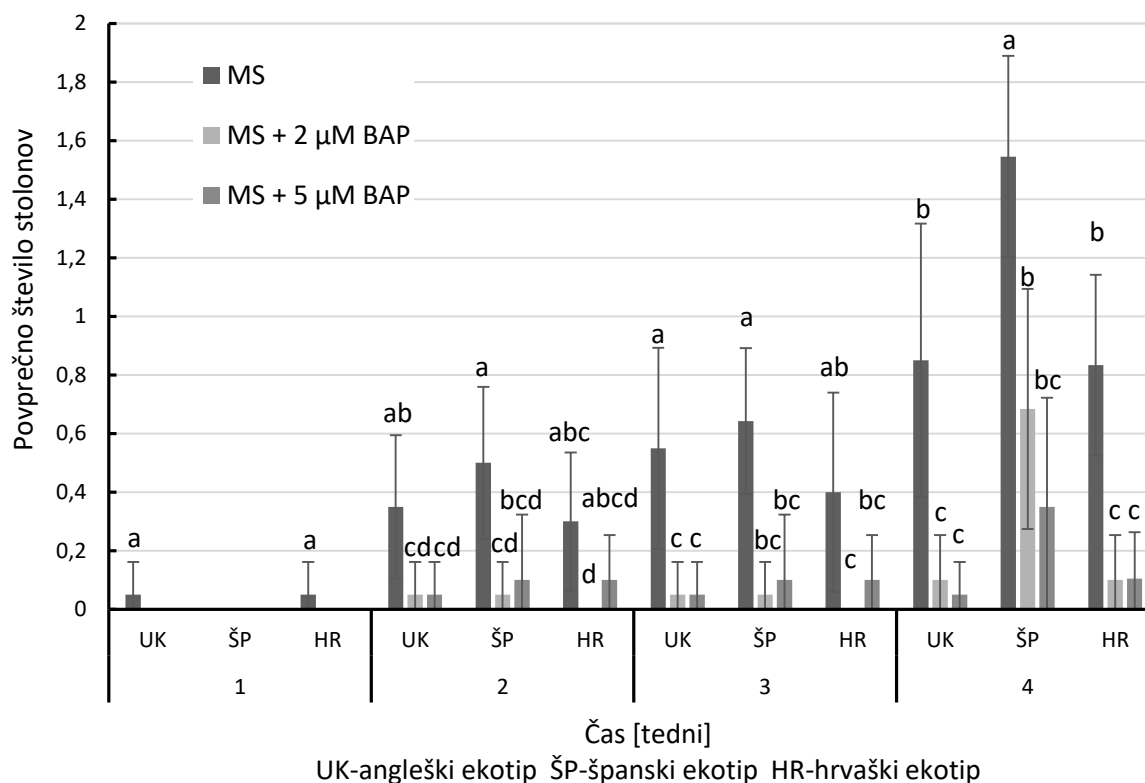
Po treh tednih so razlike v velikosti poganjkov postale očitnejše in statistično značilne. Znotraj vseh treh posameznih ekotipov so bili poganjki na osnovnem MS gojišču brez rastnih regulatorjev statistično značilno večji v primerjavi s poganjki na gojišču z 2 μM BAP in s 5 μM BAP. Ko smo primerjali posamezne ekotipe med seboj, so bili poganjki angleškega ekotipa na gojišču z 2 μM BAP in s 5 μM BAP statistično značilno manjši kot poganjki španskega in hrvaškega ekotipa.

Po štirih tednih so bili poganjki vseh treh ekotipov na osnovnem MS gojišču brez rastnih regulatorjev statistično značilno največji, pri čemer so se hkrati statistično značilno razlikovali med seboj. Največji so zrastle poganjki španskega ekotipa s povprečno višino 7,3 cm, zaostajali so poganjki hrvaškega ekotipa s povprečno višino 6 cm, statistično značilno najmanjši od obeh omenjenih so zrastle poganjki angleškega ekotipa s povprečno višino 3,9 cm.

Velikost poganjkov znotraj posameznega ekotipa na gojišču z 2 μM BAP in s 5 μM BAP je bila pri vseh treh ekotipih manjša. Pri angleškem in španskem ekotipu je bila rast v višino na gojišču z 2 μM BAP malenkost boljša, kot na gojišču s 5 μM BAP, pri hrvaškem obratno. Statistično značilna razlika pri rasti na gojišču z 2 μM BAP in s 5 μM BAP se je pokazala samo pri španskih poganjkih.

Na gojišču z 2 μM BAP so zrastle največji poganjki španskega ekotipa, najmanjši pa angleškega ekotipa, tako je bilo tudi z višino poganjkov na gojišču s 5 μM BAP. Statistično značilnih razlik pri rasti v višino nismo opazili samo na gojišču s 5 μM BAP, in sicer med španskim in hrvaškim ekotipom.

5.1.2 Število stolonov različnih ekotipov, gojenih na gojiščih z ali brez rastnih regulatorjev



Slika 11: Število stolonov različnih ekotipov *A. repens*, pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na MS gojiščih brez in z rastnimi regulatorji (2 μM BAP, 5 μM BAP). Prikazane so povprečne vrednosti števila stolonov s standardno deviacijo (\pm SD) v tedenskih intervalih tekom štirih tednov kulture. Vrednosti, označene z enakimi črkami, se statistično značilno ne razlikujejo med seboj (KW-test: $p \leq 0,05$; $N = 11-20$). Podatki so statistično primerjani med seboj po posameznem tednu.

Po prvem tednu rasti v tkivni kulturi se število stolonov ni statistično značilno razlikovalo med seboj, ne na različnih gojiščih znotraj posameznega ekotipa, kot ne pri različnih ekotipih na posameznem gojišču (Slika 11).

Po drugem tednu v številu stolonov ni bilo statistično značilnih razlik pri različnih ekotipih na posameznem gojišču, so se pa že pojavile na različnih gojiščih znotraj posameznega ekotipa. Pri angleškem in španskem ekotipu je bilo na osnovnem MS gojišču število stolonov statistično značilno večje, kot na gojišču z 2 μM BAP in s 5 μM BAP, pri hrvaškem je bilo statistično značilno večje le v primerjavi z gojiščem z 2 μM BAP.

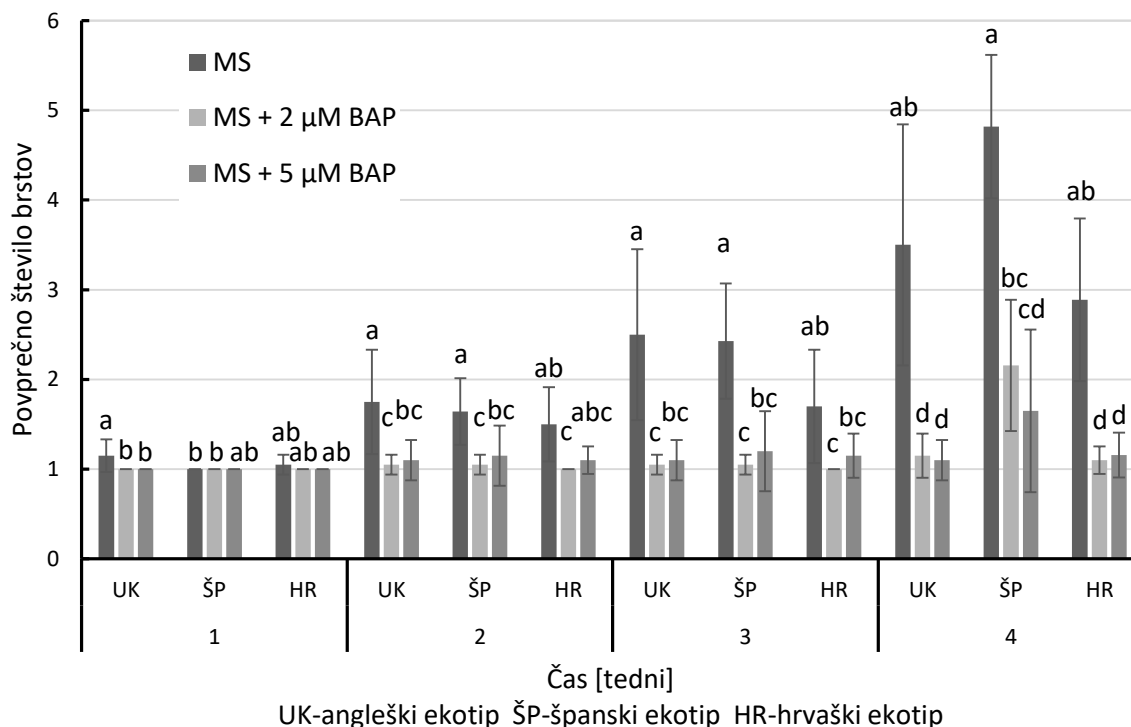
Po tretjem tednu se situacija od drugega tedna ni spremenila, statistično značilne razlike so se le povečale.

Po četrtem tednu se je pri vseh treh ekotipih na osnovnem MS gojišču brez rastnih regulatorjev razvilo statistično značilno največ stolonov, pri čemer se jih je pri angleškem in hrvaškem ekotipu statistično značilno manj, kot pri španskem. Največ, povprečno 1,55 stolona, se je razvilo pri španskem ekotipu, najmanj pri hrvaškem s povprečno 0,83 stolona, in je tako le malo zaostajal za angleškim ekotipom s povprečno 0,85 razvitega stolona.

Število stolonov znotraj posameznega ekotipa na gojišču z 2 μ M BAP in s 5 μ M BAP je bilo pri vseh treh ekotipih statistično značilno manjše. Razlika med povprečnim številom stolonov na gojišču z 2 μ M BAP in s 5 μ M BAP je bila pri angleškem in hrvaškem ekotipu minimalna, pri španskem večja, pri nobenem od teh pa statistično značilna.

Na gojišču z 2 μ M BAP se je največ stolonov razvilo pri španskem ekotipu, pri angleškem in hrvaškem statistično značilno manj, pri slednjih dveh se je razvilo povprečno enako število stolonov. Tudi na gojišču s 5 μ M BAP se je največ stolonov razvilo pri španskem ekotipu, kar pa se ni statistično značilno razlikovalo od števila stolonov pri hrvaškem in angleškem ekotipu.

5.1.3 Število brstov različnih ekotipov, gojenih na gojiščih z ali brez rastnih regulatorjev



Slika 12: Število brstov različnih ekotipov *A. repens*, pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na MS gojiščih brez in z rastnimi regulatorji (2 μ M BAP, 5 μ M BAP). Prikazane so povprečne vrednosti števila brstov s standardno deviacijo (\pm SD) v tedenskih intervalih tekom štirih tednov kulture. Vrednosti,

označene z enakimi črkami, se statistično značilno ne razlikujejo med seboj (KW-test: $p \leq 0,05$; $N = 11-20$). Podatki so statistično primerjani med seboj po posameznem tednu.

Po prvem tednu rasti v tkivni kulturi so že bile minimalne statistično značilne razlike v številu brstov tako na različnih gojiščih znotraj posameznega ekotipa, kot pri različnih ekotipih na posameznem gojišču (Slika 12). Pri angleškem ekotipu je bilo število brstov na osnovnem MS gojišču brez rastnih regulatorjev statistično značilno večje, kot na gojišču z 2 μM BAP in s 5 μM BAP, prav tako je bilo statistično značilno večje od števila brstov na osnovnem MS gojišču pri španskem ekotipu.

Po drugem tednu je bilo znotraj angleškega in španskega ekotipa število brstov na osnovnem MS gojišču statistično značilno večje, kot na gojišču z 2 μM BAP in s 5 μM BAP, pri hrvaškem je bilo statistično značilno večje le od števila brstov na gojišču z 2 μM BAP.

