

UNIVERZA V LJUBLJANI  
PEDAGOŠKA FAKULTETA

ŠTUDIJSKI PROGRAM: DVOPREDMETNI UČITELJ:

BIOLOGIJA IN KEMIJA

MOJCA ŽEMLJA

Mentorica: doc. dr. JASNA DOLENC KOCE

**VPLIV IZVLEČKOV JAPONSKEGA DRESNIKA NA  
RAST KORENIN VRTNE REDKVICE**

DIPLOMSKO DELO

LJUBLJANA, 2017

Diplomsko delo je zaključek prvostopenjskega študijskega programa Dvopredmetni učitelj: biologija in kemija. Opravljeno je bilo na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin na Oddelku za biologijo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Jasno Dolenc Koce.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Alenka GABERŠČIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Simona STRGULC KRAJŠEK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Jasna DOLENC KOCE  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mojca Žemlja

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	
KG	invazivna tujerodna vrsta/ japonski dresnik/ <i>Fallopia japonica</i> / vrtna redkvice/ <i>Raphanus sativus</i> / alelopatija/ izvleček/ mitotski indeks
AV	ŽEMLJA, Mojca
SA	DOLENC KOCE, Jasna (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Kardeljeva ploščad 16
ZA	Univerza v Ljubljani, Pedagoška fakulteta
LI	2017
IN	VPLIV IZVLEČKOV JAPONKEGA DRESNIKA NA RAST KORENIN VRTNE REDKVICE
TD	Diplomsko delo
OP	VIII., 30 str., 3 pregl., 6 sl., 29 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	

Japonski dresnik (*Fallopia japonica*) je v Evropi znan kot močno invazivna tujerodna rastlinska vrsta. Njegova uspešnost razširjanja je povezana tudi z učinkom, ki ga imajo sekundarni metaboliti, katere rastlina sprošča v prst. Tako imenovane alelopatske spojine lahko najdemo v listih in koreninah ter tudi v ostalih delih japonskega dresnika. Alelopatski učinek je najbolj opazen kot inhibicija kalitve in rasti korenin ter poganjkov bližje rastočih rastlin. Inhibicija rasti korenin je lahko povezana z zmanjšanim številom celičnih delitev v vršičku korenine.

Z diplomskim delom smo želeli ugotoviti, kako listni izvleček in izvleček korenin japonskega dresnika vplivata na rast korenin in celične delitve v koreninskem vršičku vrtno redkvice. Semena vrtno redkvice smo zalivali s 5 % izvlečkom iz listov in iz korenin japonskega dresnika. Od tretjega do sedmega dne kalitve smo beležili kalivost semen in dolžino korenin kalic. Koreninske vršičke smo fiksirali, pripravili preparate z obarvanim dednim materialom in pod mikroskopom prešteli število delečih in nedelečih celic koreninskega vršička. Razmerje smo izrazili z mitotskim indeksom. Dobljene rezultate smo primerjali s t-testom.

Semena, tretirana z izvlečkom iz listov japonskega dresnika, so kalila zakasnjeno. Dolžina korenin tretiranih kalic je bila krajša od dolžine korenin kontrolnih kalic, pri čemer je listni izvleček močnejše zavrl rast korenin kot izvleček iz korenin. Posledica dodajanja listnega in koreninskega izvlečka japonskega dresnika je bil zmanjšan mitotski indeks v koreninskem vršičku redkvice.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC  
CX invasive alien species/ Japanese knotweed/ *Fallopia japonica*/ Radish/ *Raphanus sativus*/ allelopathy/ extract/ mitotic index  
AU ŽEMLJA, Mojca  
AA DOLENC KOCE, Jasna (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Kardeljeva ploščad 16  
PB University of Ljubljana, Faculty of Education  
PY 2017  
TI THE EFFECT OF JAPANESE KNOTWEED EXTRACTS ON THE GROWTH OF RADISH ROOTS  
DT Graduation Thesis  
NO VIII., 30 p., 3 tab., 6 fig., 29 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB

The Japanese knotweed (*Fallopia japonica*) is nowadays in Europe known as a strongly invasive alien plant species. Its dissemination success is related with the effect of the secondary metabolites which are released to the soil by the plant. So-called allelopathic compounds can be found in the leaves and roots or also in other parts of the Japanese knotweed. The allelopathic effect is mostly noticeable as an inhibition of the germination and as growth of the roots and shoots of the close growing plants. The inhibition of the roots growth can be related to the reduced number of the cell division in the root tips.

In this dissertation we tried to discover how the leaf and the root extract of the Japanese knotweed have an impact on the root growth and the cellular division in the root tip of the radish. The seeds of the radish were watered with 5 % extract of the leaves and roots of the Japanese knotweed. From the third to the seventh day of the sprouting we made notes on the germination of the seeds and the length of the roots of the cotyledons. We fixed the root tips and prepared the specimen with coloured genetic material. We counted the number of the divided and undivided cells of the root tip under the microscope. We expressed the proportion with the mitotic index. The results were compared with the t-test.

The seeds, treated with the extract of the leaves of the Japanese knotweed, germinated with a delay. The length of the roots of the treated cotyledons was shorter than the length of the control cotyledons wherein the leaf extract decelerated the growth of the roots with more strength than the root extract. Adding of the leaf and root extract of the Japanese knotweed resulted as a lower mitotic index in the root tip of the radish.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1. UVOD .....</b>	<b>9</b>
1.1 CILJ DIPLOMSKE NALOGE.....	9
1.2 HIPOTEZI.....	9
<b>2. PREGLED OBJAV .....</b>	<b>10</b>
2.1 INVAZIVNE VRSTE .....	10
2.2 JAPONSKI DRESNIK.....	10
2.2.1 Opis rastline.....	10
2.2.2 Japonski dresnik kot invazivna tujerodna vrsta.....	11
2.3 ALELOPATIJA.....	12
2.3.1 Alelopatski učinki japonskega dresnika .....	13
2.3.2 Listni in koreninski izvlečki japonskega dresnika .....	13
2.4 APIKALNI MERISTEM KORENINE IN DELITEV CELIC .....	14
2.4.1 Celični cikel.....	14
2.4.2 Mitotski indeks .....	15
2.4.3 Fiziološki vplivi na mitozo in celični cikel .....	16
2.4.4 Celični cikel in rast korenin.....	16
2.5 VRTNA REDKVICA ( <i>Raphanus sativus</i> ).....	17
<b>3. MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>17</b>
3.1 RASTLINSKI MATERIAL.....	17
3.2 KALITEV IN MERJENJE DOLŽINE KORENIN.....	17
3.3 BARVANJE PO FEULGENU .....	18
3.4 PRIPRAVA IN ANALIZA MIKROSKOPSKIH PREPARATOV .....	19
3.5 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV .....	20
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>20</b>
4.1 KALITEV IN DOLŽINA KORENINE .....	20

4.2	MITOTSKI INDEKS V KORENINSKEM VRŠIČKU.....	24
<b>5.</b>	<b>RAZPRAVA.....</b>	<b>25</b>
5.1	SKLEPI .....	27
<b>6.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>28</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO SLIK

Slika 1: <i>Japonski dresnik (Kus Veenvliet, 2016)</i> .....	11
Slika 2: <i>Faze celičnega cikla v celici koreninskega vršička vrtno redkvice.</i> .....	14
Slika 3: <i>Razporeditev semen v petrijevki treh skupin vzorcev: kontrola, listni izvleček, koreninski izvleček (od leve proti desni).</i> .....	18
Slika 4: <i>Kalice vrtno redkvice po tretmaju z vodo, listnim in koreninskim izvlečkom japonskega dresnika od tretjega do sedmega dne kalitve.</i> .....	21
Slika 5: <i>Dolžina korenin od tretjega do sedmega dne kalitve po tretmaju z vodo, listnim in koreninskim izvlečkom japonskega dresnika. Prikazane so povprečne vrednosti <math>\pm</math> SN (N=4–10).</i> .....	23
Slika 6: <i>Mitotski indeks od tretjega do sedmega dne kalitve po tretmaju z vodo, listnim in koreninskim izvlečkom japonskega dresnika. Prikazane so povprečne vrednosti <math>\pm</math> SN (N=2–5).</i> .....	24

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: <i>Delež kalivosti (%) po tretmaju z vodo ter listnim in koreninskim izvlečkom japonskega dresnika od tretjega do sedmega dne kalitve. ....</i>	22
Preglednica 2: <i>Rezultati statistične analize t-test za primerjavo dolžine korenin po tretmaju z vodo, listnim in koreninskim izvlečkom japonskega dresnika. ....</i>	23
Preglednica 3: <i>Rezultati statistične analize t-test za primerjavo mitotskega indeksa po tretmaju z vodo, listnim in koreninskim izvlečkom japonskega dresnika. ....</i>	25



## 1. UVOD

Japonski dresnik je bil v Evropo prinesen kot okrasna rastlina, ki pa se je v zadnjih desetletjih zelo razširila. Na ruderalnih rastiščih in vzdolž vodotokov pogosto tvori sklenjene, goste sestoje, med katerimi domorodne rastline nimajo več možnosti uspevati. Agresivno razraščanje japonskega dresnika ima tudi ekonomske posledice, saj močne korenike lahko poškodujejo infrastrukturo (Kus Veenvliet, 2016).

