

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Katarina ŠOLN

**ALELOPATSKI VPLIV JAPONSKEGA IN  
ČEŠKEGA DRESNIKA NA MOLEKULSKE IN  
STRUKTURNE ZNAČILNOSTI KORENINE  
VRTNE REDKVICE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2022

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Katarina ŠOLN

**ALELOPATSKI VPLIV JAPONSKEGA IN ČEŠKEGA DRESNIKA  
NA MOLEKULSKE IN STRUKTURNE ZNAČILNOSTI  
KORENINE VRTNE REDKVICE**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**ALLELOPATHIC EFFECT OF JAPANESE AND BOHEMIAN  
KNOTWEED ON MOLECULAR AND STRUCTURAL TRAITS OF  
RADISH ROOT**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2022

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Komisije za doktorski študij Univerze v Ljubljani je bilo z dnem 30. 6. 2020 potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za opravljanje doktorata znanosti na Interdisciplinarnem doktorskem študijskem programu Bioznanosti, znanstveno področje biologija. Za mentorico je bila imenovana izr. prof. dr. Jasna Dolenc Koce.

Doktorsko delo je zaključek Interdisciplinarnega doktorskega študija Bioznanosti na področju biologije. Kalitveni poskusi, daljši rastni poskusi, večina biokemijskih analiz, svetlobna mikroskopija, analiza izvlečkov s HPLC in analiza elementne sestave z EDXRF so bili opravljeni na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta UL. Priprava in analiza vzorcev s presevnim elektronskim mikroskopom (TEM) je potekala na Katedri za zoologijo, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta UL. Vzorce korenin dresnikov so nam zmleli na Oddelku za lesarstvo, Biotehniška fakulteta UL. Analiza korenin z nuklearno magnetno resonanco je potekala na Katedri za organsko kemijo, Oddelek za kemijo in biokemijo, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo UL. Analiza proteazne aktivnosti je potekala na Katedri za biokemijo, Oddelek za kemijo in biokemijo, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo UL. Analiza elementne sestave izvlečkov s TXRF je potekala na Inštitutu Jožef Stefan. Molekulske analize smo izvedli na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo, Nacionalni inštitut za biologijo. Dodatne analize biokemijskih parametrov oksidativnega stresa in analiza korenin z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) smo izvedli na Inštitutu za biologijo, Karl-Franzens Universität Graz, Avstrija.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Dominik VODNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: izr. prof. dr. Andreja URBANEK KRANJC  
Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede

Član: doc. dr. Matevž LIKAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 14. 10. 2022

Katarina Šoln

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
- DK 58(043.3)
- KG alelopatija, dresnik, *Fallopia*, izvleček, mikroskopija, rast, struktura, geni
- AV ŠOLN, Katarina, mag. mol. funk. biol.
- SA DOLENC KOCE, Jasna (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni doktorski študij Bioznanosti, znanstveno področje biologija
- LI 2022
- IN ALELOPATSKI VPLIV JAPONskega IN ČEŠKEGA DRESNIKA NA MOLEKULSKE IN STRUKTURNE ZNAČILNOSTI KORENINE VRTNE REDKVICE
- TD Doktorska disertacija
- OP XII, 145 str., 13 pregl., 37 sl., 149 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Alelopatija je pojav, ko rastline preko sproščenih alelokemikalij zavrejo rast bližnjih rastlin. Namen naše raziskave je bil preučiti alelopatski vpliv invazivnih dresnikov, japonskega dresnika (*Fallopia japonica*) in češkega dresnika (*F. ×bohemica*), na strukturne, biokemijske, molekulske in ultrastrukturne značilnosti korenin testne vrste vrtno redkvice (*Raphanus sativus*). Izvlečka iz korenin obeh dresnikov sta se med seboj razlikovala po vsebnosti resveratrola. Metanolni izvlečki so imeli močnejši alelopatski učinek na redkvice kot posamezne alelokemikalije. Kalitev semen in rast korenin 3 dni starih kalic redkvice so zavrlji tudi vodni izvlečki. V koreninah se je še posebej povišala vsebnost celokupnega glutaciona, askorbata in prolina, kar kaže na znake oksidativnega stresa. Spremenilo se je tudi izražanje nekaterih genov, ki so povezani z askorbatno-glutationskim ciklom ter s programirano celično smrtjo. Izvlečki so povišali tudi aktivnost kaspazam in metakaspazam podobnih proteaz ter porušili organizacijo celic v posameznih koreninskih tkivih. Številne celice iz zunanjih slojev koreninske čepice so propadle. Na ultrastrukturnem nivoju so bile v celicah koreninske čepice najbolj izrazite naslednje spremembe: odstop plazmaleme od celične stene, poškodbe mitohondrijev, spremembe endoplazemskega retikuluma in pojav okroglih, elektronsko gostih vključkov v citoplazmi. Tudi meristemske celice so bile spremenjene. Pri daljši izpostavitvi je imel najbolj zaviralen učinek 10 % izvleček češkega dresnika, ki je povzročil propad večine rastlin. Rast glavne korenine tretiranih redkvic je bila v prvi polovici poskusa močno zavirana, po 14 dneh so pri preživelih redkvicah korenine dosegle kontrolno raven, parametri oksidativnega stresa niso bili povišani. Alelopatija dresnikov ima zaviralni vpliv predvsem na rast kalic redkvice, v koreninskih celicah se sproži oksidativni stres, kar vodi do programirane celične smrti.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dd

DC 58(043.3)

CX allelopathy, knotweed, *Fallopia*, extract, microscopy, growth, structure, genes

AU ŠOLN, Katarina

AA DOLENC KOCE, Jasna (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdisciplinary Doctoral Programme in Biosciences, Scientific Field of Biology

PY 2022

TI ALLELOPATHIC EFFECT OF JAPANESE AND BOHEMIAN KNOTWEED ON MOLECULAR AND STRUCTURAL TRAITS OF RADISH ROOTS

DT Doctoral dissertation

NO XII, 145 p., 13 tab., 37 fig., 149 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Allelopathy is a phenomenon in which plants inhibit the growth of neighboring plants by releasing allelochemicals. The aim of our study was to investigate the allelopathic effect of invasive knotweeds, Japanese knotweed (*Fallopia japonica*) and Bohemian knotweed (*F. ×bohemica*) on morphological, biochemical, molecular, and ultrastructural characteristics of roots of the tested species garden radish (*Raphanus sativus*). Extracts from both knotweeds differed in the content of resveratrol. Methanol extracts had a stronger allelopathic effect on radish than individual allelochemicals. In addition, aqueous extracts inhibited seed germination and root growth of 3-day-old radish seedlings. In particular, the content of total glutathione, ascorbate, and proline increased in the roots, indicating signs of oxidative stress. The expression of some genes related to ascorbate-glutathione cycle and programmed cell death were also altered. The extracts also increased the activities of caspase- and metacaspase-like proteases. The cell organization in root tissues was altered. Many cells from the outermost layer of the root cap were destroyed. The most prominent changes at the ultrastructural level were found in the root cap cells: plasmalemma was detached from the cell wall, mitochondria were damaged, endoplasmic reticulum changed and spherical electron dense inclusions appeared in the cytoplasm. The meristem cells were also altered. In long-term exposure, the 10 % extract of Bohemian knotweed showed the strongest inhibitory potential, causing the destruction of almost all plants. The primary root growth of the treated radish was strongly inhibited in the first half, after 14 days the root of the surviving plants reached the control level, oxidative stress related parameters did not increase. Knotweed allelopathy showed an inhibitory effect mainly on the growth of radish seedlings, which induce oxidative stress in the roots, leading to programmed cell death.

## KAZALO VSEBINE

<b>KAZALO VSEBINE</b> .....	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b> .....	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK</b> .....	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI</b> .....	<b>XI</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b> .....	<b>3</b>
2.1 ALELOPATIJA .....	3
2.1.1 Zgodovinski pregled poznavanja alelopatije.....	3
2.1.2 Pomen alelopatije v kmetijstvu .....	3
2.1.3 Vloga alelopatije v ekosistemih .....	4
2.2 ALELOPATIJA IN INVAZIVNI DRESNIKI .....	5
2.3 OKSIDATIVNI STRES .....	7
2.3.1 Reaktivne kisikove spojine: povezava med alelopatijo in programirano celično smrtjo .....	7
2.3.2 Antioksidanti: prilagoditvena strategija na oksidativni stres .....	9
2.3.3 Alelopatija in oksidativne poškodbe .....	10
2.4 ALELOPATIJA IN CELIČNA SMRT .....	12
2.4.1 Aktivnost proteaz med programirano celično smrtjo, povezano z alelopatijo .....	12
2.4.2 Aktivnost nukleaz med programirano celično smrtjo, povezano z alelopatijo .....	12
2.4.3 Morfološke spremembe med programirano celično smrtjo, povezano z alelopatijo .....	13
<b>3 MATERIAL IN METODE</b> .....	<b>15</b>
3.1 RASTLINSKI MATERIAL .....	15
3.2 PRIPRAVA IZVLEČKOV .....	15
3.2.1 Priprava vodnih izvlečkov .....	15
3.2.2 Priprava metanolnih izvlečkov in posameznih alelokemikalij.....	15
3.3 ANALIZA IZVLEČKOV .....	16
3.3.1 Analiza izvlečkov s HPLC.....	16
3.3.2 Analiza izvlečkov z <sup>1</sup> H nuklearno magnetno resonančno spektroskopijo.....	17
3.3.3 Analiza elementne sestave izvlečkov z rentgensko fluorescenčno spektroskopijo s popolnim odbojem .....	17

3.4	KALITVENI POSKUSI .....	18
3.5	BIOKEMIJSKE ANALIZE .....	19
3.5.1	<b>Lipidna peroksidacija .....</b>	<b>19</b>
3.5.2	<b>Merjenje encimske aktivnosti gvajakol peroksidaze.....</b>	<b>20</b>
3.5.3	<b>Vsebnost neencimskih antioksidantov .....</b>	<b>21</b>
3.5.4	<b>Koncentracija glutaciona in cisteina .....</b>	<b>22</b>
3.5.5	<b>Koncentracija askorbata.....</b>	<b>24</b>
3.5.6	<b>Koncentracija prolina .....</b>	<b>25</b>
3.6	DOLOČANJE PROTEAZNE AKTIVNOSTI V KORENINAH REDKVICE	25
3.7	LOKALIZACIJA VODIKOVEGA PEROKSIDA .....	27
3.8	ANALIZA POVRŠINE KORENINE.....	28
3.8.1	<b>Fiksiranje, dehidriranje in sušenje vzorcev pri kritični točki.....</b>	<b>28</b>
3.8.2	<b>Priprava in analiza korenin s SEM.....</b>	<b>29</b>
3.9	HISTOLOŠKE IN ULTRASTRUKTURNE ANALIZE .....	29
3.9.1	<b>Fiksiranje, dehidriranje in vklapljanje vzorcev v smolo .....</b>	<b>30</b>
3.9.2	<b>Priprava poltankih rezin in analiza preparatov s svetlobnim mikroskopom .....</b>	<b>31</b>
3.9.3	<b>Priprava ultratankih rezin in analiza s TEM .....</b>	<b>32</b>
3.10	MOLEKULARNE ANALIZE.....	32
3.10.1	<b>Priprava vzorcev za molekularne analize .....</b>	<b>32</b>
3.10.2	<b>Izolacija celokupne RNA iz koreninskih vršičkov.....</b>	<b>32</b>
3.10.3	<b>Odstranitev genomske DNA .....</b>	<b>33</b>
3.10.4	<b>Dodatno čiščenje in meritev koncentracije RNA.....</b>	<b>34</b>
3.10.5	<b>Transkriptomaska analiza .....</b>	<b>34</b>
3.11	DOLGOTRAJNEJŠI RASTNI POSKUS.....	35
3.11.1	<b>Zasnova poskusa in spremljanje rasti .....</b>	<b>35</b>
3.11.2	<b>Morfološke in histološke analize koreninskega sistema.....</b>	<b>37</b>
3.11.3	<b>Analiza elementov v koreninah in hipokotilu vrtna redkvice .....</b>	<b>38</b>
3.12	STATISTIČNE ANALIZE IN OBDELAVA SLIK.....	39
4	REZULTATI.....	40
4.1	ANALIZA IZVLEČKOV KORENIK DRESNIKOV .....	40
4.1.1	<b>Analiza vsebnosti izvlečkov s HPLC .....</b>	<b>40</b>
4.1.2	<b>Analiza izvlečkov z <sup>1</sup>H nuklearno magnetno resonančno spektroskopijo.....</b>	<b>41</b>
4.1.3	<b>Analiza elementne sestave izvlečkov z rentgensko fluorescenčno spektroskopijo s popolnim odbojem .....</b>	<b>43</b>

4.2	KALITVENI POSKUSI Z VODNIMI IZVLEČKI.....	44
4.2.1	Kalitev in začetna rast kalic redkvice .....	44
4.2.2	Sveža masa korenin kalic redkvice .....	45
4.2.3	Biokemijski parametri oksidativnega stresa v koreninah redkvice....	46
4.2.4	Aktivnost proteaz v koreninah redkvice .....	49
4.2.5	Analiza površine korenine .....	51
4.2.6	Histološke značilnosti korenin.....	58
4.2.7	Ultrastrukturne značilnosti koreninskega vršička .....	60
4.2.8	Molekulske značilnosti koreninskih vršičkov .....	64
4.3	KALITVENI POSKUSI Z METANOLNIMI IZVLEČKI IN IZBRANIMI DRESNIKOVIMI ALELOKEMIKALIJIAMI.....	76
4.3.1	Kalitev in začetna rast kalic redkvice .....	76
4.3.2	Biokemijski parametri oksidativnega stresa v koreninah redkvice....	77
4.3.3	Lokalizacija vodikovega peroksida v tkivih kalic.....	79
4.4	DOLGOTRAJNEJŠI RASTNI POSKUS.....	82
4.4.1	Preživetje rastlin .....	82
4.4.2	Biomasa rastlin .....	82
4.4.3	Dolžina glavne korenine.....	84
4.4.4	Prisotnost in število stranskih korenin .....	85
4.4.5	Histološke značilnosti koreninskega vršička.....	86
4.4.6	Biokemijski parametri oksidativnega stresa v koreninah .....	90
4.4.7	Elementna sestava korenin in redkvice .....	90
5	RAZPRAVA.....	92
5.1	ANALIZA IZVLEČKOV KORENIK DRESNIKOV .....	92
5.2	KALITVENI POSKUSI Z VODNIMI IZVLEČKI.....	96
5.3	KALITVENI POSKUSI Z METANOLNIMI IZVLEČKI IN IZBRANIMI DRESNIKOVIMI ALELOKEMIKALIJIAMI.....	106
5.4	ALELOPATSKI VPLIV V DALJŠEM ČASOVNEM OBDOBJU.....	110
5.5	OVREDNOTENJE LABORATORIJSKIH POSKUSOV ZA PREUČEVANJE ALELOPATIJE Z VIDIKA OKOLJSKE RELEVANTNOSTI .....	116
6	SKLEPI .....	118
7	POVZETEK.....	123
7.1	POVZETEK.....	123
7.2	SUMMARY.....	127
8	VIRI .....	131
	ZAHVALA	



## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Koncentracija emodina, resveratrola, katehina in epikatehina v izvlečkih korenin japonskega ( <i>F. japonica</i> ) in češkega dresnika ( <i>F. ×bohemica</i> ).....	41
Preglednica 2: Vsebnost izbranih alelokemikalij v koreninah japonskega in češkega dresnika ( <i>F. japonica</i> in <i>F. ×bohemica</i> ), analiziranih z <sup>1</sup> H NMR-spektroskopijo. ....	43
Preglednica 3: Elementna sestava 1 % in 10 % vodnih izvlečkov korenin japonskega in češkega dresnika ( <i>F. japonica</i> in <i>F. ×bohemica</i> ) .....	44
Preglednica 4: Sveža biomasa korenine kalic redkvice po 3-dnevni izpostavitvi vodnim izvlečkom korenin japonskega in češkega dresnika ( <i>F. japonica</i> in <i>F. ×bohemica</i> ).....	45
Preglednica 5: Velikost celic ter razmerje med njihovo dolžino in širino v prvih treh zunanjih slojih koreninske čepice pri kalicah vrtna redkvice.....	59
Preglednica 6: Deset genov v koreninskem vršičku vrtna redkvice z največjim vplivom glede na Eigenvektorje na ločitev pri PCA med kalicami.....	66
Preglednica 7: Pregled izbranih obogatenih genskih skupin v celicah korenine kalic vrtna redkvice, tretiranih z 10 % izvlečkom japonskega in češkega dresnika .....	69
Preglednica 8: Pregled izražanja izbranih genov, povezanih z rastjo celic, v koreninah vrtna redkvice. ....	72
Preglednica 9: Izbrani geni, povezani z oksidativnim stresom, v koreninah vrtna redkvice .....	73
Preglednica 10: Izbrani geni, povezani z razgradnjo proteinov in programirano celično smrtjo, v koreninah vrtna redkvice .....	75
Preglednica 11: Delež redkvic z razvitimi stranskimi koreninami prvega reda med 22-dnevno izpostavitvijo vodnim izvlečkom korenin japonskega in češkega dresnika. ....	85
Preglednica 12: Velikost celic v zunanjih slojih koreninske čepice pri vrtni redkvici po 22 dneh od izpostavitve vodnim izvlečkom .....	89
Preglednica 13: Koncentracija elementov v koreninah in hipokotila pri vrtni redkvici po 22 dneh od izpostavitve 1 % vodnim izvlečkom.....	91