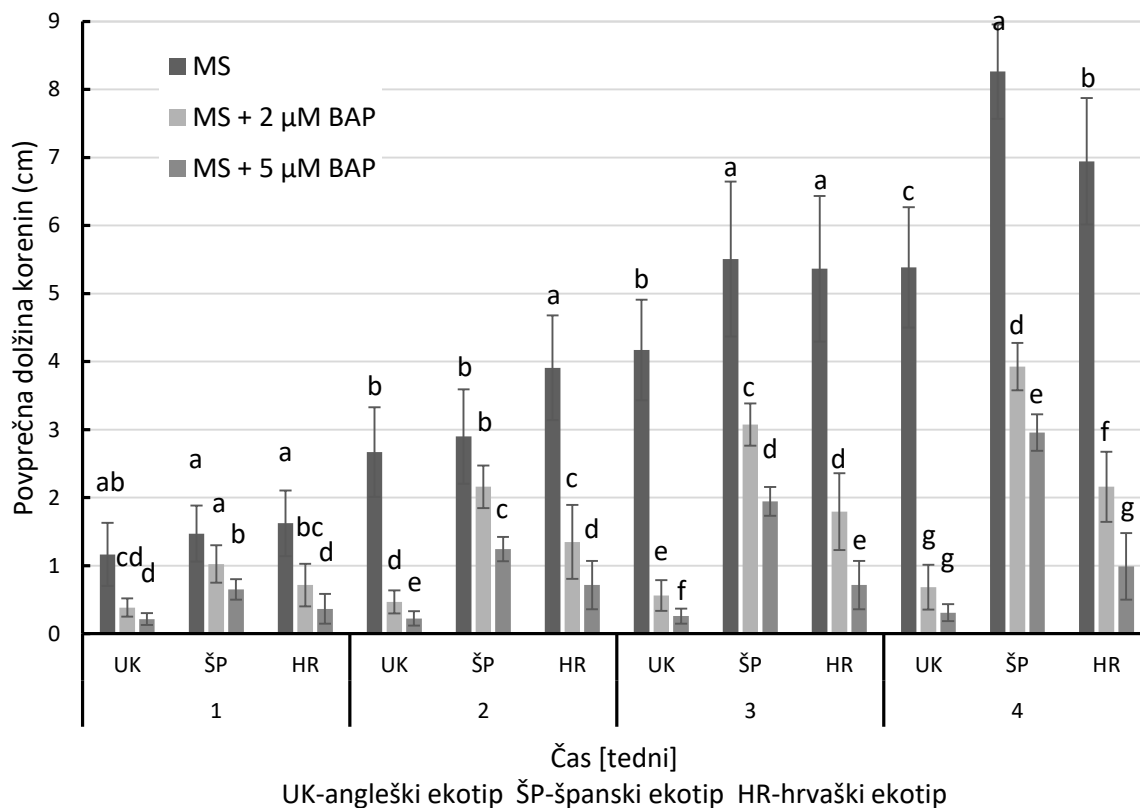
Po tretjem tednu je bilo tudi pri hrvaškem ekotipu število brstov na osnovnem MS gojišču statistično značilno večje, kot na gojišču s 5 μM BAP.

Po četrtem tednu se je pri vseh treh ekotipih na osnovnem MS gojišču brez rastnih regulatorjev razvilo statistično značilno največ brstov, med njimi pa statistično značilne razlike ni bilo. Največ se jih je razvilo pri španskem ekotipu, povprečno 4,8, zaostajala sta angleški ekotip s povprečno 3,5 stoloni in hrvaški z najmanj, povprečno 2,9 stolonoma.

Število brstov znotraj posameznega ekotipa na gojišču z 2 μM BAP in s 5 μM BAP je bilo pri vseh treh ekotipih statistično značilno manjše. Pri angleškem in španskem ekotipu je bilo na gojišču z 2 μM BAP število brstov večje, kot na gojišču s 5 μM BAP, pri hrvaškem obratno, pri nobenem pa razlika ni bila statistično značilna.

Na gojišču z 2 μM BAP se je največ brstov razvilo pri španskem ekotipu, pri angleškem in hrvaškem statistično značilno manj. Tudi na gojišču s 5 μM BAP se je največ brstov razvilo pri španskem ekotipu, kar pa se ni statistično značilno razlikovalo od števila brstov pri hrvaškem ekotipu in angleškem, kjer se jih je razvilo najmanj.

5.1.4 Dolžina korenin različnih ekotipov, gojenih na gojiščih z ali brez rastnih regulatorjev



Slika 13: Dolžina korenin različnih ekotipov *A. repens*, pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na MS gojiščih brez in z rastnimi regulatorji (2 μM BAP, 5 μM BAP). Prikazane so povprečne vrednosti dolžine korenin s standardno deviacijo (\pm SD) v tedenskih intervalih tekom štirih tednov kulture. Vrednosti, označene z enakimi črkami, se statistično značilno ne razlikujejo med seboj (KW-test: $p \leq 0,05$; $N = 11-20$). Podatki so statistično primerjani med seboj po posameznem tednu.

Po prvem tednu rasti v tkivni kulturi so že bile statistično značilne razlike v dolžini korenin tako na različnih gojiščih znotraj posameznega ekotipa, kot pri različnih ekotipih na posameznem gojišču (Slika 13). Znotraj posameznega ekotipa so bile pri angleškem in hrvaškem ekotipu korenine na osnovnem MS gojišču statistično značilno daljše, kot na gojišču z 2 μM BAP in s 5 μM BAP, pri španskem le v primerjavi z gojiščem s 5 μM BAP.

Na gojišču z 2 μM BAP so bile pri španskem ekotipu korenine statistično značilno daljše, kot pri angleškem in hrvaškem, prav tako na gojišču s 5 μM BAP.

Po drugem tednu je bila situacija znotraj posameznega ekotipa enaka, kot po prvem tednu. Pri različnih ekotipih na posameznem gojišču pa ni bilo statistično značilne razlike v dolžini korenin le pri angleškem in španskem ekotipu na osnovnem MS gojišču.

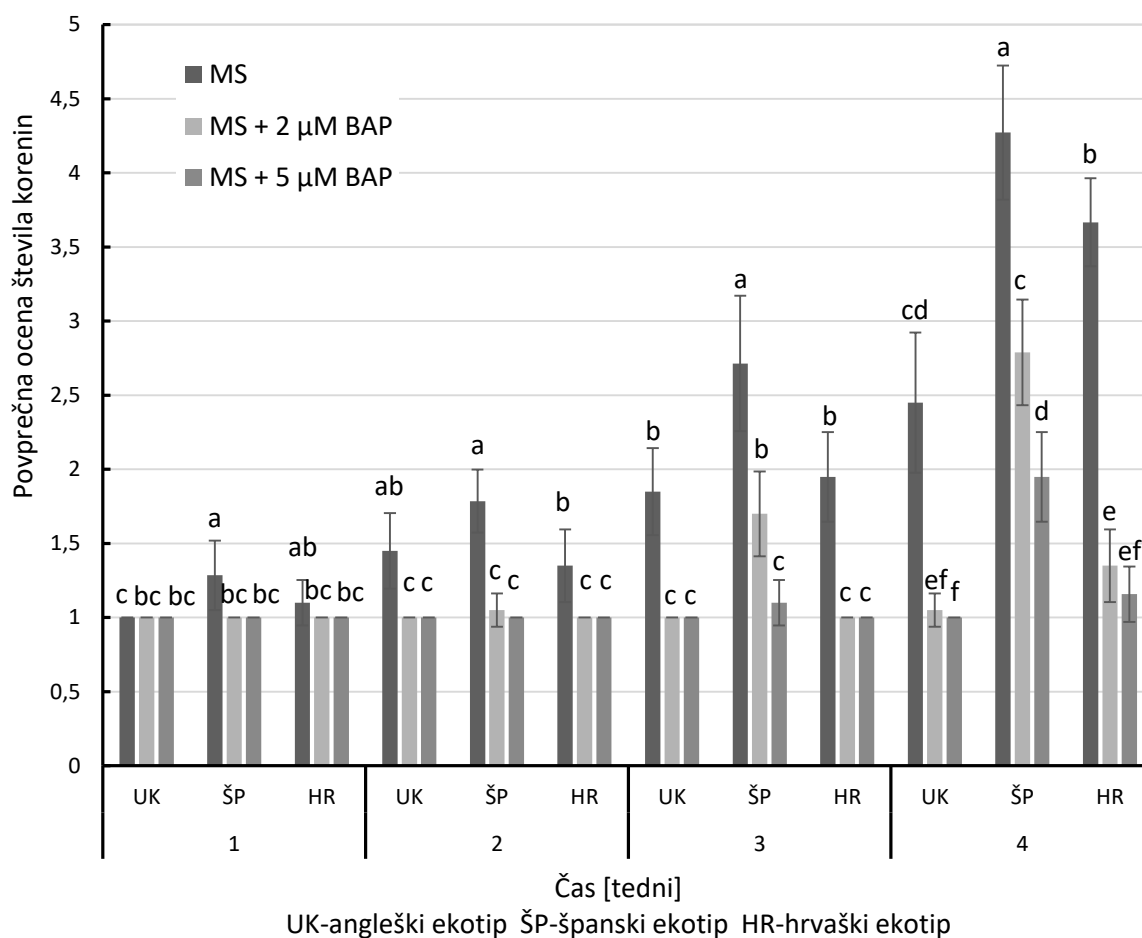
Po tretjem tednu je bila znotraj posameznega ekotipa med vsemi tremi gojišči v dolžini korenin statistično značilna razlika. Pri različnih ekotipih na posameznem gojišču pa ni bilo statistično značilne razlike v dolžini korenin le med španskim in hrvaškim ekotipom na osnovnem MS gojišču.

Po četrtem tednu so bile korenine vseh treh ekotipov na osnovnem MS gojišču brez rastnih regulatorjev statistično značilno najdaljše, pri čemer so se hkrati statistično značilno razlikovale med seboj. Najdaljše korenine smo izmerili pri španskem ekotipu s povprečno dolžino 8,3 cm, krajše pri hrvaškem s povprečno dolžino 6,9 cm, statistično značilno najkrajše pri angleškem s povprečno dolžino 5,4 cm.

Rast korenin znotraj posameznega ekotipa na gojišču z 2 μM BAP in s 5 μM BAP je bila pri vseh treh ekotipih počasnejša. Pri vseh treh ekotipih so bile korenine na gojišču z 2 μM BAP daljše, kot na gojišču s 5 μM BAP. Statistično značilna razlika v dolžini korenin na gojišču z 2 μM BAP in s 5 μM BAP se je pokazala pri španskem in hrvaškem ekotipu.

Na gojišču z 2 μM BAP so zrastle najdaljše korenine španskega ekotipa, najkrajše angleškega ekotipa, tako je bilo tudi z dolžino korenin na gojišču s 5 μM BAP. Statistično značilnih razlik v dolžini korenin nismo opazili samo na gojišču s 5 μM BAP, in sicer med angleškim in hrvaškim ekotipom.

5.1.5 Ocena števila korenin različnih ekotipov, gojenih na gojiščih z ali brez rastnih regulatorjev



Slika 14: Ocena števila korenin različnih ekotipov *A. repens*, pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na MS gojiščih brez in z rastnimi regulatorji (2 μM BAP, 5 μM BAP). Prikazane so povprečne vrednosti ocene števila korenin s standardno deviacijo (±SD) v tedenskih intervalih tekom štirih tednov kulture. Vrednosti, označene z enakimi črkami, se statistično značilno ne razlikujejo med seboj (KW-test: $p \leq 0,05$; $N = 11-20$). Podatki so statistično primerjani med seboj po posameznem tednu.