Z japonskim dresnikom se po Evropi že več let spopadajo zaradi njegove izredne invazivnosti. Njegovo odstranjevanje je težavno in dolgotrajno, saj ima veliko sposobnost regeneracije. Fizično odstranjevanje zahteva nekajletno vztrajnost in natančnost, kemično odstranjevanje s herbicidi pa ima ob nepravilni in nenadzorovani uporabi preveč negativen vpliv na okolje (Frajman, 2008).

Alelopatija je eden od mehanizmov, ki lahko pomaga japonskemu dresniku k invazivnosti. Poznavanje delovanja alelopatije je tako lahko za biološki način omejevanja te rastline velikega pomena (Dolenc Koce, 2016).

### 1.1 CILJ DIPLOMSKE NALOGE

Z diplomskim delom želimo ugotoviti, ali listni izvleček in izvleček korenin japonskega dresnika vplivata na rast korenin in celične delitve v koreninskem vršičku modelne rastlinske vrste - vrtna redkvice.

### 1.2 HIPOTEZI

Izvlečki iz korenin in listov japonskega dresnika zmanjšajo rast korenin in celične delitve pri vrtni redkvi.

Izvleček iz korenin japonskega dresnika bolj zavira rast korenin in celične delitve kot izvleček iz listov.

## 2. PREGLED OBJAV

### 2.1 INVAZIVNE VRSTE

»Invazivne tujerodne vrste so tujerodne vrste, ki z naturalizacijo in širjenjem v novem (pol)naravnem ekosistemu povzročajo različne spremembe v strukturi in/ali funkciji ekosistema, torej ogrožajo celotni ekosistem, habitate ali domorodne vrste« (Bačič idr., 2013, str. 9). Število tujerodnih vrst v Evropi je začelo naraščati v 19. stoletju, ko so stiki Evrope s preostalim svetom postali veliko pogostejši, zaradi hitrejšega in lažjega premagovanja dolgih razdalj. V zadnjih desetletjih smo z intenzivno globalizacijo vnos še povečali. Problem, ki nastane v zvezi z invazivnimi tujerodnimi vrstami, je upadanje biodiverzitete, s katerim se soočamo po celem svetu, pa tudi povzročanje gospodarske škode. V zvezi s problematiko smo pogosto nemočni, ko vrsta na nekem območju že postane invazivna. Prav zato pri invazivkah pogosto ni več govora o tem, kako jih iztrebljati, ampak o iskanju znosnega sožitja z njimi (Bačič idr., 2013).

Postavljenih je bilo več hipotez, zakaj nekatere tujerodne vrste postanejo tako invazivne (Murrell, Gerber, Krebs, Parepa, Schaffner in Bossdorf, 2011):

- (1) Invazivke nadvladajo pri rasti in boju za hranilne snovi nad prvotnim rastjem.
- (2) Imajo prednost, ker izločajo spojine s škodljivim delovanjem.
- (3) Postale so močnejše zaradi hitre evolucije v novem okolju.

Številne raziskave so pripisale uspešnost invazivnih tujerodnih vrst prav izločanju škodljivih spojin v okolico, kar imenujemo alelopatija.

### 2.2 JAPONSKI DRESNIK

Japonski dresnik (*Fallopia japonica* (Houtt.) Ronse Decr.) je rastlina iz družine dresnovk (*Polygonaceae*) (Frajman, 2008). Izvira iz vzhodne Azije, danes v Evropi spada med 100 najbolj invazivnih vrst (Lowe, Browne, Boudjelas in De Poorter, 2000).

#### 2.2.1 Opis rastline

Rastlina je trajnica, ki ima grmičasto razrast in doseže višino 2 do 3 metre vsako rastno sezono. Pozimi nadzemni deli odmrejo, ostanejo pa podzemne korenike. Korenike lahko segajo več metrov stran od materinske rastline. Listi so široko jajčaste oblike s celim robom, dolgi med 5 in 15 cm ter široki do 10 cm. Na vrhu se hitro zožijo, dno je presekan. Nameščeni so premenjalno na rdečkasto lisasto steblo. Japonski dresnik zacveti konec julija z belkasto – zelenkastimi cvetovi, ki so združeni v pokončna latasta socvetja. Plod je črn trikotni orešek. Japonski dresnik najpogosteje zaseda sončna vlažna rastišča ob rekah in potokih. Uspeva tako v zakisani, bazični, lahko tudi nekoliko

slani prsti. Vrsta najhitreje naseli ruderalna rastišča, ki so nastala zaradi antropogenih dejavnikov (Frajman, 2008).



Slika 1: Japonski dresnik (*Kus Veenvliet*, 2016)

Japonski dresnik je najpogostejši in zaradi svoje invazivnosti najbolj poznan. Poleg njega pri nas uspeva tudi njemu soroden sahalinski dresnik (*Fallopia sachalinensis*), ki je redkejši, a ponekod v Sloveniji že invaziven (Strgulc Krajšek in Jogan, 2011). Zelo je razširjen tudi njun križanec češki dresnik (*Fallopia x bohemica*) (Dolenc Koce in Strgulc Krajšek, 2015).

#### 2.2.2 Japonski dresnik kot invazivna tujerodna vrsta

V Evropo je prišel v 19. stoletju, ko so ga sadili po parkih kot okrasno rastlino in na brežine, za utrjevanje in preprečevanje erozije. Poleg tega so ga uporabljali tudi kot krmno in medonosno rastlino. Invazivnost japonskega dresnika v Sloveniji negativno vpliva na biotsko pestrost na številnih mestih, predvsem ob Dravi, Savi, Savinji, Muri ter drugih rekah in potokih, kjer tvori goste, sklenjene sestoje. Poleg tega spreminja videz krajine in povzroča tudi gospodarsko škodo, saj močne korenike prodrejo skozi do 5 cm debele plasti asfalta, uničujejo stavbe, ceste, jezove in rečne nasipe (Frajman, 2008).

Njegova uspešnost razširjanja je povezana z večjim številom dejavnikov, najpomembnejša sta hitra rast in nespolno razmnoževanje s koreniko. Invazivka tvori goste sklenjene sestoje, ki jih najdemo na obrežjih rek in potokov, ob cestah, železniških progah, po skoraj celotni Sloveniji. Zaradi svoje konkurenčnosti preraste in izpodrine avtohtono rastje. Ima veliko sposobnost regeneracije, saj nova rastlina zraste iz samo 5 gramov težkih koščkov korenike. Prav tako se uspešno zakoreninijo tudi stebelni členki. Koščke rastline pogosto raznašajo reke, potoki, pa tudi človek in tako invazivka zaseda nove habitate (Frajman, 2008).

K uspešnosti japonskega dresnika lahko pripomore tudi učinek, ki ga imajo sekundarni metaboliti, ki jih rastlina izloča ali sprošča v prst. To so tako imenovane alelopatske

spojine, ki praviloma škodljivo vplivajo na rastline, ki rastejo v bližini (Anaya in Pelayo-Benavides, 1997).

Do sedaj najuspešnejše odstranjevanje in nadzor te invazivne vrste je, da celotno rastlino s koreninami in okoliško prstjo izkopljemo in ves material zakopljemo nekaj metrov globoko. Prav tako se rastline uniči z večletnim tretiranjem s herbicidi. Sama paša in košnja nista učinkoviti. Japonski dresnik ima namreč razrasel podzemni sistem korenin, ki lahko preživijo tudi večletne redne košnje poganjkov (Kus Veenvliet idr., 2009).

Poznavanje delovanja alelopatije je lahko za biološki način omejevanja te rastline velikega pomena (Dolenc Koce, 2016).

### 2.3 ALELOPATIJA

Alelopatija označuje izraz, ko rastline proizvajajo in izločajo biomolekule, najpogosteje so to sekundarni metaboliti, ki povzročijo škodo ali korist drugim (bližnjim) rastlinam. Gre torej za biokemično interakcijo med rastlinami. Na začetku se je izraz nanašal izključno na odnos rastline – rastline, kasneje so pod tem izrazom raziskovali tudi učinek rastline – mikroorganizmi in so alelopatijo definirali kot vsako neposredno ali posredno škodljivo ali koristno vplivanje rastlin na druge organizme, s pomočjo spojin, ki jih izločajo v okolje (Rizvi in Rizvi, 1992).

Kljub temu da ima lahko interakcija pozitivne ali negativne učinke, z izrazom alelopatija mnogi znanstveniki označujejo le slednje (Hierro in Callaway, 2003; Fan, Hostettmann in Lou, 2010). Alelopatski učinek je dobro raziskan že pri črnem orehu (*Juglans nigra*), velikem pajesnu (*Ailanthus altissima*) in česnovki (*Alliaria petiolata*) (Weston in Duke, 2003, v Dolenc Koce, 2016). Danes alelopatske učinke preučujejo pod kontroliranimi pogoji v laboratoriju. Tako uporabljajo rastlinske izvlečke, fitokemične spojine, izolirane iz rastlinskih delov ali pa umetno izdelane spojine, ki so identične naravnim (Macias idr., 2003).

Spojine z alelopatskim učinkom se lahko sintetizirajo v vseh delih rastline in sprostijo v okolico skozi koreninski sistem, s pomočjo evaporacije, pri razkroju rastline ali pa jih z listne površine spira dež (Dolenc Koce, 2016).