## KAZALO SLIK

Slika 1: Japonski dresnik in češki dresnik v Sloveniji.....	5
Slika 2: Alelopatija je interakcija med rastlinami .....	7
Slika 3: Prikaz kalitvenega poskusa. ....	18
Slika 4: Korenina 3 dni stare kalice vrtno redkvice, posneta z vrstičnim elektronskim mikroskopom.....	29
Slika 5: Vzдолžni prerez korenine 3 dni stare kalice vrtno redkvice in prikaz koreninske čepice z označenimi sloji.....	31
Slika 6: Prikaz dolgotrajnejšega poskusa v rizoboksih .....	38
Slika 7: Kromatogrami HPLC vodnih izvlečkov .....	41
Slika 8: <sup>1</sup> H NMR-spektri za posamezne čiste spojine resveratrol, epikatehin in emodin ter za izvlečka korenin <i>F. japonica</i> in <i>F. ×bohemica</i> .....	42
Slika 9: Delež kaljivosti semen ter dolžina korenine in poganjka.....	45
Slika 10: Vsebnost malondialdehida in neencimskih antioksidantov v koreninah 3 dni starih kalice vrtno redkvice po izpostavitvi izvlečkom .....	46
Slika 11: Celokupni glutation, oksidirani glutation, celokupni cistein, oksidirani cistein, celokupni askorbat in oksidirani askorbat v koreninah .....	48
Slika 12: Koncentracija prolina v koreninah 3-dni starih kalice redkvice .....	49
Slika 13: Kaspazam podobna proteazna aktivnost in metakaspazam podobna proteazna aktivnost v koreninah 3-dni starih kalice vrtno redkvice. ....	50
Slika 14: Korenine 3 dni starih kalice vrtno redkvice po fiksaciji in sušenju pri kritični točki, ki smo jih nadalje uporabili za analize s SEM. ....	51
Slika 15: Površina koreninskega vršička in koreninske čepice .....	53
Slika 16: Površina območja podaljševanja pri koreninah.....	55
Slika 17: Površina območja diferenciacije korenine .....	57
Slika 18: Tri dni stare kalice vrtno redkvice, vzdolžni prerezi njihovega koreninskega vršička, vzdolžni prerez koreninske čepice in vzdolžni prerez apikalnega meristema korenine. ....	60
Slika 19: Ultrastruktura celic koreninske čepice .....	62
Slika 20: Ultrastruktura celic apikalnega meristema korenine.....	64
Slika 21: Prikaz izolirane RNA na gelu in z Bioanalyzerjem iz koreninskih vršičkov...65	
Slika 22: Analiza izražanja genov v koreninskem vršičku 3 dni stare vrtno redkvice po metodi glavnih komponent (PCA).....	66
Slika 23: Pregled izražanja genov osnovnih metabolnih poti .....	67
Slika 24: Delež kaljivosti semen redkvice po 3-dnevni izpostavitvi dresnikovim alelokemikalijam in metanolnim izvlečkom.....	76
Slika 25: Dolžina korenine in poganjka pri kalicah vrtno redkvice po izpostavitvi dresnikovim alelokemikalijam, njihovi mešanici ter metanolnim izvlečkom.....	77
Slika 26: Vsebnost malondialdehida in vsebnost neencimskih antioksidantov v koreninah 3 dni starih kalice vrtno redkvice .....	78
Slika 27: Heat map sprememb različnih parametrov pri kalicah redkvice.....	79
Slika 28: Kalice vrtno redkvice in njihove korenine, obarvane z DAB, po 3-dnevni izpostavitvi tretmajema z 10 % metanolnima izvlečkom.....	80
Slika 29: Kalice vrtno redkvice in njihove korenine, obarvane z DAB, po 3-dnevni izpostavitvi tretmajem resveratrola, epikatehina in emodina. ....	81
Slika 30: Krivulja preživetja vrtnih redkvic. ....	82

Slika 31: Sveža biomasa korenin, hipokotila in listov vrtna redkvice po 22 dneh izpostavitve vodnim izvlečkom .....	83
Slika 32: Vrtna redkvice po 22 dneh od izpostavitve .....	83
Slika 33: Dolžina glavne korenine vrtna redkvice .....	84
Slika 34: Število stranskih korenin prvega reda med 22-dnevno rastjo. ....	86
Slika 35: Vzdržni prerezi koreninskega vršička in koreninske čepice pri vrtni redkvi po 22 dneh od izpostavitve tretmajem. ....	88
Slika 36: Lipidna peroksidacija, specifična encimska aktivnost gvajakol peroksidaze in vsebnost neencimskih antioksidantov v koreninah vrtna redkvice .....	90
Slika 37: Prikaz potencialnega mehanizma alelopatije pri invazivnih dresnikih .....	121

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AEVD	kaspazni substrat, ki vsebuje aminokislinsko zaporedje AEVD
AMC	metakaspazni substrat, ki vsebuje aminometilkumarin (AMC)
APX	askorbat peroksidaza
ATP	adenozin trifosfat
BOA	2-benzoksazolinon
CAT	katalaza
DAB	diaminobenzidin
DEVD	kaspazni substrat, ki vsebuje aminokislinsko zaporedje DEVD
DHAR	dehidroaskorbat reduktaza
DIBOA	2,4-dihidroksi-1,4(2H)-benzoksanin-3-on
DPPH	2,2-difenil-1-pikril-hidrazil
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDXRF	energijsko disperzijska rentgenska fluorescenčna spektrometrija
ER	endoplazemski retikulum
FJ	japonski dresnik ( <i>Fallopia japonica</i> )
FB	češki dresnik ( <i>Fallopia ×bohemica</i> )
G-POD	gvajakol peroksidaza
GR	glutation reduktaza
GSH	reducirana oblika glutaciona
GSSG	oksidirana oblika glutaciona
GPX	glutation peroksidaza
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IAA	indol-3-ocetna kislina
IETD	kaspazni substrat, ki vsebuje aminokislinsko zaporedje IETD
LEHD	kaspazni substrat, ki vsebuje aminokislinsko zaporedje LEHD
LEVD	kaspazni substrat, ki vsebuje aminokislinsko zaporedje LEVD
MDA	malondialdehid
MDHA	monodehidroaskorbat
N	numerus (število ponovitev)
NGS	sekvenciranje nove generacije
NMR	nuklearna magnetna resonančna spektroskopija
p	p-vrednost
PCD	programirana celična smrt
RNA	ribonukleinska kislina
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
SEM	vrstični (scanning) elektronski mikroskop
SN	standardna napaka
TAC	vsebnost neencimskih antioksidantov
TBA	tiobarbiturna kislina

TCA	trikloroacetna kislina
TEM	presevni (transmisijski) elektronski mikroskop
TXRF	rentgenska fluorescenčna spektroskopija s popolnim odbojem
w/v	delež mase v volumnu raztopine
WEHD	kaspazni substrat, ki vsebuje aminokislinsko zaporedje WEHD
VDVAD	kaspazni substrat, ki vsebuje aminokislinsko zaporedje VDVAD
VEID	kaspazni substrat, ki vsebuje aminokislinsko zaporedje VEID
YVAD	kaspazni substrat, ki vsebuje aminokislinsko zaporedje YVAD

## 1 UVOD

Alelopatija je biokemijski vpliv ene rastline na sosednje rastline. Alelopatska rastlina sprošča v svojo okolico sekundarne metabolite (alelokemikalije), ki zavrejo kalitev, rast in razvoj bližnjih rastlin (Gniazdowska in Bogatek, 2005). Alelokemikalije so prisotne v različnih rastlinskih delih od korenin do korenik, lubja, poganjkov, listov in cvetov. V okolico se alelopatske spojine lahko sproščajo kot koreninski izločki, hlapne spojine ali posredno z razgradnjo listnega opada (Weir in sod., 2004; Farooq in sod., 2020). Koncentracija alelopatskih spojin v rastlinah se spreminja sezonsko (Chen in sod., 2013; Frantík in sod., 2013) in glede na geografsko področje rasti alelopatske rastline (Fan in sod., 2010; Chen in sod., 2013).

V zadnjih letih se vedno bolj zavedamo problematičnosti invazivnih tujerodnih rastlin. Pri mnogih med njimi predstavlja alelopatija dodatni mehanizem za hitro širjenje v novem okolju (Murrell in sod., 2011). V Sloveniji sta med takimi invazivni rastlini japonski dresnik (*Fallopia japonica*) in češki dresnik (*Fallopia ×bohemica*) (Strgulc Krajšek in Jogan, 2011), ki sodita med globalno zelo problematične invazivne tujerodne rastline. Zaradi tega je potrebno bolj poglobljeno znanje o njihovi biologiji, ki bi omogočilo učinkovitejše upravljanje z invazivnimi tujerodnimi vrstami. Poleg tega bi lahko s pomočjo alelopatije začrtali nove smernice v kmetijstvu: alelokemikalije predstavljajo namreč velik potencial predvsem kot morebiten razvoj bioherbicidov, s katerimi bi na polju po eni strani preprečili rast plevelnih rastlin, po drugi strani pa bi bil pritisk na okolje z vidika onesnaženosti manjši.

Invazivni dresniki v svojih tkivih vsebujejo številne alelokemikalije, predvsem fenole. Najpogostejši so resveratrol, epikatehin, emodin in piceid. Dresniki največ alelokemikalij kopičijo v koreninah (Chen in sod., 2013; Frantík in sod., 2013). Do zdaj je bilo narejenih veliko raziskav o vplivu dresnikovih posameznih alelopatskih spojin (Fan in sod., 2010; Tucker Serniak, 2016), izvlečkov (Dolenc Koce in Šoln, 2018; Moravcová in sod., 2011; Vrhotová in Šerá, 2008) in posušenih delov, pomešanih z zemljo (Dolenc Koce in Šoln, 2018; Šerá, 2012), na morfologijo testnih rastlin (npr. dolžina korenin in poganjkov, biomasa) ter o alelopatskih interakcijah različnih vrst na istem rastišču (Murrell in sod., 2011; Siemens in Blossey, 2007). V predhodnih raziskavah alelopatije so se osredotočili na celične spremembe, ki jih povzročajo izvleček tujerodne bučke (*Sicyos deppei*) na korenine kalic fižola in buče (Rocio Cruz-Ortega in sod., 1998) ter sekundarna metabolita iz rži 2(3H)-benzoksazolinon (BOA) in 2,4-dihidroksi-1,4(2H)-benzoksantin-3-on (DIBOA) pri koreninah kalic navadne kumare (Burgos in sod., 2004).

### NAMEN DELA

Čeprav je alelopatija poznana že iz antičnih časov, je znanje o strukturnih, fizioloških in molekularnih mehanizmih alelopatije relativno majhno. Še manj pa je znanega o povezavi

med alelopatijo ter oksidativnim stresom in programirano celično smrtjo, ki sta del odziva na stresne rastne razmere (Šoln in sod., 2022). Namen te doktorske naloge je zato preučiti več ravni delovanja alelopatije, od molekulskega, biokemijskega, celičnega, histološkega do strukturnega, na primeru dveh tujerodnih invazivnih vrst, japonskega in češkega dresnika.

Z rezultati poskusov te doktorske disertacije bomo dobili vpogled v celični mehanizem alelotoksičnosti in celovitejši pregled delovanja alelopatskih spojin pri japonskem in češkem dresniku. To znanje nam bo omogočilo učinkovitejše upravljanje z invazivnimi rastlinskimi vrstami, hkrati pa nam bo poznavanje alelopatskega delovanja predstavljalo vir koristnih informacij za morebitni razvoj bioherbicidov v kmetijstvu.

Cilj doktorske naloge je bil preučiti mehanizem zavrtne rasti korenine pri testni vrsti vrtno redkvice po delovanju alelopatskih spojin in izvlečkov iz japonskega in češkega dresnika v laboratorijskih pogojih.

## RAZISKOVALNE HIPOTEZE

Raziskovalne hipoteze v tem doktorskem delu so sledeče:

- Izvlečka korenin japonskega in češkega dresnika se razlikujeta glede na vsebnost alelopatskih spojin resveratrol, epikatehin in emodin.
- Izvlečka korenin japonskega in češkega dresnika ter posamezne alelopatske spojine (resveratrol, epikatehin, emodin) koncentracijsko odvisno vplivajo na morfološke značilnosti korenin vrtno redkvice.
- Izvlečka korenin japonskega in češkega dresnika vplivata na histološke značilnosti koreninskega vršička redkvice ter ultrastrukturne značilnosti apikalnega meristema korenine in koreninske čepice.
- Izvlečka korenin japonskega in češkega dresnika vplivata na izbrane biokemijske parametre, ki so povezani z oksidativnim stresom (lipidna peroksidacija, vsebnost neencimskih antioksidantov, lokalizacija vodikovega peroksida).
- Izvlečka korenin japonskega in češkega dresnika vplivata na aktivnost proteaznih encimov v korenini redkvice in na izražanje genov, ki so povezani s programirano celično smrtjo.
- Po dolgotrajnejši izpostavitvi izvlečkom so negativne spremembe pri testni rastlini bolj izražene kot po kratkotrajni izpostavitvi, kar kaže na alelopatsko delovanje izvlečkov.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ALELOPATIJA

#### 2.1.1 Zgodovinski pregled poznavanja alelopatije

Zaviralen vpliv ene rastline na druge rastline, ki rastejo skupaj v istih tleh, so ljudje opazovali že tisočletja (Patni in sod., 2018). Kmalu so prišli do spoznanja, da lahko določene rastline popolnoma spremenijo lastnosti tal, kar potem posledično zmanjša velikost pridelkov drugih rastlin. Da bi omilili negativen vpliv snovi, ki so ostajale v tleh in drugim rastlinam oteževale rast, so razvili kolobarjenje (Shahzad in sod., 2016). Pojem alelopatija je prvič uporabil avstrijski znanstvenik Hans Molish, ki je deloval v prvi polovici 20. stoletja (Gniazdowska in Bogatek, 2005; Patni in sod., 2018). Beseda alelopatija je sestavljena iz dveh grških besed: *allelon*, kar pomeni »drug drugemu«, in *pathos*, kar pomeni »trpeti«. Vse skupaj bi lahko prevedli kot »povzročati trpljenje drug drugemu«. Molish je alelopatijo opisal kot negativen vpliv ene rastline na druge preko sproščenih kemijskih spojin v okolico. Ameriški znanstvenik Elroy Leon Rice pa je leta 1984 definicijo alelopatije razširil kot katerikoli, pozitivni ali negativni, vpliv ene rastline na druge rastline ali mikroorganizme v bližini (Gniazdowska in Bogatek, 2005; Patni in sod., 2018). Danes se veliko študij osredotoča predvsem na negativne alelopatske vplive (Šoln in sod., 2022).

#### 2.1.2 Pomen alelopatije v kmetijstvu

V zadnjih desetletjih se zanimanje za študije alelopatije povečuje, največ v povezavi s kmetijstvom. Z znanjem o alelopatiji bi namreč lahko razvili bioherbicide, s katerimi bi zavirali rast plevelov, hkrati pa z njimi za razliko od kemičnih herbicidov ne bi onesnaževali zemlje in podtalnice (Cheng in Cheng, 2015; Patni in sod., 2018; Farooq in sod., 2020). Ena izmed najbolj enostavnih rešitev za zaustavitev rasti plevelov je sajenje poljščin, ki imajo alelopatski potencial. Najbolj znane alelopatske poljščine, ki zavirajo rast plevelnih rastlin, so: rž (*Secale cereale*), sončnica (*Helianthus annuus*), riž (*Oryza sativa*), pšenica (*Triticum aestivum*), lucerna (*Medicago sativa*), koruza (*Zea mays*), korenje (*Daucus carota*), kumara (*Cucumis sativus*), soja (*Glycine max*) in sirek (*Sorghum bicolor*) (Farooq in sod., 2020).

