

UNIVERZA V LJUBLJANI
PEDAGOŠKA FAKULTETA

Študijski program: Kemija in biologija

Kramar Saša

Mentorica: doc. dr. Jasna Dolenc Koce

VPLIV IZVLEČKOV VRBE NA FOTOSINTEZNA BARVILA V JAPONSKEM
DRESNIKU (*Fallopia japonica*)

DIPLOMSKO DELO

Ljubljana, 2014

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

DK

KG invazivne tujerodne vrste /japonski dresnik /*Fallopia japonica* /vrba /
spektrofotometrija /fotosintezni pigmenti / masa

AV KRAMAR, Saša

SA DOLENC KOCE, Jasna (mentorica)

KZ SI-1000 Ljubljana, Kardeljeva ploščad 16

ZA Univerza v Ljubljani, Pedagoška fakulteta, Biotehniška fakulteta

LI 2014

IN VPLIV IZVLEČKOV VRBE NA FOTOSINTEZNA BARVILA V JAPONSKEM
DRESNIKU (*Fallopia japonica*)

TD Diplomsko delo

OP V, 29 str., 3 pregl., 5 sl., 2 pril., 23 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI

Tako strokovnjaki kot laična javnost se vsako leto bolj zavedajo težav, ki jih prinašajo tujerodne vrste. Vedno bolj je potrebno iskati načine za zaviranje naseljevanja ali razširjanja tujerodnih vrst, saj so pri tem oškodovane naše, domorodne vrste. Tako je bil glavni cilj moje diplomske naloge ugotoviti ali izvleček krhke vrbe (*Salix fragilis*) vpliva na rast in razvoj japonskega dresnika (*Fallopia japonica*). V predhodni raziskavi so bile rastline japonskega dresnika zalivane z destilirano vodo ter 0,1 % in 1 % izvlečkom krhke vrbe, vodovodno in destilirano vodo. Iz vsake skupine rastlin sem vzela nekaj vzorcev listov in korenin in jih pripravila za spektrofotometrično merjenje. Izmerila sem koncentracije klorofila a, klorofila b in ksantofilov. V vsakem vzorcu sem stehtala še svežo in suho maso ter iz teh podatkov izračunala še količino vode. Iz dobljenih podatkov sem izračunala povprečje in standardni odklon, posamezne izpostavitve pa medsebojno primerjala še s Studentovim t-testom. Kljub temu, da stres zaradi spremenjenih rasti razmer se v rastlinah lahko povzroči različne biokemijske in fiziološke spremembe, v naši raziskavi vodni izvlečki vrbe niso vplivali na vsebnost fotosinteznih barvil in vode niti na maso rastlin.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ŠD Dn

DC

CX invasive alien species /japanese knotweed /*Fallopia japonica* /alelopaty /
spectrophotometry /photosintetic pigments / mass

AU KRAMAR, Saša

AA DOLENC KOCE, Jasna (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Kardeljeva ploščad 16

PB Univerza v Ljubljani, Pedagoška fakulteta, Biotehniška fakulteta

PY 2014

TI EFFECT OF SALIX EXTRACTS ON PHOTOSINTETIC PIGMENTS IN JAPANESE
KNOTWEED (*Fallopia japonica*)

DT Graduation Thesis

NO V, 29 p., 3 tab., 5 fig., 2 ann., 23 ref.

LA sl

AL sl/en

Every year, experts and laic community are more aware of the problems posed by non-native species. It is increasingly necessary to look for ways to inhibit the colonization or spread of non-native species, as they do not benefit our own native species. Thus, the main goal of my diploma thesis was to find out if the extract of brittle willow (*Salix fragilis*) affects the growth and development of Japanese knotweed (*Fallopia japonica*). In the previous study, the plants of Japanese knotweed were watered with 0.1 % and 1 % essence of aqueous extract of brittle willow and distilled water. I took some samples of leaves and roots from each group of plants and prepared them for spectrophotometric measurements. I measured the concentrations of chlorophyll a, chlorophyll b, and xanthophylls in each sample. I also measured the fresh and dry weight of the samples, and calculated the water from these data. I calculated the mean and standard deviation, and then further processed the results using Student's t-test. Despite stress is reflected in biochemical and physiological changes, in our thesis extract of brittle willow didn't reflect on Japanese knotweed.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	I
KEY WORDS DOCUMENTATION	II
KAZALO VSEBINE.....	III
KAZALO SLIK.....	IV
KAZALO PREGLEDNIC.....	V
1 UVOD	1
1.1 HIPOTEZE	1
2 GLAVNO BESEDILO	2
2.1 ALELOPATIJA.....	2
2.2 TUJERODNE VRSTE V SLOVENIJI.....	3
2.3 VRBE.....	6
2.4 JAPONSKI DRESNIK	6
2.5 FOTOSINTEZNA BARVILA	8
2.5.1 KLOOROFILI	8
2.5.2 KAROTENOIDI.....	9
2.6 STRES PRI RASTLINAH	9
2.7 SPEKTROFOTOMETRIJA	10
3 METODOLOGIJA	12
3.1 POSTOPEK PRAKTIČNEGA DELA	13
4 REZULTATI.....	15
5 RAZPRAVA IN SKLEP.....	21
6 LITERATURA	23
ZAHVALA.....	25
PRILOGE	26

KAZALO SLIK

Slika 1 : Narezani zamrznjeni koščki listov	13
Slika 2 : Homogenizacija vzorca z acetonom, kremenčevim peskom in Na ₂ SO ₄	13
Slika 3 : Filtriranje vzorca v merilni valj.	14
Slika 4 : Vsebnosti barvil (v mg/g sveže mase) pri rastlinah zalitih z destilirano vodo, vodovodno vodo, 1 % ekstraktom vrbe in 0,1 % ekstraktom vrbe. Z različnimi barvami so prikazane posamezne vrednosti za klorofil a, klorofil b in karotenoide.	18
Slika 5 : Delež vodne, suhe in seštevek obeh-sveže mase pri vzorcih zalivanih z različnimi koncentracijami vrbe.	19

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Končne vrednosti izračunanih barvil.....	16
Preglednica 2: Razporeditev vzorcev po številkah glede na tretma s katerim so bili v prejšnji raziskavi obdelani.....	17
Preglednica 3 : Primerjava sveže, suhe in vodne mase s t-testom glede na različne koncentracije izvlečka vrbe s katerimi so bile zalite.....	20

1 UVOD

Tujerodni organizmi so tisti, ki se k nam nenadzorovano ali nadzorovano širijo in s koeksistenco vplivajo na domorodne vrste. Ena izmed takih vrst je tudi japonski dresnik (*Fallopia japonica*). Vrsta je zelo trdovratna, saj njegova korenika brez težav preživi še tako neugodne razmere. Odstraniti ga poskušajo z različnimi mehanskimi in biološkimi metodami, pokrivanjem rastišča s folijo in kemičnimi metodami, vendar se nobena metoda še ni izkazala za popolnoma učinkovito. Pri uporabi kemičnih sredstev so pogosto opazne negativne posledice tudi na drugih vrstah in na celotnem ekosistemu (Laznik in Trdan, 2012). Ker so vrbe rastline za katere je znano alelopatsko delovanje in pogosto rastejo na revnih tleh, predvidevamo, da se pri metabolizmu vrb sproščajo metaboliti (predvsem sekundarni), ki imajo biološko aktivnost (Rizvi in Rizvi, 1992). Ker je bilo v naravi opaženo, da v bližini vrb japonski dresnik ne uspeva, smo želeli z laboratorijskimi raziskavami preveriti ali vrbe zavirajo rast japonskega dresnika. Cilj diplomske naloge je ugotoviti, ali ima krhka vrba alelopatski učinek na invazivno tujerodno vrsto japonski dresnik. To bomo preverjali na nivoju sveže in suhe mase in fotosinteznih pigmentov.

1.1 HIPOTEZE

Vrba ima alelopatski učinek na rastline. Pri mladih rastlinah japonskega dresnika, ki so bile zalivane z vodnim izvlečkom listov vrbe, se bodo pojavile spremembe v koncentraciji fotosinteznih pigmentov.

Krhka vrba zavira rast japonskega dresnika, zato se njegova masa zmanjša.

Spremembe v masi rastlin in v vsebnosti fotosinteznih pigmentov bodo večje pri višji koncentraciji vodnega izvlečka vrbe.