Po prvem tednu rasti v tkivni kulturi so že bile statistično značilne razlike v številu korenin tako na različnih gojiščih znotraj posameznega ekotipa, kot pri različnih ekotipih na posameznem gojišču (Slika 14). Znotraj posameznega ekotipa so bile pri španskem ekotipu korenine na osnovnem MS gojišču statistično značilno številnejše, kot na gojišču z 2 μM BAP in s 5 μM BAP. Pri španskem in hrvaškem ekotipu so bile korenine na osnovnem MS gojišču statistično značilno številnejše, kot pri angleškem ekotipu.

Po drugem tednu so bile znotraj vseh treh ekotipov na osnovnem MS gojišču korenine statistično značilno številnejše, kot na gojišču z 2 μM BAP in s 5 μM BAP. Pri španskem

ekotipu so bile korenine na osnovnem MS gojišču statistično značilno številnejše, kot pri hrvaškem ekotipu.

Po tretjem tednu so bile znotraj vseh treh ekotipov na osnovnem MS gojišču statistično značilno številnejše korenine, kot na gojišču z 2 μM BAP in s 5 μM BAP, pri španskem ekotipu se je pokazala statistično značilna razlika tudi med številnostjo korenin na gojišču z 2 μM BAP in s 5 μM BAP. Pri španskem ekotipu so se na osnovnem MS gojišču razvile statistično številnejše korenine, kot pri angleškem in hrvaškem, prav tako na gojišču z 2 μM BAP.

Po četrtem tednu so bile korenine pri vseh treh ekotipih na osnovnem MS gojišču brez rastnih regulatorjev statistično značilno najštevilnejše, pri čemer so se hkrati statistično značilno razlikovale med seboj. Najštevilnejše korenine smo ocenili pri španskem ekotipu z oceno 4,3, zaostajale so korenine hrvaškega ekotipa z oceno 3,7, najredkejše so bile pri angleškem z oceno 2,5.

Številnost korenin znotraj posameznega ekotipa na gojišču z 2 μM BAP in s 5 μM BAP je bila pri vseh treh ekotipih manjša in sicer na gojiščih z 2 μM BAP večja, kot na gojiščih s 5 μM BAP. Statistično značilna razlika med oceno števila korenin na gojišču z 2 μM BAP in s 5 μM BAP se je pokazala le pri španskem ekotipu.

Na gojišču z 2 μM BAP so se razvile statistično značilno najštevilnejše korenine španskega ekotipa, najredkejše korenine angleškega ekotipa, tako je bilo tudi s številom korenin na gojišču s 5 μM BAP. Na gojišču z 2 μM BAP in prav tako s 5 μM BAP ni bilo statistično značilne razlike med angleškim in hrvaškim ekotipom.

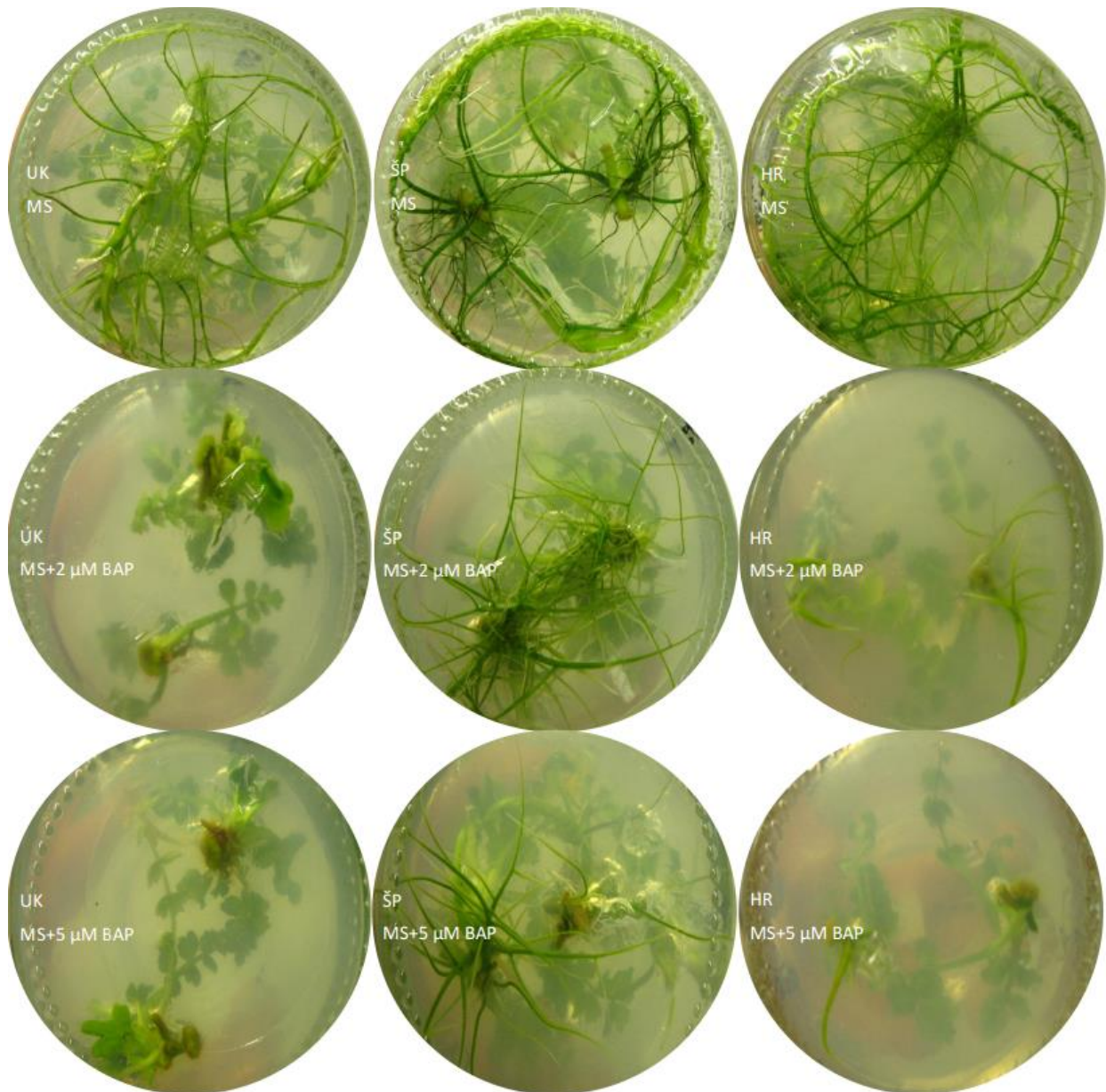
Opazili smo, da so gojišča vplivala na odebeljenost stolonov in brstov ter na velikost listnih ploskev, pa tudi na prisotnost/odsotnost glavnih in stranskih korenin ter njihovo odebeljenost (Slika 15).



Slika 15: Poganjki različnih ekotipov *A. repens*, pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na MS gojiščih brez in z rastnimi regulatorji (2 μ M BAP, 5 μ M BAP) po štirih tednih kulture.

Na osnovnem MS gojišču je imel španski ekotip odebeljene tako stolone kot brste, angleški in hrvaški ekotip je imel brste tanjše od stolonov. Na gojišču z dodanim 2 μ M BAP je imel španski ekotip manj odebeljeni stolone in brste, kot na osnovnem MS gojišču, bolj odebeljene pa v primerjavi z angleškim in hrvaškim ekotipom na gojišču z dodanim 2 μ M BAP. Enako je bilo na gojišču z dodanim 5 μ M BAP.

Na osnovnem MS gojišču je španski ekotip razvil zelo velike listne ploskve, angleški in hrvaški dosti manjše, sicer hrvaški večje, kot angleški. Na gojišču z dodanim 2 μ M BAP je imel španski ekotip manjše listne ploskve, kot na osnovnem MS gojišču, večje pa v primerjavi z angleškim in hrvaškim ekotipom na gojišču z dodanim 2 μ M BAP. Enako je bilo pri rasti na gojišču z dodanim 5 μ M BAP.



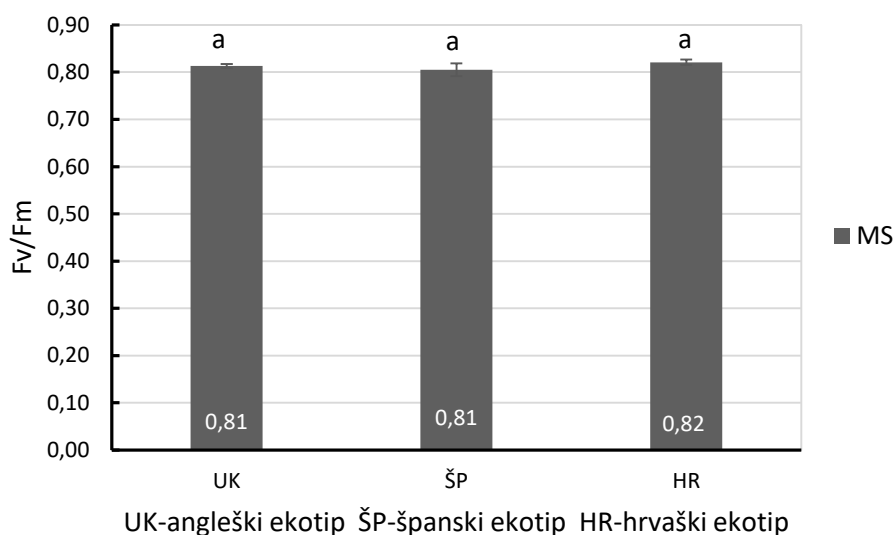
Slika 16: Koreninski sistem različnih ekotipov *A. repens*, pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na MS gojiščih brez in z rastnimi regulatorji (2 µM BAP, 5 µM BAP) po štirih tednih kulture.

Na osnovnem MS gojišču so vsi trije ekotipi *A. repens* tvorili odebeljene glavne korenine in veliko tankih stranskih korenin, teh je bilo še najmanj pri angleškem ekotipu. Na gojišču z dodanim 2 µM BAP je imel španski ekotip odebeljene glavne in stranske korenine, bilo jih je manj, kot na osnovnem MS gojišču (Slika 16). Hrvaški ekotip je tvoril odebeljene glavne korenine, odebelenih stranskih je bilo zelo malo, pri angleškem ekotipu skoraj ni bilo opaziti niti glavnih korenin. Na gojišču z dodanim 5 µM BAP je imel španski ekotip odebeljene glavne korenine in zelo malo odebelenih stranskih korenin, hrvaški ekotip je imel zelo malo odebelenih glavnih korenin, pri angleškem skoraj ni bilo opaziti niti glavnih korenin.

5.2 FIZIOLOŠKI PARAMETRI

5.2.1 FOTOKEMIČNA UČINKOVITOST

Po štirih tednih rasti in razvoja tkivne kulture različnih ekotipov *A. repens* smo izmerili potencialno fotokemično učinkovitost posameznega ekotipa na osnovnem MS gojišču.