Poleg neposrednega sajenja alelopatskih rastlin na polje je posamezne alelopatske spojine mogoče tudi izolirati iz dotičnih rastlin ter jih nato komercialno uporabiti kot bioherbicide (Cheng in Cheng, 2015; Ghimire in sod., 2019). Eden od primerov uporabne alelokemikalije kot bioherbicida je kumarin. Za to bioaktivno alelopatsko spojino so poročali, da že pri zelo nizki koncentraciji,  $10^{-4}$  M, vidno vpliva na koreninski sistem pri navadnem repnjakovcu (*Arabidopsis thaliana*): dolžina glavne korenine je bila pri



izpostavljenih rastlinah za več kot 50 % krajša v primerjavi s kontrolnimi rastlinami, hkrati pa se je pri rastlinah, tretiranih s kumarinom, število stranskih korenin povečalo za 85 % (Lupini in sod., 2014). Toda alelopatije nimajo samo poljščine, ampak so jo odkrili tudi pri številnih plevelnih rastlinah. Slednje lahko zavirajo tako rast ostalih plevelnih vrst (Farooq in sod., 2020) kot tudi rast poljščin (Majeed in sod., 2012; Mitić in sod., 2018; Mustafa in sod., 2019), kar posledično otežuje njihovo pridelavo. Ravno zaradi tega je potrebno dodatno znanje o mehanizmih delovanja alelopatskih spojin.

S pojavom invazivnih tujerodnih vrst se je alelopatija pokazala kot dodatno biokemijsko orožje, ki pripomore k njihovemu hitremu širjenju in prevladi nad domorodnimi vrstami (Hierro in Callaway, 2003; Inderjit in sod., 2011).

### 2.1.3 Vloga alelopatije v ekosistemih

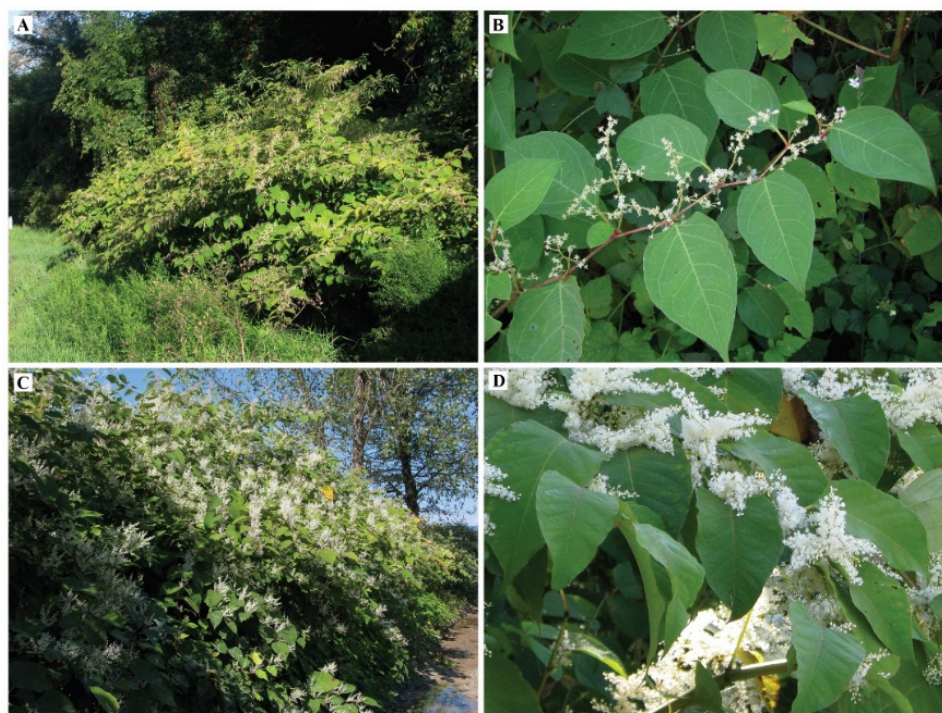
Rastline med seboj tekmujejo za sončno svetlobo, prostor, vodo in mineralne snovi. Bolj kot so pri tem uspešne, višje lahko zrastejo in več naravnih virov si lahko pridobijo (Craine in Dybzinski, 2013). Pri tem deluje alelopatija kot pomemben dodaten mehanizem, ki pogosto prevesi jeziček na tehtnici v boju za naravne vire (Inderjit in sod., 2011). Alelopatske snovi namreč ne zaustavijo samo rasti bližnjih rastlin, ampak vplivajo tudi na mikrobiološke združbe v rizosferi in na pH tal (Qu in sod., 2021), spremenijo lahko tudi privzem vode (Hejl in Koster, 2004) in dostopnost mineralov v tleh. Tako na primer dodatek posušenih in zmletih alelopatskih rastlin, kot sta lesni grm *Alhagi maurorum* in navadni poprovnik (*Cardaria draba*), v tleh zmanjša koncentracijo makrohranil ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , P) in mikronutrientov ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ) v koreninah in poganjkih pšenice (*Triticum aestivum*) (Mohammadkhani in Servati, 2017).

Rastline iz istega okolja se razvijajo sočasno in se med rastjo prilagajajo druga drugi, zato lahko rastejo večinoma nemoteno, kljub prisotnosti različnih alelopatskih snovi v tleh. Problem pa se pojavi, ko se s prodorom tujerodnih rastlinskih vrst naravno ravnovesje v ekosistemu poruši. Invazivne tujerodne rastline so vrste ali nižji taksoni, ki so se (s človeško) pomočjo razširile na nova območja, začele izpodrivati domorodne rastlinske vrste in s tem zmanjševati biodiverzitetu. Ena izmed hipotez o uspešnosti invazivnih rastlinskih vrst, »hipoteza novega orožja« (ang. *novel weapons hypothesis*), predvideva, da je ravno alelopatija eden izmed dejavnikov, ki pripomore k prevladi invazivnih rastlin (Callaway in Aschehoug, 2000; Bais in sod., 2003; Cappuccino in Arnason, 2006; Chen in sod., 2017). Domorodne rastline namreč niso prilagojene na alelopatske snovi tujerodne rastline, zato ima ta nanje večji vpliv kot na rastline iz okolja, od koder izvira (Callaway in Aschehoug, 2000; Hierro in Callaway, 2003). Alelopatija torej invazivnim rastlinam omogoča, da se hitreje razširjajo v svojem novem okolju, pri čemer tvorijo velike in goste sestoje (Hierro in Callaway, 2003; Frantík in sod., 2013). Posledično s senčenjem še dodatno ovirajo rast drugih rastlin, kar vodi k zmanjšanju biotske

pestrosti neke pokrajine (Mincheva in sod., 2016). Boljše razumevanje alelopatije bo zato lahko uporabno tako pri omejevanju rasti že obstoječih invazivnih rastlin ter kot preventiva pred novim širjenjem tujerodnih rastlin (Chen in sod., 2017).

## 2.2 ALELOPATIJA IN INVAZIVNI DRESNIKI

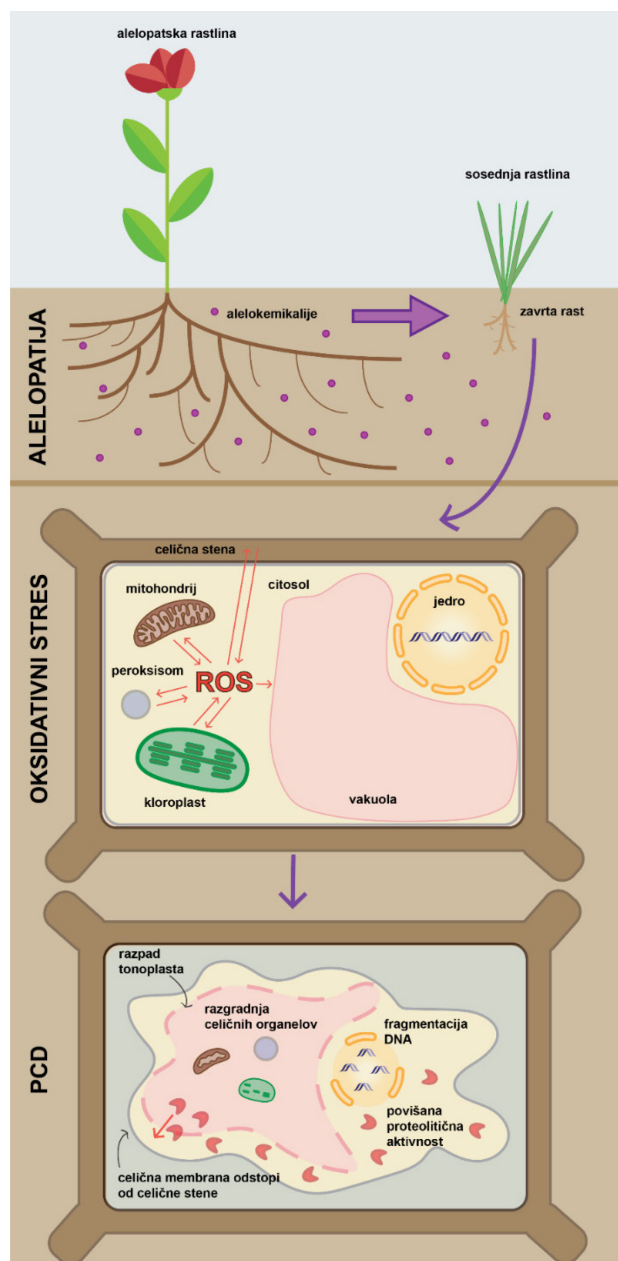
Tako v Sloveniji (Strgulc Krajšek in Jogan, 2011) kot drugod po Evropi in Severni Ameriki (Bailey in sod., 2009) je v zadnjih desetletjih postal zelo problematičen japonski dresnik (*Fallopia japonica* var. *japonica* (Houtt.) Ronse Decr.), ki ga Lowe in sod. (2000) uvrščajo med 100 najbolj invazivnih vrst na svetu. Japonski dresnik izvira iz Kitajske, v 19. stoletju pa so ga kot okrasno rastlino prinesli v Evropo (Bailey in sod., 2009). Danes skupaj s češkim dresnikom (*Fallopia* × *bohemica* (Chrtek and Chrtková) J. P. Bailey), ki je križanec med japonskim in prav tako invazivnim sahalinskim dresnikom (*Fallopia sachalinensis* (F. Schmidt) Ronse Decr.), predstavljata velik okoljski problem v Evropi in Severni Ameriki. Za oba dresnika je namreč značilna hitra vegetativna rast z zelo razvejanim podzemnim sistemom korenin (Bailey in sod., 2009), hitra regeneracija (Bímová in sod., 2003) in proizvodnja velike količine biomase (Frantik in sod., 2013). Poleg tega lahko poganjki japonskega dresnika dosežejo tudi 3 m v višino, poganjki češkega dresnika pa še meter več (Bailey in sod., 2009), kar dresnikoma omogoča, da z uspešnim tekmovanjem za vire (svetloba, voda, hranila) omejita rast bližnjih rastlin (Moravcová in sod., 2011) (Slika 1).



**Slika 1:** Japonski dresnik (A, B) in češki dresnik (C, D) v Sloveniji (Foto: S. Strgulc Krajšek, 2014).

Tudi pri dresnikih je prisotna alelopatija (Murrell in sod., 2011). Najbolj pogoste dresnikove alelokemikalije so sekundarni metaboliti fenoli: resveratrol, emodin, (-)-epikatehin, (-)-katehin in piceid (Fan in sod., 2009). Vsebnost dresnikovih sekundarnih metabolitov se spreminja glede na geografsko lego (Fan in sod., 2010) in rastno sezono. Po poročanju Chen in sod. (2013) ter Frantík in sod. (2013) imajo dresniki največ sekundarnih metabolitov v koreninah, in sicer v jesenskem času. Vsebnost fenolov se povečuje tudi s starostjo korenin (Chen in sod., 2013).

Do zdaj so bile narejene raziskave o vplivu dresnikovih posameznih alelopatskih spojin (Fan in sod., 2010; Tucker Serniak, 2016), izvlečkov (Vrchotová in Šerá, 2008; Moravcová in sod., 2011; Dolenc Koče in Šoln, 2018), posušenih delov, pomešanih z zemljo (Šerá, 2012; Dolenc Koče in Šoln, 2018), na morfologijo testnih rastlin (npr. dolžina korenin in poganjkov, biomasa) ter o alelopatskih interakcijah različnih vrst na istem rastišču (Siemens in Blossey, 2007; Murrell in sod., 2011), medtem ko o vplivu na strukturne in molekulske značilnosti ni znanega ničesar (Šoln in sod., 2022). Predvideva se, da alelopatske snovi povzročijo oksidativni stres, kar vodi do poškodb makromolekul in celične smrti (Slika 2) (Šoln in sod., 2022).



**Slika 2:** Alelopatija je interakcija med rastlinami, pri kateri alelopatska rastlina sprošča alelokemikalije v okolje, kar zavre rast bližnjih rastlin. Na celični ravni alelokemikalije sprožijo povečano sintezo in kopičenje reaktivnih kisikovih spojin (ROS), kar vodi do oksidativnega stresa in s tem do razgradnje makromolekul, razpada organelov preko aktivacije proteolitičnih in nukleolitičnih encimov in končno do okoljsko inducirane programirane celične smrti (PCD) (Slika: K. Šoln).

## 2.3 OKSIDATIVNI STRES

### 2.3.1 Reaktivne kisikove spojine: povezava med alelopatijo in programirano celično smrtjo

Reaktivne kisikove spojine (ROS) so prosti radikali, ki nastanejo kot stranski produkti aerobnega metabolizma. Najbolj znane ROS so superoksidni radikal ( $O_2^{\bullet-}$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), singletni kisik ( $^1O_2$ ) in hidroksilni radikal ( $OH^{\bullet}$ ) (Gechev in sod., 2006; Das in Roychoudhury, 2014; Gniazdowska in sod., 2015). ROS imajo v rastlinah dvojno vlogo. V nizkih koncentracijah delujejo kot signalne molekule in sodelujejo v različnih rastnih in razvojnih procesih (Gechev in sod., 2006). ROS med drugim vplivajo na velikost apikalnega meristema korenine (Yamada in sod., 2019) in sodelujejo pri aktivaciji rastlinske obrambe, s čimer se posledično poveša tudi odpornost rastline (Hayat in sod., 2016). Po drugi strani pa visoke koncentracije ROS povzročijo oksidacijo makromolekul v rastlinskih celicah, kar posledično vodi do njihovega propada (Gechev in sod., 2006; Das in Roychoudhury, 2014). V celicah se koncentracija ROS lahko močno poveša zaradi različnih dejavnikov v okolju, kot so visoke temperature, suša (Liu in sod., 2019), izpostavitve težkim kovinam (Tamás in sod., 2017) ali okužbe s patogenimi mikroorganizmi (Rossi in sod., 2017).