Alelopatija ima pomembno vlogo pri tekmovanju med vrstami rastlin. Vse vrste rastlin – tako zelišča, grmovja kot drevesa z alelopatskim učinkom, lahko močno vplivajo na rastje v njihovi neposredni bližini (Rizvi in Rizvi, 1992). Mnogo spojin, ki so v rastlini proizvedene kot sekundarni metaboliti, imajo visoko fitotoksičnost. Nekatere povzročijo spremembe v kalitvi in rasti drugih rastlin, tako da povzročijo celično smrt ali zaustavijo celično delitev (Teerarak idr., 2012, v Soltys, Rudzinska-Langwald, Gniazdowska, Wisniewska in Bogatek, 2012).

### 2.3.1 Alelopatski učinki japonskega dresnika

Mnoge invazivne tujerodne vrste v krajih, od koder prihajajo, niso tako razširjene kot drugje po svetu. K temu domnevno pripomorejo alelopatski mehanizmi v rastlinah. Izločene spojine za rastline, ki naravno uspevajo skupaj, nimajo tolikšnega vpliva, kot ga imajo lahko spojine neke tuje vrste. Tako jim lahko uspe prevladati nad prvotnim rastjem (Hierro in Callaway, 2003).

Ker je japonski dresnik postal močno invazivna vrsta v Evropi, so v povezavi z njim začeli izvajati mnoge raziskave. Prisotnost japonskega dresnika občutno zmanjša število rastlinskih vrst v bližini (Aguilera idr., 2010; Stoll idr., 2012, v Tucker Serniak, 2015). V njem je nakopičenih razmeroma veliko sekundarnih metabolitov, ki so biološko aktivni. Večinoma so to fenolne spojine in sicer stilbeni (resveratrol in piceid) ter flavonoidi (katehin in epikatehin). Glede na inhibitorne učinke resveratrola, emodina in epikatehina so našete spojine verjetno pomemben dejavnik za delovanje alelopatije, medtem ko piceid učinkuje šibkeje. Raziskovane spojine skupaj delujejo sinergistično, da upočasnijo rast okoliškega rastja (Tucker Serniak, 2015; Fan idr., 2010).

Kemijske analize so pokazale očitno razliko med sestavinami v koreninah japonskega dresnika iz Kitajske, kjer je rastlina avtohtona, in Švice, kjer predstavlja invazivno vrsto (Fan idr., 2009, v Fan, 2010).

Moravcova idr. (2011) je raziskovala vpliv različnih koncentracij izvlečkov listov japonskega dresnika na kalitev in rast rastlin. Ugotovila je, da so učinki pri 5 % izvlečku pogostejši kot pri 0,5 % izvlečku. Prav tako je lahko ena doza spojine z alelopatskim učinkom mnogo učinkovitejša kot več manjših doz (Tucker Serniak, 2015).

Največji alelopatski učinek se je pokazal pri resveratrolu, ki so ga izolirali tako iz korenike iz Švice kot tudi iz Kitajske. Na Kitajskem japonski dresnik ni invazivna vrsta, kljub vsebnosti nekaterih alelopatskih spojin. Na podlagi tega Fan idr. (2010) ugotavljajo, da le spojine, ki se izločajo iz rastline v okolje, lahko delujejo alelopatsko.

Negativni alelopatski učinki se kažejo predvsem v začetnih fazah rasti in razvoja poganjkov. V nadaljnji rasti pa japonski dresnik negativno vpliva na rastje v bližini predvsem s hitro rastjo, gostimi sestoji, ki manjšim rastlinam onemogočijo dostop svetlobe, in s privzemom mineralnih snovi in vode iz prsti (Dolenc Koce in Šoln, 2017).

### 2.3.2 Listni in koreninski izvlečki japonskega dresnika

Vsebnost biološko aktivnih snovi se v nad- in podzemnih delih dresnika razlikujejo. Tako kvalitativno, kot tudi kvantitativno. V podzemnih delih dresnika prevladujejo fenolne spojine (Verchotova, Šera in Triska, 2007). V nadzemnih poganjkih pa flavonoli (prevladuje kvercetin) in kavno kislinski derivati. Tudi v nadzemnih delih najdemo kinone in stilbene, a so ti prisotni v nižjih koncentracijah kot v koreninah (Verchotova in Šera, 2008).

Vrchotova in Šera (2008) sta primerjali koreninske ekstrakte treh različnih vrst dresnika. Vsi so vplivali na zakasnjeno rast tretiranih rastlin, najbolj so bili zavrti poganjki. Razlike v delovanju med različnimi vrstami dresnika niso bile izrazite.

Alelopatske spojine so bile najdene ne le v koreninah, ampak tudi v listih, steblih, cvetovih in plodovih dresnika. Nadzemni deli pozno jeseni propadejo in posledično se spojine, nakopičene v poganjkih, ob razgradnji izločajo v prst. Pri tem zavzemajo listi največjo biomaso (Vrchotova idr., 2007).

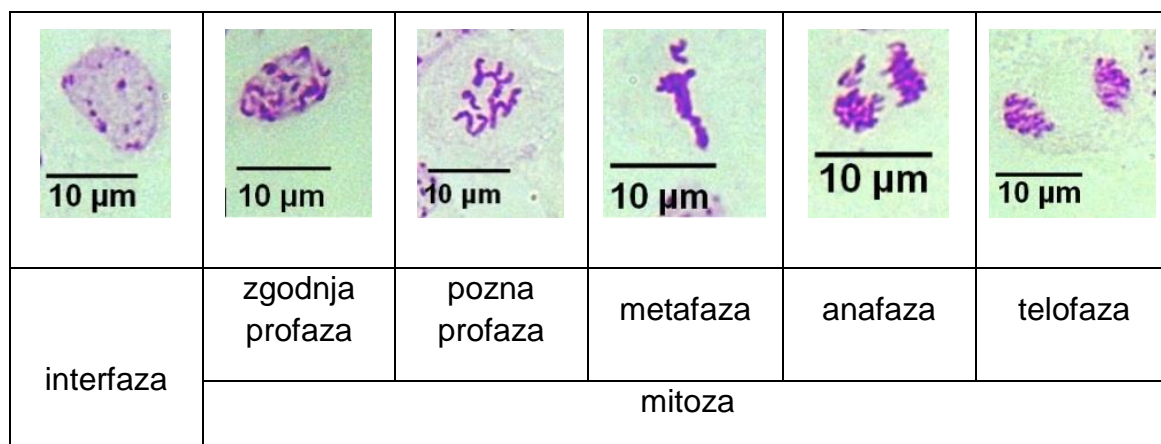
## 2.4 APIKALNI MERISTEM KORENINE IN DELITEV CELIC

Apikalni meristem korenine je sestavljen iz nediferenciranih celic, ki so zelo stabilne in se nahaja v osrednjem delu koreninskega vršička. Nediferencirane celice z delitvami proizvajajo potomke, ki gradijo tkiva korenin. Tik nad koreninsko čepico je t.i. območje mirovanja, kjer se nahajajo nediferencirane izvorne celice, ki se delijo le občasno. Pri asimetrični delitvi izvorne celice ena hčerinska celica ostane v stiku z območjem mirovanja in s tem zadrži identiteto izvorne celice, druga pa gre v proces diferenciacije in specializacije (Dermastia, 2007).

### 2.4.1 Celični cikel

V rastnih vršičkih in meristemih se nahajajo celice, ki imajo sposobnost, da se neprestano delijo in rastejo. Ostale celice rastline so povečini specializirane za opravljanje točno določenih funkcij (Moore in sod., 1995, v Sinkovič, 2008).

Celični cikel vključuje celično delitev in interfazo. Delitev celic imenujemo mitozo in poteka v štirih fazah, imenovane: profaza, metafaza, anafaza in telofaza. Mitozi pa sledi interfaza. V času interfaze se celica ne deli, ampak raste. Celice, ki so zaključile celični cikel, se diferencirajo v trajna tkiva, embrionalne celice pa preidejo v nov celični cikel. Za opazovanje poteka mitoze so koreninski rastni vršički najprimernejši. Jedra pri celicah v meristemu zavzemajo 50 % celice, medtem ko jedra diferenciranih celic, ki nimajo več sposobnosti delitve, zavzemajo le 10 % celotne celice (Sinkovič, 2008).



Slika 2: Faze celičnega cikla v celici koreninskega vršička vrtno redkvice.

### *Interfaza*

Interfaza je obdobje med celičnima delitvama in traja v povprečju 9-krat dlje od mitoze. V tej fazi je molekula DNA razvita in je v delujoči – prepisovalni obliki. Interfaza se deli na prvo rastno fazo (G1), obdobje sinteze DNA (S) in drugo rastno fazo (G2). V času G1 se celica pripravlja na sintezo DNA, tvori primarne in sekundarne metabolite. Nato se DNA podvoji, ko se dvojni vijačnici razkleneta, odvijeta in ob vsaki verigi se sintetizira nova (S). Na koncu se vrši še tvorba ATP in beljakovin, ki sestavljajo delitveno vreteno (G2). Z optičnim mikroskopom spremembe med interfazo niso vidne, zato so včasih to fazo imenovali kar faza mirovanja (Sinkovič, 2008).