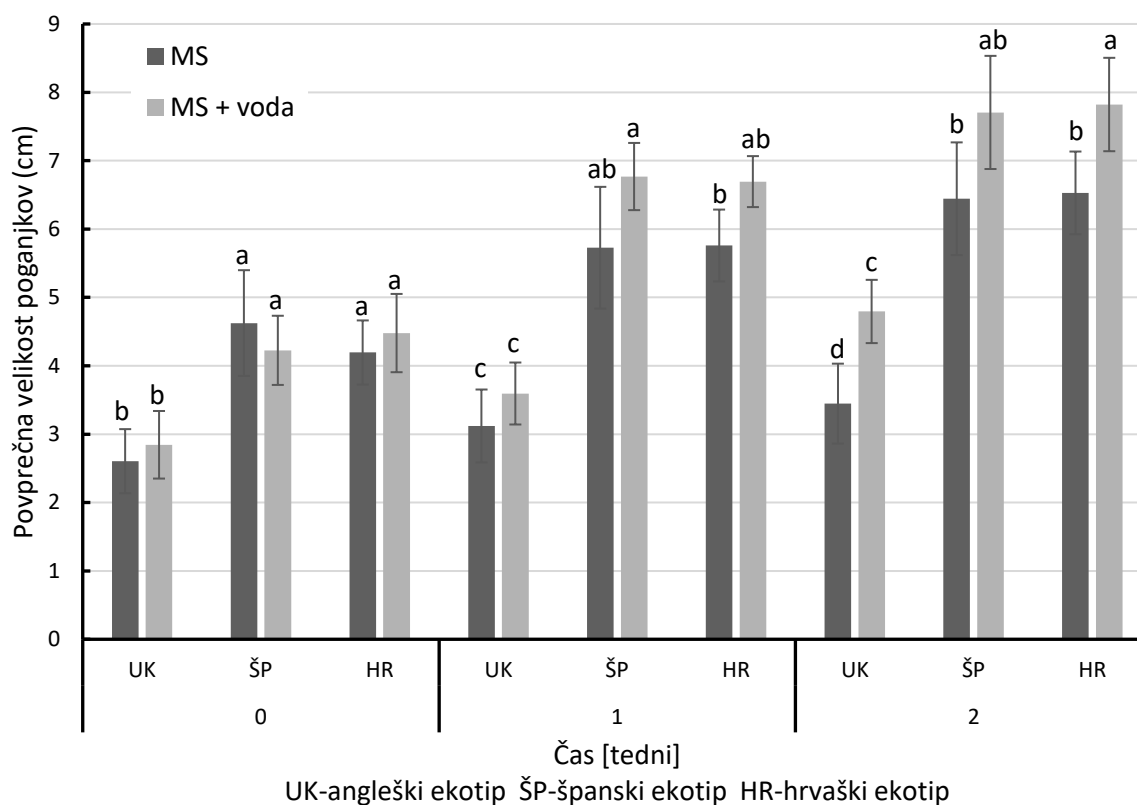
Slika 17: Potencialna fotokemična učinkovitost (Fv/Fm) različnih ekotipov *A. repens*, pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na osnovnem MS gojišču. Prikazane so povprečne vrednosti potencialne fotokemične učinkovitosti s standardno deviacijo (\pm SD) po štirih tednih kulture. Vrednosti, označene z enakimi črkami, se statistično značilno ne razlikujejo med seboj (KW-test: $p \leq 0,05$; $N = 8-12$).

Povprečne vrednosti potencialne fotokemične učinkovitosti se med vsemi tremi ekotipi niso statistično značilno razlikovale. Pri angleškem in španskem ekotipu je povprečna vrednost potencialne fotokemične učinkovitosti znašala 0,81, pri hrvaškem 0,82.

5.3 PRIMERJAVA RASTNIH PARAMETROV RAZLIČNIH EKOTIPOV, GOJENIH NA OSNOVNEM MS GOJIŠČU BREZ IN Z ZALITJEM Z VODO

Po treh tednih rasti na osnovnem MS gojišču v tkivni kulturi smo poganjkom izmerili višino, število stolonov, število brstov, dolžino in ocenili število korenin. Polovico gojišč smo zalili z enako količino avtoklavirane vode, kot je bilo osnovnega MS gojišča, ter še dva tedna spremljali in beležili rastne parametre.

5.3.1 Velikost poganjkov različnih ekotipov, gojenih na osnovnem MS gojišču brez in z zalitjem z vodo



Slika 18: Velikost poganjkov različnih ekotipov *A. repens*, pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na MS gojišču brez (MS) in z zalitjem z vodo (MS + voda). Prikazane so povprečne velikosti poganjkov s standardno deviacijo (\pm SD). Meritve smo izvedli tik pred zalitjem in v tedenskih intervalih tekom dveh tednov po zalitju kulture. Vrednosti, označene z enakimi črkami, se statistično značilno ne razlikujejo med seboj (KW-test: $p \leq 0,05$; $N = 16-20$). Podatki so statistično primerjani med seboj po posameznem tednu.

V začetnem stanju se velikost poganjkov na nezalitem in zalitem gojišču znotraj posameznega ekotipa ni statistično značilno razlikovala med seboj. Poganjki angleškega ekotipa pa so bili

tako na nezalitem kot zalitem gojišču statistično značilno manjši od poganjkov španskega in hrvaškega ekotipa (Slika 18).

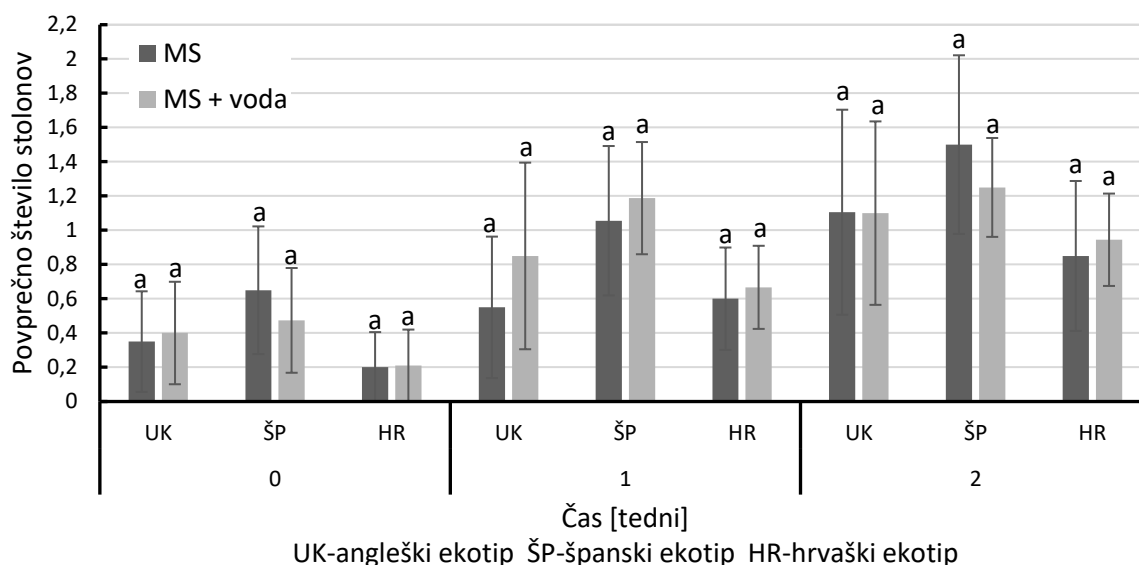
Po prvem tednu rasti se začetno stanje ni spremenilo.

Po dveh tednih so razlike v velikosti poganjkov postale statistično značilne. Pri vseh treh ekotipih so se na zalitem gojišču razvili večji poganjki, pri čemer med španskim in hrvaškim ni bilo statistično značilne razlike. Največji so zrastle poganjki hrvaškega ekotipa s povprečno višino 7,8 cm, le malo so zaostajali poganjki španskega ekotipa s povprečno višino 7,7 cm, statistično značilno najmanjši ob obeh omenjenih so zrastle poganjki angleškega ekotipa s povprečno višino 4,8 cm.

Velikost poganjkov znotraj posameznega ekotipa na nezalitem gojišču je bila pri vseh treh ekotipih manjša. Največji so zrastle poganjki hrvaškega ekotipa s povprečno višino 6,5 cm, le malo so zaostajali poganjki španskega ekotipa s povprečno višino 6,4 cm, statistično značilno najmanjši ob obeh omenjenih so zrastle poganjki angleškega ekotipa s povprečno višino 3,4 cm.

Razlika v velikosti poganjkov na nezalitem in zalitem gojišču je znašala največ pri angleškem ekotipu, 1,36 cm, pri hrvaškem 1,29 cm in pri španskem najmanj, 1,27 cm; statistično značilna je bila pri angleškem in hrvaškem ekotipu.

5.3.2 Število stolonov različnih ekotipov, gojenih na osnovnem MS gojišču brez in z zalitjem z vodo



Slika 19: Število stolonov različnih ekotipov *A. repens*, pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na MS gojišču brez (MS) in z zalitjem z vodo (MS + voda). Prikazane so povprečne velikosti poganjkov s standardno deviacijo (\pm SD). Meritve smo izvedli tik pred zalitjem in v tedenskih intervalih tekom dveh tednov po zalitju kulture. Prikazane so povprečne vrednosti števila stolonov s standardno deviacijo (\pm SD) v tedenskih intervalih tekom dveh tednov po zalitju kulture. Vrednosti, označene z enakimi črkami, se statistično značilno ne razlikujejo med seboj (KW-test: $p \leq 0,05$; $N = 16-20$). Podatki so statistično primerjani med seboj po posameznem tednu.

V začetnem stanju se število stolonov na nezalitem in zalitem gojišču znotraj posameznega ekotipa ni statistično značilno razlikovalo, kot tudi ne pri različnih ekotipih na nezalitem in zalitem gojišču (Slika 19).

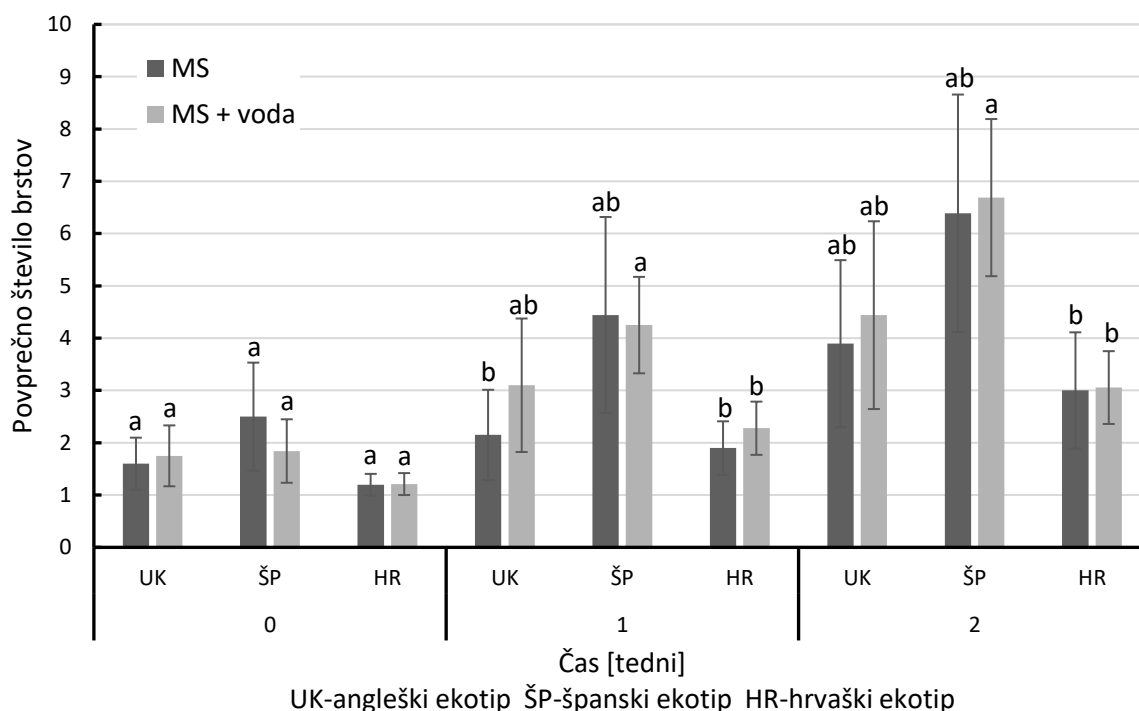
Po prvem tednu rasti se začetno stanje še ni spremenilo.