V zadnjem času vedno več študij poroča, da lahko tudi alelopatski stres močno poveša raven ROS v celicah izpostavljenih rastlin (Gniazdowska in sod., 2015). Ravno oksidativni stres bi namreč lahko bil eden od ključnih mehanizmov alelopatije, ki vodi do zavrti rasti bližnjih rastlin (Araniti in sod., 2018). Tako na primer izpostavitve solate (*Lactuca sativa*) alelopatski spojini juglon (Babula in sod., 2014) in navadnega repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*) benzojski kislini (Zhang in sod., 2018) močno povešata vsebnost ROS v njihovih koreninah. Veliko alelopatskih spojin v izpostavljenih rastlinah poveša predvsem količino  $H_2O_2$ : 0,5 mM koncentracija 2-benzoksazolinona (BOA) poveša raven  $H_2O_2$  v koreninah zelenega mungo fižola (*Phaseolus aureus*) za 25 %, medtem ko 5 mM koncentracija povzroči, da se raven  $H_2O_2$  zviša za več kot 2-krat glede na kontrolo (Batish in sod., 2006); prav tako je povešal raven  $H_2O_2$  v koreninah in listih več avtohtonih brazilskih rastlin tudi izvleček tropske rastline *Senna occidentalis* (da Silva in Vieira, 2019); izvleček *Chenopodium murale* je povešal raven  $H_2O_2$  v koreninah pšenice (*Triticum aestivum*) za več kot 60 % (Mitić in sod., 2018); izpostavitve rožmarinski kislini pa vodi do povešane sinteze tako  $H_2O_2$  kot  $O_2^{\bullet-}$  v koreninah kalic navadnega repnjakovca (Araniti in sod., 2018). Povešano raven slednjih dveh ROS so opazili tudi v koreninah čebule (*Allium cepa*) po izpostavitvi alelokemikaliji cianimid. Prvi odziv na alelokemikalijo je lahko zelo buren: v koreninah čebule se je po enodnevni izpostavitvi 10 mM cianimidu raven  $H_2O_2$  močno povešala (153 mM), po 6 dneh pa upadla za več kot 2-krat glede na začetek (65 mM) (Soltys in sod., 2011). Povešano raven ROS v prvih dneh po izpostavitvi alelopatskemu stresu so opazili tudi pri koreninah paradiznika (*Lycopersicon esculentum*), kjer se je koncentracija  $H_2O_2$  povešala za 77 % v prvih 24 urah po izpostavitvi vodnemu izvlečku tujerodne bučke (*Sicyos deppei*) (Lara-Nuñez in sod., 2006) ter v koreninah navadne kumare (*Cucumis sativus*), kjer se je po 3-dnevni izpostavitvi 0,25 mM cimetovi kislini sinteza  $O_2^{\bullet-}$  in  $H_2O_2$  povešala za 179 % oz. za 74 % (Ding in sod., 2007).

### 2.3.2 Antioksidanti: prilagoditvena strategija na oksidativni stres

Glavni obrambni mehanizem pred prekomerno sintezo ROS so antioksidanti. Antioksidanti v celicah skrbijo za redoks homeostazo: ko se raven ROS v celici poveča, antioksidanti reagirajo z ROS in tako zaustavijo njihove verižne reakcije. S tem neposredno preprečijo oksidacijo makromolekul v celicah in posledično nastanek poškodb (Gechev in sod., 2006; Das in Roychoudhury, 2014). Povišana količina antioksidantov je zato lahko jasen znak, da se rastlina nahaja v stresni situaciji, kot je alelopatija (Lara-Nuñez in sod., 2006). Po izpostavitvi kalic redkvice izvlečku poprove mete (*Menta ×peppermint*) se je v njihovih listih povečala aktivnost več antioksidativnih encimov: katalaze, askorbat peroksidaze in peroksidaze (Mahdavia in sod., 2017), encimov, ki so vključeni v razgradnjo  $H_2O_2$  (Das in Roychoudhury, 2014). Pri visokih koncentracijah  $H_2O_2$  je v celicah aktivna katalaza, pri nižjih koncentracijah pa so bolj aktivne druge peroksidaze (Gechev in sod., 2006). Aktivnost katalaze in askorbat peroksidaze se je v koreninah zelenega mungo fižola po izpostavitvi 5 mM BOA povečala za 6,6-krat oz. za 8,5-krat (Batish in sod., 2006). Podobno povečano aktivnost katalaze in peroksidaze so zaznali tudi v koreninah paradižnika po 24-urni in 48-urni izpostavitvi česnovi alelokemikaliji dialil disulfid (Cheng in sod., 2016). Izpostavitvev 0,25 mM cimetovi kislini pa je v koreninah kumare povzročila za 40 % višjo katalazno aktivnost in za 38 % višjo gvajakol peroksidazno aktivnost (Ding in sod., 2007).

Čeprav se antioksidativni sistem vedno odzove na povečano sintezo ROS, pa je njegov odziv pogosto zakasnen (Gechev in sod., 2006; Das in Roychoudhury, 2014). V svoji študiji so Lara-Nuñez in sod. (2006) ugotovili, da izpostavitvev vodnemu izvlečku tujerodne bučke v koreninah paradižnika najprej poveča količino  $H_2O_2$ : po 24 urah, ko je bila koncentracija  $H_2O_2$  najvišja, je bila aktivnost katalaze še vedno nizka. Raziskovalci domnevajo, da šele prisotnost  $H_2O_2$  spodbudi aktivnost katalaze, ki nato postaja vedno bolj aktivna in doseže svoj vrh po 72 urah od izpostavitve alelopatskim snovem (Lara-Nuñez in sod., 2006). Podoben odziv so opazili tudi pri koreninah koruze, ki so jih tretirali z vodo, s katero so izpirali orehove luščine – encimska aktivnost superoksid dismutaze je bila po 3 urah še vedno nizka, nato pa je po 6 in 12 urah od izpostavitve postopoma naraščala in dosegla najvišjo aktivnost 24 ur po izpostavitvi (Ciniglia in sod., 2015). Superoksid dismutaza je antioksidativni encim, ki katalizira pretvorbo strupenega  $O_2^{\cdot-}$  v  $H_2O_2$  in vodo (Das in Roychoudhury, 2014). Povečano aktivnost superoksida dismutaze za 58 % glede na kontrolo so opazili tudi v koreninah paradižnika v prvih 24 urah od izpostavitve izvlečku tujerodne bučke, hkrati pa se je koncentracija  $O_2^{\cdot-}$  v koreninah znižala (Lara-Nuñez in sod., 2006). Podobno je aktivnost superoksida dismutaze narasla v koreninah kumare (za 16 %) po 3-dnevni izpostavitvi 0,25 mM cimetovi kislini (Ding in sod., 2007) in za 17 % v koreninah kalic paradižnika po 24-urni izpostavitvi dialil disulfidu (Cheng in sod., 2016).

Ostali antioksidativni encimi, ki imajo prav tako pomembno vlogo pri homeostazi ROS, so: monodehidroaskorbat reduktaza, dehidroaskorbat reduktaza in glutathion reduktaza, ki reagirajo tako z  $O_2^{\cdot-}$  kot z  $OH^{\cdot}$  (Das in Roychoudhury, 2014). V koreninah 7 dni starih kalic zelenega mungo fižola se je po izpostavitvi 0,5 mM BOA aktivnost glutathion reduktaze podvojila, pri 5 mM BOA pa se je njena aktivnost povišala 22-krat glede na kontrolo (Batish in sod., 2006).

Poleg antioksidativnih encimov poznamo tudi neencimske antioksidante, med katerimi so najbolj znani askorbinska kislina (vitamin C), reduciran glutathion,  $\alpha$ -tokoferol (vitamin E), karotenoidi, flavonoidi in prolin (Gechev in sod., 2006; Das in Roychoudhury, 2014). Izpostavitve listnemu izvlečku rastline *Thapsia garganica* je v listih in koreninah solate povišala tako raven antioksidativnih encimov kot neencimskih antioksidantov (prolina, flavonoidov, flavanolov, karotenoidov) in drugih sekundarnih metabolitov z zaščitno vlogo (tanini, proantocijanidini) (Jmii in sod., 2020). V svoji študiji pa so Cheng in sod. (2016) ugotovili, da dialil disulfid v koreninah kalic paradižnika spodbudi izražanje več genov, ki so povezani z uravnavanjem metabolizma glutathiona. Tudi 5 % izvleček listov japonskega dresnika je po 7 dneh povišal vsebnost neencimskih antioksidantov v koreninah kalic redkvice za približno 3 % (Dolenc Koce in Šoln, 2018), prav tako pa se je v kalicah solate po 24-urni izpostavitvi kumarina umbeliferona povišala vsebnost prolina z 49 na 98  $\mu$ M/g sveže mase (Yan in sod., 2016).

Antioksidativni sistem torej z nevtralizacijo radikalov v celicah omogoča, da rastline preživijo kljub oksidativnemu stresu (Gniazdowska in sod., 2015). Po drugi strani pa lahko zelo močna ali dolgotrajna izpostavitve alelopatskim interakcijam vodi do prekomerne sinteze in akumulacije ROS v celicah tarčnih rastlin, kar privede do tega, da postane njihov antioksidativni sistem preobremenjen in ne zmore več učinkovito odstranjevati radikalov (Šoln in sod., 2022). Posledično koncentracija ROS zelo naraste, kar vodi do poškodb makromolekul v celicah. To neravnovesje med ROS in antioksidanti imenujemo oksidativni stres (Gechev in sod., 2006; Das in Roychoudhury, 2014).

### 2.3.3 Alelopatija in oksidativne poškodbe

Povišana sinteza in akumulacija ROS v rastlinskih celicah vodi do poškodb lipidov, proteinov in DNA. ROS zelo pogosto reagirajo z lipidi v celični membrani. To vodi do radikalske verižne reakcije, znane pod imenom lipidna peroksidacija (Gechev in sod., 2006; Das in Roychoudhury, 2014). Zaradi poškodb lipidnega dvosloja se poveča permeabilnost membran in zmanjša aktivnost membranskih encimov, kar negativno vpliva na delovanje membrane (Osredkar, 2012). Če je koncentracija ROS zelo visoka, so lahko poškodbe lipidnega dvosloja tako hude, da povzročijo propad membrane (Das in Roychoudhury, 2014). Lipidno peroksidacijo lahko povzroči tudi alelopatski stres, kot se je pokazalo po izpostavitvi alelokemikalijam BOA (Batish in sod., 2006), rožmarinovi kislini (Araniti in sod., 2018), cimetovi kislini (Ding in sod., 2007), juglonu (Babula in

sod., 2014) in umbeliferonu (Yan in sod., 2016). Prav tako je lipidna peroksidacija velikokrat povišana pri rastlinah, tretiranih z različnimi pripravki iz alelopatskih rastlin: od izvlečkov, kot je npr. izvleček tropske rastline *Senna occidentalis* (da Silva in Vieira, 2019), do vode, v kateri so namakali ali spirali posamezne rastlinske dele. V študiji Lara-Núñez in sod. (2009) so namakali liste tujerodne bučke (*Sicyos deppei*) in nato s to vodo zalivali testne rastline, v študiji Ciniglia in sod. (2015) pa so uporabili vodo, v kateri so spirali orehove luščine (*Juglans regia*).

Povišana peroksidacija membrane zmanjša aktivnost H<sup>+</sup>-ATPaze v membrani, kar posledično lahko vodi v smrt celice, kot se je pokazalo pri koreninah kumare, tretirane s cimetovo kislino (Ding in sod., 2007). ROS pa lahko prizadenejo tudi membrane mitohondrijev. Ti so še posebej izpostavljeni kisikovim radikalom, saj je eno izmed mest sinteze ROS ravno v mitohondrijih (Das in Roychoudhury, 2014). Za rožmarinovo kislino so na primer poročali, da je močno znižala mitohondrijski membranski potencial v koreninah 7 in 14 dni starih kalic navadnega repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*) (Araniti in sod., 2018).

Naslednje makromolekule, ki jih prizadenejo ROS, so proteini. Oksidacija proteinov vodi do različnih sprememb njihove strukture, npr. karboksilacija, nitrozilacija, glutationilacija in nastanek disulfidnih vezi. Vse te spremembe onemogočajo normalno delovanje takih proteinov v rastlinskih celicah, hkrati pa so oksidirani proteini tudi znamenje za proteolitične encime, da jih razgradijo (Das in Roychoudhury, 2014). Kot primer oksidativnih poškodb proteinov lahko navedemo izpostavitve celične kulture tobaka BY-2 alelokemikalijama juglon in plumbagin. Obe alelokemikaliji sta vplivali na encimsko aktivnost dehidrogenaz in oksidoreduktaz, encimov, ki sodelujejo v elektronski transportni verigi. Omenjeni alelokemikaliji lahko kot sprejemnika elektronov porušita elektronsko transportno verigo v mitohondrijih (Babula in sod., 2009). Za cimetovo kislino so ugotovili, da v kalicah kumare poviša aktivnost membranskega encima NADPH oksidaza (Ding in sod., 2007), medtem ko izvleček tujerodne bučke (*Sicyos deppei*) delovanje slednjega encima v koreninah paradižnika zavre za več kot polovico, kar bi lahko bilo povezano s poškodbami membran kot posledico oksidativnega stresa (Lara-Núñez in sod., 2006).

Prekomerno kopičenje ROS v celicah lahko privede tudi do poškodb DNA (Das in Roychoudhury, 2014), fragmentacije DNA (Babula in sod., 2014) ter posledično do zmanjšane celične viabilnosti (Ding in sod., 2007; Babula in sod., 2009; Yan in sod., 2016) in števila celic (Babula in sod., 2009), kar se kaže kot zavrta rast rastlin (Soltys in sod., 2012; Araniti in sod., 2018). Močno povišana koncentracija ROS v celicah lahko vodi tudi do preobčutljivostnega odgovora in programirane celične smrti (Van Doorn in sod., 2011).



## 2.4 ALELOPATIJA IN CELIČNA SMRT

Programirana celična smrt (PCD, ang. *programmed cell death*) je sestavni del rastlinskega življenja in neločljivo povezana z vsemi fazami razvoja rastline od oploditve do propada celotne rastline. PCD je aktiven in nadzorovan proces, med katerim se postopoma razgradijo celični organeli, na koncu pa propade tudi sama celica. Med PCD se porablja ATP (Van Doorn in Woltering, 2005). Glede na vrsto sprožilca ločimo razvojno in okoljsko PCD. Razvojno PCD aktivirajo notranji sprožilci, ki med drugim povzročijo razvojno diferenciacijo trahejskih elementov v žilah, trihomov in ženskega gametofita (Van Hautezem in sod., 2015). Okoljsko PCD pa sprožijo različni zunanji dejavniki. To je lahko abiotski stres (npr. vročina, močna UV-svetloba, suša itd.) ali biotski stres (npr. okužba s patogenimi mikroorganizmi). Med najbolj raziskanimi mehanizmi, ki jih sproži okoljski stres in vodijo do PCD, je preobčutljivostni odgovor. Ta mehanizem se aktivira predvsem ob okužbi s patogeni, s čimer rastlina omeji območje okužbe in s smrtjo okuženih celic prepreči širjenje okužbe po celotni rastlini (Salguero-Linares in Coll, 2019). Čeprav je o naravi delovanja alelopatskih snovi znanega malo, nekatere študije vseeno kažejo, da lahko izpostavitve alelopatiji prav tako vodi do PCD. Glede na naravo sprožilca bi tudi PCD, do katere privedejo alelopatske interakcije, lahko štel med okoljske PCD (Šoln in sod., 2022).

### 2.4.1 Aktivnost proteaz med programirano celično smrtjo, povezano z alelopatijo

Proteaze so encimi, ki ireverzibilno cepijo peptidne vezi v molekulah proteinov, s čimer jih razgradijo na manjše gradnike (peptide in aminokislinske). Glede na njihov katalitični mehanizem ločimo 5 glavnih tipov proteaz: cisteinske, aspartatne, treoninske, serinske in metaloproteaze. Za posamezne predstavnike vseh tipov proteaz so pri rastlinah znani dokazi, da sodelujejo tako pri razvojni kot pri okoljski PCD (Stael in sod., 2019). Po drugi strani pa je alelopatskih raziskav, ki bi preučevale delovanje proteaz na ravni mRNA ali njihove encimske aktivnosti, zelo malo. Problem je tudi zgodovinski, saj so v preteklosti PCD močno povezovali predvsem s kaspazami pri živalih ali s proteazami, ki so imele podobno strukturo kot kaspaze. Ostalih proteaz pa niso preučevali (Šoln in sod., 2022).

Pred manj kot dvajsetimi leti so med rastlinsko PCD odkrili aktivnost strukturnih homologov kaspaz, ki se imenujejo metakaspaze. V primerjavi s kaspazami metakaspaze ne cepijo substrata glede na negativno nabite aminokislinske ostanke na poziciji P1, ampak na poziciji P1 preferirajo bazične aminokislinske ostanke lizina ali arginina (Minina in sod., 2020).