### *Profaza*

Profaza je prva faza celične delitve. V profazi se zvija nitast kromatin v krajše, debelejše in dobro vidne kromosome (Sinkovič, 2008). Ti so sestavljeni iz dveh sestrskih kromatid, ki sta povezani s centromero. V centromeri se kromosom pripne na delitveno vreteno. Naključno orientirani kromosomi se ob koncu profaze poravnajo vzdolž bodoče osi delitvenega vretena. Oblikujejo se niti delitvenega vretena. Prav tako izgine jedrce in jedrna ovojnica (Dermastia, 2007).

### *Metafaza*

V metafazi se delitveno vreteno dokončno izoblikuje. Kromosomi se poravnajo v ekvatorijalni ravnini delitvenega vretena. V tej fazi so najkrajši in najbolj opazni za štetje in analizo (Sinkovič, 2008).

### *Anafaza*

Anafaza je najkrajša faza mitoze. V njej se kromatide ločijo, saj se začnejo sestrške kromatide (v tej fazi jih imenujemo hčerinski kromosomi) pomikati do nasproti ležečih polov (Dermastia, 2010). Tako se dedna snov enakomerno razdeli med hčerinski celici (Sinkovič, 2008).

### *Telofaza*

V zadnji fazi, telofazi, se kromatin razvija in kromosomi preidejo v tanjšo in daljšo, bolj nitasto obliko. Delitveno vreteno razpade, ponovno se tvorita jedrna ovojnica in jedrce. Iz celične plošče, ki je nastala iz veziklov Golgijevega aparata v ekvatorijalni ravnini, se tvori plazmalema, nato pa še celična stena, ki ločita novo nastali celici. Tako nastali diploidni celici sta genetsko popolnoma enaki (Sinkovič, 2008).

#### 2.4.2 Mitotski indeks

Mitotski indeks je definiran kot razmerje med številom celic v fazi mitoze in celotnim številom celic. Izražen je v odstotkih in se uporablja za merjenje hitrosti nastajanja novih celic. Pri celični populaciji, ki se hitreje deli, lahko pričakujemo, da bo večji delež celic v fazi mitoze (bo mitotski indeks večji) kot tam, kjer so delitve redkejšje (Jagodič, 2014).

#### 2.4.3 Fiziološki vplivi na mitozo in celični cikel

Sinkovič (2008) omenja, da imamo o fizioloških vplivih na mitozo še omejeno znanje. Celične delitve se dnevno spreminjajo. Na število delitev lahko vpliva dnevno – nočni ritem, temperatura, vlaga, razpoložljiva hranila. Delitve niso odvisne od kisika, temveč od nakopičene energije. Notranja regulacija celičnega cikla pa poteka preko rastlinskih hormonov, predvsem citokininov in avksinov. Razvoj rastlin, celične delitve in rast celic, apikalna dominanca, razvoj stranskih korenin in prevodnih tkiv je pod nadzorom avksina. Citokinini sodelujejo pri rasti procesih, proženju celičnih delitev, tvorbi in razvoju poganjkov in senescenci. Hormoni vplivajo tudi na nadaljnji potek in celo ustavitev celičnega cikla (Ramirez-Parra in sod., 2005, v Sinkovič 2008).

Celični cikel je zaradi svoje pomembnosti nadzorovan na večih mestih v celičnem ciklu, glavni regulatorji so ciklini in od ciklinov odvisne kinaze (Bergfeld, Bergmann in Sengbusch, 2004).

#### 2.4.4 Celični cikel in rast korenin

Celična delitev in rast celic v apikalnem meristemu korenine sta ključna procesa, ki sta odgovorna za koreninsko rast (Cosgrove, 1997, v Soltys idr., 2012). Zaviranje celičnih delitev vodi v manjšo rast korenin, četudi nič ne učinkuje na celično rast (Ding, Qi, Jing, Li, Wang in Wang, 2008).

Alelopatski učinek je najbolj opazen kot inhibicija kalitve in rasti korenin ter poganjkov. Inhibicija rasti korenin je lahko povezana z zmanjšanim številom celičnih delitev v vršičku korenine (Anaya in Pelayo-Benavides, 1997). Oba procesa, delitev in rast celic, sta nadzorovana z rastlinskimi hormoni avksini in etilenom (Cho idr., 2007, v Soltys idr., 2012). Zato je hormonalno ravnovesje pomembno za nemoteno rast korenin. S citokinini tretirana črna kumina in čebula sta imeli daljše korenine in višji mitotski indeks delečih celic apikalnega meristema korenin od kontrolnih rastlin. Poleg višjega mitotskega indeksa so opazili tudi abnormalnosti v delečih celicah. (El-Ghamery in Mousa, 2017).

Delovanje alelopatije so veliko raziskovali na različnih rastlinskih vrstah, malo pa se ve o delovanju alelopatije na celični ravni (Soltys idr., 2012).

Cinamid je biološko aktiven sekundarni metabolit kuštrave grašice (*Vicia villosa*). Tretiranje paradižnika z njim je zavrlo rast korenin, ki se je ujemala s spremembo v delitvi celic in spremembami koncentracije etilena in avksina v koreninah. Soltys idr. (2012) so ugotovili, da se zaradi drugačnega izražanja genov ravnovesje rastlinskih hormonov v koreninah spremeni, zato pride do motnje celičnih delitev in posledično zmanjšane rasti korenin.



## 2.5 VRTNA REDKVICA (*Raphanus sativus*)

Vrtna redkvice (*Raphanus sativus* L.) spada v družino križnic (*Brassicaceae*). Semena vrtno redkvice dobro kalijo in kalice hitro rastejo. Križnice so pogosto uporabljene v toksikoloških raziskavah in raziskavah, povezanih z alelopatijo (Dolenc Koče in Šoln 2017; Tucker Serniak, 2015).

## 3. MATERIALI IN METODE

Praktični del diplomske naloge je obsegal kalitev semen vrtno redkvice, merjenje dolžine korenin, fiksacijo in barvanje korenin, pripravo mikroskopskih preparatov, analizo mikroskopskih preparatov in statistično obdelavo podatkov.

### 3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Za raziskavo smo uporabili vrtno redkvico (*Raphanus sativus* L.) var. Saxa 3 (Semenarna Ljubljana).

5 % izvleček iz listov in korenin japonskega dresnika je bil pripravljen v predhodni raziskavi (Osolnik, 2017).

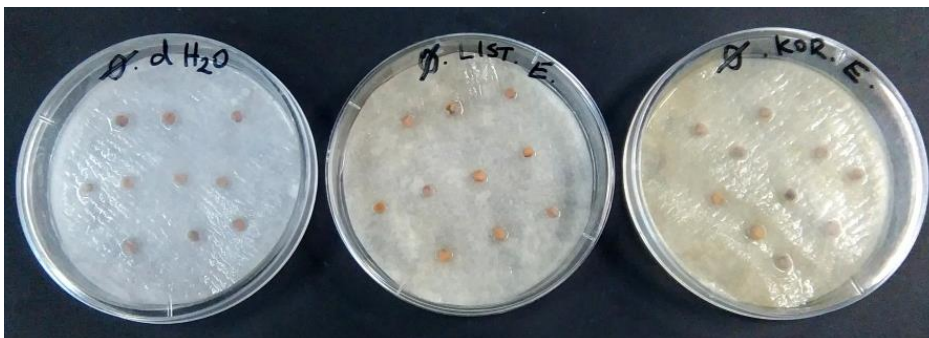
### 3.2 KALITEV IN MERJENJE DOLŽINE KORENIN

Material:

- 15 petrijevk premera 7 cm
- filtrirni papir
- kapalke
- milimetrski papir
- skalpel
- pinceta
- fiksativ etanol:ocetna kislina 3:1 (v/v)
- 5 % izvleček iz listov japonskega dresnika
- 5 % izvleček iz korenin japonskega dresnika
- destilirana voda
- 150 semen vrtno redkvice

V 15 petrijevk smo na filter papir položili po 10 semen vrtno redkvice. Pripravili smo tri skupine vzorcev: semena, ki so bila zalita z vodo, so bila kontrolni vzorec (5 petrijevk), drugi vzorec so bila semena, zalita s 5 % izvlečkom iz korenin japonskega dresnika (5 petrijevk) in tretji vzorec semena, zalita s 5 % izvlečkom iz listov japonskega dresnika (5 petrijevk).

Na filtrirni papir v petrijevki smo prilili 3 mL in naknadno še 2 mL vode oz. ustreznega izvlečka. Peti dan kalitve smo dodatno navlažili filtrirni papir v petrijevkah z 1 mL ustrezne tekočine.



Slika 3: Razporeditev semen v petrijevki treh skupin vzorcev: kontrola, listni izvleček, koreninski izvleček (od leve proti desni).

Od tretjega do sedmega dne smo vsak dan analizirali po eno petrijevko iz vsake skupine vzorcev. Prešteli smo število semen, ki so skalila in s pomočjo milimetrskega papirja izmerili dolžino korenin. Prvi centimeter vsake korenine smo s skalpelom odrezali in vršiček fiksirali v mešanici etanol:ocetna kislina 3:1 (v/v).

Koreninske vršičke v fiksativu smo shranili v hladilniku pri 4 °C.