2 GLAVNO BESEDILO

2.1 ALELOPATIJA

Izraz alelopatija je sestavljen iz grških besed *allelon*, ki pomeni drug od drugega, in *pathos*, ki pomeni trpeti. Alelopatija je biološki pojav, pri katerem produkcija biomolekul, predvsem sekundarnih metabolitov ene rastline vpliva na rast drugih rastlin. Velikokrat sosednjim rastlinam škodi, lahko pa ima tudi koristne učinke. Fenomen lahko razumemo tudi kot biokemijsko povezavo med rastlinami. Biomolekule, ki jih največkrat poimenujemo kar alelopatske spojine (tudi alelokemikalije), ki jih ena rastlina proizvaja, pronicajo v okolje in postopoma vplivajo na rast in razvoj sosednjih rastlin in drugih organizmov. S pomočjo alelopatskih spojin lahko rastlina veliko pripomore k obrambi pred rastlinojedci. Znanje o pojavu alelopatije se je začelo razvijati vzporedno z razvojem agrikulture (Rizvi in Rizvi, 1992).

Kot sem že prej omenila so alelopatske spojine predvsem sekundarni metaboliti, ki imajo za rastline pomembno ekološko vlogo, saj olajšajo njihovo preživetje. Te sekundarne produkte lahko razdelimo v tri velike kateogrije: terpeni, fenoli in dušikove spojine. (Buchanan B. in Gruissem W, 2000). Alelopatske spojine višjih rastlin in mikroorganizmov so razdelili v naslednje kategorije: preproste organske kisline, ki so topne v vodi, alkoholi z ravnimi verigami, alifatski aldehidi in ketoni, preprosti nenasičeni laktoni, maščobne kisline z dolgimi verigami, poliacetileni, preprosti fenoli, benzojska kislina, derivati cimetine kisline, flavonoidi, tanini, terpenoidi, steroidi, aminokisline in polipeptidi, alkaloidi, cianovodiki, sulfidi in glukozidi, purini in nukleotidi (Rizvi in Rizvi, 1992; Whittaker in Feery, 1971).

Alelopatske spojine imajo lahko na okolico posreden ali neposreden vpliv. Posredno lahko vplivajo na lastnosti tal, vsebnost hranil, populacije organizmov v tleh (mikroorganizmi, žuželke, gliste). Ti učinki so zaenkrat še manj raziskani. Neposredno pa se vplivi alelopatskih spojin kažejo v rasti rastlin in metabolizmu, kar se kaže pri sledečih procesih in delih celic (povzeto po Rizvi in Rizvi, 1992):

- citologija in ultrastruktura
- fitohormoni in njihovo ravnovesje
- membrane in njihova prepustnost
- kaljivost spor
- privzem mineralov

-sinteza pigmentov in fotosinteza

-respiracija

-sinteza proteinov

-fiksacija dušika

-specifične encimske aktivnosti

-vezivna tkiva

-genetski material

Da bi alelopatijo dobro razumeli, moramo povezati znanje iz različnih področij: iz botanike, mikrobiologije, fitofiziologije, ekologije...

Invazivne tujerodne vrste pojav alelopatije dobro izkoriščajo za svoje razširjanje (Muller, 1969). Alelopatijo najpogosteje preučujejo v laboratoriju. Pojav se večinoma izraža v zakasneni ali zavrti kaljivosti semen ter povečani ali pomanjšani rasti korenin in poganjkov. Stopnja inhibicije je najbolj pogosto sorazmerna s koncentracijo ekstrakta rastline, ki ima alelopatski učinek.

2.2 TUJERODNE VRSTE V SLOVENIJI

»Tujerodna vrsta je vrsta, podvrsta ali takson nižje kategorije, ki se nahaja izven območja (pretekle ali sedanje) naravne razširjenosti oz območja, ki bi ga lahko dosegla z naravnim širjenjem (to je izven območja naravne razširjenosti, ki ga ni mogla doseči brez neposredne ali posredne naselitve ali posredovanja človeka). To vključuje katerikoli del organizma, ki lahko preživi in je sposoben razmnoževanja (npr. spolne celice, semena, jajca).« (Kus Veenvliet in sod., 2009). Svetovna zveza za varstvo narave (International Union for Conservation of Nature, IUCN) je invazivno vrsto opredelila kot vrsto, ki povzroča spremembe v okolju, ogroža zdravje ljudi ter gospodarstvo in domorodno biotsko raznovrstnost.

»Domorodne vrste pa so tiste, ki se pojavljajo na območju svoje naravne razširjenosti. Štejejo vsa območja, ki jih vrsta lahko osvoji sama s hojo, letenjem, prenosom z vodo, vetrom ali drugimi načini razširjanja« (Kus Veenvliet in sod. 2009).

Tujerodne rastline so tiste, ki jih je človek prenesel v okolje v katerem prej niso bile prisotne. Nekatere od njih se zelo hitro razraščajo in razširjajo in njihova naselitev po svetu predstavlja grožnjo domorodnim rastlinam ter živalim. Tujerodne rastline so ljudje prenesli v določeno okolje zaradi okrasnih namenov, za namene kmetijstva, gozdarstva in podobno in tako so se te vrste pričele nenadzorovano razmnoževati ter se preselile tudi v naravo. Prenašajo se lahko

tudi v prsti okrasnih lončnic ali kot primesi različnim mešanicam semen, v embalaži izdelkov, med izdelki... (Kus Veenvliet in sod. 2009).

Pri naselitvi invazivnih vrst ločimo dva načina: namerno in nenamerno naselitev. V praksi hitro prehajata ena v drugo. Tujerodne rastline so lahko na primer posajene v okrasne namene v vrtove, od koder se nato nenadzorovano širijo v naravo. Zaradi tega je sajenje tujerodnih vrst v vrtove prepovedano, razen če se presodi, da ta poseg ne bo ogrozil naravnega ravnovesja ali sestavin biotske raznovrstnosti. Širijo pa se tudi zaradi izgradnje novih prometnih povezav. Z gradnjo mostov, rečnih kanalov in podobnim, jim omogočimo lažji prehod med kraji, kjer so prej stale visoke geografske pregrade. Tak primer je Sueški prekop, ki je močno skrajšal čas potovanja med Evropo in Azijo. Vrste, ki so se nemoteno selile imenujemo Lessepske selivke (Kus Veenvliet in sod. 2009).

Človek je v nekatere naravne sisteme tujerodne vrste naselil z namenom, da bi imel od njih korist. Na primer določene vrste rib za športni ribolov, določene lovne vrste, ki bi povečale željo po lovu, ribe, školjke in rastline za prehrano... (Bačič in sod., 2009)

Danes je to, kot že prej omenjeno prepovedano, žal pa še vedno prihaja do nezakonitih namernih naselitev. Zelo pogost primer naselitve je tudi, ko se ljudje naveličajo svojih akvarijskih in vivarijskih domačih živali (na primer želve rdečevratke *Pseudoemys scripta elegans* ali zlatih ribic *Carassius auratus*) in jih spustijo v naravo. S tem velikokrat nezavedno naredijo veliko škode domorodnim vrstam (Kus Veenvliet in sod. 2009).

Sprva se tujerodne vrste začnejo razširjati po našem območju v majhnih razsežnostih in tako težko opišemo njihove škodljive učinke. Ko pa se te rastline začnejo hitro in nenadzorovano razraščati, pa njihove negativne vplive vidimo na več nivojih (povzeto po Kus Veenvliet in sod. 2009):

-vpliv na domorodne vrste: Tujerodne vrste postanejo tekmeci domorodnim vrstam za življenjski prostor, hrano ali druge pomembne vire. Pogosto vplivajo tudi na biotsko pestrost. Če se v okolje, kjer nekaj časa vlada ravnovesje kar naenkrat naseli nov plenilec, tako živali kot rastline nanj niso pripravljene in postanejo lahek plen. In če neka domorodna vrsta, ki ima v prehranjevalni verigi ključno vlogo izumre, se ekosistem spremeni.

-vpliv na ekosisteme: Vrste lahko v novem okolju popolnoma spremenijo odnose med vrstami, kroženje hranil, fizikalne in kemijske dejavnike v prsti. Ekosistem se lahko popolnoma spremeni in domorodne vrste izginejo.

-vpliv na gospodarstvo: Nekateri tujerodne vrste so namenoma naselili v nova okolja in danes predstavljajo veliko ekonomsko korist: npr. koruza, ječmen, krompir. S transportom izdelkov

iz tujine pa pogosto prinašamo tudi škodljivce (viruse, bakterije in glive) ki povzročajo bolezni. Od tega pa je seveda odvisno tudi ekonomsko stanje posameznikov in države.

-vpliv na zdravje: Mnoge okrasne rastline so strupene. Njihovo sajenje je lahko tvegano. Nekatere so močno alergene, druge pa v okolje sproščajo nevarne snovi.