### 2.4.2 Aktivnost nukleaz med programirano celično smrtjo, povezano z alelopatijo

Izpostavitve alelopatskim snovem lahko vodi tudi do razgradnje DNA v tarčnih rastlinah, kar je večinoma povezano z oksidativnim stresom (Šoln in sod., 2022). Najpogostejše

spremembe DNA so sprememba ali izguba nukleotida, oksidacija deoksiriboze, prelomi verig DNA in prečno mreženje (Das in Roychoudhury, 2014). Alelopatske snovi lahko vplivajo tudi na celovitost DNA izpostavljenih rastlin, kar so pokazali Ciniglia in sod. (2015), ki so pri koruzi, tretirani z odpadno vodo orehovitih luščin, odkrili povečano aktivnost DNaze v koreninah in hkrati povečano fragmentacijo DNA. Fragmentacijo DNA so opazili tudi v koreninskem vršičku solate, ki je bila izpostavljena juglonu (Babula in sod., 2014), in pri soji, ki so jo izpostavili odpadlemu listju evkaliptusa (Abdelmigid in Morsi, 2017). Poleg tega alelopatske snovi pogosto zmanjšajo mitotski indeks meristemskih celic v koreninskem vršičku, med drugim so negativni vpliv na mitotski indeks ugotovili za juglon (Babula in sod., 2014), cianimid (Soltys in sod., 2011, 2012) in umbeliferon (Yan in sod., 2016).

### **2.4.3 Morfološke spremembe med programirano celično smrtjo, povezano z alelopatijo**

PCD pri rastlinah spremljajo različne morfološke spremembe, tako na histološkem kot na ultrastrukturnem nivoju. Te spremembe so v literaturi zaradi svoje kompleksnosti pogosto razvrščene v različne skupine PCD glede na morfološke (in ultrastrukturne) značilnosti. Van Doorn in sod. (2011) so na osnovi strukturnih kriterijev opredelili dve osnovni skupini propada rastlinskih celic: vakuolna celična smrt in nekrozna celična smrt. Raziskav, ki bi sicer preučevale ultrastrukturne spremembe, povezane s PCD, po izpostavitvi alelopatskim snovem, je relativno malo (Šoln in sod., 2022).

Med vakuolno celično smrtjo se število vakuol postopoma povečuje zaradi fragmentacije osrednje vakuole. Vanje se akumulirajo številne makromolekule, kjer se začnejo razgrajevati. Vakuole se medtem združujejo v veliko osrednjo vakuolo (Van Doorn in sod., 2011). O nastanku velike vakuole poroča tudi nekaj alelopatskih študij. Tako na primer BOA in DIBOA sprožita nastanek velikih vakuol v celicah koreninske čepice pri kalicah kumare (Burgos in sod., 2004). Intenzivno vakuolizacijo so opazili tudi v meristemskih celicah v koreninah redkvice po izpostavitvi kumarinu (Aliotta in sod., 1993) in v celicah koreninske čepice po tretmaju z izvlečkom drevesa *Eugenia dysenterica* (Pereira in sod., 2017). Nastanek velikih vakuol v celicah koreninske čepice in apikalnega meristema korenine so opazili tudi Cruz-Ortega in sod. (1998), potem ko so smokvolistno bučo (*Cucurbita ficifolia*) in fižol (*Phaseolus vulgaris*) izpostavili izvlečku tujerodne bučke (*Sicyos deppei*). Poleg tega so za vakuolno PCD značilni tudi manjši znaki razgradnje citoplazme, medtem ko se turgor in ultrastruktura celičnih organelov ohranjata vse do zadnje stopnje PCD. V zadnji fazi vakuolne PCD se tonoplast razgradi, hidrolitični encimi pa se sprostijo iz vakuole v citoplazmo in hitro razgradijo celoten protoplast. Po koncu vakuolne PCD od rastlinske celice ostane samo celična stena (Van Doorn in sod., 2011).

Nekrotično celično smrt pogosto sprožijo različne poškodbe. V primerjavi z vakuolno PCD poteka propad celice pri nekrozi zelo hitro: od izpostavitve sprožilnemu dejavniku do konca celične smrti lahko mine od le nekaj minut do enega dneva. Med nekrozo se zgodijo številne celične spremembe, med drugim se celični organeli napihnejo, pojavijo se nepravilnosti v strukturi celične membrane, protoplast odstopi od celične stene in se skrči. To je najprepoznavnejši znak te vrste celične smrti, posledično se izgubi membranska celovitost (Van Doorn in sod., 2011). V celicah koreninske čepice kalice fižola, ki so jih izpostavili izvlečku tujerodne bučke, so mitohondriji začeli nabrekati, število njihovih kristalov pa se je zmanjšalo. Poleg tega je celična membrana odstopila od celične stene, celična jedra pa so postala nepravilnih oblik. Podobne spremembe so opazili tudi pri kalicah smokvolistne buče (*Cucurbita ficifolia*) (Cruz-Ortega in sod., 1998).

Poleg ultrastrukturnih sprememb lahko alelopatski stres negativno vpliva tudi na samo velikost apikalnega meristema korenine in zmanjša število meristemskih celic, kot so pokazali pri kalicah navadnega repnjakovca, ki so jih tretirali z benzojsko kislino (Zhang in sod., 2018) in farnezenom (Araniti in sod., 2017). Alelopatske spojine lahko vplivajo tudi na celični cikel. Zaradi prisotnosti cianimida se je med drugim v meristemskih celicah korenine čebule preoblikoval citoskelet in zmanjšala celična viabilnost (Soltys in sod., 2011). Izvleček *Chenopodium murale* pa je povzročil tanjšanje celične stene pri celicah koreninske čepice pšenice (Mitić in sod., 2018). Vsi ti vplivi kažejo, da lahko alelopatske snovi negativno vplivajo tako na zgradbo kot na delovanje koreninskega sistema sosednjih rastlin, kar predstavlja prednost alelopatske rastline v tekmovanju za naravne vire (Šoln in sod., 2022).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Korenike japonskega dresnika (*Fallopia japonica* var. *japonica* (Houtt.) Ronse Decr.) in češkega dresnika (*Fallopia ×bohemica* (Chrtek in Chrtková) J. P. Bailey) smo nabrali 5. 10. 2018 oz. 12. 10. 2018 v Ljubljani. Japonski dresnik smo vzorčili v sestoji na rečnem bregu Malega grabna na Vrhovcih, cesta Dolomitskega odreda (46° 2' 33,98" N, 14° 27' 0,91" E). Češki dresnik smo vzorčili v sestoji na mokrotnem travniku v Rožni dolini, Cesta XV (46° 3' 0,3" N, 14° 28' 44" E). Identiteto obeh vrst je potrdila predhodna analiza velikosti genoma (Strgulc Krajšek in Dolenc Koce, 2015). Korenike japonskega dresnika smo ponovno nabrali na isti lokaciji 14. 7. 2020. S korenin smo sprali zemljo in jih posušili. Nato smo jih razrezali na približno centimeterske koščke, jih zamrznili s tekočim dušikom in 5 dni liofilizirali pri tlaku 0,002 bara (liofilizer Scanvac CoolSafe, Labogene, Danska). Liofiliziran material so na Oddelku za lesarstvo Biotehniške fakultete zmleli v prah z mlinom SM 100 (Retsch, Düsseldorf, Nemčija), velikost zobcev žage 1 mm. Tako pripravljen rastlinski material smo do uporabe hranili v temi, v zaprtih steklenih kozarcih pri sobni temperaturi.

#### 3.2 PRIPRAVA IZVLEČKOV

##### 3.2.1 Priprava vodnih izvlečkov

Vodne izvlečke smo pripravili, kot je opisano v članku Dolenc Koce in Šoln (2018). Iz posušenih, zmletih in liofiliziranih korenin japonskega oz. češkega dresnika smo pripravili 10 % vodna izvlečka (w/v): 10 g rastlinskega materiala v 100 ml destilirane vode. Nastalo suspenzijo smo 24 ur stresali na stresalniku Laboshake RO5 (Gerhardt, Nemčija) pri 175 obratih/min in sobni temperaturi. Nato smo suspenzijo vakuumsko filtrirali skozi grob filtrirni papir (Grade 520A, Whatman, Maidstone, Velika Britanija). Iz 10 % izvlečka smo z redčenjem z destilirano vodo pripravili še 1 % izvleček. Izvlečke smo pred kalitvenim testom pripravili sveže.

##### 3.2.2 Priprava metanolnih izvlečkov in posameznih alelokemikalij

Metanolne izvlečke smo pripravili iz posušenih, zmletih in liofiliziranih korenin japonskega oz. češkega dresnika v koncentraciji 10 % (w/v): 10 g rastlinskega materiala v 100 ml 33 % metanola (VWR Chemicals, ZDA). Nastalo suspenzijo smo 24 ur stresali na stresalniku Laboshake RO5 (Gerhardt, Nemčija) pri 175 obratih/min in sobni temperaturi. Nato smo suspenzijo vakuumsko filtrirali skozi grob filtrirni papir (Grade 520A, Whatman, Maidstone, Velika Britanija), ki smo ga po potrebi menjavali. Iz 10 %

izvlečka smo z redčenjem s 33 % metanolom pripravili še 1 % izvleček. Izvlečke smo pred kalitvenim testom pripravili sveže.

V raziskavi smo analizirali tudi vpliv najpogostejših alelokemikalij, ki so prisotne pri dresnikih: resveratrol, (-)-epikatehin in emodin. Vse navedene komercialno dostopne alelokemikalije (Sigma-Aldrich, ZDA) smo raztopili v 33 % metanolu (VWR Chemicals, ZDA) in za vsak tretma pripravili sledeči koncentraciji: 0,2 mg/ml in 0,6 mg/ml. Glede na podatke iz študije Tucker Serniak (2016) o naravnih razmerjih med posameznimi alelokemikalijami v dresnikih smo pripravili tudi mešanico alelokemikalij s sledečimi koncentracijami: 0,2 mg/ml resveratrola, 0,6 mg/ml (-)-epikatehina in 0,2 mg/ml emodina.

### 3.3 ANALIZA IZVLEČKOV

#### 3.3.1 Analiza izvlečkov s HPLC

Standardne raztopine resveratrola, emodina, epikatehina in katehina smo pripravili v 33 % metanolu, vse v koncentraciji 1 mg/ml. Nato smo jih s 33 % metanolom razredčili do končne koncentracije 10 µg/ml. Vodne in metanolne izvlečke v koncentraciji 10 % smo pripravili, kot je opisano v podpoglavju 3.2, ter jih pred analizo še dodatno filtrirali s filtrom Millex GS (velikost por: 0,22 µm).

Za analizo vsebnosti resveratrola in emodina v izvlečkih japonskega in češkega dresnika smo uporabili metodo, ki je opisana v študiji Cheng in sod. (2013), in jo nekoliko prilagodili za naše vzorce. Analiza izvlečkov s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) je potekala na koloni Luna Omega 5 µm C18 (Phenomex Inc., ZDA), v velikosti 250 x 4,6 mm, z uporabo sistema HPLC Waters 2695 in detektorjem s fotodiodnim nizom (ang. *photodiode array detector*, PDA) 2996 (Waters, ZDA). Mobilno fazo sta sestavljala acetonitril (gradient, faza A) in 1,5 % fosforna kislina (faza B), pripravljena v bidestilirani vodi. Gradientna elucija je potekala po sledečem vrstnem redu: prvih 10 min izokratska elucija (44 % faza A), od 10. do 25. min je potekala linearna gradientna elucija (44–82 % faza A). Injekcijski volumen je bil 25 µl, analite smo ločevali pri pretoku 1 ml/min in temperaturi kolone 30 °C. Retencijski čas za resveratrol je bil 4,8 min in za emodin 20,5 min. Detekcija resveratrola je potekala pri valovni dolžini 320 nm, emodina pa pri 435 nm.

Vsebnost katehina in epikatehina smo določili po metodi Gürbüz in sod. (2007). Analitični sistem je bil enak kot pri določanju vsebnosti resveratrola in emodina, s to razliko, da smo uporabili fluorimetrični detektor Waters 2475 (Waters, ZDA). Mobilno fazo sta sestavljala acetonitril (gradient, faza A) in 5 % očetna kislina (faza B), pripravljena v bidestilirani vodi. Gradientna elucija je potekala po sledečem vrstnem redu: prvih 10 min izokratska elucija (9 % faza A), od 10. do 11. min je potekala linearna

gradientna elucija (9–25 % faza A) in od 11. do 20. min ponovno izokratska elucija (25 % faza A). Injekcijski volumen je bil 10  $\mu$ l, s hitrostjo na kolono 1 ml/min in temperaturo 30 °C. Retencijski čas za katehin je bil 7,5 min in za epikatehin 11,4 min. Detekcija je potekala pri ekscitacijski valovni dolžini 280 nm in emisijski valovni dolžini 315 nm.

Vse kemikalije za analizo HPLC (faza A in B) so bile znamke Merck (Nemčija).

### 3.3.2 Analiza izvlečkov z $^1\text{H}$ nuklearno magnetno resonančno spektroskopijo

Vsebnost resveratrola, epikatehina in emodina v koreninah japonskega in češkega dresnika smo določili tudi s pomočjo nuklearne magnetne resonančne spektroskopije (NMR).

Zmleti in liofilizirani material korenin dresnikov (opisano v podpoglavju 3.1) smo suspendirali v 96 % etanolu (12 g materiala v 100 ml 96 % etanola) in nastalo mešanico 24 ur mešali na magnetnem mešalu Rotamix 550MMH (Tehtnica, Slovenija) pri 400 obratih/min in sobni temperaturi. Po ekstrakciji smo mešanico vakuumsko filtrirali in topilo uparili pod znižanim tlakom na rotavaporju RV 10 digital V (IKA-WERKE, Nemčija) pri temperaturi 30 °C. Ekstrakcijo smo neodvisno ponovili trikrat.

Za NMR-analizo smo uporabili po 6 mg posameznega standarda (resveratrol, emodin in (-)-epikatehin, vse Sigma-Aldrich, ZDA) in po 50 mg posušenih izvlečkov japonskega in češkega dresnika ter jih raztopili v 0,7 ml *d*-dimetilsulfoksida (DMSO, Fluorochem, Velika Britanija). Spektri  $^1\text{H}$  NMR-standardov in izvlečkov so bili posneti z NMR-spektrometrom Avance III 500 (Bruker, ZDA) pri 296 K. Nato smo s programom MestReNova primerjali  $^1\text{H}$  NMR-spekter standardov in izvlečkov ter tako identificirali posamezne alelokemikalije v izvlečkih. Količino resveratrola, epikatehina in emodina v izvlečkih smo določili preko  $^1\text{H}$  NMR-spektrov, s pomočjo standarda 1-bromo-4-nitrobenzen (Sigma-Aldrich, ZDA).

### 3.3.3 Analiza elementne sestave izvlečkov z rentgensko fluorescenčno spektroskopijo s popolnim odbojem

Koncentracijo elementov S, Cl, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn, Se, Br, Rb in Sr v 1 % in 10 % vodnih izvlečkih korenin japonskega in češkega dresnika (postopek priprave je opisan v podpoglavju 3.2) smo izmerili z rentgensko fluorescenčno spektroskopijo s popolnim odbojem (ang. *total reflection X-ray fluorescence*, TXRF). Vzorce za analizo smo pripravili tako, da smo s pipetiranjem zmešali 1 ml posameznega izvlečka in 10  $\mu$ l galijevega standarda (Gallium standards for ICP, Sigma-Aldrich, ZDA). Tako pripravljeno raztopino smo odpipetirali na sredino reflektorja (premer: 3 cm), sušili 12 ur v eksikatorju ter nato postopek še enkrat ponovili. Vzorce smo nato sušili v eksikatorju

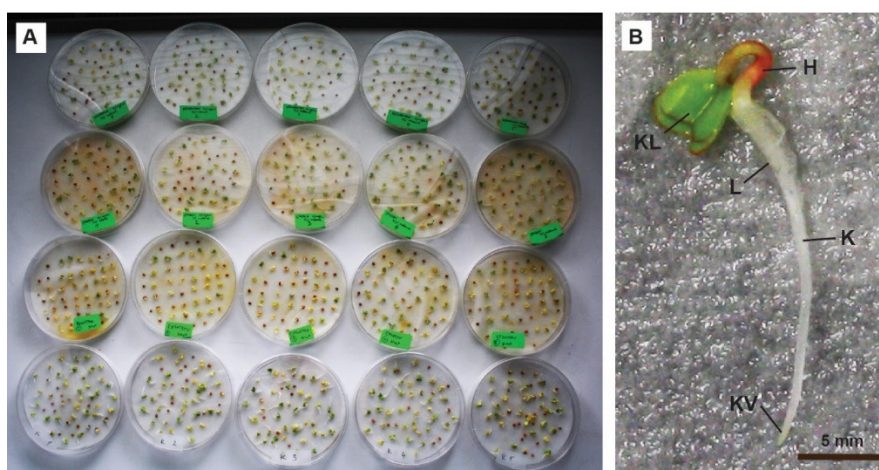
14 dni. Analiza je potekala s TXRF na Inštitutu Jožef Stefan po metodi Nečemer in sod. (2008).