Po dveh tednih je začetno stanje ostalo nespremenjeno. Pri angleškem ekotipu se je na nezalitem in zalitem gojišču razvilo enako število stolonov, pri španskem se jih je več na nezalitem gojišču, pri hrvaškem več na zalitem gojišču, pri nobenem razlika ni bila statistično značilna.

Na nezalitem gojišču se je največ stolonov razvilo pri španskem ekotipu s povprečno 1,5 stolona, manj pri angleškem s povprečno 1,1 stolona, najmanj pri hrvaškem s povprečno 0,9 stolona. Na zalitem gojišču se je največ stolonov razvilo pri španskem ekotipu s povprečno 1,3 stolona, manj pri angleškem s povprečno 1,1 stolona, najmanj pri hrvaškem s povprečno 0,9 stolona. Pri nobenem razlika ni bila statistično značilna.

Razlika v številu stolonov na nezalitem in zalitem gojišču je pri angleškem ekotipu znašala 0,3 stolona in pri hrvaškem 0,1 stolona, pri nobenem ni bila statistično značilna.

5.3.3 Število brstov različnih ekotipov, gojenih na osnovnem MS gojišču brez in z zalitjem z vodo



Slika 20: Število brstov različnih ekotipov *A. repens*, pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na MS gojišču brez (MS) in z zalitjem z vodo (MS + voda). Prikazane so povprečne velikosti poganjkov s standardno deviacijo (\pm SD). Meritve smo izvedli tik pred zalitjem in v tedenskih intervalih tekom dveh tednov po zalitju kulture. Vrednosti, označene z enakimi črkami, se statistično značilno ne razlikujejo med seboj (KW-test: $p \leq 0,05$; $N = 16-20$). Podatki so statistično primerjani med seboj po posameznem tednu.

V začetnem stanju se število brstov na nezalitem in zalitem gojišču znotraj posameznega ekotipa ni statistično značilno razlikovalo, kot tudi ne pri različnih ekotipih na nezalitem in zalitem gojišču (Slika 20).

Po enem tednu je bilo pri španskem ekotipu število brstov na zalitem gojišču statistično značilno manjše, kot pri hrvaškem.

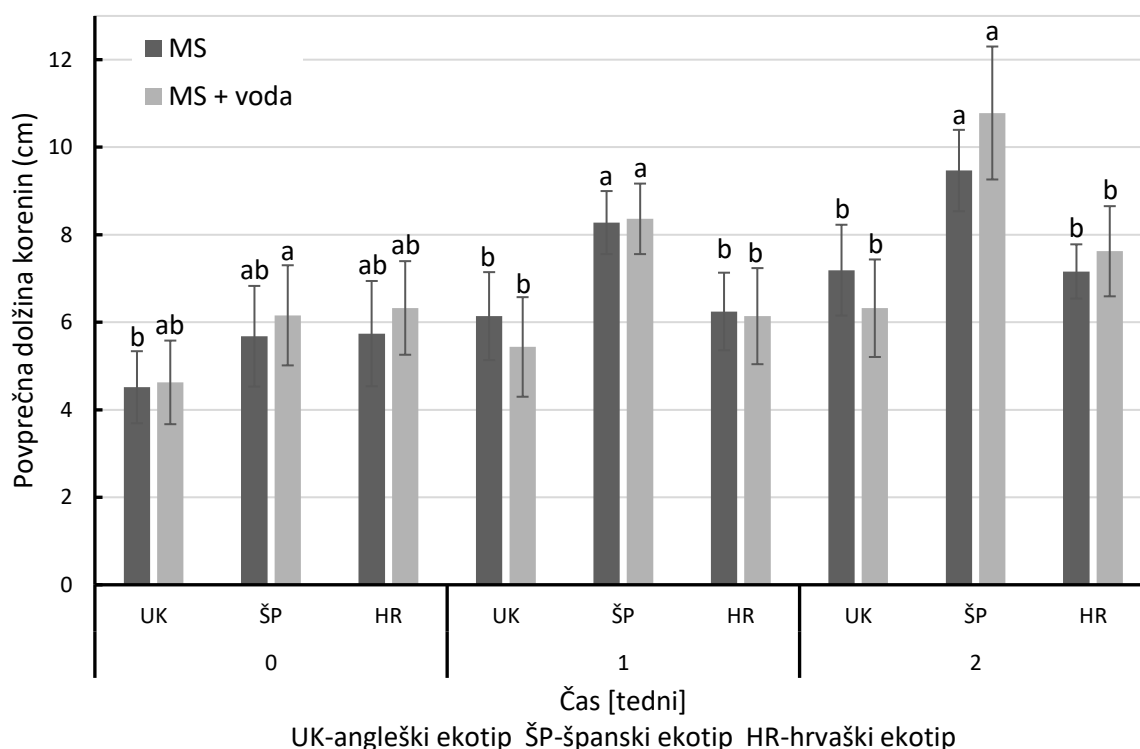
Po dveh tednih je ostalo stanje enako, kot po prvem tednu. Pri vseh treh ekotipih se je na zalitem gojišču razvilo več brstov, pri čemer se jih je pri španskem ekotipu statistično značilno več, kot pri hrvaškem. Največ s povprečno 6,7 stolona se jih je razvilo pri španskem ekotipu, manj pri

angleškem ekotipu s povprečno 4,4 stolona in najmanj pri hrvaškem ekotipu s povprečno 3,1 stolona.

Število brstov na nezalitem gojišču znotraj posameznega ekotipa je bilo pri vseh treh ekotipih manjše, med njimi ni bilo statistično značilne razlike. Največ, povprečno 6,4 stolona, se je razvilo pri španskem ekotipu, manj pri angleškem ekotipu s povprečno 3,9 stolona in najmanj pri hrvaškem ekotipu s povprečno 3 stoloni.

Razlika v številu brstov na nezalitem in zalitem gojišču je znašala največ pri angleškem ekotipu z 0,5 stolona, pri španskem 0,29 stolona in pri hrvaškem najmanj, 0,05 stolona, pri nobenem pa razlika ni bila statistično značilna.

5.3.4 Dolžina korenin različnih ekotipov, gojenih na osnovnem MS gojišču brez in z zalitjem z vodo



Slika 21: Dolžina korenin različnih ekotipov *A. repens*, pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na MS gojišču brez (MS) in z zalitjem z vodo (MS + voda). Prikazane so povprečne velikosti poganjkov s standardno deviacijo (\pm SD). Meritve smo izvedli tik pred zalitjem in v tedenskih intervalih tekom dveh tednov po zalitju kulture. Vrednosti, označene z enakimi črkami, se statistično značilno ne razlikujejo med seboj (KW-test: $p \leq 0,05$; $N = 16-20$). Podatki so statistično primerjani med seboj po posameznem tednu.

V začetnem stanju se dolžina korenin na nezalitem in zalitem gojišču znotraj posameznega ekotipa ni statistično značilno razlikovala, kot tudi ne pri različnih ekotipih na nezalitem in zalitem gojišču (Slika 21).

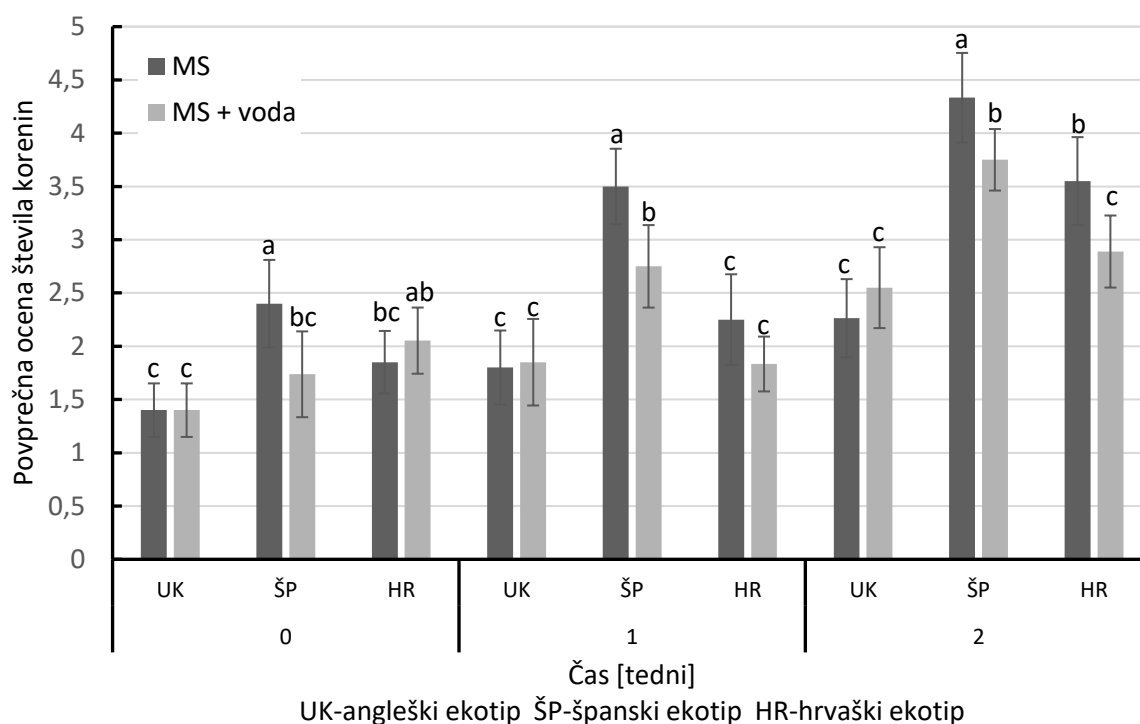
Po prvem tednu so bile korenine španskega ekotipa tako na nezalitem kot na zalitem gojišču statistično značilno daljše, kot pri angleškem in hrvaškem ekotipu.

Po dveh tednih je bilo stanje enako, kot po prvem tednu, le razlike so bile večje. Pri španskem in hrvaškem ekotipu so se na zalitem gojišču razvile daljše korenine, pri angleškem na nezalitem gojišču.

Na nezalitem gojišču so se pri španskem ekotipu razvile statistično značilno najdaljše korenine s povprečno 9,47 cm, pri angleškem ekotipu s povprečno dolžino 7,19 cm in pri hrvaškem najkrajše s povprečno dolžino 7,16 cm. Na zalitem gojišču so se prav tako pri španskem ekotipu s povprečno 10,8 cm razvile statistično najdaljše korenine, pri hrvaškem s povprečno dolžino 7,6 cm in pri angleškem najmanj s povprečno dolžino 6,3 cm.

Razlika v dolžini korenin na nezalitem in zalitem gojišču je znašala največ pri španskem ekotipu z 1,3 cm, manj pri angleškem ekotipu z 0,9 cm in najmanj pri hrvaškem ekotipu z 0,5 cm, pri nobenem pa razlika ni bila statistično značilna.

5.3.5 Ocena števila korenin različnih ekotipov, gojenih na osnovnem MS gojišču brez in z zalitjem z vodo



Slika 22: Ocena števila korenin različnih ekotipov *A. repens*, pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR), na MS gojišču brez (MS) in z zalitjem z vodo (MS + voda). Prikazane so povprečne vrednosti ocene števila korenin s standardno deviacijo (\pm SD). Meritve smo izvedli tik pred zalitjem in v tedenskih intervalih tekom dveh tednov po zalitju kulture. Vrednosti, označene z enakimi črkami, se statistično značilno ne razlikujejo med seboj (KW-test: $p \leq 0,05$; $N = 16-20$). Podatki so statistično primerjani med seboj po posameznem tednu.