Problema tujerodnih invazivnih vrst se zavedamo šele v zadnjih letih. Človek je z namernimi in nenamernimi naselitvami v skoraj vseh državah sveta povzročil nepopravljive spremembe ekosistemov in izgubo biotske raznovrstnosti. Za celovito reševanje problematike tujerodnih vrst je potrebno opraviti številne analize in na podlagi izsledkov oblikovati strategijo za ravnanje z njimi. Oblikovali pa so se že nekateri načini odstranjevanja in njihovega nadzora glede značilnosti vrst. Običajno je potrebno ukrepe odstranjevanja izvajati skozi daljše časovno obdobje, nato pa še nekaj let spremljati, če je bila odstranitev uspešna. Kadar širjenja ne uspemo preprečiti v zgodnjih fazah naselitve, se vrsta navadno tako razširi, da popolna odstranitev iz narave ni več mogoča. V takem primeru nam preostane le še nadzor vrste. To pomeni, da vrsto z enakimi metodami aktivno odstranjujemo iz okolja, vendar se zavedamo, da vrste ne bomo uspeli v celoti odstraniti, bomo pa omejili širjenje in vsaj zmanjšali negativne vplive. Ukrepi nadzora so tako trajni, kar seveda pomeni tudi stalne stroške (Kus Veenvliet in sod. 2009).

Ukrepe za odstranjevanje ali nadzor tujerodnih vrst lahko razdelimo v tri skupine (povzeto po (Kus Veenvliet in sod. 2009):

1. Mehanično odstranjevanje: Ukrepi vključujejo odstranitev organizma iz narave, na primer s puljenjem, žaganjem, košnjo ali pašo. Ti ukrepi se lahko dopolnjujejo s kemičnim zatiranjem.
2. Kemično zatiranje: Ukrepi kemičnega zatiranja vključujejo rabo pesticidov. Pesticide uporabljamo za zatiranje škodljivcev, plevela ali rastlinskih bolezni. Raba pesticidov je strogo nadzorovana, saj predstavlja potencialno nevarnost za okolje, pa tudi za zdravje ljudi.
3. Biotično varstvo: Pri ukrepih biotičnega varstva škodljive organizme odstranimo z živimi organizmi, ki so njihovi naravni sovražniki. Ker tujerodne vrste običajno v novem okolju nimajo naravnih sovražnikov, je potrebno za namene biotičnega varstva tujerodnih vrst vnesti nov tujerodni organizem. Vnos novih tujerodnih organizmov pa je lahko tudi tvegano, saj lahko vrsta napade tudi domorodne vrste in povzroči dodatno škodo. Zato je biotično varstvo strogo nadzorovano.

Ukrepi za odstranjevanje tujerodnih vrst (torej takšnih, ki povzročajo škodo biotski raznovrstnosti) se zaenkrat ne izvajajo sistematično, prav tako zanje še nimamo vseh zakonskih podlag. (Kus Veenvliet in sod., 2009).

Kot lahko pričakujemo, izvirajo uspešne tujerodne vrste iz klimatsko podobnih predelov in s tem tudi iz podobnih preostalih okoljskih razmer (vrednost pH, vrsta zemlje, matična podlaga, prisotnost različnih ionov in drugih snovi...). Kljub temu pa bi bilo, za boljše načine odstranjevanja, potrebno bolje poznati odziv organizmov na posamezne parametre, ki lahko vplivajo tako na njihovo kalitev kot na rast.

Za izboljšanje možnosti novih načinov odstranjevanja je potrebno natančno poznavanje tako invazivnih kot domačih rastlin.

2.3 VRBE

Družino vrbovk (*Salicaceae*) sestavlja preko 400 vrst, ki so razširjene po vsem svetu. So dvodomna listopadna drevesa ali grmi (Jogan, 2001). Listi so enostavni, večinoma suličasti do jajčasti, spiralasto nameščeni, razviti so prilisti, ki lahko zgodaj odpadejo. Njihovi cvetovi so združeni v mačičasta socvetja. Rod vrbe (*Salix*) je dokaj široko zastopan tudi v naši flori (čez 20 vrst) (Martinčič in sod. 2007).

Drevesa in grmi vrb dajejo veliko senco in tako zavrejo rast podrasti. Na razvoj in rast korenin vpliva tudi alelopatija. To so raziskovali na koreninah navadne smreke (*Picea abies*), ki so jo zalivali z izvlečki listov ive (*Salix caprea*) (Schütt in Blaschke, 1980). V listih je bilo nakopičenih vsaj 12 različnih fenolnih spojin. Vrbe so v naravi zelo uspešne, na njihovo razširjanje pa pozitivno vplivata tudi hitra rast in vegetativno razmnoževanje (Schütt in Blaschke, 1980).

2.4 JAPONSKI DRESNIK (*Fallopia japonica* (Houtt.) Ronse Decraene)

Japonski dresnik sodi v družino dresnovk (*Polygonaceae*). Družino sestavlja preko 1100 vrst. Poleti ga najpogosteje najdemo ob bregovih vodotokov, kjer opazimo dva ali tri metre visoke in goste sestoje. Liste ima jajčasto oblikovane, spiralasto nameščene, celerobe, pri dnu plitvo srčaste. Nad kolencem se nahaja listna škornjica (ohrea). Rastlina cveti pozno poleti ali jeseni. Cvetovi so drobni, v sestavljenih mnogocvetnih socvetjih, enospolni vendar z

zakrnelimi organi drugega spola (npr. ženski cvetovi imajo zasnove prašnikov). Cvetovi imajo pet cvetnih listov, plod je trikotni orešek, endosperm je bogat z olji in škrobom, perisperma ni. Ob zrelosti je plod črno obarvan. Konec jeseni vsi nadzemni poganjki propadejo. To nam pove, da japonski dresnik v resnici ni grm, temveč zelnata trajnica, ki zimo preživi s podzemno koreniko (Jogan, 2006). Japonski dresnik so leta 1823 iz Japonske prinesli Nizozemci (Lažnik in Trdan, 2013). V Sloveniji so ga prvič opazili v okolici Celja v začetku 20. stoletja. Takrat se je nemoteno začel širiti po osrednji Sloveniji. Prvi, ki je nanj postal pozoren je bil Vinko Strgar, ki je našel že približno 100 nahajališč dresnika ob rekah Dravi, Meži, Sotli, Savinji in Savi s pritoki. Danes je dresnik razširjen že po vseh območjih Slovenije, poleg japonskega pa je v sestojih najpogostejši še križanec češki dresnik (*F. x bohémica*) (Strgulc Krajšek in Jogan, 2011).

Zatiranje dresnika je zelo težavno ravno zaradi trdovratne podzemne korenike. Košnja je le začasna rešitev. Beerling in sod.(1993) celo navajajo, da s košnjo tvorbo novih poganjkov nevede pospešimo. Priporočene metode za odstranjevanje japonskega dresnika so, da rastlino izkopljemo skupaj s korenikami in prstjo, ki se nahaja okoli korenike, in ves ta material uničimo. Ta postopek je potrebno ponavljati tudi več let, saj so korenike zelo trdovratne. (Kus Veenvliet in sod., 2009). Odpadni material je potrebno sproti posušiti in sežgati. Seveda pa je predhodno potrebno javnost opozoriti, da rastline dresnika ni dovoljeno saditi v okrasne, čebelarske in druge namene. Večkrat pa se je kot uspešna izkazala rešitev zatiranja košnje v kombinaciji s kemičnim zatiranjem (večletno vbrizgavanje herbicidov v stebela), pa tudi ta metoda se je v večini primerov izkazala kot neučinkovita. Sedaj se sklicujejo le še na zatiranje z vnosom naravnega sovražnika iz okolja, od koder japonski dresnik izhaja. S poskusi, ki so jih izvajali v Veliki Britaniji so ugotovili, da ima japonski dresnik približno 180 naravnih sovražnikov, najprimernejši med njimi pa naj bi bila bolšica (*Aphalara itadori*) (Homoptera:Psyllidae) (Lažnik in Trdan, 2013). Ker ima ta žuželka majhen krog gostiteljskih rastlin, avtohtonim vrstam ne bi predstavljala grožnje. Za bolj učinkovito zatiranje te invazivne vrste pa se vsako leto še bolj zagnano trudijo.

V Sloveniji poleg japonskega dresnika uspevajo tudi nekatere druge vrste iz rodu *Fallopia* in vse spadajo med invazivne vrste (Strgulc Krajšek in Jogan, 2011).

-grmasti slakovec (*Fallopia baldschuanica* [Regel] Holub)

-sahalinski dresnik (*Fallopia sachalensis* [F. Schmidt] Ronse Decraene)

-češki dresnik (*F. x bohemica* [Chrtek&Chrtkova] J. P. Bailey) križanec med japonskim in sahalinskim dresnikom. Vse spadajo med invazivne vrste (Strgulc Krajšek in Jogan, 2011).

V kitajski in japonski medicini se uporabljata snovi resveratrol in emodin, ki ju pridobivajo iz japonskega dresnika. Dresniki na splošno vsebujejo antociane, ki delujejo kot antioksidanti (Jogan, 2009). V zadnjem času pa je sploh prvi kot prehransko dopolnilo komercialno dostopen tudi pri nas.