### 3.4 KALITVENI POSKUSI

Za modelno rastlino smo izbrali vrtno redkvico (*Raphanus sativus* L. cv. Saxa 2, Semenarna Ljubljana, Slovenija). Po 50 semen smo kalili v zaprtih plastičnih petrijevkah (premer: 14 cm) na enem filtrirnem papirju (Grade 520A, Whatman, Maidstone, Velika Britanija). Za vsak tretma smo pripravili po pet neodvisnih ponovitev (N = 5). Na začetku kalitvenega poskusa smo semena zalili z 10 ml vodnega izvlečka, kontrolna semena pa z 10 ml destilirane vode.

Pri kalitvenih poskusih z metanolnimi izvlečki in posameznimi alelokemikalijami smo najprej uporabili steklene petrijevke (premer: 14 cm), filtrirni papir pa namočili z 10 ml metanolnega izvlečka oz. alelokemikalije. Za kontrolo smo uporabili 33 % metanol. Nato smo steklene petrijevke z omočenim filtrirnim papirjem posušili v sušilniku (40 °C, 20 min), da je ves metanol izhlapel in je bil filtrirni papir popolnoma suh. Nato smo filtrirni papir prenesli v plastične petrijevke, nanj položili semena redkvice in vse tretmaje zalili z destilirano vodo.

Semena smo kalili pri sobni temperaturi ( $22 \pm 2$  °C) in sobnih svetlobnih razmerah (približna fotoperioda 15 ur svetloba – 9 ur tema). Poskus smo zaključili po 3 dneh. Primer kalitvenega poskusa v petrijevkah je prikazan na Sliki 3. Po koncu poskusa smo prešteli število kaljenih semen in določili delež kaljivosti. Kalice smo fotografirali s fotoaparatom EOS 1000D z objektivom EF-S 60 mm f/2,8 makro (Canon, Japonska). Na digitalnih fotografijah smo z računalniškim programom ImageJ 1.x (Schneider in sod., 2012) izmerili dolžino korenin in poganjkov.



**Slika 3:** Prikaz kalitvenega poskusa: v plastičnih petrijevkah smo na omočenem filtrirnem papirju kalili semena redkvice (A). Struktura kalice redkvice po 3 dneh kalitve (B). Oznake: hipokotil (H), korenina (K), klični listi (KL), koreninski vršček (KV) in koreninski laski (L).

S skalpelom smo ločili poganjek in korenine, stehali svežo biomaso korenin kalic vsake ponovitve posebej ter korenine zamrznili v tekočem dušiku (N<sub>2</sub>) in shranili v zamrzovalniku pri –20 °C za nadaljnje biokemijske analize: lipidno peroksidacijo, TAC, antioksidativne encime in prolin. Za biokemijsko analizo koncentracije glutaciona in askorbata smo po koncu poskusa korenine liofilizirali in v terilnici zmleli v prah ter shranili pri –80 °C. Pri drugih biokemijskih, molekulskih in mikroskopskih analizah oz. kjer je omenjeno drugače, pa je končni postopek zamrzovanja in shranjevanja oz. priprave tkiv potekal drugače.

### 3.5 BIOKEMIJSKE ANALIZE

V koreninah vrtno redkvice smo z biokemijskimi analizami ločeno analizirali: vsebnost malondialdehida (MDA), ki je pokazatelj lipidne peroksidacije, vsebnost proteinov, aktivnost antioksidativnega encima gvajakol peroksidaze (G-POD) in koncentracijo celokupnih antioksidantov (TAC). Za vsak tretma smo pripravili po 5 ponovitev.

Na Univerzi v Gradcu, Avstrija, smo nato v koreninah kontrolnih in tretiranih kalic analizirali še vsebnost glutaciona, askorbata in prolina.

#### 3.5.1 Lipidna peroksidacija

Lipidno peroksidacijo smo določili posredno z merjenjem vsebnosti MDA, kot je opisano v Šoln in Dolenc Koce (2022). V terilnici smo v 1,5 ml 100 mM kalij-fosfatnega pufru (pH: 7,0) homogenizirali 100 mg zamrznjenih korenin. Homogenat smo centrifugirali 20 min v centrifugi 5417 R (Eppendorf, Nemčija) pri 14 000 obratih/min (oz. 15 339 x g) in temperaturi 4 °C. Nato smo v 6-ml steklene epruvete odpipetirali 200 µl supernatanta posameznega vzorca in dodali 800 µl reagenčne raztopine za MDA, ki je bila mešanica 2-tiobarbiturinske kisline (TBA, C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S, Fluka, Nemčija) in trikloroacetne kisline (TCA, C<sub>2</sub>HCl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, Acros Organics, Španija), v razmerju s končno koncentracijo 0,5 % TBA v 20 % TCA. Slepri vzorec je vseboval 200 µl 100 mM kalij-fosfatnega pufru (pH: 7,0) in 800 µl 0,5 % TBA v 20 % TCA. Epruvete smo 30 min inkubirali v sušilniku (WTC Binder, Nemčija) pri temperaturi 95 °C, da je potekla reakcija. Po koncu inkubacije smo epruvete ohladili v mrzli vodi in ledu ter tako ustavili reakcijo. S spektrofotometrom UV-1800 (Shimadzu UV Spectrophotometer, Japonska) smo izmerili absorbanco vzorcev pri valovnih dolžinah 532 nm in 600 nm. Uporabili smo polistirenske kivete za vidno svetlobo (PS; Brand, Nemčija). Referenčna kiveta je vsebovala 1 ml destilirane vode.

Vsebnost MDA smo izračunali po enačbi (1):

$$MDA/FW = \frac{A_{532} - A_{600}}{\epsilon \times 1000 \times m} \quad \dots (1)$$

Oznake:



MDA/FW: vsebnost MDA/sveža masa vzorca [ $\text{nM g}^{-1}$ ]

$A_{532} - A_{600}$ : razlika med absorbanco vzorca pri valovni dolžini 532 nm in 600 nm

$\epsilon$ : ekstinkcijski koeficient MDA pri 532 nm,  $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

m: sveža biomasa vzorca [g]

### 3.5.2 Merjenje encimske aktivnosti gvajakol peroksidaze

V homogenatu korenin smo spektrofotometrično izmerili aktivnost antioksidativnega encima gvajakol peroksidaze.

Homogenat smo pripravili tako, da smo 100 mg zamrznjenih korenin strli v terilnici ob dodatku 1,5 ml 100 mM kalij-fosfatnega pufru (pH: 7,0). Homogenat smo 20 min centrifugirali v centrifugi 5417 R (Eppendorf, Nemčija) pri 14 000 obratih/min (15 339 x g) in temperaturi 4 °C. Supernatant smo uporabili za merjenje aktivnosti gvajakol peroksidaze in koncentracije proteinov.

Za merjenje encimske aktivnosti gvajakol peroksidaze (G-POD; EC 1.11.1.7) smo uporabili reagenčno raztopino, ki je vsebovala 50 mM kalijev-fosfatni pufer (pH: 7,0) z 1 % gvajakolom (Sigma, ZDA) in 10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Belinka Perkemija, Slovenija). V polistirenske kivete za vidno svetlobo (PS; Brand, Nemčija) smo odpipetirali 980  $\mu\text{l}$  reagenčne raztopine G-POD in 20  $\mu\text{l}$  posameznega supernatanta ter mešanico dobro premešali s pipetiranjem. S spektrofotometrom UV-1280 (Shimadzu, Japonska) smo izmerili absorbanco posameznega vzorca pri valovni dolžini 470 nm. Referenčna kiveta je vsebovala 1 ml destilirane vode. Encimsko aktivnost G-POD smo merili 60 s, z 0,5-sekundnim intervalom odčitavanja absorpcije.

Encimsko aktivnost G-POD smo izračunali po enačbi (2):

$$EA = \frac{\Delta A}{\epsilon \times l} \quad \dots (2)$$

Oznake:

EA: encimska aktivnost [ $\mu\text{M min}^{-1}$ ]

$\Delta A$ : spremembe absorbance

$\epsilon$ : ekstinkcijski koeficient tetragvajakola pri 470 nm,  $\epsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

l: debelina kivete (1 cm)

Specifično encimsko aktivnost (SEA), ki je definirana kot aktivnost encima glede na koncentracijo vseh proteinov v vzorcu, smo izračunali po sledeči enačbi (3):

$$SEA = \frac{EA}{V \times c / 1000} \quad \dots (3)$$

Oznake:

SEA: specifična encimska aktivnost [ $\mu\text{M min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ]

EA: encimska aktivnost [ $\mu\text{M min}^{-1}$ ]

V: volumen supernatanta [ml]

c: koncentracija proteinov v vzorcu [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ ]

Za izračun aktivnosti G-POD smo potrebovali tudi koncentracijo proteinov. Slednjo smo v vzorcih določili s kompletom BCA za določanje koncentracije proteinov (BCA Protein Assay Kits, Novagen, ZDA). Reagenta A in B, ki sta bila priložena kompletu BCA, smo zmešali v razmerju 50 : 1. Uporabili smo 50  $\mu\text{l}$  supernatanta posameznega vzorca in 1 ml raztopine AB. Slepri vzorec je vseboval 50  $\mu\text{l}$  100 mM kalij-fosfatnega puфра (pH: 7,0) in 1 ml raztopine AB. Vzorce smo 30 min inkubirali v vodni kopeli pri 37 °C. Nato smo s spektrofotometrom UV-1280 (Shimadzu, Japonska) izmerili absorbanco vzorcev pri valovni dolžini 562 nm. Uporabili smo polistirenske kivete za vidno svetlobo (PS; Brand, Nemčija). Referenčna kiveta je vsebovala 1 ml destilirane vode.

Umeritveno krivuljo smo pripravili z govejim serumskim albuminom, kot je opisano v protokolu kompleta BCA. Preko umeritvene krivulje smo iz absorpcije vzorcev izračunali koncentracijo proteinov v vzorcih v  $\mu\text{g/ml}$ . Koncentracijo proteinov smo v nadaljevanju uporabili za izračun specifične encimske aktivnosti gvajakol peroksidaze.

### 3.5.3 Vsebnost neencimskih antioksidantov

Koncentracijo neencimskih antioksidantov (ang. *total antioxidative capacity* – TAC) smo analizirali preko vsebnosti 2,2-difenil-1-pikril-hidrazila (DPPH), kot je opisano v Šoln in Dolenc Koce (2022). Najprej smo pripravili 12 mM založno raztopino DPPH (Sigma-Aldrich, Nemčija) v 100 % metanolu (Merck, Nemčija) ter jo nato nadalje redčili s 100 % metanolom do končne koncentracije 120  $\mu\text{M}$  DPPH.

Homogenat smo pripravili tako, da smo v terilnici ob postopnem dodajanju 100 % metanola (skupaj 2 ml) strli 100 mg zamrznjenih korenin. Če je bilo rastlinskega materiala manj kot 100 mg (pri nekaterih vzorcih korenin), smo sorazmerno biomasi prilagodili volumen dodanega metanola. Tako pripravljen homogenat smo prelili v 2-ml mikrocentrifugirke in vzorce v centrifugi 5417 R (Eppendorf, Nemčija) 5 min centrifugirali pri 14 000 obratih/min (oz. 15 339 x g) pri 4 °C. Nato smo supernatant odpipetirali v 2-ml mikrocentrifugirke in usedlino zavrgli.

V nove 2-ml mikrocentrifugirke smo odpipetirali 2 ml 120  $\mu\text{M}$  DPPH in 30  $\mu\text{l}$  supernatanta. Vzorce smo 15 minut inkubirali v temi, da je potekla reakcija. Pri tem se je barva iz vijolične spremenila v svetlo rumeno. Raztopino smo prelili v steklene kivete (Hellma Analytics, Nemčija) in s spektrofotometrom UV-1800 (Shimadzu UV

Spectrophotometer, Japonska) izmerili absorbanco vzorcev pri valovni dolžini 515 nm. Referenčna kiveta je vsebovala 2 ml 100 % metanola (Merck, Nemčija). Kiveto smo med posameznimi meritvami spirali z metanolom. Glede na umeritveno krivuljo troloxa smo s programsko opremo UV Probe version 2.32 (Shimadzu corporation, Japonska) dobili koncentracijo TAC v mM.

Priprava umeritvene krivulje: trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilna kislina; Sigma-Aldrich, Nemčija) smo raztopili v metanolu in pripravili 10 mM založno raztopino trolox. Iz založne raztopine smo z redčenjem s 100 % metanolom pripravili sledeče koncentracije: 2, 1,5, 0,8, 0,6, 0,4 in 0,2 mM troloxa. Za vsako koncentracijo smo pripravili 3 paralelke. Nadaljnji postopek spektrofotometričnih meritev je bil enak, kot je opisano pri merjenju koncentracije TAC, le da smo namesto 30 µl posameznega vzorca uporabili 30 µl standarda trolox. Enačba umeritvene krivulje je bila:  $y = -0,29725x + 1,03177$ .

### 3.5.4 Koncentracija glutationa in cisteina

Koncentracijo celokupnih in oksidiranih tiolov (glutaciona in cisteina) v koreninah redkvic, ki so bile izpostavljene 1 % in 10 % izvlečkom japonskega oz. češkega dresnika, smo izmerili, kot je opisano v Roach in sod. (2018).

12 ur pred začetkom analize smo pripravili raztopino HCl: v 10-ml plastično centrifugirko smo dodali 20 mg polivinilpolipirolidona (Sigma, ZDA) in 1,1 ml ohlajene 0,1 M HCl (Roth, Nemčija). Centrifugirko z raztopino HCl smo pripravili za vsak vzorec posebej in jih do nadaljevanja shranili pri 4 °C. Naslednji dan smo približno 10 mg liofiliziranega in zmletega materiala korenin prenesli v raztopino HCl in vzorce homogenizirali s homogenizatorjem UltraTurax (Ika Labortechnik, Nemčija). Homogenizacija posameznega vzorca je potekala 20 s s hitrostjo 24 000 l/min. Vzorce smo nato centrifugirali v centrifugi BR4 (Jouvan, Francija) pri 10 000 obratih/min in 4 °C. Nato smo odpipetirali supernatant v nove 2-ml mikrocentrifugirke. V vmesnem času so bili vzorci ves čas na ledu.

Za meritev celokupnega glutaciona smo za posamezen vzorec v 1,5-ml rjavih mikrocentrifugirkah pripravili sledečo reakcijsko mešanico: 30 µl 1 M NaOH (Merck, Nemčija), 280 µl 200 mM pufra tris (pripravljen največ 2 dni pred uporabo: raztopili smo 900,5 mg tricina (> 99 %, Fluka, Monako) v 25 ml bidestilirane vode, dodali smo 10,6 mg EDTA Titriplex III (Merck, Nemčija) in pH s pH-metrom uravnali na 8,0), 70 µl 8 mM ditiotreitola (> 99 %, Roth, Nemčija), ki je bil pripravljen sveže, in 280 µl supernatanta posameznega vzorca. Za standard smo uporabili L-cistein (Roth, Nemčija) s sledečimi koncentracijami: 3,31 nmol/l, 6,63 nmol/l, 9,94 nmol/l, 13,25 nmol/l. Reakcijsko mešanico s standardi smo pripravili po enakem postopku kot za vzorce, le da smo namesto supernatanta dodali v mešanico 280 µl posameznega standarda. Tako

pripravljene reakcijske mešanice smo 5 s mešali na vorteksu in s pH-metrom 420A (Orion, Finska) preverili vrednost pH, ki je morala biti med 7,9 in 8,3. Vzorce smo nato 1 uro inkubirali na stresalniku za mikrocentrifugirke Thermomixer comfort (Eppendorf, Nemčija) pri 700 obratih/min in sobni temperaturi. Potem smo dodali 100  $\mu$ l monobromobimana (Sigma, ZDA), ki je v vzorcih označil tiolne (-SH) skupine, in vzorce nadalje inkubirali na stresalniku pri enakih pogojih. Po 15 min smo reakcijo ustavili z dodatkom 600  $\mu$ l 0,75 % metansulfonske kisline (Merck, Nemčija) in vzorce 30 min centrifugirali pri 14 000 obratih/min in temperaturi 4 °C. Nato smo 800  $\mu$ l supernatanta prenesli v vialo za HPLC.