V začetnem stanju so bile korenine pri španskem ekotipu na nezalitem gojišču statistično značilno številnejše, kot pri angleškem. Pri hrvaškem ekotipu so bile korenine na zalitem gojišču statistično številnejše, kot pri angleškem ekotipu. Statistično značilna razlika v številu korenin pa je bila že tudi pri španskem ekotipu med nezalitim in zalitim gojiščem (Slika 22).

Po prvem tednu so bile korenine španskega ekotipa tako na nezalitem kot na zalitem gojišču statistično značilno številnejše, kot pri angleškem in hrvaškem ekotipu.

Po dveh tednih so se pri španskem in hrvaškem ekotipu razvile številnejše korenine na nezalitem gojišču, pri angleškem na zalitem gojišču.

Na nezalitem gojišču so se pri španskem ekotipu s povprečno oceno 4,3 razvile najštevilnejše korenine, redkejšje pri hrvaškem s povprečno oceno 3,6 in najredkejšje pri angleškem s povprečno oceno 2,3. Med vsemi tremi je bila razlika statistično značilna. Prav tako so se pri

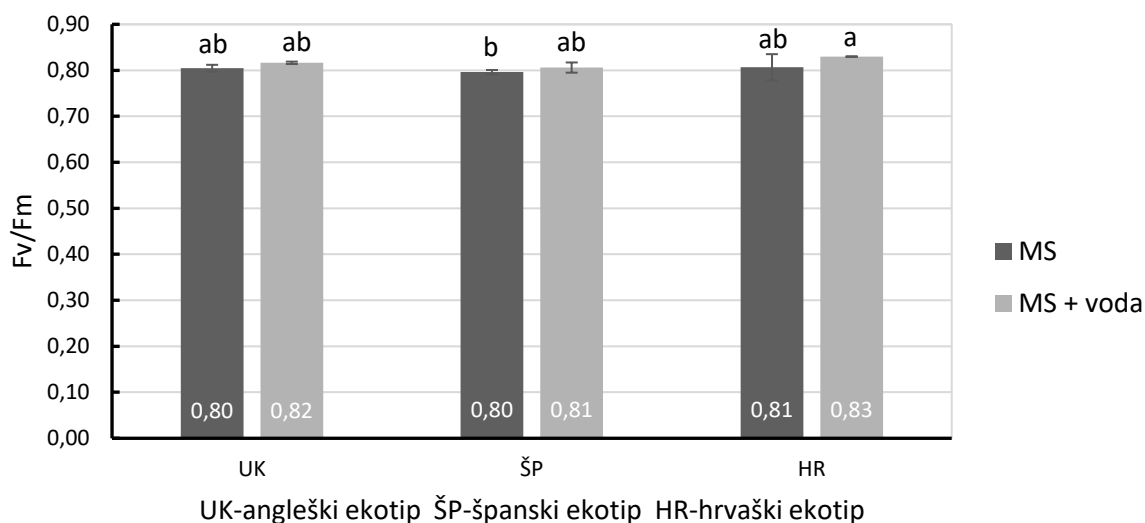
španskem ekotipu na zalitem gojišču s povprečno oceno 3,8 razvile statistično značilno najgostejše korenine, manj pri hrvaškem s povprečno oceno 2,9 in pri angleškem s povprečno oceno 2,6, kjer so se razvile najredkejše, med slednjima statistično značilne razlike ni bilo.

Razlika v številu korenin na nezalitem in zalitem gojišču je znašala največ pri hrvaškem ekotipu z oceno 0,7, manj pri španskem ekotipu z oceno 0,58 in najmanj pri angleškem ekotipu z oceno 0,3. Le pri slednjem razlika ni bila statistično značilna.

5.4 FIZIOLOŠKI PARAMETRI

5.4.1 FOTOKEMIČNA UČINKOVITOST

Po petih tednih rasti in razvoja tkivne kulture različnih ekotipov *A. repens*, od tega je bila pri posameznem ekotipu polovica kulture zadnja dva tedna zalita z avtoklavirano vodo, smo izmerili potencialno fotokemično učinkovitost posameznega ekotipa na osnovnem MS gojišču.



Slika 23: Potencialna fotokemična učinkovitost (F_v/F_m) različnih ekotipov *A. repens*, pridobljenih iz Velike Britanije (UK), Španije (ŠP) in Hrvaške (HR) na MS gojišču brez (MS) in z zalitjem z vodo (MS + voda). Prikazane so povprečne vrednosti potencialne fotokemične učinkovitosti s standardno deviacijo (\pm SD) po dveh tednih zalitja kulture. Vrednosti, označene z enakimi črkami, se statistično značilno ne razlikujejo med seboj (KW-test: $p \leq 0,05$; $N = 4$).

Znotraj vseh treh ekotipov je bila povprečna vrednost potencialne fotokemične učinkovitosti na zalitem gojišču večja, kot na nezalitem, ni pa bila statistično značilna. Povprečne vrednosti potencialne fotokemične učinkovitosti niso bile statistično značilne tudi pri različnih ekotipih na nezalitem in zalitem gojišču. Na nezalitem gojišču je povprečna vrednost potencialne

Ramšak, J.: Rast in razvoj treh ekotipov plazeče zelene (*Apium repens* (Jacq.) Lag.) v tkivni kulturi. Magistrsko delo, Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Oddelek za biologijo, 2017.

fotokemične učinkovitosti pri angleškem in španskem ekotipu znašala 0,8, pri hrvaškem 0,81. Na zalitem gojišču je povprečna vrednost potencialne fotokemične učinkovitosti pri angleškem ekotipu znašala 0,82, pri španskem 0,81 in pri hrvaškem 0,83.

6 DISKUSIJA

Primerjali smo rastne parametre različnih ekotipov vrste *A. repens* v tkivni kulturi. Rastline so rastle na osnovnem MS gojišču brez ali z rastnim regulatorjem, ali na osnovnem MS gojišču, ki smo ga zalili z vodo. Pri obeh vrstah poskusa smo primerjali morfologijo in fiziologijo angleškega, španskega in hrvaškega ekotipa *A. repens* ter ugotavljali, ali so si med seboj podobni ali se razlikujejo.

Pri **poskusu primerjave rastnih parametrov različnih ekotipov, gojenih na gojiščih z ali brez rastnih regulatorjev** smo preizkusili, kako gojišče MS brez in z dodatkom 2 μM ali 5 μM BAP vpliva na višino poganjkov, število stolonov, število brstov, dolžino in število korenin angleškega, španskega in hrvaškega ekotipa *A. repens*. Pri vseh ekotipih smo na MS gojišču brez rastnih regulatorjev ob koncu poskusa izmerili še fiziološki parameter fotokemično učinkovitost.

Morfološki parametri. Po prvem tednu rasti v tkivni kulturi so se ponekod že pojavile minimalne statistično značilne razlike v rastnih parametrih tako na različnih gojiščih znotraj posameznega ekotipa, kot pri različnih ekotipih na posameznem gojišču. Zaradi majhne tvorbe brstov in nezadostne sinhronizacije posameznih ekotipov *A. repens* namreč nismo mogli vcepljati enako razvitih poganjkov. Statistično značilne razlike v rastnih parametrih poganjkov so se praviloma pokazale v tretjem tednu in so se po četrtem tednu še povečale in postale očitnejše.

Vsi trije ekotipi *A. repens* so najbolje uspevali na osnovnem MS gojišču brez rastnih regulatorjev. Na omenjenem gojišču so zrastle najvišje, razvili največ stolonov in brstov ter tvorili najdaljše in najštevilnejše korenine. Dodatek citokinina BAP osnovnemu MS gojišču je vplival na rastne parametre tako, da je zavrl rast in razvoj. Poganjki so bili manjši, razvili manj stolonov in brstov ter tvorili krajše in redkejše korenine. BAP je vplival tudi na razrast korenin. Višja kot je bila koncentracija, bolj šopasta je bila razrast korenin. Višja koncentracija citokinina (5 μM BAP) je v večina primerih statistično značilno zaviralno vplivala na vse izmerjene rastne parametre kot nižja koncentracija (2 μM BAP) ali pa vpliv višje in nižje koncentracije na rastne parametre ni bil statistično značilen.

Po štirih tednih rasti v tkivni kulturi je španski ekotip izstopal po vseh izmerjenih parametrih. Na osnovnem MS gojišču so poganjki španskega ekotipa zrastle najvišje. Imeli so največje listne ploskve, rastlinski material je izgledal robustno v primerjavi z angleškim in hrvaškim ekotipom.

Poganjki hrvaškega ekotipa so zrastle statistično značilno manjši kot poganjki španskega ekotipa, še bolj statistično značilno manjši pa so zrastle poganjki angleškega ekotipa.

Na osnovnem MS gojišču se je pri španskem ekotipu razvilo največ stolonov, ti so bili odebeljeni. Statistično značilno manj stolonov se je razvilo pri angleškem in hrvaškem ekotipu, med katerima ni bilo statistično značilne razlike, hkrati so bili manj odebeljeni.

Tudi brstov se je na MS gojišču razvilo največ pri španskem ekotipu, ti so bili odebeljeni. Manj jih je bilo angleškem ekotipu, najmanj pri hrvaškem, pri slednjih dveh brsti niso bili odebeljeni. Med ekotipi sicer ni bilo statistično značilnih razlik v številu brstov.

Na osnovnem MS gojišču so se pri španskem ekotipu razvile najdaljše korenine, statistično značilno krajše kot španske so se razvile pri hrvaškem ekotipu in statistično značilno najkrajše pri angleškem ekotipu. Prav tako so se pri španskem ekotipu razvile najštevilnejše korenine, statistično značilno manj številne so bile pri hrvaškem ekotipu, statistično značilno najmanj številne pri angleškem ekotipu. Vsi trije ekotipi so razvili odebeljene glavne korenine in tanke stranske korenine, slednjih je bilo še najmanj pri angleškem ekotipu.

Večina rastlin se v tkivni kulturi težko zakorenini kljub dodajanju rastnih regulatorjev avksinov, za *A. repens* pa to ne velja. Za vse tri ekotipe je ne glede na statistične razlike značilno, da tvorijo močne korenine na MS gojišču brez in z rastnimi regulatorji. To nakazuje, da ima rastlina zelo visok endogeni nivo avksinov. V nadaljevanju poskusov zato predlagamo analizo avksinov v rastlinskem tkivu.

Fiziološki parameter. Potencialno fotokemično učinkovitost (F_v/F_m) smo določili s fluorescenco klorofila a v FS II, ki služi kot merilo učinkovitosti fotosinteze (PSII) rastline. Zaradi spremenljivih svetlobnih razmer v naravi morajo rastline dobro izkoristiti šibko jakost sevanja in se izogniti močnim jakostim, ki bi povzročile oksidacijske poškodbe fotosinteznega aparata in drugih delov celice. Pred presežno energijo sevanja se zavarujejo z zmanjšanjem prodiranja sevanja do fotosistemov, s porabljanjem presežne fotokemične energije v drugih celičnih procesih in s sproščanjem presežne absorbirane energije sevanja v obliki toplote in fluorescence. Energija sevanja, ki doseže fotosintezni aparat, se pretvori v fotokemično delo, toploto in fluorescenco. Razmerje med energijo sevanja, porabljeno za fotokemično delo, toploto in fluorescenco, se spreminja glede na razmere na rastišču, saj v stresnih razmerah rastlina izrabi manj absorbirane svetlobe za fotokemično delo kot rastlina, ki raste v ugodnih razmerah. V stresnih razmerah se delež oddane energije v obliki fluorescence bistveno poveča

(Trošt Sedej, 2005). Vsi trije ekotipi so na osnovnem MS gojišču dosegli optimalne vrednosti Fv/Fm, okoli 0,8, kar pomeni, da noben ni bil v stresu. Bili so tudi fotokemično podobno učinkoviti, saj se povprečne vrednosti Fv/Fm med vsemi tremi ekotipi niso statistično značilno razlikovale.