2.5 FOTOSINTEZNA BARVILA

Klorofili in karotenoidi so fotosintezna barvila, ki se nahajajo v kloroplastih, natančneje na tilakoidnih membranah, kjer so vezani na proteine. Klorofil a ima pri fotosintezi in izrabi svetlobe funkcijo glavnega asimilacijskega pigmenta v reakcijskem centru, preostali klorofili in karotenoidi pa so antentski pigmenti. Pri nekaterih algah in cianobakterijah najdemo še dodatne pigmente - fikobiliproteide (Likar, 2012). Ker so klorofili in karotenoidi topni v organskih topilih, jih biokemijsko uvrščamo med lipide (Boyer, 1990).

2.5.1 KLOROFILI

Molekula klorofila je sestavljena iz tetrapirolovega obroča in dolge hidrofobne strani, ki je pravimo fitolni rep. V tetrapirolov obroč je vezan atom magnezija (Zieger, 2000). Molekula klorofila je zelo nepolarna. Razlika med klorofiloma a in b je v tem, da ima klorofil a v tetrapirolovem obroču vezano metilno, klorofil b pa aldehydno skupino (Boyer, 1990).

Klorofili absorbirajo v rdečem in modrem delu vidnega spektra. Klorofil a pri 430 nm in 660 nm, klorofil b pa pri 460 nm in 640 nm. Ravno te razlike v absorpcijskih značilnostih pigmentov lahko s pomočjo spektrofotometrije izkoristimo za določanje njihove količine v rastlinskem tkivu (Likar, 2012). Klorofil a in klorofil b se v rastlinah pojavljata približno v razmerju 3:1 (Boyer, 1990).

Biosintetsko pot klorofila so ugotavljali skozi različne študije encimske biokemije in analize mutantov (Buchanan in Gruijssem, 2000).

2.5.2 KAROTENOIDI

Karotenoide razdelimo v dve skupini: Karotene, ki jih sestavljajo čisti ogljikovodiki in ksantofile - derivate karotenov, ki vsebujejo kisik. Karotenoidi so po kemijski sestavi tetraterpeni, ki absorbirajo v modrem delu spektra (med 400 in 520 nm) (Likar, 2012).

Med karoteni sta najpogostejša α - in β - karoten, med ksantofili, ki so rumenkaste barve, pa so najpogostejši zeaksantin, lutein, violaksantin, kriptoksantin... Karotenoidi imajo v primeru visokih intenzitet svetlobe tudi zaščitno funkcijo. S pomočjo askorbata in NADPH₂, se violaksantin preko anteraksantina spreminja v zeaksantin. (Likar, 2012).

Klorofil a in karotenoide vsebujejo rastline, zelene alge, diatomeje, rjave in rumene alge, rdeče alge in cianobakterije. Klorofil b pa vsebujejo le rastline in zelene alge.

2.6 STRES PRI RASTLINAH

Pri vseh živih organizmih se stres odraža kot neka sprememba v organizmu. Stres lahko povzroči veliko dejavnikov, ki jih imenujemo stresni dejavniki oziroma stresorji. To so lahko suša, premočno UV-sevanje, zmrzal, težke kovine... Stresne dejavnike razdelimo na fizikalne, kemijske in biotske. K fizikalnim dejavnikom spadajo temperatura, poplave, veter, suša, magnetno polje, sevanje. Kemijski stresni dejavniki so povečane koncentracije pesticidov, toksinov, težke kovine, onesnaženje zraka in povečana slanost. Biotski stresni dejavniki pa so virusi, alelopatija, kompeticija, herbivorija, bolezni in patogene glive (Larcher, 2001). Ker pa se redko zgodi, da bi na rastlino deloval le en stresni dejavnik, ti ponavadi delujejo hkrati. To imenujemo multipli stres. Stres povzroči spremembe v notranjosti celic, v metabolizmu, hkrati pa se to odraža v zunanosti rastlin. Lahko pride do spremembe v encimski aktivnosti (peroksidaze, glutation reduktaze, dehidroaskorbat reduktaze), do biosinteze poliaminov, povečanja sinteze in akumulacije antioksidantov (askorbinska kislina, tokoferol), osmotsko aktivnih snovi (prolin, betain, polioli) in sekundanih spojin (polifenoli, antociani). Poveča se sinteza stresnih hormonov (abscizinska kislina, etilen, jasminska kislina). Pride tudi do sprememb na plazmalemi (transport težje poteka in poruši se potencial). Stres se v rastlinah odraža tudi pri dihanju in fotosintezi.

Rastline lahko odreagirajo tudi tako, da pride do spremembe v koncentraciji fotosinteznih barvil. Ta lahko očitno naraste ali pa se zmanjša (Fiziologija stresa, 2012).

Stres rastlina občuti tudi ob suši. Prva sprememba se opazi v vodnem potencialu tkiva in sicer v padcu turgorja (potencialnega tlaka). Celična rast, izgradnja celične stene, sinteza proteinov in redukcija nitrata so najbolj občutljivi fiziološki procesi. Zavrtja je rast, sinteza celične stene, sinteza proteinov, sinteza klorofilov, sinteza abscizinske kisline v koreninah iz karotenoidov, kalitev, celično dihanje (ko se stres pri rastlini začne oz. ko že lahko zaznamo zmeren stres, pride do povečane aktivnosti dihanja in tudi do porasta svetlobnega dihanja (fotorespiracija) in prevodnost ksilema). Poveča se kopičenje prolina in sladkorjev. Ker rastlina zapre listne reže, prihaja do pomanjkanja CO₂ v rastlini in s tem je omejena fotosinteza. Tako se posledice pomanjkanja vode v rastlini odražajo v spremenjenem razmerju suhe in sveže mase rastlin. Čeprav so rastline, ki rastejo v sušnih območjih na sušo prilagojene, ob daljših sušnih obdobjih tudi te prilagoditve niso dovolj (Fiziologija stresa, 2012).

2.7 SPEKTROFOTOMETRIJA

Z molekularno absorpcijsko spektrometrijo (spektrofotometrijo) merimo prepustnost svetlobe skozi raztopino vzorca. Merimo absorpcijo svetlobe, ki prehaja skozi vzorec. Vzbuja molekule, katerim se spremenijo elektronska stanja (Prosen in Cigić, 2006).

Instrument za merjenje se imenuje spektrofotometer. Princip delovanja spektrofotometra je, da primerja delež prepuščene svetlobe pri referenčni raztopini (v mojem primeru acetona) in pri merjenem vzorcu. Delež svetlobe se absorbira, ostala svetloba pa prehaja skozi vzorec do detektorja. Spektrofotometer je sestavljen iz vira svetlobe, ki najprej osvetli vzorec v kiveti. Del svetlobe je skozi vzorec prepuščen, del pa se je absorbira. Svetloba iz vzorca se projicira na monokromator. Monokromator loči posamezne valovne dolžine in jih zaporedno usmerja na fotodetektor. Ta meri intenziteto (I) prepuščene svetlobe. S pomočjo merjenja prepustnosti slepega vzorca določimo začetno intenziteto (I₀) (Prosen in Cigić, 2006). V našem primeru ima spektrofotometer računalniško krmiljenje s programom UV Probe.

Monokromator je lahko sestavljen iz optične rešetke, optične prizme, v nekaterih primerih pa tudi iz optičnega filtra. Kivete so lahko iz kvarčnega ali navadnega stekla. Tista stran kivete, skozi katero bo potoval žarek more biti čista, saj različne nečistoče lahko vplivajo na točnost

merjenja. Za razredčene raztopine velja Beerov zakon, ki pravi, da je absorbanca (A) linearno sorazmerna s koncentracijo snovi, ki absorbira svetlobo:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot b \cdot c, \quad A = -\log T; \quad T = \text{transmitanca} = I/I_0, \quad \text{delež absorbirane svetlobe: } 1 - T$$

kjer je ε molarna absorptivnost [L/mol*cm], b je dolžina svetlobne poti kivete [cm], c pa koncentracija snovi, ki absorbira svetlobo [mol/L].

Molarna absorptivnost je odvisna od valovne dolžine (Prosen in Cigić, 2006).