Za meritev oksidiranega glutationa smo za posamezen vzorec v 1,5 ml brezbarvnih mikrocentrifugirkah pripravili sledečo reakcijsko mešanico: 43  $\mu$ l 1 M NaOH, 400  $\mu$ l 200 mM pufra tricin (pH: 8,0), 30  $\mu$ l 50 mM N-etilmaleimida (Sigma, Nemčija) in 400  $\mu$ l supernatanta. Tako pripravljeno reakcijsko mešanico smo 5 s mešali na vorteksu in nato 15 min inkubirali na stresalniku pri 700 obratih/min in sobni temperaturi. Med inkubacijo smo vzorce z aluminijasto folijo zaščitili pred svetlobo. Potem smo v reakcijsko mešanico dodali 500  $\mu$ l toluola (Roth, Nemčija), 20 s mešali na vorteksu in 3 min centrifugirali (pri 14 000 obratih/min, 4 °C). Zgornjo fazo s toluolom smo s pipeto odstranili. Ta postopek smo ponovili 3-krat. Na koncu smo s pipeto prenesli 500  $\mu$ l spodnje faze v nove 1,5-ml mikrocentrifugirke rjave barve ter dodali 57  $\mu$ l ditionitrola. Po 1-urni inkubaciji na stresalniku pri 700 obratih/min in sobni temperaturi smo dodali 82  $\mu$ l monobromobimana. Vzorce smo nadalje inkubirali v temi, na stresalniku pri 700 obratih/min in sobni temperaturi. Po 15 min smo reakcijo ustavili z dodatkom 491  $\mu$ l 0,75 % metansulfonske kisline in vzorce 30 min centrifugirali pri 14 000 obratih/min in temperaturi 4 °C. Nato smo 800  $\mu$ l supernatanta prenesli v vialo HPLC.

Analiza celokupne in oksidirane oblike tiolov je potekala na koloni Eurosphere II 100-5-C18 (Knauer, Nemčija), velikost 250 x 4 mm, debelina 5  $\mu$ m, z uporabo sistema HPLC Dionex Ultimate 3000 (Dionex, ZDA) in flurimetričnega detektorja Jasco FP2020 (Jasco, Japonska). Detekcija je potekala pri ekscitacijski in emisijski valovni dolžini 380 nm, 480 nm.

Koncentracijo glutationa in cisteina v vzorcih smo preračunali glede na standard glutationa (GSH) in cisteina, ki smo ju na HPLC izmerili skupaj z meritvijo vzorcev. Oksidirani obliki glutationa (GSSG) in cisteina smo izračunali tako, da smo od celokupne koncentracije glutationa oz. cisteina odšteli koncentracijo oksidiranih vzorcev ter delili z 2. Pri izračunu smo upoštevali, da med redukcijo z ditionitrolom 1 mol oksidiranega tiola doprinese za 2 mola reduciranega tiola. Vsebnost oksidiranega glutationa in cisteina smo izrazili kot % glede na celokupno vrednost.

### 3.5.5 Koncentracija askorbata

Koncentracijo celokupnega in oksidirane askorbata v koreninah redkvic, ki so bile izpostavljene 1 % in 10 % izvlečkom japonskega oz. češkega dresnika, smo izmerili, kot je opisano v Teuschler in sod. (2021).

Homogenizacijsko raztopino smo pripravili 12 ur pred začetkom analize. Za posamezen vzorec smo v 2-ml mikrocentrifugirke dodali 15–20 mg polivinilpolipirolidona (Sigma, ZDA) in 1,4 ml 1,5 % metafosforne kisline (Roth, Nemčija). Tako pripravljeno homogenizacijsko raztopino v mikrocentrifugirkah smo čez noč shranili pri 4 °C. Naslednji dan smo približno 10 mg liofiliziranega in zmletega materiala korenin prenesli v homogenizacijsko raztopino in vzorce homogenizirali s homogenizatorjem Ultra Turax Heidolph DIAX 600 (Ika Labortechnik, Nemčija). Homogenizacija posameznega vzorca je potekala 20 s s hitrostjo 24 000 l/min. Vzorce smo nato centrifugirali v centrifugi BR4 (Jouvan, Francija) pri 14 000 obratih/min in 4 °C. Nato smo odpipetirali supernatant v nove 2-ml mikrocentrifugirke. V vmesnem času so bili vzorci ves čas na ledu.

Za meritev reducirane askorbinske kisline smo za posamezen vzorec v 1,5-ml prozorni mikrocentrifugirki uporabili sledečo reakcijsko mešanico: 337,5 µl 0,2 M pufra tris (pH: 8,0), 37,5 µl bidestilirane vode, 75 µl ortofosforne kisline (1 : 10, 85 %) in 450 µl supernatanta.

Za meritev celokupne askorbinske kisline smo za posamezen vzorec v 1,5-ml prozorni mikrocentrifugirki uporabili sledečo reakcijsko mešanico: 337,5 µl 0,2 M pufra tris (pH: 8,0), 37,5 µl ditiotreitola (60 mg ditiotreitola smo raztopili v 1,5 ml bidestilirane vode) in 450 µl supernatanta. Vzorce smo v reakcijski mešanici 3 s premešali na vorteksu, nato smo jih 10 min inkubirali na stresalniku Thermomixer comfort (Eppendorf, Nemčija) pri 700 obratih/min in sobni temperaturi. Nato smo dodali 100 µl ortofosforne kisline (Roth, Nemčija), ki smo jo pripravili tako, da smo 10 ml 85 % ortofosforne kisline raztopili v 100 ml bidestilirane vode.

Nadaljnji postopek je bil za določitev tako reducirane kot celokupnega askorbata enak: vzorce smo za 3 s premešali na vorteksu in centrifugirali 30 min pri 14 000 obratih/min in 4 °C. Nato smo 750 µl supernatanta prenesli v vialo HPLC.

Analiza koncentracije askorbata je potekala na koloni Eurosphere II 100-5-NH2 (Knauer, Nemčija), v velikosti 250 x 4 mm, z uporabo sistema HPLC Dionex Ultimate 3000 (Dionex, ZDA) in detektorjem (Dionex, ZDA) s serijo diod. Detekcija askorbata je potekala pri 250 nm.

### 3.5.6 Koncentracija prolina

Koncentracijo prostega prolina smo določili spektrofotometrično. Uporabili smo korenine redkvice, ki smo jih po koncu poskusa po 100 mg sveže mase prenesli v 2-ml mikrocentrifugirke in jih zamrznili s tekočim dušikom ter jih do analize shranili pri  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Najprej smo vzorce homogenizirali: v mikrocentrifugirke s koreninami smo dodali 1,5 ml 3 % sulfosalicilne kisline (Merck, Nemčija) in vzorce homogenizirali s homogenizatorjem Ultra Turax Heidolph DIAX 600 (Ika Labortechnik, Nemčija) približno 20–30 s. Nato smo vzorce centrifugirali 15 min pri 14 000 obratih/min in sobni temperaturi.

Raztopino ninhidrina ( $> 99\%$ , Roth, Nemčija) smo pripravili tako, da smo 2,5 g ninhidrina raztopili v 60 ml led-ocetne kisline (Roth, Nemčija) in 40 ml 6 M ortofosforne kisline (Merck, Nemčija). Reakcijo za analizo prolina smo izvedli v steklenih epruvetah. Posamezna reakcijska mešanica je vsebovala: 500  $\mu\text{l}$  kislega ninhidrina, 500  $\mu\text{l}$  led-ocetne kisline in 500  $\mu\text{l}$  supernatanta.

Za standard smo uporabili L-prolin (Merck, Nemčija). Najprej smo pripravili založno raztopino 1 mg/ml prolina: 10 mg prolina smo raztopili v 10 ml 3 % sulfosalicilne kisline. Posamezne nižje koncentracije smo pripravili tako, da smo založno raztopino redčili s 3 % sulfosalicilno kislino. Za standarde smo uporabili sledečo koncentracijsko vrsto: 0, 5, 10, 15, 20, 30 in 40  $\mu\text{g/ml}$  prolina. Reakcijsko mešanico s standardi smo pripravili po enakem postopku kot za vzorce, le da smo namesto supernatanta dodali v mešanico 280  $\mu\text{l}$  posameznega standarda.

Reakcijsko mešanico tako vzorcev kot standardov smo nato inkubirali 1 uro v vodni kopeli (Waterbath B-480, Büchi, Švica) pri temperaturi  $100^{\circ}\text{C}$ . V tem času se je barva raztopine spremenila iz brezbarvne v svetlo rdečo. Reakcijo smo nato ustavili z ledom. Po približno 10 min smo dodali toluol (Roth, Nemčija). Vzorce smo nato 15–20 s mešali na vorteksu. Potem smo odpipetirali zgornjo, rdečo fazo in jo zavrgli. Spodnjo fazo smo prenesli v steklene kivete (Hellma, Nemčija) in na spektrofotometru U-300 (Hitachi, Japonska) izmerili absorbanco pri valovni dolžini 520 nm. Referenčna kiveta je vsebovala toluol.

## 3.6 DOLOČANJE PROTEAZNE AKTIVNOSTI V KORENINAH REDKVICE

V svežih vzorcih korenin kalic redkvice smo merili proteazno aktivnost, kot je opisano v Šoln in Klemenčič (2022). Po koncu kalitvenega poskusa smo korenine odrezali približno 1 cm od koreninskega vršička. Nato smo 100 mg korenin homogenizirali v terilnici s tekočim dušikom ter na koncu dodali 1 ml pufru MES (2-(N-morfolino)etansulfonska

kislina, Sigma-Aldrich, ZDA). Pufer MES smo pripravili predhodno: 20 mM MES hidrata (Sigma, ZDA), 150 mM NaCl (Gram-Mol, Hrvaška), pH 5,5. Celični lizat smo nato prelili v predhodno ohlajene mikrocentrifugirke in jih 15 s mešali na vorteksu. Med celotnim postopkom so bili vzorci na ledu. Za vsak tretma smo uporabili po 2 biološki ponovitvi.

Proteazno aktivnost smo merili s pomočjo fluorogenih substratov. Za analizo kaspazam podobne proteazne aktivnosti smo uporabili Caspase Fluorometric Substrate Set II (BioVision, ZDA). Za analizo metakaspazam podobne proteazne aktivnosti smo uporabili Z-RR-AMC (PeptaNova, Nemčija). V obeh primerih smo reakcijo izvedli na mikrotitrskih ploščah.

Za analizo kaspazam podobne proteazne aktivnosti smo za posamezen vzorec uporabili sledečo reakcijsko mešanico: 188  $\mu$ l pufru MES, 1  $\mu$ l 1 M ditionitroila (Thermo Scientific, ZDA) in 1  $\mu$ l 1 mM kaspaznega substrata v dimetilsulfoksidu (Sigma-Aldrich, ZDA). Uporabili smo sledeče kaspazne substrate: YVAD, DEVD, VDVAD, WEHD, LEHD, LEVD, IETD, VEID in AEVD. Vsi uporabljeni kaspazni substrati so imeli na poziciji P1 asparagin. Vsak kaspazni substrat je vseboval specifično aminokislinsko zaporedje, za katerega je značilno, da ga cepijo določene proteaze.

Specifično aminokislinsko zaporedje posameznega kaspaznega substrata:

- YVAD: tirozin (Y), valin (V), alanin (A), asparaginska kislina (D)
- DEVD: asparaginska kislina (D), glutaminska kislina (E), valin (V), asparaginska kislina (D)
- VDVAD: valin (V), asparaginska kislina (D), valin (V), alanin (A), asparaginska kislina (D)
- WEHD: triptofan (W), glutaminska kislina (E), histidin (H), asparaginska kislina (D)
- LEHD: levcin (L), glutaminska kislina (E), histidin (H), asparaginska kislina (D)
- LEVD: levcin (L), glutaminska kislina (E), valin (V), asparaginska kislina (D)
- IETD: izolevcin (I), glutaminska kislina (E), treonin (T), asparaginska kislina (D)
- VEID: valin (V), glutaminska kislina (E), izolevcin (I), asparaginska kislina (D)
- AEVD: alanin (A), glutaminska kislina (E), valin (V), asparaginska kislina (D)

Za analizo metakaspazam podobne proteazne aktivnosti smo za posamezen vzorec uporabili sledečo reakcijsko mešanico: 188  $\mu$ l pufra HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina (20 mM HEPES (Sigma, ZDA) s 150 mM NaCl, pH 7,5)), 1  $\mu$ l 1 M ditiotreitola in 1  $\mu$ l 1 mM metakaspaznega substrata RR-AMC v dimetilsulfoksidu. Metakaspazni substrat je imel na poziciji P1 arginin, substrat je vseboval aminometilkumarin (AMC). V vsak vzorec smo na koncu dodali 10  $\mu$ l celičnega lizata. Mikrotitrne plošče smo pokrili z aluminijasto folijo in jih 1 uro inkubirali na namiznem stresalniku (Thermo Scientific, ZDA) pri 120 obratih/min in sobni temperaturi. Proteazno aktivnost smo izmerili s fluorimetrom Tecan Infinite F200 Fluorescence Microplate Reader (Tecan, Švica). Detekcija kaspazam podobne aktivnosti je potekala pri ekscitacijski valovni dolžini 400 nm in emisijski valovni dolžini 505 nm. Detekcija metakaspazam podobne aktivnosti pa pri 388 nm in 455 nm.

Koncentracijo celokupnih proteinov v celičnem lizatu smo za vsak vzorec določili spektrofotometrično z uporabo metode Bradford. Reagenčna mešanica za en vzorec je vsebovala: 790  $\mu$ l destilirane vode Milli-Q, 200  $\mu$ l 5  $\times$  reagenta Bradford in 10  $\mu$ l celičnega lizata. S spektrofotometrom UV/VIS Pharmacia Ultrospec 1000 (Amersham Pharmacia, Švica) smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 595 nm. Koncentracijo proteinov smo izračunali glede na umeritveno krivuljo standarda, govejega serumskega albumina.

Na koncu smo vrednosti fluorescence, ki smo jih dobili pri merjenju proteazne aktivnosti, za vsak lizat normalizirali glede na koncentracijo proteinov.

### 3.7 LOKALIZACIJA VODIKOVEGA PEROKSIDA

Po koncu kalitvenega poskusa z metanolnimi izvlečki in komercialnimi alelokemikalijami smo pri posameznem tretmaju izbrali po 5 reprezentativnih kalic vrtno redkvice, jih fotografirali in v njihovih tkivih lokalizirali  $H_2O_2$  z barvilom 3,3'-diaminobenzidin (DAB) ter tako ocenili intenzivnost oksidativnega stresa.

Najprej smo pripravili raztopino DAB: 50 mg DAB (Sigma-Aldrich, Nemčija) smo raztopili v 45 ml destilirane vode. S pomočjo pH-lističev smo določili pH-vrednost in jo z dodajanjem 0,2 M HCl (Carlo Erba, Italija) umerili na vrednost 3. Centrifugirko z raztopino smo ovili v aluminijasto folijo in jo 1 uro mešali na magnetnem mešalu. Nato smo dodali še 25  $\mu$ l Tween-20 (Sigma-Aldrich, Nemčija) in 2,5 ml 0,2 M  $Na_2HPO_4$ .

Majhne plastične petrijevke (premer: 5,5 cm) smo do vrha napolnili z raztopino DAB in vanjo potopili po 5 kalic redkvice. Petrijevke smo zložili v eksikator in jih 10 minut vakuumsko infiltrirali. Nato smo kalice v temi inkubirali na stresalniku Laboshake RO5 (Gerhardt, Nemčija) pri 40 obratih/min. Po 4 urah smo jih razbarvali v vročem 96 % etanolu (10 minut). Kalice smo shranili v mešanici 96 % etanola (VWR Chemicals,



Francija), očetne kisline (Carlo Erba, Italija) in glicerola (Carlo Erba, Italija) v razmerju 3 : 1 : 1 (v/v/v), kot je opisano v Jambunathan (2010).

Rastlinska tkiva, v katerih poteka sinteza  $H_2O_2$ , se po barvanju z DAB obarvajo temno rjavo. Po barvanju smo kalice pregledali s stereo lupo (Stemi SV 11, Carl Zeiss, Nemčija) ter jih s kamero AxioCam in programom AxioVision (Carl Zeiss, Nemčija) fotografirali pri 0,6- in 2,5-kratni povečavi. Slike kalic smo nato uredili z računalniškima programoma Adobe Illustrator CS5 in Adobe Photoshop CS5 (Adobe System, ZDA).