### 3.3 BARVANJE PO FEULGENU

Za pripravo mikroskopskih preparatov smo fiksirane vršičke barvali po standardnem postopku za barvanje DNA (Dolenc Koce, 2001).

Material:

- vodna kopel
- pipeta
- 5 N HCl
- Feulgenov reagent
- kalijev metabisulfid ( $K_2S_2O_5$ )
- 5 M HCl
- destilirana voda

Vzorcem, ki so bili shranjeni v fiksativu pri 4 °C, smo fiksativ odpipetirali in dodali destilirano vodo. Po petih minutah smo vodo odpipetirali in dodali kalibrirano 5 N HCl. Vzorce smo za 60 minut postavili v vodno kopel pri 20 °C. Po eni uri smo HCl odstranili in dodali hladno destilirano vodo za 5 minut, da smo hidrolizo ustavili.

Vzorcem smo dodali Feulgenov reagent in vzorce pustili 2 uri pri 20 °C oziroma čez noč pri 4 °C, da se je DNA obarvala.

Za odstranjevanje prebitnega barvila smo pripravili mešanico imenovano  $SO_2$  – voda. Za 100 mL raztopine smo natehtali 0,5 g  $K_2S_2O_5$  ter dodali 1 mL 5 M HCl in 99 mL

destilirane vode. Spiranje s SO<sub>2</sub> – vodo smo ponovili 4-krat in sicer smo obarvane korenine dvakrat spirali po 2 min, enkrat 10 min in enkrat 20 min. Po zadnjem spiranju smo vzorce dali v destilirano vodo v hladilnik. Tako so lahko počakali tudi čez noč na pripravo mečkancev.

### 3.4 PRIPRAVA IN ANALIZA MIKROSKOPSKIH PREPARATOV

Material:

- svetlobni mikroskop (1000-kratna povečava; Olympus CH-2)
- objektna in krovna stekelca
- preparirna igla
- skalpel
- 45 % očetna kislina
- 96 % etanol
- suhi led (CO<sub>2</sub> v trdnem agregatnem stanju)
- britvica
- stojalo za sušenje preparatov

Vršiček korenine smo vzeli iz destilirane vode in ga za 5–10 minut namočili v 45 % očetni kislini, da se je tkivo zmehčalo. Nato smo s skalpelom odrezali le najbolj obarvan končni del vršička (pribl. 1 mm), ki predstavlja apikalni meristem korenine. Vršiček smo prenesli v kapljico očetne kisline na objektnem steklu in ga prekrili s krovnim stekelcem. S pomočjo preparirne igle in s palcem smo pritiskali na krovno stekelce, pod katerim je bilo rastlinsko tkivo tako, da so se celice razporedile v eno plast. Sproti smo preverjali, da so jedra dobro vidna in da se ne prekrivajo. Preparate smo zamrzili na suhem ledu. S pomočjo britvice smo odstranili krovno stekelce in preparat dehidrirali v 96 % etanolu za 2 minuti in posušili na zraku v temi.

Za posamezen dan vzorčenja smo za vsako skupino vzorcev poskušali pripraviti po 5 preparatov. Zaradi majhne kalivosti ali izgube vršička smo ponekod lahko pripravili le 2–4 preparate. Tako je bilo končno število izdelanih preparatov 56. Preparate smo hranili v temi v škatlah, saj Feulgenovo barvilo na svetlobi razpada.

Analiza mikroskopskih preparatov je potekala s pomočjo svetlobnega mikroskopa. Uporabili smo imerzijski objektiv s 1000-kratno povečavo. Na vsakem preparatu smo analizirali okoli 1000 jeder in določili število nedelečih jeder (interfaza) ter število jeder v različnih fazah celične delitve (profaza, metafaza, anafaza in telofaza). Iz preštetihih jeder smo izračunali mitotski indeks (MI) za posamezen preparat (formula 1). Mitotski indeks smo izrazili v odstotkih (%).

$$MI = \frac{\text{število delečih celic}}{\text{število vseh celic}}$$

### 3.5 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

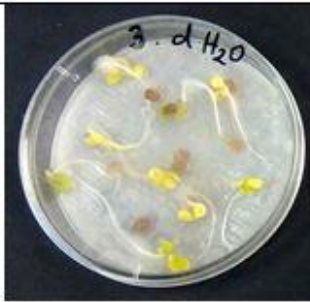


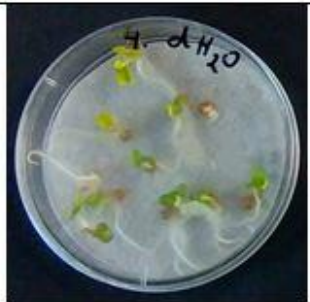











Dobljene podatke smo s pomočjo računalniškega programa Microsoft Excel statistično obdelali.

Za posamezno skupino vzorcev smo za vsak dan izračunali odstotek kalitve, povprečno vrednost dolžine korenin in mitotskega indeksa, standardni odklon in standardno napako. Vzorce smo primerjali s  $t$ -testom, pri čemer smo kot statistično pomembne razlike upoštevali tiste, kjer je bila vrednost  $p \leq 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1 KALITEV IN DOLŽINA KORENINE

Semena vrtno redkvice smo zalivali z listnim in koreninskim izvlečkom japonskega dresnika. Zanimalo nas je, ali izvlečka vplivata na rast korenin vrtno redkvice. Na sliki 4 so zbrane fotografije petrijevk, ki smo jih vzorčili. Že iz samih fotografij je razvidno, da je bila zaradi delovanja izvlečkov zmanjšana tako kalivost semen kot dolžina korenin.

Tretma	Voda	Listni izvleček	Koreninski izvleček
Dan vzorčenja	3 	3. LIST. E. 	3. KOR. E. 
	4 	4. LIST. E. 	4. KOR. E. 
	5 	5. LIST. E. 	5. KOR. E. 
	6 	6. LIST. E. 	6. KOR. E. 
	7 	7. LIST. E. 	7. KOR. E. 

Slika 4: Kalice vrtno redkvice po tretmaju z vodo, listnim in koreninskim izvlečkom japonskega dresnika od tretjega do sedmega dne kalitve.

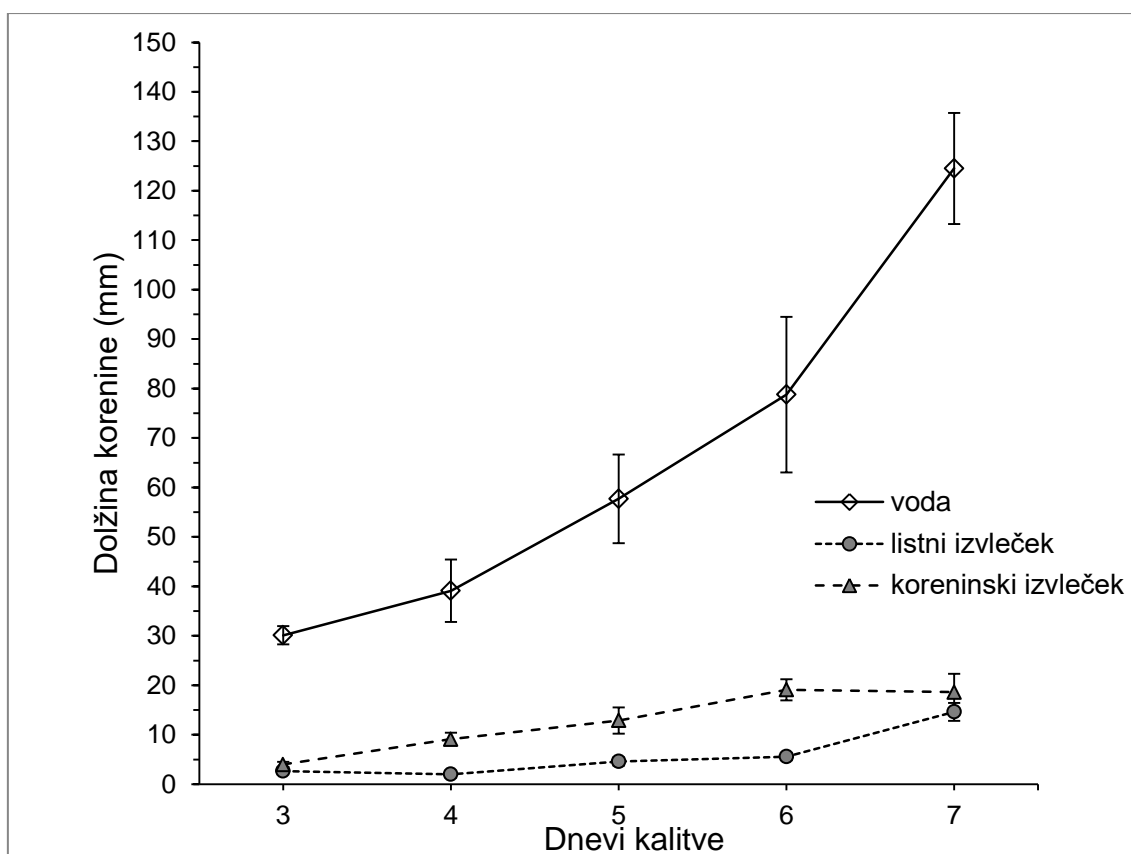
V kontrolnem vzorcu, ki je bil zalit z destilirano vodo, je v enem tednu v povprečju vzkalilo 92 % semen (pregl. 1). Nekoliko slabša je bila kalivost kontrole šesti (90 %) in sedmi dan (80 %). Podobna - 94 % povprečna kalivost je bila pri semenih, zalivanih s koreninskim izvlečkom. Koreninski izvleček torej ni vplival na kalivost. Semena, ki smo jih zalivali z listnim izvlečkom, so kalila zakasnjeno. Do tretjega dne je bila kalivost 40 %, do sedmega dne pa je skalilo 90 % semen, kar je primerljivo z ostalima tretmajema ob koncu poskusa.