3 METODOLOGIJA

PRIPOMOČKI:

-Zamrznjeni vzorci listov japonskega dresnika (*Fallopia japonica*), ki je bil v predhodni raziskavi zalivan z destilirano vodo (kontrola) ter 0,1 % in 1 % ekstraktom krhke vrbe (*Salix fragilis*),

-laboratorijska tehtnica (Kern alj160-4nm, Nemčija),

-škarje,

-terilnica,

-pestilo,

-merilni valj,

-lij,

-filtrirni papir,

-centrifugirke,

-centrifuga (Eppendorf 5417R, Nemčija),

-spektrofotometer (Shimadzu, UV-1800 Japonska),

-kvarčne kivete (Hellma, Nemčija)

KEMIKALIJE:

-Aceton $\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$,

-kremenčev pesek,

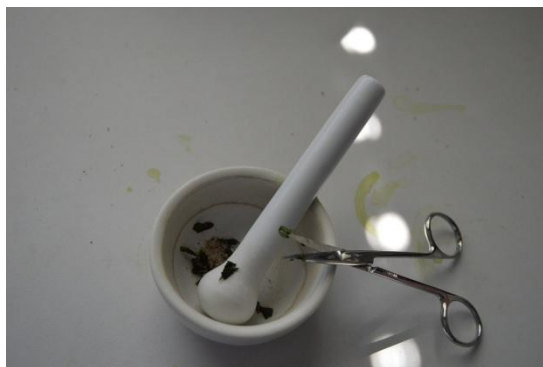
-magnezijev hidrogenkarbonat $\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$,

-natrijev sulfat Na_2SO_4 .

3.1 POSTOPEK PRAKTIČNEGA DELA

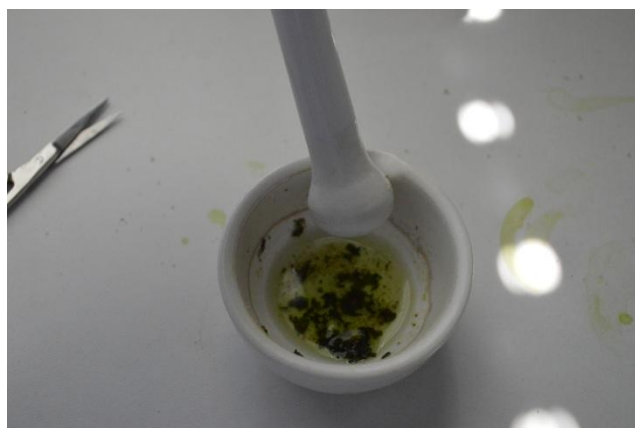
Praktični del svoje diplomske naloge sem opravljala z zamrznjenimi zelenimi listi japonskega dresnika (*Fallopia japonica*), ki so ga v predhodni raziskavi (Šušteršič, 2014) zalivali z destilirano vodo ter 0,1 in 1 % vodnim izvlečkom vrbe.

Vzela sem okoli 200 mg zamrznjenih listov. S škarjami sem jih narezala na manjše koščke in jih dala v terilnico (slika 1).



Slika 1 : Narezani zamrznjeni koščki listov

Dodala sem ščepec kremenčevega peska, da so se listi lažje zdrobili. Potem sem dodala še dvakrat po 4 ml v zamrzovalniku ohlajenega acetona in ščepec Na_2SO_4 in trla, dokler vzorec ni postal homogen (slika 2). Zmes sem prefiltrirala v merilni valj. Terilnico in filtrirni papir sem še dodatno sprala z acetonom. Odčitala sem volumen filtrata in ga zapisala za vsak vzorec (slika 3). V centrifugirke sem odpipetirala po 2 ml filtrata in jih 5 min centrifugirala pri 3000 obratih in 4°C . Tako so bili vzorci pripravljene za merjenje s spektrofotometrom.



Slika 2 : Homogenizacija vzorca z acetonom, kremenčevim peskom in Na_2SO_4



Slika 3 : Filtriranje vzorca v merilni valj.

Spektrofotometer smo umerili z acetonom. Pri meritvi smo uporabili kvarčne kivete. Potem smo izmerili absorpcijo supernatanta vsakega vzorca pri 470 nm, 645 nm in 662 nm. Za izračun koncentracije pigmentov v vzorcih sem uporabila naslednje formule:

$$\text{klorofil a} = 11.24 \times A_{662} - 2.04 \times A_{645}$$

$$\text{klorofil b} = 20.13 \times A_{645} - 4.19 \times A_{662}$$

$$\text{karotenoidi} = (1000 \times A_{470} - 1.9 \times Ca - 63.14 \times Cb) / 214$$

A_{662} Absorpcija ekstrakta pri valovni dolžini 662 nm

A_{645} Absorpcija ekstrakta pri valovni dolžini 645 nm

A_{470} Absorpcija ekstrakta pri valovni dolžini 470 nm

Za izračun končnih koncentracij (X) klorofila a, klorofila b in karotenoidov sem uporabila formulo: $X = \text{koncentracija pigmenta} \times V \text{ ekstrakta (mL)} / \text{sveža masa (g)} \times 1000$. Rezultat je podan v enotah mg g^{-1} .

Svežo maso zamrznjenih listov sem določila s tehtanjem. Za vsak vzorec sem si zapisala svežo maso. Nato sem liste posušila v sušilniku pri temperaturi 60 °C do suhega in ponovno tehtala njihovo suho maso. Iz razlike sem določila vsebnost vode v vzorcih. Izmerila sem fotosintezna barvila v vseh vzorcih. Za vsak vzorec sem v tabelo zapisala natančno maso listov, volumen acetona in izmerjeno koncentracijo barvil (klorofila a, klorofila b in karotenoidov) (priloga C). Za vsako barvilo posebej sem izračunala povprečje in standardni odklon.

4 REZULTATI

Pri kontrolnih rastlinah in rastlinah, ki so bile izpostavljene med zalivanjem 0,1 in 1 % vodnemu ekstraktu vrbe smo izmerili vsebnost fotosinteznih barvil (slika 4).

Pri kontrolnih rastlinah, ki so bile zalivane z destilirano vodo, so bile izmerjene vsebnosti klorofila a od 0,71 do 0,82 mg/g sveže mase, povprečje je bilo 0,78 mg/g sveže mase (slika 4). Vsebnosti klorofila b so se gibale med 0,65 in 0,73 mg/g sveže mase, povprečje je bilo pri 0,70 mg/g sveže mase, vsebnosti karotenoidov so bile od 0,19 do 0,22 mg/g sveže mase, povprečje pa je bilo 0,21 mg/g sveže mase. Dva vzorca sta bila zalita z vodovodno vodo, kjer pa rezultati niso mogli biti obdelani s t-testom, saj je bilo podatkov premalo (preglednica 1).

Pri rastlinah, ki so jih zalivali z 0,1% ekstraktom vrbe, so bile izmerjene vsebnosti klorofila a od 0,60 do 0,85 mg/g sveže mase, povprečna vsebnost klorofila a je bila 0,76 mg/g sveže mase. Vsebnosti klorofila b so bile od 0,68 do 1,04 mg/g sveže mase, povprečna vrednost je bila 0,83 mg/g sveže mase. Vsebnosti karotenoidov so bile od 0,10 do 0,22 mg/g sveže mase, povprečje je bilo 0,19 mg/g sveže mase (preglednica 1).

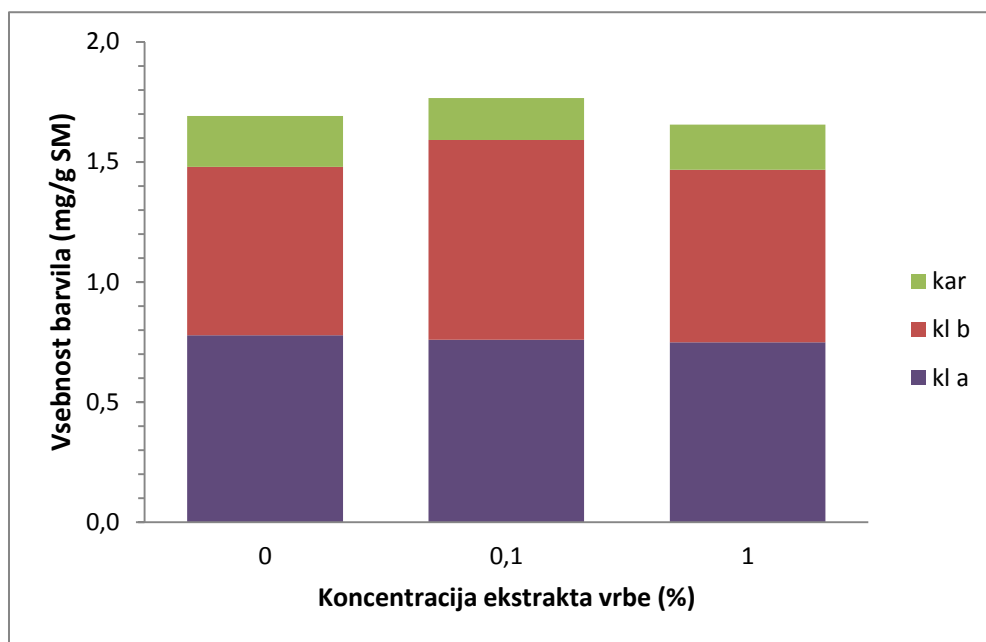
Pri rastlinah, ki so bile zalite z 1 % ekstraktom vrbe, so bile izmerjene naslednje vrednosti. Vsebnosti klorofila a so se gibale od 0,67 do 0,83 mg/g sveže mase, povprečje je bilo 0,75 mg/g sveže mase. Vsebnosti klorofila b so bile od 0,44 do 0,90 mg/g sveže mase, povprečje je bilo 0,72 mg/g sveže mase. Vsebnosti karotenoidov so bile od 0,12 do 0,21 mg/g sveže mase, povprečje pa je bilo 0,19 mg/g sveže mase. Kontrolni skupini pa so bile rastline zalivane z destilirano in vodovodno vodo (preglednica 1).