Pri poskusu primerjave rastnih parametrov različnih ekotipov, gojenih na osnovnem MS gojišču brez in z zalitjem z vodo smo preizkusili, kako na višino poganjkov, število stolonov, število brstov, dolžino in število korenin ter na fotokemično učinkovitost angleškega, španskega in hrvaškega ekotipa *A. repens* vpliva delna potopitev. Uporabili smo osnovno MS gojišče, saj smo pri prvem poskusu ugotovili, da na tem gojišču vsi trije ekotipi najbolj uspevajo. Rastne parametre smo zabeležili po treh tednih rasti v tkivni kulturi, nato smo polovico gojišč zalili z avtoklavirano vodo ter še nadaljnja dva tedna spremljali in beležili rastne parametre. Pri vseh ekotipih na nezalitem in zalitem gojišču smo ob koncu poskusa izmerili še fiziološki parameter fotokemično učinkovitost.

Morfološki parametri. V začetnem stanju oz. po treh tednih rasti v tkivni kulturi in tik pred zalitjem polovice kozarčkov z avtoklavirano vodo je razvoj poganjkov posameznega ekotipa v večji meri sovpadal z razvojem poganjkov pri prvem poskusu po treh tednih rasti poganjkov posameznega ekotipa na osnovnem MS gojišču, ko smo primerjali rastne parametre različnih ekotipov, gojenih na gojiščih z ali brez rastnih regulatorjev. Poganjki angleškega ekotipa so bili statistično značilno manjši, kot poganjki španskega in hrvaškega ekotipa, med slednjima ni bilo statistično značilne razlike. V številu stolonov in brstov med posameznimi ekotipi ni bilo statistično značilne razlike. Manjše razlike po treh tednih rasti na osnovnem MS gojišču pri prvem in drugem poskusu so se pojavile pri rasti in razvoju korenin. Pri prvem poskusu so se pri angleškem ekotipu razvile statistično značilno krajše korenine, kot pri španskem in hrvaškem, med slednjima ni bilo statistično značilne razlike. Pri drugem poskusu v dolžini korenin med posameznimi ekotipi ni bilo statistično značilne razlike. Pri prvem poskusu so bile korenine pri španskem ekotipu statistično značilno številnejše, kot pri angleškem in hrvaškem ekotipu, med slednjima ni bilo statistično značilne razlike. Pri drugem poskusu je prišlo do tega, da so bile pri španskem ekotipu korenine poganjkov, katere kasneje nismo zalili z avtoklavirano vodo, že v začetnem stanju statistično značilno številnejše, kot korenine poganjkov španskega ekotipa, katere smo tik za tem zalili z vodo in pričeli s poskusom. Ta rastni parameter je bil najbolj subjektivno določen, lahko pripišemo tudi nezadostni sinhronizaciji ekotipov med sabo. Številnosti korenin pri španskem ekotipu na zalitem gojišču pa se ni statistično značilno

razlikovala od številnosti korenin pri hrvaškem ekotipu tako na zalitem kot na nezalitem gojišču.

Po petih tednih rasti v tkivni kulturi, od tega jih je bilo zadnja dva tedna polovico kozarčkov zalitih z avtoklavirano vodo, delna potopitev v veliki meri ni vplivala na morfološke in fiziološke parametre. Do statistično značilnih razlik rastnih parametrov pri posameznem ekotipu na nezalitem in zalitem gojišču praviloma ni prišlo, izjemoma kasneje po dveh tednih in sicer pri velikosti poganjkov. Pri angleškem in hrvaškem ekotipu so se na zalitem gojišču razvili statistično značilno večji poganjki, kot na nezalitem. Pri oceni števila korenin poganjkov španskega ekotipa se je statistično značilna razlika povečala, pri hrvaškem je nastala. Na nezalitem gojišču so se namreč razvile številnejše korenine, kot na zalitem.

Fiziološki parameter. Vsi trije ekotipi so na osnovnem MS gojišču brez in z zalitjem z vodo dosegli optimalne vrednosti F_v/F_m , okoli 0,8, kar pomeni, da noben ekotip glede na vodni režim ni bil v stresu. Na zalitih gojiščih smo sicer zasledili višje vrednosti F_v/F_m , kot na nezalitih, vendar te razlike niso bile statistično značilne. Burmeier in Jensen (2008) poročata, da je kaljivost semen *A. repens* uspešnejša pri stalnem vodnem režimu, z ali brez potopitve. Verjetno je tudi kasnejše preživetje rastlin uspešnejše pri stalnih vodnih pogojih.

Glede na morfološke, fiziološke parametre ter videz angleškega, španskega in hrvaškega ekotipa *A. repens* sklepamo, da sta si angleški in hrvaški ekotip podobna, španski ekotip pa od njiju različen.

Izboljšave. Med poskusi je prišlo do nekaj okužb in posušenih poganjkov, zato bi bilo smiselno vcepljati po en poganjek v kozarček, saj smo morali zaradi okužbe enega poganjka zavreči oba poganjka v kozarčku. Bolje bi bilo uporabiti večje gojitvene kozarčke, da bi lažje izmerili, določili oziroma ocenili rastne parametre. Sploh dolžino korenin je bilo v zadnjem tednu težko izmeriti zaradi prepredenosti koreninskega sistema. Zaradi majhne tvorbe brstov in nezadostne sinhronizacije posameznih ekotipov *A. repens* nismo mogli vcepljati enako velikih in razvitih poganjkov. Potrebno bi bilo popisati rastne parametre že na dan nastavitve poskusa in bi tako lahko upoštevali začetne razlike, ki niso temeljile na raznolikosti ekotipov med seboj.

Za **ponovno naselitev *A. repens* na slovenska tla** bi bilo izmed teh treh ekotipov najbolje uporabiti hrvaški ekotip, ker je njen izvor z nam najbližje populacije rastlin. Za uspešnost renaturacije je namreč pomembno pridobiti rastlinski material iz lokalno prilagojenih in ekološko podobnih okolij, da je možnost genetske preobremenjenosti okoliških populacij s slabo prilagojenimi geni nižja (Miller in sod., 2010). Brez podatkov o prilagojenosti rastlin na okolje lahko pri izbiri rastlinskega materiala gledamo na geografsko razdaljo, na topografske, klimatske in edafske (talne) razmere, torej ekoregije, da bi določili cone ekološke podobnosti, znotraj katerih lahko posamezno vrsto prenašamo. Cone morajo biti dovolj velike, da ne siromašimo genskega fonda, da se izognemo depresiji zaradi sorodstvenega križanja (inbreeding depression) in tako ohranjamo genetsko raznolikost naravnih populacij. Hkrati pa ne smejo biti prevelike, da ne pride do depresije zaradi nesorodstvenega parjenja (outbreeding depression) kot posledica križanja genetsko nesorodnih rastlin (McKay in sod., 2005).

Pred renaturacijo je potrebno oceniti tudi kakovost in raznolikost rastlinskega materiala, ki naj bo čim bolj prilagojen razmeram na novih rastiščih in ki bo najbolje prenašal kasnejše spremembe kot posledice globalnih okoljskih sprememb. Ekoregije, torej geografska območja s podobno geologijo, podnebjem, vegetacijo, tlemi in hidrologijo, bi tako lahko bile primerne kot cone prenosa rastlinskega materiala za vrste, ko ni na voljo podatkov o genetiki vrst in vplivu genov na prilagojenost vrst, da se tako zagotovi oziroma izboljša učinkovitost in genska raznolikost rastlinskega materiala pri obnovi populacij (Miller in sod., 2010). Kot nadaljevanje dela magistrske naloge bi zato predlagali genetske analize vseh treh ekotipov *A. repens*. Ti podatki bodo omogočili čim natančnejše določanje cone prenosa rastlinskega materiala posameznih ekotipov te vrste.

Pri obnovi populacij je zelo pomembno natančno dokumentiranje lokacije izvora in prenosa rastlinskega materiala. Dokumentacija nam lahko kasneje pomaga pri razumevanju obnove avtohtonih vrst (Gustafson in sod., 2005). Pri tej nalogi bi nam zelo prav prišli podatki natančnega izvora rastlinskega materiala vseh treh ekotipov, ki smo jih uporabili v poskusih. Tako bi lahko primerjali topografske, klimatske in talne razmere območij njihovega izvora.

Potrebno bi bilo preučiti potencialna slovenska rastišča, kamor bi lahko vrsto ponovno naselili. Ambrožič Dolinšek in sod. (2011) poročajo, da so razmere na rastiščih, kjer *A. repens* uspeva v Veliki Britaniji, podobne razmeram v ravninskem predelu severovzhodne Slovenije. Jogan (2004) prav tako poroča, da naj bi bila v Sloveniji vrsti ustrezna rastišča na prodiščih na delu Drave med Obrežjem in Središčem. Iz Hrvaške pa poročajo, da vrsta pri njih raste na zelo

oligotrofnih kraških vodnih rastiščih (Dublić in sod., 2008), predvsem, kjer je tok počasnejši in pride do nalaganja usedlin in razvoja mokriščnih elementov (Valorizacija zaščiteneh področja Karlovačke županije, 2008). Na Hrvaškem so našli in potrdili rastišča *A. repens* leta 2006 in sicer narodni park Plitvička jezera, Rudnica-Tounjčica, Krbavsko polje, Zagorska Mrežnica in reka Slunjščica. Te lokacije bi bilo potrebno natančno kartirati, oceniti velikost populacij *A. repens* in preučiti primernost rastlinskega materiala za renaturacijo na slovenska tla. Smiselno bi bilo primerjati kemijsko sestavo teh hrvaških voda s kemijsko sestavo Drave, pa tudi s kraškimi izviri slovenskih ponikalnic.

Pred dejansko renaturacijo bi *A. repens* najprej prenesli iz tkivne kulture in jo posadili *ex situ*, da se namnoži za potrebe nadaljnjih poskusov. Sledila bi dejanska renaturacija na potencialna rastišča.

Za ohranitev vrste *A. repens* po ponovni naselitvi bi bilo potrebno ta nova rastišča zavarovati *in situ* ter hkrati uvesti klasične *ex situ* ukrepe za zaščito rastlinskih vrst, kot je vzdrževanje v zbirkah živih rastlin v botaničnih vrtovih in rezervatih ali vsakoletno nabiranje in hramba semen v zbirkah oziroma bankah semen (Jogan, 2004). Varovanje sploh v primerih redkosti in ogroženosti rastlin lahko vključuje tudi hrambo genskega materiala v tkivni kulturi, ki omogoča hitro namnožitev rastlin z mikropropagacijo (Savič, 2007).