Preglednica 1: *Delež kalivosti (%) po tretmaju z vodo ter listnim in koreninskim izvlečkom japonskega dresnika od tretjega do sedmega dne kalitve.*

Tretma	Delež kalivosti po dnevih kalitve (%)				
	3. dan	4. dan	5. dan	6. dan	7. dan
Kontrola	90	100	100	90	80
Listni izvleček	40	50	60	80	90
Koren. izvleček	90	90	90	100	100

Statistična obdelava s t – testom kaže, da je razlika v kalivosti semen med kontrolo in listnim izvlečkom statistično značilna ( $p=0,0232$ ). Koreninski izvleček na kalitev v primerjavi s kontrolo ni vplival ( $p=0,6666$ ). Razlika med listnim in koreninskim izvlečkom je bila statistično značilna ( $p=0,0141$ ).

Med tretjim in sedmim dnem smo vsak dan izmerili dolžino korenine pri vsaki kalici iz ene petrijevke. Rezultati dolžin za posamezno skupino so prikazani na sliki 5 in v preglednicah (priloga 1–3).



Slika 5: Dolžina korenin od tretjega do sedmega dne kalitve po tretmaju z vodo, listnim in koreninskim izvlečkom japonskega dresnika. Prikazane so povprečne vrednosti  $\pm$  SN ( $N=4-10$ ).

Pri kontrolni skupini so korenine zadnji dan dosegle v povprečju 124,5 mm. Pri listnem izvlečku je bila rast korenin precej manjša. Dolžina korenin je v sedmih dneh rasti dosegla le 14,6 mm, kar predstavlja 11,8 % dolžine kontrole. Tudi korenine, zalite s koreninskim izvlečkom, so bile krajše od kontrolnih, saj so dosegle le 14,9 % kontrolne dolžine in bile torej podobno kratke kot korenine, tretirane z listnim izvlečkom japonskega dresnika.

Preglednica 2: Rezultati statistične analize t-test za primerjavo dolžine korenin po tretmaju z vodo, listnim in koreninskim izvlečkom japonskega dresnika.

primerjava dolžine korenin	t-test po dnevih kalitve (vrednost p)				
	3.dan	4.dan	5.dan	6.dan	7.dan
voda-list. izvleček	$9,87 \times 10^{-7}$	$1,52 \times 10^{-3}$	$5,11 \times 10^{-4}$	$5,58 \times 10^{-4}$	$4,63 \times 10^{-8}$
voda-koren. izvleček	$2,90 \times 10^{-10}$	$3,82 \times 10^{-4}$	$2,77 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^{-3}$	$3,63 \times 10^{-8}$
listni-koren. izvleček	0,1581	<b>0,0047</b>	<b>0,0319</b>	<b>0,0001</b>	0,5672

Opombe: Krepka pisava za statistično značilne razlike ( $p \leq 0,05$ ).

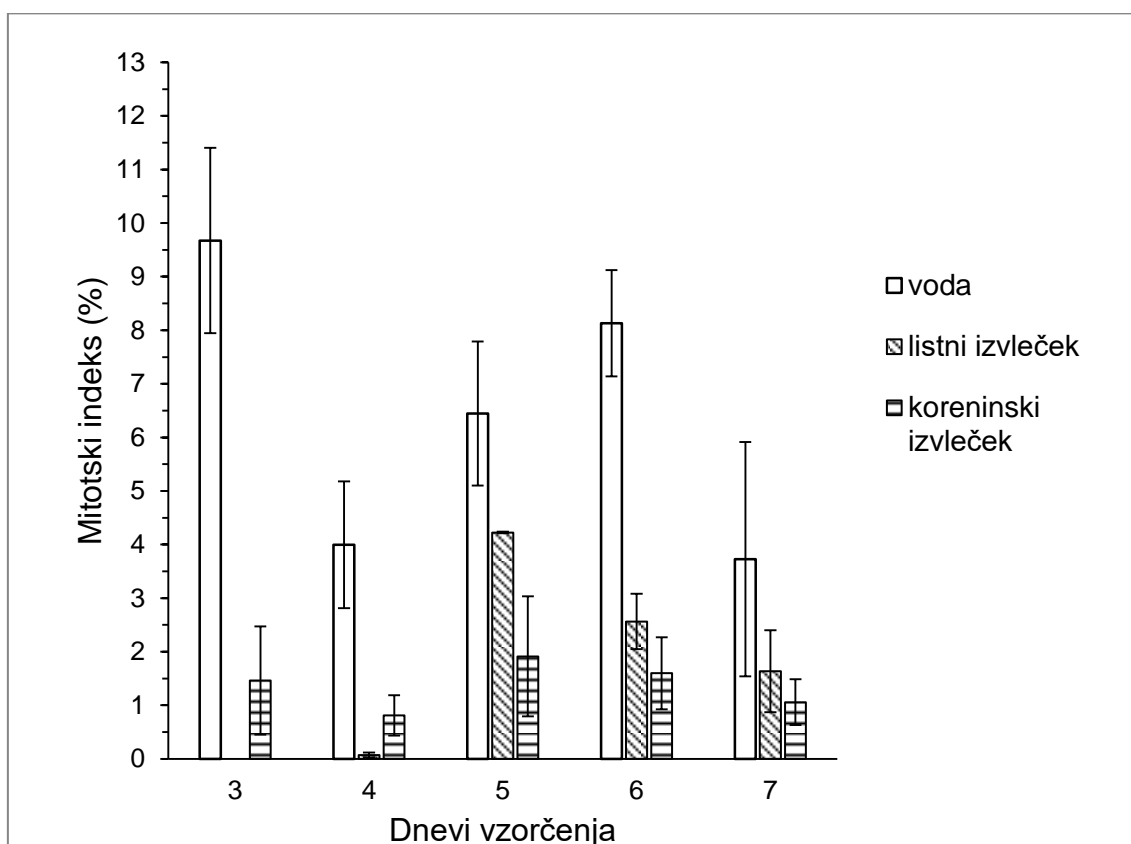
Analiza rezultatov s t-testom kaže, da so bile razlike v dolžini korenin, ki so bile zalite tako z listnim kot koreninskim izvlečkom, statistično značilne, v primerjavi s kontrolno



skupino (pregl. 2). Prav tako so bile statistično pomembne razlike v dolžini korenin med listnim in koreninskim izvlečkom četrsti, peti in šesti dan kalitve, kar je posledica zakasnjene kalitve semen, ki smo jih zalili z listnim izvlečkom. Zadnji, 7. dan, razlika ni bila več statistično značilna.

#### 4.2 MITOTSKI INDEKS V KORENINSKEM VRŠIČKU

V koreninskih vršičkih vrtno redkvice, ki smo jih zalivali z vodo ter listnim in koreninskim izvlečkom japonskega dresnika, smo izračunali mitotski indeks. Zanimalo nas je, ali izvlečka vplivata na celične delitve v apikalnem meristemu korenine. Na vsakem preparatu obarvanih jader koreninskega vršička smo prešteli okoli 1000 jeder, ki smo jih delili glede na to, ali so v fazi mitoze ali interfazi. Izračunane mitotske indekse v odstotkih smo predstavili v sliki 6 in preglednicah (priloga 4-6).



Slika 6: Mitotski indeks od tretjega do sedmega dne kalitve po tretmaju z vodo, listnim in koreninskim izvlečkom japonskega dresnika. Prikazane so povprečne vrednosti  $\pm$  SN ( $N=2-5$ ).

V povprečju je mitotski indeks kontrolnih vzorcev znašal okoli 6,4 %, medtem ko je bil mitotski indeks v koreninah, zalitih z listnim izvlečkom, le okoli 1,7 % in v koreninah, zalitih s koreninskim izvlečkom, okoli 1,4 %. Pri tretmajih z izvlečki japonskega dresnika je bil mitotski indeks do 79 % nižji od kontrolnega vzorca. Tudi rezultati mitotskega indeksa kažejo na zakasnjeno kalitev pri vzorcih, tretiranih z listnim izvlečkom, saj tretji dan delitev sploh ni bilo, četrsti dan pa so bile zelo redke ( $MI_{4,dan/listi} = 0,07 \pm 0,1$  %) (priloga 5). V naslednjih dneh je število delečih se celic naraslo, vendar



ostalo nižje od kontrolne skupine. Pri koreninskih izvlečkih do zakasnitve celičnih delitev ni prišlo, saj tudi kalitev ni bila zakasnjena (priloga 6).

Statistična analiza s t-testom je pokazala, da tako koreninski kot listni izvleček v primerjavi s kontrolo statistično značilno zmanjšata mitotski indeks tretji, četrti in šesti dan (pregl. 3). Korenine, zalite z vodo, imajo tako značilno več celičnih delitev kot korenine, zalite z izvlečkoma japonskega dresnika.