Preglednica 1 : Končne vrednosti izračunanih barvil za klorofil a, klorofil b in karotenoide. V tabeli so izračunane še povprečne vrednosti in standardni odklon.

Št vzorca	konc Ka	konc Kb	konc kar
1	0,85	1,04	0,18
2	0,73	0,79	0,17
3	0,82	0,76	0,22
4	0,69	1,03	0,13
7	0,60	0,79	0,10
8	0,82	0,68	0,21
10	0,80	0,74	0,21
Povprečje	0,76	0,83	0,18
SD	0,09	0,14	0,05
11	0,67	0,90	0,12
12	0,74	0,60	0,20
13	0,71	0,55	0,19
14	0,83	0,83	0,21
15	0,82	0,85	0,21
16	0,74	0,85	0,18
17	0,77	0,82	0,19
18	0,70	0,66	0,19
19	0,70	0,44	0,18
20	0,82	0,68	0,21
Povprečje	0,75	0,72	0,19
SD	0,06	0,16	0,03
22	0,80	0,72	0,22
23	0,79	0,65	0,21
24	0,82	0,73	0,22
25	0,71	0,71	0,19
Povprečje	0,78	0,70	0,21
SD	0,05	0,03	0,02

Preglednica 2: Razporeditev vzorcev po številkah glede na tretma s katerim so bili v prejšnji raziskavi obdelani (zalivani z destilirano vodo (0), 0,1 % in 1 % izvlečkom vrbe).

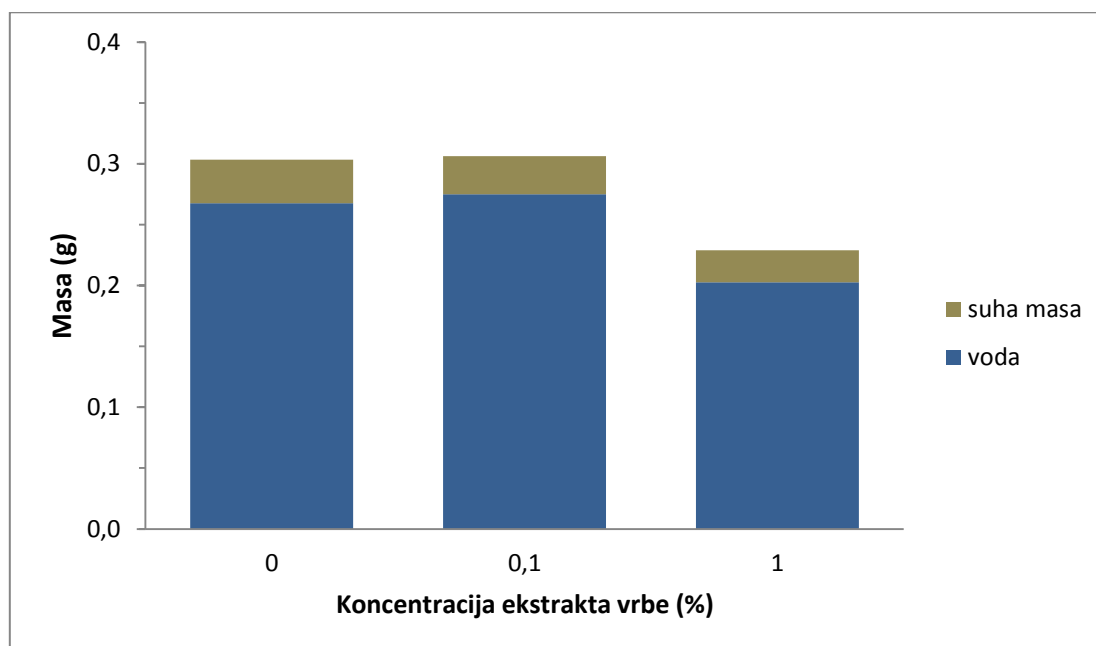
konc. ekstrakta vrbe (%)	vzorec
0,1	1
0,1	2
0,1	3
0,1	4
0,1	6
0,1	7
0,1	8
0,1	10
1	11
1	12
1	13
1	14
1	15
1	16
1	17
1	18
1	19
1	20
0	22
0	23
0	24
0	25



Slika 4 : Vsebnosti barvil (v mg/g sveže mase) pri rastlinah zalitih z destilirano vodo, vodovodno vodo, 1 % ekstraktom vrbe in 0,1 % ekstraktom vrbe. Z različnimi barvami so prikazane posamezne vrednosti za klorofil a, klorofil b in karotenoide.

Razlike med tremi izpostavitvami japonskega dresnika (kontrola, 0,1 % in 1 % vodni ekstrakt vrbe) smo testirali s Studentovim t-testom. Izkazalo se je, da razlike niso bile statistično pomembne, kjer je bila vrednost $p > 0,05$ (priloga B).

Vpliv izvlečka vrbe na rast japonskega dresnika smo preverili tudi s tehtanjem sveže in suhe mase, iz katerih smo izračunali vsebnost vode (slika 5). Najmanjšo svežo maso so imele rastline, ki so bile zalivane z 1 % izvlečkom vrbe, predvsem na račun manjše vsebnosti vode (slika 5). Povprečna vrednost sveže mase pri vzorcih zalitih z destilirano vodo je bila 0,30333 g, pri vzorcih zalitih z 0,1 % izvlečkom je vrednost znašala 0,30625 g, pri vzorcih zalitih z 1 % izvlečkom pa je povprečna sveža masa padla na 0,229 g (priloga B, a). Povprečne vrednosti suhe mase so bile pri vzorcih zalitih z destilirano vodo 0,035667 g, pri vzorcih zalitih z 0,1 % izvlečkom vrbe je bila povprečna vrednost 0,031263 g, pri vzorcih zalitih z 1 % izvlečkom vrbe pa je vrednost suhe mase padla na 0,0263 g (priloga B, a). Količina vodne mase pa je pri vzorcih zalitih z destilirano vodo znašala 0,267667 g, pri vzorcih zalitih z 0,1 % izvlečkom je vodna masa znašala 0,274988 g, pri vzorcih zalitih z 1 % izvlečkom vrbe pa je vrednost vodne mase padla na 0,2027 g (priloga B,a).



Slika 5 : Delež vodne, suhe in seštevke obeh-sveže mase pri vzorcih zalivanih z različnimi koncentracijami vrbe.

Pri primerjavi suhe mase razlike med vzorci niso bile statistično značilne. Enako velja za sveže mase, razen v primeru 0,1 % izvlečka v primerjavi z 1 % izvlečkom vrbe, ko je bila razlika med njima statistično skoraj pomembna (vrednost p je znašala 0,0677). Tudi pri primerjavi vodne mase je bila vrednost p pri primerjavi 0,1 % in 1 % izvlečka mejna ($p = 0,0661$) (preglednica 3).

Preglednica 3 : Primerjava (t-test) sveže, suhe in vodne mase japonskega dresnika s t-testom glede na različne koncentracije izvlečka vrbe s katerimi so bile rastline zalite.