7 POVZETEK

Plazeča zelena (*Apium repens* (Jacq.) Lag.) je predstavnica rodu *Apium* L. (Martinčič in sod., 2010) iz družine kobulnic (Apiaceae). Poleg izoliranih populacij v severni Afriki je z redkimi rastišči porazdeljena po vzhodni in južni Evropi (McDonald in Lambrick, 2006), kjer v splošnem velja za redko vrsto (Burmeier in Jensen, 2008). Za obstoj populacij *A. repens* je nujna dinamika (Jogan, 2004), ki zagotavlja optimalni režim motenj za dolgoročno obstojnost vrste (Rosenthal in Lederbogen, 2007). Lahko je rečna dinamika z zgodnjepoletnimi poplavami in anoksijo, ki na rastišču odpira nove neporasle površine in tako primerna mesta za kalitev (McDonald in Lambrick, 2006), lahko tudi sekundarna dinamika, kot sta košnja in paša, ki vzdržujeta primerno nizko vegetacijo in s tem dovolj svetlobe (Rosenthal in Lederbogen, 2007). Zato omejevanje rečne dinamike z utrjevanjem brežin, gradnjo nasipov preblizu struge in poglobljanjem struge, s čimer se preprečuje poplavljanje rek, predstavlja rastiščem *A. repens* glavno grožnjo. Nanje vpliva negativno tudi industrijsko izkoriščanje proda na prodiščih in evtrofikacija predvsem zaradi pretirane uporabe gnojil na okoliških kmetijskih površinah (Jogan, 2004).

Ker je ohranjanje redkih rastlinskih vrst pomemben vidik varovanja globalne biodiverzitete (Burmeier in Jensen, 2008), v Sloveniji pa že 20 let ni najdenih novih ali potrjenih obstoječih rastišč in je možno, da je vrsta že izumrla, če ne, pa je ves čas na robu izumrtja (Jogan, 2004), bi vrsto radi ponovno renaturirali. Rastlinski material bi pridobili od drugod. Pri tem je potrebno upoštevati, da so se zaradi adaptacije lokalnim okoljskim pogojem populacije *A. repens* po območju razširjenosti izoblikovali osebki z genetsko določenimi morfološkimi in fiziološkimi lastnosti (Hufford in Mazer, 2003) oz. ekotipi.

Izhodni material za naše poskuse so bili ekotipi *A. repens* iz Anglije, Španije in Hrvaške. Linije angleškega in španskega ekotipa so bile vzgojene iz plodov in že v stalni *in vitro* zbirki rastlin, linije hrvaškega ekotipa pa so bile pridobljene sveže in prenesene v tkivno kulturo. Pred začetkom poskusa smo linije vseh treh ekotipov trikrat razmnožili na trdnem gojišču MS z dodanim citokininom BAP (2 μ M), ki je nekoliko upočasnil razvoj poganjkov in so se poganjki prilagoditi na gojenje v tkivni kulturi.

Pri poskusu primerjave rastnih parametrov različnih ekotipov, gojenih na gojiščih z ali brez rastnih regulatorjev smo primerjali rastne parametre med angleškim, španskim in hrvaškim ekotipom na osnovnem MS gojišču brez rastnih regulatorjev, na MS gojišču z dodanim 2 μ M BAP in na MS gojišču z dodanim 5 μ M BAP. Merili smo višino poganjkov, določali število

stolonov, število brstov, dolžino korenin in ocenjevali število korenin. Ekotipi iz Anglije, Španije in Hrvaške so na različnih gojiščih različno dobro uspevali. Najbolje so se razvili na osnovnem MS gojišču brez dodanih rastnih regulatorjev, citokinin BAP je negativno vplival na vse izmerjene rastne parametre. Morfološko so se razlikovali v večina merjenih rastnih parametrih poganjkov, fotokemično so bili podobno učinkoviti.

Pri poskusu primerjave rastnih parametrov različnih ekotipov, gojenih na osnovnem MS gojišču brez in z zalitjem z vodo smo primerjali rastne parametre med angleškim, španskim in hrvaškim ekotipom na osnovnem MS gojišču brez rastnih regulatorjev, od katerih jih je bila polovica gojišč zalitih z vodo. Merili smo višino poganjkov, določali število stolonov, število brstov, dolžino korenin in ocenjevali število korenin. Delna potopitev v veliki meri ni vplivala na morfološke in fiziološke parametre. Na zalitih gojiščih so bile vrednosti F_v/F_m višje, kot na nezalutih, sicer ne statistično značilno, vendar noben ekotip glede na vodni režim ni bil v stresu.

8 ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Jani Ambrožič Dolinšek za strokovno pomoč, vodenje, nasvete, čas in potrpežljivost med izdelovanjem magistrskega dela.

Zahvaljujem se tudi dr. Tereziji Ciringer za pomoč v laboratoriju in prof. dr. Francu Janžekoviču za pomoč pri statistični analizi podatkov.

Hvala družini in prijateljem, ki so me spremljali in podpirali v času študija.

9 LITERATURA

Ambrožič-Dolinšek, J., Bakan, B., Jarnak, M., McDonald, A. (2011). *Apium repens*. Poročilo srečanja na Ptuj, 12. 5. 2011.

Bašič, K. (2014). *Mikropropagacija plazeče zelene (Apium repens (Jacq.) Lag.) ekotip »Kew«, Velika Britanija*. Magistrsko delo. Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Oddelek za biologijo.

Burmeier, S., Jensen, K. (2008). *Is the endangered Apium repens (Jacq.) Lag. rare because of a narrow regeneration niche?* Plant Species Biology 23(2), 111–118.

Clausen, J., Keck, D. D., Hiesey, W. M. (1940). *Experimental studies on the nature of species, Volume I: Effect of varied environments on western north american plants*. Washington (DC): Carnegie institution of Washington. Publication 520.

Clausen, J. (1951). *Stages in the evolution of plant species*. Ithaca (NY): Cornell University Press, Ithaca, New York.

Dublić, A., Fabio, K., Plavac, I., Posavec-Vukelić, V., Radović, J., Topić, R., Zwicker, G. (2008). *Značajni krajobraz Slunčica. Stručna podloga sa smjernicama za upravljanje zaštićenim područjem*. Zagreb: Državni zavod za zaštitu prirode.

Fenster, C. B., Stenøien, H. K. (2001). *Clines and ecotypes*. Macmillan reference USA.

Gowing, D., Youngs, E. (2005). *The requirements of Apium repens – an ecohydrological assessment*. Institute of Water and Environment, Cranfield University.

Grassly, N. C., Harris, S. A., Cronk, Q. C. B. (1996). *British Apium repens (Jacq.) Lag. (Apiaceae) status assessed using random amplified polymorphic DNA (RAPD)*. Watsonia 21, 103–111.

Gustafson, D. J., Gibson, D. J., Nickrent, D. L. (2005). *Using local seeds in prairie restoration: data support the paradigm*. Native plants 6(1), 25–28.

Hiesey, W. M., Clausen, J., Keck, D. D. (1942). *Relations between climate and intraspecific variation in plants*. The American Naturalist 76(762), 5–22.

Ramšak, J.: Rast in razvoj treh ekotipov plazeče zelene (*Apium repens* (Jacq.) Lag.) v tkivni kulturi. Magistrsko delo, Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Oddelek za biologijo, 2017.

Hufford, K. H., Mazer, S. J. (2003). *Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration*. Trends in ecology and evolution 18(3), 147–155.

Jensen, K., Schwerdtfeger., Burmeier, S. *EU-Life project BALTCOAST: Conservation guidelines for Apium repens*. Universität Hamburg, Fachbereich Biologie.

Jogan, N., Bačič, T., Vreš, B. (1999). *Prispevek k poznavanju flore okolice Ormoža (vzhodna Slovenija)*. Zveza za tehnično kulturo Slovenije, Ljubljana, Natura Slovenije 1(1), 5–28.

Jogan, N. (2004). *Apium repens* (Jacq.) Lag. – plazeča zelena. V: Čušin, B. (ur.). *Natura 2000 v Sloveniji. Rastline*. Ljubljana: Biološki inštitut Jovana Hadžija, ZRC SAZU, 36–39

Lovrenčak, F. (2003). *Osnove biogeografije*. Ljubljana: Filozofska fakulteta, Oddelek za geografijo.

Lowry, D. B. (2012). *Ecotypes and the controversy over stages in the formation of new species*. Biological Journal of the Linnean Society 106(2), 241–257.

McMillan, C. (1960). *Ecotypes and community function*. The American Naturalist 94(876).

Manuel, C., Molles, Jr. (2010). *Ecology: concepts and applications*. Boston: McGraw-Hill Higher Education. 5th edition.

Martinčič, A. (2010). *Mala flora Slovenije: ključ za določanje praprotnic in semenk*. Ljubljana: Tehniška založba Slovenije.

Mathew, J., George, K. V. (2013). *Morpho-ecotypes of endemic flowering plants from Achankovil Shear Zone in Agasthyamalai Biosphere Reserve, Western Ghats, Kerala*. Annals of plant sciences 2(12), 514-519.

McDonald A. W., Lambrick, C. R. (2006). *Apium repens creeping marshwort Species Recovery Programme 1995–2005*. English Nature Research Reports No 706, Oxford.

McDonald, A. W. (2011). *Identification of Creeping Marshwort (Apium repens) from Slovenia/Spain*. Ashmolean Natural History Society of Oxfordshire, Rare Plants Group.

McKay, J. K., Christian, C. E., Harrison, S., Rice, K. J. (2005). *"How local is local?" – A review of practical and conceptual issues in the genetics of restoration*. Restoration ecology 13(3), 432-440.

Ramšak, J.: Rast in razvoj treh ekotipov plazeče zelene (*Apium repens* (Jacq.) Lag.) v tkivni kulturi. Magistrsko delo, Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Oddelek za biologijo, 2017.

Miller, S. A., Bartow, A., Gisler, M., Ward, K., Young, A. S., Kaye, T. N. (2010). *Can an ecoregion serve as a seed transfer zone? Evidence from a common garden study with five native species*. Restoration ecology 19(201), 268-276.

Murashige, T., Skoog, F. (1962). *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures*. Physiologia Plantarum 15(3), 473–497.

Nosil, P. (2012). *Ecological speciation*. New York: Oxford University Press.

Núñez-Farfán, J., Schlichting C. D. (2001). *Evolution in changing environments: The "synthetic" work of Clausen, Keck, and Hiesey*. The Quarterly Review of Biology 76(4), 433–457.

Ronse, A. C., Popper, Z. A., Preston, J. C. (2010). *Taxonomic revision of European Apium L. s.l.: Helosciadium W.D.J.Koch restored*. Plant Systematics and Evolution 287(1), 1–17.

Rosenthal, G., Lederbogen, D. (2007). *Response of the clonal plant Apium repens (Jacq.) Lag. to extensive grazing*. Flora 203(2), 141–151.

Savič, A. (2007). *Tkivna kultura plazeče zelene (Apium repens (Jacq.) Lag.)*. Diplomsko delo. Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Oddelek za biologijo.

Slovenski medicinski slovar. (2012). Ljubljana: Medicinska fakulteta; Kamnik: Amebis.

Pridobljeno 12.6.2017 iz: <http://www.termania.net/slovarji/95/slovenski-medicinski-slovar>

Smith, R. L., Smith, T. M. (2003). *Elements of ecology*. San Francisco: Benjamin Cummings. 5th ed.

Valorizacija zaštićenih područja Karlovačke županije, stručna podloga. (2008). Zagreb: Državni zavod za zaštitu prirode.

What are plant ecotypes? (2010). United states department of agriculture, NRCS – Texas.

Pridobljeno 4.5.2016, iz

https://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_DOCUMENTS/nrcs144p2_002420.pdf

Turesson, G. (1922b). *The genotypic response of the plant species to habitat*. Hereditas 3, 211–350.

Ramšak, J.: Rast in razvoj treh ekotipov plazee zelene (*Apium repens* (Jacq.) Lag.) v tkivni kulturi. Magistrsko delo, Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Oddelek za biologijo, 2017.

Turesson, G. (1925). *The plant species in relation to habitat and climate*. Hereditas 6, 147–236.

Turesson, G. (1930). *The selective effect of climate upon the plant species*. Hereditas 14, 99–152.