O razliki med listnimi in koreninskimi izvlečki glede na mitotski indeks pa ne moremo govoriti, saj razlike med njima niso bile statistično pomembne (pregl. 3).

Preglednica 3: Rezultati statistične analize t-test za primerjavo mitotskega indeksa po tretmaju z vodo, listnim in koreninskim izvlečkom japonskega dresnika.

primerjava dolžine korenin	t-test po dnevih kalitve (vrednost p)				
	3. dan	4. dan	5. dan	6. dan	7. dan
voda-listni izvleček	<b>0,001</b>	<b>0,011</b>	0,241	<b>0,001</b>	0,401
voda-koren. izvleček	<b>0,014</b>	<b>0,033</b>	0,073	<b>0,002</b>	0,276
listni-koren. izvleček	0,144	0,101	0,241	0,283	0,534

Opombe: Krepka pisava za statistično značilne razlike ( $p \leq 0,05$ ).

## 5. RAZPRAVA

Japonski dresnik je postal močno invazivna vrsta v Evropi, zato so v povezavi z njim začeli izvajati mnoge raziskave, da bi ugotovili razlog za tako uspešno razširjanje in prevlado nad avtohtonim rastjem.

Poleg hitrega tvorjenja sklenjenih, gostih sestojev, kjer ni prostora za uspevanje drugih rastlin, in nespolnega razmnoževanja z razraščanjem korenin, pripomore k uspešnosti tudi alelopatski učinek, ki ga imajo sekundarni metaboliti, ki se nahajajo v vseh delih rastline (Anaya in Pelayo-Benavides, 1997). Vsebnost potencialno alelopatskih snovi se v nad- in podzemnih delih dresnika razlikuje. Tako kvalitativno kot kvantitativno (Verchotova, Šera in Triska, 2007). V diplomski nalogi smo raziskovali, ali se vplivi izvlečkov iz listov in korenin japonskega dresnika razlikujejo, če z njimi tretiramo semena vrtna redkvice.

V prvem delu raziskave, kjer smo preverjali alelopatske učinke japonskega dresnika, smo opazovali kalitev semen in dolžino korenin vrtna redkvice, tretirane z različnimi izvlečki japonskega dresnika.

Koreninski izvleček na kalivost ni vplival, saj so tretirana semena dosegla kalivost popolnoma primerljivo s kontrolo. Kalitev semen, zalitih z izvlečkom listov japonskega dresnika, je bila zakasnjena. Do razlik je prišlo 3., 4. in 5. dan, 6. in 7. dan pa statistično pomembnih razlik med kontrolo in listnim izvlečkom ni bilo več.

Podobne rezultate so znanstveniki dobili že v predhodnih raziskavah. Tako so Vrchotova in Šera (2012) in Murrell idr. (2011) ugotovili, da so na zmanjšano kalivost semen bolj vplivali ekstrakti nadzemnih delov japonskega dresnika ter da so izvlečki korenin dresnika vplivali na zakasnjeno rast rastlin oz. avtohtonega rastja, ne pa na kalivost (Murrell idr. 2011).

V naši raziskavi smo ugotovili, da listni in koreninski izvlečki japonskega dresnika zavirajo rast korenin vrtno redkvice. Korenine kontrolnih kalic so neprekinjeno rasle med celotno gojitvijo. Od tretjega do sedmega dne se je dolžina korenin povečala iz 30,1 mm na 124,5 mm. Korenine tretiranih kalic so bile opazno krajše kot korenine kontrolnih. Kalice, zalite s 5 % listnim izvlečkom japonskega dresnika, so dosegle 11,8 % kontrolne vrednosti, medtem ko so kalice, zalite s 5 % koreninskim izvlečkom japonskega dresnika, dosegle 14,9 % dolžine v primerjavi s koreninami kontrolne skupine. Večino časa so bile opazne tudi razlike med obema vrstama izvlečkoma, verjetno zaradi zakasnjene kalivosti, ki jo je povzročilo tretiranje semen z listnim izvlečkom japonskega dresnika.

Značilno zmanjšane korenine v primerjavi s kontrolo je potrdil tudi Tucker Serniak (2015), ki je semena vrtno redkvice zalival z resveratrolom, emodinom in epikatehinom; tj. alelopatskimi spojinami, ki se v večjih koncentracijah pojavljajo v podzemnih delih dresnika.

Ker je alelopatski učinek najbolj opazen kot inhibicija kalitve in rasti korenin ter poganjkov, smo v drugem delu raziskave preverjali, ali je inhibicija rasti korenin lahko povezana z zmanjšanim številom celičnih delitev v vršičku korenine, kot to navaja Anaya in Pelayo-Benavides (1997).

Število celičnih delitev v apikalnem meristemu korenin vrtno redkvice smo opisali z mitotskim indeksom. Mitotski indeks celic koreninskega vršička kontrolne skupine ni bil konstanten tekom eksperimenta. Rezultati so pokazali, da je vrednost mitotskega indeksa tretiranih vzorcev v primerjavi s kontrolo do 79 % nižja. Torej listni in koreninski izvleček japonskega dresnika zmanjšata celične delitve v vršičku korenine. O razlikah med mitotskim indeksom zaradi različnega delovanja koreninskega in listnega izvlečka pa ne moremo govoriti.

Soltys idr. (2011; 2012) so prav tako zabeležili povezavo med zmanjšano rastjo korenin in nižjim odstotkom deležih se celic v koreninskem vršičku, pri tretiranju paradižnika oziroma čebule z rastlinskim hormonom cinamidom.

Na podlagi rezultatov lahko zaključimo, da izvleček iz listov japonskega dresnika bolj zavira kalitev in rast korenin kot izvleček iz korenin. Oba tudi zavirata celične delitve, vendar razlike med njunim delovanjem niso pomembne.

### 5.1 SKLEPI

Izvlečki iz korenin in listov japonskega dresnika zmanjšajo rast korenin in celične delitve pri vrtni redkviči.

Izvleček iz listov japonskega dresnika vpliva na zakasnjeno kalivost semen, medtem ko izvleček iz korenin na kalivost nima vpliva.

Izvleček iz listov japonskega dresnika bolj zavira rast korenin kot izvleček iz korenin.

Med izvlečkoma ni pomembne razlike pri zmanjšanem mitotskem indeksu v koreninskem vršičku.

## 6. LITERATURA

- Anaya, A. L., Pelayo-benavides, H.R. (1997). Allelopathic potential of *Mirabilis jalapa* L.(Nyctaginaceae): Effects on germination, growth and cell division of some plants. *Allelopathy Journal*, 4(1), 57-68.
- Bačič, M., Bordjan, D., Brancelj, A., Čas, M., De Groot, M., Gogala, A., ... Zelnik, I. (2013). Neobiota Slovenije, končno poročilo projekta. Pridobljeno s <http://www.bioportal.si/neobiota/CRPNeobiota%20Slovenije%20Zbornik%201%20Uvod.pdf>.
- Bergfeld, A., Bergmann, R., Sengbusch P. (2003). Cytology: Meiosis, Fertilization, Karyokinesis, Cytokinesis, The Chromosome Theory of Inheritance (Part I). V A. Bergfeld (ur.), *Botany online*. Hamburg: University of Hamburg, pridobljeno s <http://www1.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e00/contents.htm>.
- Dermastia, M. (2007). *Pogled v rastline*. Ljubljana: Nacionalni inštitut za biologijo.
- Ding, L., Qi, L., Jing, H., Li, J., Wang, W. in Wang, T. (2008). Phytotoxic Effects of Leukamenin E (an *ent*-kaurene diterpenoid) on Root Growth and Root Hair Development in *Lactuca sativa* L. seedlings. *J Chem Ecol.* 34, 1492-1500.
- Dolenc Koce, J. (2001). Ugotavljanje variabilnosti količine jedrne DNA pri standardnih rastlinskih vrstah in morskih kritosemenkah s slikovno citometrijo (Doktorska disertacija). Biotehniška fakulteta, Ljubljana.
- Dolenc Koce, J. (2016). The effects of leaf extracts of crack willow (*Salix fragilis*) on the growth of Japanese knotweed (*Fallopia japonica*). *Acta Biologica Slovenica*, 59 (1), 13-21.
- Dolenc Koce, J. in Strgulc Krajšek, S. (2015). Sexual reproduction of knotweed (*Fallopia* sect. *Reynoutria*) in Slovenia. *Preslia* 87, 17–30.
- Dolenc Koce, J. in Šoln, K. (2017). Phytotoxic effects of *Fallopia japonica* and *F. × bohemica* leaves. *Phyton*. V tisku
- El-Ghamery, A. A. in Mousa, M. A. (2017). Investigation on the effect of benzyladenine on the germination, radicle growth and meristematic cells of *Nigella sativa* L. and *Allium cepa* L.. *Annals of Agricultural Sciences*: 62(1),11-21.
- Fan, P., Hostettmann, K. in Lou, H. (2010) Chemical variability of the invasive neophytes *Polygonum cuspidatum* and *P. sachalensis*. *Biochemistry and Systematic Ecology*, 37, 24-34.
- Frajman, B. (2008). Japonski dresnik *Fallopia japonica*, Informativni list 1. Pridobljeno 12.4.2017, s <http://www.tujerodne-vrste.info/wp-content/uploads/2016/11/INF1-japonski-dresnik.pdf>
- Hierro, J. L. in Callaway, R. M. (2003). Allelopathy and exotic plant invasion. *Plant*

*and soil*, 256(1), 29-39.