PRIMERJAVA	SVEŽA MASA (vrednost p)	SUHA MASA (vrednost p)	VODNA MASA (vrednost p)
0 vs. 0,1 %	0,9663	0,6098	0,9111
0 vs. 1 %	0,2492	0,2617	0,2731
0,1 % vs. 1 %	0,0677	0,4213	0,0661

5 RAZPRAVA IN SKLEP

Že tisočletja med celinami in državami poteka preseljevanje rastlinskih in živalskih vrst. Ljudje s popotovanj v oddaljene kraje prinašajo domov različne zanimive in uporabne vrste. V zadnjih desetletjih pa je prenašanje vrst postalo vse bolj množično zaradi razmaha svetovne trgovine in nenehne povezanosti preko različnih oblik transporta. Številne so ljudem koristne, bistveno prispevajo h kakovosti življenja in tudi nimajo negativnih vplivov. Nekatere vrste pa so škodljive, saj se v novem okolju ustalijo in ob odsotnosti naravnih sovražnikov pogosto oblikujejo velike populacije ter se začnejo hitro širiti. Ena izmed takih vrst je tudi japonski dresnik. Zaradi svojega hitrega razširjanja s spolnim in nespolnim načinom razmnoževanja je ena izmed najbolj trdovratnih tujerodnih vrst. (Kus Veenvliet in sod., 2009). Vegetativno se japonski dresnik razmnožuje s pomočjo korenin ali nadzemnih poganjkov. (Strgulc Krajšek in Jogan, 2011). Ljudje s širjenjem gradbišč korenike razkosavamo, te pa se potem s pomočjo vode ali gradbene mehanizacije razširjajo v nove habitate. Že majhen delček korenike se v novem okolju hitro razraste v gost podzemni preplet korenin. Iz podzemnega prepleta v ugodnih pogojih rastejo nove rastline dresnika. Tako smo preizkusili ukrep proti zatiranju japonskega dresnika s pomočjo alelopatije vrbe. Rastline japonskega dresnika so v predhodni raziskavi zalivali s 0,1 % 1 % vodnim izvlečkom krhke vrbe (*Salix fragilis*). Vzorce sem pripravila tako, da sem najprej zatehtala določeno maso zamrznjenih listov, jih mehansko obdelala in s pomočjo acetona naredila ustrezen filtrat, ki sem ga prefiltrirala v merilni valj. Potem sem filtrat centrifugirala in s spektrofotometrom izmerila koncentracije fotosinteznih barvil. Stehtala sem tudi svežo in suho maso listov rastlin. Iz teh podatkov sem izračunala vodo v listih. Tudi v teh količinah se pri rastlinah lahko pokaže stresna situacija. Rezultate sem obdelala s pomočjo ustreznih statističnih metod (povprečje, standardni odklon, t-test). Izkazalo se je, da izvleček vrbe ne zavira rasti japonskega dresnika in ne vpliva na vsebnost fotosinteznih barvil. Zato sklepam, da metoda zatiranja japonskega dresnika z vrbo ne bi bila uspešna. Dobljene rezultate sem primerjala z že objavljenimi raziskavami. Podobne, vendar obsežnejše raziskave so pokazale, da ko so preučevane rastline zalivali z izvlečki rastlin, ki imajo dokazano alelopatske učinke na druge rastline se je koncentracija klorofila a, b in ksantofilov postopoma počasi zviševala le dokler so preučevane rastline zalivali z 0,5 % izvlečkom rastline z alelopatskim učinkom. Ko so odstotek izvlečka povišali, se je koncentracija barvil zmanjšala, še posebej se je zmanjšala koncentracija klorofila a (Al-Wakeel in sod., 2007). Primerjali so tudi vpliv na suho, svežo in vodno maso. Nižje koncentracije (0,25 % in 0,5 %) izvlečkov rastlin z alelopatskimi učinki so celo nekolike

zvišale svežo in suho maso v rastlinah glede na kontrolno skupino, medtem ko se na vsebnosti vodne mase vpliv skoraj ni poznal. Povišanje koncentracije izvlečka na 2% pa je pri testnih rastlinah povzročilo postopno upadanje vseh mas (Al-Wakeel in sod., 2007). Raziskava pri kateri so cianobakterije izpostavljali alelopatskim učinkom je pokazala, da po štiri urni izpostavljenosti razlik v koncentraciji klorofilov še ni bilo, po štirideset urni izpostavljenosti pa se je koncentracija znatno znižala. Opazno se je začela zmanjševati po šestnajstih urah. Podobno je bilo pri karotenoidih, kjer po štirih urah razlik še ni bilo, po štiridesetih urah pa so bile razlike opazne (Hong, Sakoda, Hu in Sagehashi, 2010).

T. Vaithiyanathan, M. Soundari, M.Rajesh, K. Sankar Ganesh in P. Sundaramoorthy so prišli do podobnih rezultatov. Alelopatski učinki rastline (*Azadirachta indica*) so vplivali na t.i. jedilni oslez (*Abelmoschus esculentus*). Opazna je bila zmanjšana koncentracija klorofila a in b glede na kontrolni vzorec. Tudi vsebnosti sveže in suhe mase na vzorcih sta se zmanjšali. Vsebnost klorofila a se je po tretmaju zmanjšala iz 0,232 mg/rastlino na 0,163 mg/rastlino, klorofil b se je iz 0,186 mg/rastlino zmanjšal na 0,159 mg/rastlino (Vaithiyanathan idr. 2014).

Hipoteze, ki smo jih postavili na začetku raziskovanj brez nadaljnjih in podrobnejših raziskav ne bi mogli potrditi, saj so bile pri vseh podatkih, ki so bili obdelani s t-testom razlike neznačilne. Pri nekaterih vrednostih so bile vrednosti mejne, vendar vseeno premalo reprezentativne za vzorec. Spremembe v koncentraciji fotosinteznih pigmentov so se pojavile. Pri zalivanju z 1 % in 0,1 % izvlečkom vrbe je bila koncentracija klorofila a in karotenoidov nekoliko nižja kot pri vzorcih, ki so bili zalivani z destilirano in vodovodno vodo, vendar razlike niso bile statistično pomembne. Pri klorofilu b pa je koncentracija pri zalivanju z 1 % in 0,1% izvlečkom celo nekoliko narasla, zato hipoteze ne bi mogli potrditi.

Pri merjenju mas se je sveža masa pri vzorcih zalitih z 0,1 % izvlečkom krhke vrbe celo nekoliko povečala, pri vzorcih zalitih z 1 % izvlečkom vrbe pa se je zmanjšala, predvsem na račun vodne mase. Da bi hipotezo lahko z gotovostjo potrdili bi potrebovali večje število vzorcev.

6 LITERATURA

- Al-Wakeel, S.A.M., Gabr, M.A., A.A. Hamid., Abu-El.Soud W.M.(2007). Allelopathic effect of Acacia nibotica leaf residue Pisum Satium L. Allelopathy journal 19(2):411-422.
- Bačič M. , Jogan J., Dolenc B., Frajman B., Jamnik M. , Strgulc-Krajšek S. (2009) Tujerodne vrste. Informativni listi izbranih invazivnih vrst. Grahovo : Zavod Symbiosis.
- Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (2000). Biochemistry & molecular chemistry of plants; American Soiciety of plant physiologist Rockville Manifold.
- Fiziologija stresa. (2012).Univerza v Ljubljani. Biotehniška fakulteta. Oddelek za agronomijo. Pridobljeno 8.8.2014 s
http://www.bf.unilj.si/fileadmin/groups/2711/Gradiva_Vodnik_Predavanja_Bolonja/Vodnik_P_B_AG-UNI-Ekofiziologija-Stres1-P6_-11-12.pdf.
- Hong Y., Hu N. Y., Sakoda A., Sagehashi M. (2010). Effects of Allelochemical Gramine on Photosynthetic Pigments of Cyanobacterium Microcystis aeruginosa. World Academy of Science, Engineering and Technology Vol:4.
- Jogan N. (2001) Navodila za vaje iz sistematske botanike. (3. Izdaja delovne verzije) Ljubljana, 110 str.
- Jogan J. (2006) Japonski dresnik (*Fallopia japonica*)-rastlina leta 2006. Proteus, 68/9-10, 437-440.
- Kus Veenvliet J., Veenvliet P., Bačič M., Frajman B., Jogan J., Lešnik M., Kube J. (2009). Tujerodne vrste. Priročnik za naravovarstvenike. Grahovo : Zavod Symbiosis, 45 str.
- International Union for Conservation of Nature, IUCN, pridobljeno 12.8.2014
<http://www.iucn.org/>.
- Laznik Ž., Trdan S. (2013) Prvi rezultati vzorčenja potencialnih naravnih sovražnikov japonskega dresnika (*Fallopia japonica* Houtt. Ronse Decraene) v Sloveniji. Zbornik predavanj in referatov 11. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin z mednarodno udeležbo Bled, 5.-6. Marec 2013. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Katedra za fitomedicino, kmetijsko tehniko, poljedelstvo, pašništvo in travništvo. Ljubljana, 422-428.
- Larcher W.(2001). Physiological Plant Ecology. Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups. 4th eddition. New York, Springer: 513 str.
- Likar, M. (2012) Navodila za laboratorijske vaje pri predmetih Fiziologija rastlin in Fitofiziologija,57 str.
- Martinčič, A., Wraber, T., Jogan, N., Podobnik, A., Turk, B., Vreš, B., Strgulc Krajšek S., Trčak B., Bačič T., Fischer M., Ravnik B., Eler K., Surina B.,(2007). Mala flora Slovenije.ključ za določanje praprotnic in semenk. Dopolnjena in spremenjena izdaja. Ljubljana: Tehniška založba Slovenije.

Muller, C.H., (1969). Allelopathy as a factor in ecological process. *Vegetatio* 18: 348-357.

Prosen H., Kralj Ciglič I., (2006). Navodila za vaje pri predmetu kemijska analiza živil. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. Katedra za analizo kemijo.

Rizvi, S.J.H., Rizvi, V., (1992). *Allelopathy: Basic and applied aspects*. London, Chapman in Hall, 1-20.

Schütt, P., Blaschke, H. (1980.) Seasonal changes in the allelopathic effect of *Salix ooprea* foliage. *Flora*, 1694: 316-328.

Strgulc-Krajšek S., Jogan N. (2013). Invazivke so tu! Kaj pa vpliv na naše zdravje?. *Zdrave novice*. April, št. 3. 14-16

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

Šušteršič, J., (2014). Vpliv vodnega izvlečka krhke vrbe na rast in razvoj japonskega dresnika. Diplomsko delo. Pedagoška fakulteta.

Vaithyanathan T., Soundari M., Rajesh M., Sankar Ganesh K., Sundaramoorthy P. (2014) Allelopathic effect of *Azadirachta indica* L. on the germination of *Abelmoschus esculentus* L. *International Letters of Natural Sciences*. Pridobljeno 10.8.2014 <http://www.ilns.pl/wp-content/uploads/2013/11/ILNS-10-2014-13-22.pdf>.

Zieger E. (2000). *Plant physiology* Fourth edition; . Sinauer association Inc. publishers Lincoln T., Sunderland Masatchussas, str. 128-130.

Whittaker, R.H., Feery, P.P. (1971). Allelochemicis: chemical interreactio between species. *Science*, 171, 757-770.

ZAHVALA

Želela bi se zahvaliti mentorici doc. dr. Jasni Dolenc Koce za vso prijaznost, topel odnos, pomoč in strokovnost pri pisanju diplomske naloge. Za vse odgovore na vprašanja in ustrežljivost. Želela bi se zahvaliti tudi ostalim članom komisije doc. dr. Matevžu Likarju in doc. dr. Katarini Vogel Mikuž za sodelovanje in čas.

Hvala tudi Katji najprej za prijateljstvo, ki je ta štiri leta študija naredilo še lepša in za vse popravke in nasvete pri pisanju diplomske naloge.

Največja zahvala pa gre moji družini za vso ljubezen in podporo, ki so mi jo izkazali v času študija. Brez vas noben uspeh ne bi bil tako sladek.

PRILOGE

PRILOGA A

Rezultati T-testa za primerjavo povprečnih vrednosti klorofila a, klorofila b in karotenoidov. Razlike so bile statistično pomembne, če je bila vrednost $p > 0,05$. Ker so rastline zalite z vodovodno in destilirano vodo služile kot kontrolni skupini, primerjava med njima za našo raziskavo ni bila pomembna.

PRIMERJAVA KLOROFILA A (t-test)	
0 vs. 0,1 %	0,7146
0 vs. 1 %	0,4032
0,1 % vs. 1 %	0,7900
0 vs. VV	0,0947

PRIMERJAVA KLOROFILA B (t-test)	
0 vs. 0,1 %	0,4925
0 vs. 1 %	0,2429
0,1 % vs. 1 %	0,1458
0 vs. VV	0,8494

PRIMERJAVA KAROTENOIDOV (t- test)	
0 vs. 0,1 %	0,1573
0 vs. 1 %	0,1168
0,1 % vs. 1 %	0,4891
0 vs. VV	0,0034

PRILOGA B

- a) Sveža, suha in vodna masa pri rastlinah zalivanih z 0,1 % ,1 % koncentracijo izvlečka vrbe in destilirano vodo (0) ter njihovo povprečje in standardi odklon.

Koncentracija izvlečka (%)	sveža masa (g)	suha masa (g)	voda (g)
0,1	0,39	0,0564	0,3336
0,1	0,37	0,0271	0,3429
0,1	0,17	0,024	0,146
0,1	0,21	0,0266	0,1834
0,1	0,33	0,0143	0,3157
0,1	0,24	0,0331	0,2069
0,1	0,36	0,0426	0,3174
0,1	0,38	0,026	0,354
Povprečje	0,30625	0,031263	0,274988
SD	0,086344	0,012934	0,082296
1	0,21	0,03	0,18
1	0,25	0,0369	0,2131
1	0,15	0,0193	0,1307
1	0,14	0,0117	0,1283
1	0,1	0,012	0,088
1	0,31	0,0384	0,2716
1	0,25	0,0117	0,2383
1	0,23	0,0316	0,1984
1	0,35	0,0247	0,3253
1	0,3	0,0467	0,2533
povprečje	0,229	0,0263	0,2027
SD	0,080478	0,012468	0,073123
0	0,3	0,0421	0,2579
0	0,17	0,0244	0,1456
0	0,44	0,0405	0,3995
povprečje	0,303333	0,035667	0,267667
SD	0,135031	0,00979	0,135031

b) Rezultati T-testa za primerjavo povprečnih vrednosti sveže, suhe in vodne mase.

PRIMERJAVA SVEŽIH MAS (t-test)	
0 vs. 0,1 %	0,9663
0 vs. 1 %	0,2492
0,1 % vs. 1 %	0,0677

PRIMERJAVA SUHIH MAS (t-test)	
0 vs. 0,1 %	0,6098
0 vs. 1 %	0,2617
0,1 % vs. 1 %	0,4213

PRIMERJAVA VODNE MASE (t-test)	
0 vs. 0,1 %	0,9111
0 vs. 1 %	0,2731
0,1 % vs. 1 %	0,0661

PRILOGA C

Celotna tabela izračunov in meritev s spektrofotometrom.

Tretma	Sample ID	WL470,0	WL645,0	WL662,0	Comments	V acetona	m listov	kl a	končna Ka	kl b	končna Kb	kar	končna kar	
0,1% ekstrakt vrbe	1	3,787	2,213	3,096	400 mg lista + 16 ml acetona	11,2	0,4	30,28	0,85	37,26	1,04	6,43	0,18	
	2	3,659	1,986	3,076		4,8	0,2	30,52	0,73	32,71	0,79	7,18	0,17	
	3	3,606	1,768	3,046		5,6	0,21	30,63	0,82	28,35	0,76	8,21	0,22	
	4	4	2,556	3,109		4,9	0,21	29,73	0,69	44,15	1,03	5,40	0,13	
	7	3,637	2,311	3,069		4,8	0,24	29,78	0,60	39,26	0,79	5,15	0,10	
	8	3,347	1,617	3,008		5,4	0,2	30,51	0,82	25,35	0,68	7,89	0,21	
	10	3,607	1,775	3,072		5,2	0,2	30,91	0,80	28,47	0,74	8,18	0,21	
									30,34	0,76	33,65	0,83	6,92	0,18
									0,09	0,14				0,05
	1% ekstrakt vrbe	11	3,788	2,405	3,133		4,4	0,2	30,31	0,67	41,09	0,90	5,31	0,12
12		3,315	1,575	2,964		4,9	0,2	30,10	0,74	24,55	0,60	7,98	0,20	
13		3,217	1,483	2,899		4,8	0,2	29,56	0,71	22,76	0,55	8,05	0,19	
14		3,648	1,88	3,062		5,4	0,2	30,58	0,83	30,59	0,83	7,75	0,21	
15		3,745	1,947	3,074		5,6	0,21	30,58	0,82	31,93	0,85	7,81	0,21	
16		3,928	2,126	3,139		4,8	0,2	30,95	0,74	35,47	0,85	7,62	0,18	
17		3,759	1,985	3,101		5	0,2	30,81	0,77	32,67	0,82	7,65	0,19	
18		3,682	1,798	3,067		4,8	0,21	30,81	0,70	28,94	0,66	8,39	0,19	
19		2,409	1,106	2,42		5,6	0,2	24,94	0,70	15,65	0,44	6,42	0,18	
20		3,296	1,615	3,01		5,4	0,2	30,54	0,82	25,31	0,68	7,66	0,21	
0								29,92	0,75	28,90	0,72	7,46	0,19	
									0,06	0,16			0,03	
	22	3,648	1,734	3,039		5,2	0,2	30,62	0,80	27,68	0,72	8,61	0,22	
	23	3,405	1,603	3,007		5,2	0,2	30,53	0,79	25,07	0,65	8,24	0,21	
	24	3,588	1,723	3,053		5,3	0,2	30,80	0,82	27,44	0,73	8,40	0,22	
VV	25	3,773	1,897	3,09		4,8	0,21	30,86	0,71	30,91	0,71	8,24	0,19	
								30,70	0,78	27,77	0,70	8,37	0,21	
									0,05	0,03			0,02	
	26	2,035	0,909	2,001		4,8	0,2	20,64	0,50	12,11	0,29	5,75	0,14	
	27	3,888	2,476	3,118	200 mg lista + 8 ml acetona	4,8	0,2	30,00	0,72	42,53	1,02	5,35	0,13	
								27,87	0,61	27,32	0,66	5,55	0,13	
									0,16	0,18			0,09	