- Jagodič, E. (2014). *Dnevne spremembe mitotskega indeksa v koreninskih vršičkih kalečih semen boba (Vicia faba L.)* (Diplomsko delo). Biotehniška fakulteta, Ljubljana.
- Kus Veenvliet, J. (2016). *Japonski dresnik*. Pridobljeno 28.7.2017, s <http://tujerodne-vrste.info/japonski-dresnik/>.
- Kus Veenvliet, J., Veenvliet, P., Bačič, T., Frajman, B., Jogan, N., Lešnik, M. in Kebe, L. (2009). *Tujerodne vrste, priročnik za naravovarstvenike*. Pridobljeno s [http://www.tujerodne-vrste.info/wp-content/uploads/2016/11/Tujerodne\\_vrste\\_prirocnik.pdf](http://www.tujerodne-vrste.info/wp-content/uploads/2016/11/Tujerodne_vrste_prirocnik.pdf)
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S. in De Poorter, M. (2000). 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the global invasive species database. Pridobljeno s <http://rewilding.org/rewildit/images/IUCN-GISP.pdf>
- Macias, F. A., Marin, D., Oliveros-Bastidas, A., Varela, R. M., Simonet, A. M., Carrera, C. in Molinillo, J. M. J. (2003). Allelopathy as a new strategy for sustainable ecosystems development. *Biological Sciences in Space*, 17(1), 18-23.
- Moravcová, L., Pyšek, P., Jaroší, K V. in Zákavský P. (2011). Potential phytotoxic and shading effects of invasive *Fallopia* (Polygonaceae) taxa on the germination of dominant native species. *NeoBiota*, 9, 31-47.
- Murrell, C., Gerber, E., Krebs, C., Parepa, M., Schaffner, U. in Bossdorf O. (2011). Invasive knotweed affects native plants through allelopathy. *American Journal of Botany*, 98(1), 38-43.
- Osolnik, T. (2017). *Vpliv izvlečka iz listov in korenin japonskega dresnika na celično delitev pri čebuli* (Diplomsko delo). Pedagoška fakulteta, Ljubljana.
- Rizvi, S. J. H. in Rizvi, V. (1992). *Allelopathy: Basic and applied aspects*. London: Chapman & Hall.
- Sinkovič, T. (2008). Mitoza in celični cikel pri višjih rastlinah. *Acta agriculturae Slovenica*, 9(2), 465-477.
- Soltys, D., Rudzińska-Langwald, A., Gniazdowska, A., Wisniewska, A. in Bogatek, R. (2012). Inhibition of tomato (*Solanum lycopersicum L.*) root growth by cyanamide is due to altered cell division, phytohormone balance and expansin gene expression. *Planta*, 236(5), 1629-1638.
- Soltys, D., Rudzińska-Langwald, A., Kurek, W., Gniazdowska, A., Sliwiska, E. in Bogatek, R. (2011). Cyanamide mode of action during inhibition of onion (*Allium cepa L.*) root growth involves disturbances in cell division and cytoskeleton formation. *Planta*, 234(83), 609-621.

Strgulc Krajšek, S. in Jogan, N. (2011). *Rod Fallopia Adans. v Sloveniji. Hladnika*, 28, 17-40.

Tucker Serniak, L. (2015). Comparison of the allelopathic effects and uptake of *Fallopia japonica* phytochemicals by *Raphanus sativus*. *Weed research Society*, 56, 97-101.

Vrchotova, N. in Šera, B. (2008). Allelopathic properties of knotweed rhizome extracts. *Plant and Soil Environment*, 54, 301-303.

Vrchotova, N., Šera, B. in Triska, J. (2007). The stilbene and catechin content of the spring sprouts of Reynoutria species. *Acta chromatographica*, 19, 21-28.

## **ZAHVALA**

Velika zahvala gre mentorici doc. dr. Jasni Dolenc Koce, za vso pomoč in podporo pri nastajanju diplomskega dela.

Hvala sestri Vidi, za pomoč pri zbiranju podatkov in moji stari mami, za družbo v času nočnega pisanja diplomske naloge.

Hvala vsem, ki ste mi stali ob strani v času mojega študija – še posebej družini, Jakobu in cimram.

## PRILOGE

Priloga 1: Dolžina kontrolnih korenin (mm) od tretjega do sedmega dne kalitve.

Vzorec	Dolžina korenine po dnevih kalitve (mm)				
	3. dan	4. dan	5. dan	6. dan	7. dan
1	32	24	42	65	175
2	23	30	34	86	132
3	28	45	70	150	149
4	24	40	114	85	125
5	29	32	41	145	90
6	30	66	42	81	75
7	29	71	102	62	115
8	41	52	37	30	135
9	35	25	50	5	
10		6	45		
P	30,11	39,10	57,70	78,78	124,50
SD	5,49	20,00	28,41	47,23	31,73
SN	1,83	6,32	8,99	15,74	11,22
N	9	10	10	9	8

Oznake: P – povprečje, SD – standardni odklon, SN – standardna napaka, N – število kalic.

Priloga 2: Dolžina korenin (mm) po tretmaju z listnim izvlečkom japonskega dresnika od tretjega do sedmega dne kalitve.

Vzorec	Dolžina korenine po dnevih kalitve (mm)				
	3.dan	4.dan	5.dan	6.dan	7.dan
1	3	5	6	6	27
2	3	4	6	9	15
3	3	2	2	5	20
4	2	1	5	3	23
5		1	7	7	15
6			3	5	5
7				4	15
8				6	11
9					13
10					
P	2,67	2,00	4,60	5,57	14,63
SD	0,58	1,41	2,07	1,99	5,45
SN	0,29	0,63	0,85	0,70	1,82
N	4	5	6	8	9

Oznake: P – povprečje, SD – standardni odklon, SN – standardna napaka, N – število kalic



Priloga 3: Dolžina korenin (mm) po tretmaju s koreninskim izvlečkom japonskega dresnika od tretjega do sedmega dne kalitve.

Vzorec	Dolžina korenine po dnevih kalitve (mm)				
	3.dan	4.dan	5.dan	6.dan	7.dan
1	3	11	8	22	18
2	4	10	21	15	18
3	7	16	4	21	15
4	3	10	4	28	3
5	6	12	6	25	35
6	4	9	20	27	15
7	4	6	23	13	37
8	3	4	10	15	30
9	2	4	20	18	7
10				7	8
P	4,00	9,11	12,89	19,10	18,60
SD	1,58	3,92	7,96	6,72	11,81
SN	0,53	1,31	2,65	2,13	3,73
N	9	9	9	10	10

Oznake: P – povprečje, SD – standardni odklon, SN – standardna napaka, N – število kalic

Priloga 4: Mitotski indeks (%) v kontrolni skupini od tretjega do sedmega dne kalitve.

številka preparata	Mitotski indeks po dnevih kalitve (%)				
	3.dan	4.dan	5.dan	6.dan	7.dan
1	14,22	1,81	5,10	10,97	8,39
2	10,25	5,88	7,79	8,02	6,52
3	6,15	4,30		6,92	0,00
4	8,08			6,61	0,00
5					
P	9,68	4,00	6,45	8,13	3,73
SD	3,46	2,05	1,90	1,99	4,37
SN	1,73	1,18	1,35	0,99	2,19
N	4	3	2	5	4

Oznake: P – povprečje, SD – standardni odklon, SN – standardna napaka, N – število preparatov

Priloga 5: *Mitotski indeks (%) po tretmaju z listnim izvlečkom japonskega dresnika od tretjega do sedmega dne kalitve.*

številka preparata	Mitotski indeks po dnevih kalitve (%)				
	3.dan	4.dan	5.dan	6.dan	7.dan
1	0,00	0,00	4,21	0,89	1,96
2	0,00	0,00	4,24	2,67	0,99
3	0,00	0,09		2,26	0,00
4	0,00	0,20		4,09	3,59
5				2,91	
P	0,00	0,07	4,23	2,56	1,64
SD	0,00	0,10	0,02	1,16	1,53
SN	0,00	0,05	0,02	0,52	0,76
N	4	4	2	5	4

Oznake: P – povprečje , SD – standardni odklon, SN – standardna napaka, N – število preparatov

Priloga 6: *Mitotski indeks (%) po tretmaju s koreninskim izvlečkom japonskega dresnika od tretjega do sedmega dne kalitve.*

številka preparata	Mitotski indeks po dnevih kalitve (%)				
	3.dan	4.dan	5.dan	6.dan	7.dan
1	0,00	0,48	0,00	0,00	0,80
2	3,40	1,77	0,00	3,06	1,98
3	0,99	0,00	3,37	1,07	1,45
4		0,99	4,28	2,26	
5					0
P	1,46	0,81	1,91	1,60	1,06
SD	1,75	0,76	2,24	1,34	0,85
SN	1,01	0,38	1,12	0,67	0,43
N	3	4	4	4	4

Oznake: P – povprečje , SD – standardni odklon, SN – standardna napaka, N – število preparatov