### 3.8 ANALIZA POVRŠINE KORENINE

Površine koreninskih vršičkov redkvic smo analizirali z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM). Osredotočili smo se na spremembe zunanje morfologije korenin. Kalitveni poskus smo izvedli po enakem postopku, kot je opisan v podpoglavju 3.4, le da smo rastline 3 dni gojili v rastni komori (Binder, Nemčija). Uporabili smo 1 % in 10 % koncentracijo vodnega izvlečka japonskega oz. češkega dresnika. Pri vsakem tretmaju smo analizirali vzorce treh koreninskih vršičkov.

#### 3.8.1 Fiksiranje, dehidriranje in sušenje vzorcev pri kritični točki

Po koncu poskusa smo od kalic redkvice s skalpelom odrezali približno 1 cm dolg končni del korenine s koreninskim vršičkom, ki smo ga uporabili za pripravo vzorcev za SEM. Vzorce korenin smo fiksirali z 2,5 % glutaraldehidom (Roth, Nemčija) v 0,067 M Sørensenovem pufru (392 ml 0,067 M  $KH_2PO_4$  smo zmešali s 608 ml 0,067 M  $Na_2HPO_4$ , pH: 7,0; obe kemikaliji Merck, Nemčija). Vzorce smo 3–4 ure inkubirali pri sobni temperaturi (20 °C) in nato čez noč pri 4 °C.

Naslednji dan smo s kapalko odstranili fiksativ in ga nadomestili s Sørensenovim pufrom. Čez 2 uri smo zamenjali pufer z novim. Nato smo čez približno 3 ure vzorce dehidrirali v naraščajoči koncentracijski vrsti od 50 % do 100 % acetona (HPLC grade, Roth, Nemčija). Postopek je potekal po sledečem vrstnem redu: iz stekleničk smo odstranili Sørensenov pufer in ga nadomestili s 50 % acetonom. Postopek smo čez približno 3 ure ponovili ter vzorce pustili čez noč v 50 % acetonu. Po približno 8 urah smo ga nadomestili s 70 % acetonom ter postopek po približno 4 urah še enkrat ponovili. Po približno 3 urah smo vzorce izpostavili 90 % acetonu. Naslednji dan smo postopek ponovili ter 90 % aceton po 6 urah nadomestili s 100 % acetonom ter postopek še enkrat ponovili. Vzorce smo čez noč shranili v 100 % acetonu pri 4 °C.

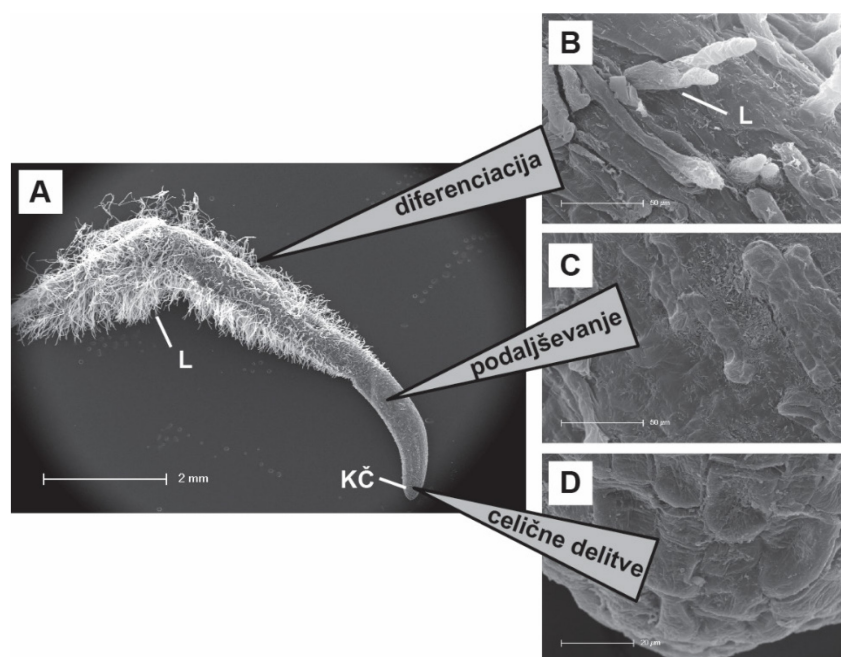
Naslednji dan smo vzorce posušili s sušenjem pri kritični točki na aparatu CPD 030 (Balzers, Lihtenštajn). Za sušilni medij smo uporabili  $CO_2$ . Posušene vzorce smo pregledali s stereo mikroskopom Olympus SZX16 (Olympus, Japonska) in fotografirali z računalniško opremo CellSensEntry (Japonska).

### 3.8.2 Priprava in analiza korenin s SEM

Fiksirane vzorce smo naprašili z zlatom (Agar Sputter Coater, Velika Britanija) in jih nadalje analizirali z vrstičnim elektronskim mikroskopom XL30 ESEM (FEI, Nizozemska) s pospeševalno napetostjo 20 kV, vzorci so bili v vakuumu.

S SEM smo preučevali površino korenine. Osredotočili smo se na 3 dele korenine: območje celičnih delitev, območje podaljševanja (struktura celic) in območje diferenciacije (prisotnost in pogostost koreninskih laskov) (Sl. 5). Osredotočili smo se na zunanost celic, povezave med njimi, prisotnost bakterij na površini korenine ter na prisotnost in dolžino koreninskih laskov.

Slike korenin smo nato uredili z računalniškima programoma Adobe Illustrator CS5 in Adobe Photoshop CS5 (Adobe System, ZDA).



**Slika 4:** Korenina 3 dni stare kalice vrtno redkvice (A), posneta z vrstičnim elektronskim mikroskopom, kjer smo preučevali 3 koreninska območja: območje celičnih delitev, območje podaljševanja in območje diferenciacije. Prikazani so koreninski laski (B), celice v območju elongacije (C) in koreninska čepica (D). Oznake: koreninska čepica (KČ), koreninski laski (L).

### 3.9 HISTOLOŠKE IN ULTRASTRUKTURNE ANALIZE

Za analizo koreninskih vršičkov redkvic na histološkem in ultrastrukturnem nivoju smo izvedli poskus po enakem postopku kot za kalitveni test, ki je opisan v podpoglavju 3.4, le da smo za tretma uporabili samo 10 % vodna izvlečka japonskega oz. češkega dresnika.

Poskus je trajal 3 dni. Po koncu poskusa smo kalice redkvice fotografirali s fotoaparatom EOS 1000D (Canon, Japonska).

### **3.9.1 Fiksiranje, dehidriranje in vklapljanje vzorcev v smolo**

Kalice redkvic smo po koncu poskusa prenesli v petrijevke (premer: 14 cm) z mokrim filtrirnim papirjem in s skalpelom odrezali vzorec končnega dela korenine, približno 1 cm od koreninskega vršička. Pri vsakem tretmaju smo po 10 korenin fiksirali s 3 % glutaraldehidom v 0,075 M fosfatnem pufru (pH: 7,2). V 2-ml mikrocentrifugirke smo odpipetirali 1 ml fiksativa in vanje s pinceto previdno prenesli sveže odrezan vzorec korenin. Mikrocentrifugirke smo zaprli, jih oblepili s parafilmom in vzorce 2 uri inkubirali v fiksativu na rotorju B7925 (Agar Scientific, Velika Britanija). Nato smo vzorce v istem fiksativu shranili čez noč pri 4 °C. Po 24 urah smo iz mikrocentrifugirk odstranili fiksativ in ga nadomestili s pufrom za spiranje (0,075 M natrij-natrijev fosfatni pufer s pH 7,2, pripravljen z vodo Milli-Q). Spiranje smo s 15-minutnimi razmaki 3-krat ponovili. Vzorce v mikrocentrifugirkah smo v vmesnem času inkubirali na rotorju. Na koncu smo pufer za spiranje nadomestili z 1 % osmijevim tetroksidom (OsO<sub>4</sub>) v fosfatnem pufru. Postfiksacija v OsO<sub>4</sub> je trajala 1,5 ure. Nato smo OsO<sub>4</sub> sprali s fosfatnim pufrom ter s 15-minutnimi razmaki postopek 3-krat ponovili.

Vzorce smo dehidrirali v naraščajoči alkoholni vrsti od 30 % do 100 % etanola (Honeywell Riedel-de-Haën, Nemčija). V vsaki fazi smo vzorce 15 minut inkubirali na rotorju. Postopek je potekal po sledečem vrstnem redu: iz mikrocentrifugirk smo odstranili pufer za spiranje in ga nadomestili s 30 % etanolom. Tega smo po 15 minutah nadomestili s 50 % etanolom, dvakrat s 70 % etanolom, dvakrat z 90 % etanolom in dvakrat s 100 % etanolom. Nato smo vzorce dvakrat po 15 min dehidrirali v acetonu (Merck, Nemčija). Na koncu smo vzorce čez noč inkubirali v mešanici smole Agar 100 in acetona, ki sta bila v razmerju 1 : 1 (v/v). Mikrocentrifugirke so se pri tem ves čas vrtele na rotorju (3. stopnja, sobna temperatura).

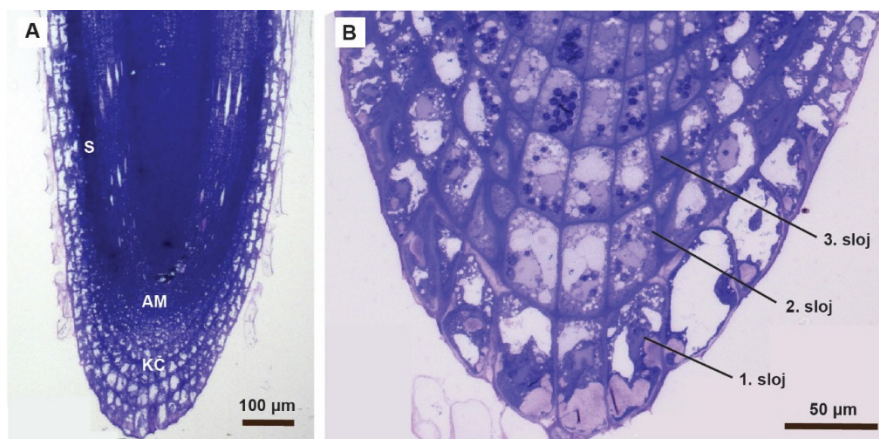
Naslednji dan smo vzorce vklopili v smolo Agar 100 (Agar Scientific, Velika Britanija), ki smo jo pripravili po navodilih proizvajalca za smolo srednje trdote. Iz mešanice smole in acetona v razmerju 1 : 1 (v/v) smo vzorce prenesli v čisto smolo in jih v njej inkubirali 2 uri. Nato smo jih še dvakrat za 2 uri prenesli v svežo smolo ter jih čez noč pustili v smoli. Mikrocentrifugirke so se pri tem ves čas vrtele na rotorju (3. stopnja, sobna temperatura). Na koncu smo vzorce prenesli v silikonske modelčke za oblikovanje blokca ter jih vklopili v čisto smolo. Koreninske vršičke smo orientirali vzdolžno. Polimerizacija smole je potekala 24 ur pri 60 °C.

### 3.9.2 Priprava poltankih rezin in analiza preparatov s svetlobnim mikroskopom

Poltanke rezine smo pripravili z ultramikrotomom Reichert Ultracut S (Leica, Avstrija). Za pripravo poltankih rezin smo uporabili steklene nože (Leica, Avstrija). Rezine debeline 1  $\mu\text{m}$  smo prenesli v kapljico destilirane vode na objektnem stekelcu, prevlečenem s polilizinskim adhezivom. Poltanke rezine v kapljici vode smo posušili na grelni plošči TP2025 (Krocker Marijan, s. p., Slovenija) pri temperaturi 80  $^{\circ}\text{C}$ . Nato smo jih obarvali z barvilom Azur II-metilen modro. Ko so bile rezine popolnoma suhe, smo pripravili trajne preparate: na objektno stekelce z rezinami smo s kapalko prenesli krovni medij Ultrakitt (Biosystems, Švica), pokrili s krovnim stekelcem in posušili.

Trajne mikroskopske preparate vzdolžnih prerezov korenin redkvic smo opazovali s svetlobnim mikroskopom Axioskop 2 MOT (Carl Zeiss, Nemčija) pri 40-, 100- in 400-kratni povečavi. Vzorce smo fotografirali z barvno digitalno kamero AxioCam MRc (Carl Zeiss Vision, Nemčija) in računalniškim programom AxioVision (Carl Zeiss Vision, Nemčija). Slike koreninskih vršičkov smo uredili z računalniškima programoma Adobe Illustrator CS5 in Adobe Photoshop CS5 (Adobe System, ZDA).

Za analizo korenin s svetlobnim mikroskopom smo pri posameznem tretmaju pregledali poltanke rezine vzdolžnega prereza 3–5 korenin. Na slikah koreninskih vršičkov pri 400-kratni povečavi smo z računalniškim programom ImageJ 1.x (Schneider in sod., 2012) izmerili dolžino in širino celic v prvih treh zunanjih slojih koreninske čepice (Sl. 4). V vsakem sloju smo izmerili dolžino in širino 10 celic, 5 od sredine vršička levo in 5 od sredine vršička desno. Prešteli smo tudi število vseh celičnih slojev, ki so sestavljali koreninsko čepico.



**Slika 5:** Vzdolžni prerez korenine 3 dni stare kalice vrtno redkvice (A) in prikaz koreninske čepice z označenimi sloji, kjer smo izmerili dolžino in širino celic (B): 1. sloj je zunanji, 2. sloj je pod njim, 3. sloj je notranji. Oznake: apikalni meristem (AM), koreninska čepica (KČ), skorja (S).

### 3.9.3 Priprava ultratankih rezin in analiza s TEM

Ko smo na osnovi poltankih rezin določili sredino korenine, smo na istem mestu z diamantnim nožem (Diatome, Švica), vpetim v ultramikrotom Reichert Ultracut S (Leica, Avstrija) pripravili ultratanke rezine, debeline 70 nm. Ultratanke rezine smo prenesli na bakrene mrežice grid (SPI Supplies, ZDA) s folijo Formvar (Fluka, Nemčija). Kontrastirali smo jih 8 min z 1 % uranil acetatom (SPI Supplies, ZDA) in 8 min z 10 % svinčevim citratom (SPI Supplies, ZDA). Nato smo jih sprali z 0,05 M NaOH in destilirano vodo.

Ultratanke rezine smo pregledali s presevnim elektronskim mikroskopom CM 100 (Philips, Nizozemska) ter jih fotografirali z digitalno kamero Bioscan 792 (Gatan, ZDA) in računalniškim programom Digital Micrograph (Gatan, ZDA). Osredotočili smo se predvsem na prve tri zunanje plasti koreninske čepice in apikalni meristem. Pri vsakem tretmaju smo analizirali vzorce treh koreninskih vršičkov. Za vsak vzorec smo pregledali najmanj dve mrežici.

## 3.10 MOLEKULARNE ANALIZE

### 3.10.1 Priprava vzorcev za molekularne analize

Za molekularne analize korenin redkvic po tretiranju z vodnimi izvlečki dresnikov smo izvedli enak kalitveni poskus z vodnimi izvlečki, kot je opisan v podpoglavju 3.4. Semena redkvice (*Raphanus sativus* L. cv. Saxa 2) smo izpostavili 10 % vodnima izvlečkoma korenin japonskega in češkega dresnika, za kontrolo smo uporabili destilirano vodo. Po 3 dneh smo s skalpelom odrezali približno 1 cm dolg končni del korenine, vključno z vršičkom. Po 2 koreninska vršička iz posameznega tretmaja smo takoj prenesli v plastične mikrocentrifugirke s keramično kroglico ter jih zamrznili s tekočim dušikom. Za vsak tretma smo pripravili po 3 vzorce. Vzorce smo do nadaljnjih postopkov hranili pri  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 3.10.2 Izolacija celokupne RNA iz koreninskih vršičkov

Iz zamrznjenih vzorcev koreninskih vršičkov smo izolirali celokupno RNA z uporabo kompleta RNeasy Plant Mini Kit (Quiagen, ZDA). Izolacija je potekala po navodilih proizvajalca, z nekaj prilagoditvami.

V mikrocentrifugirke z zamrznjenimi koreninskimi vršički smo dodali 500  $\mu\text{l}$  pufru RLT in jih približno 5 s mešali na vorteksu. Nato smo mikrocentrifugirke z vzorci vpeli v homogenizator FastPrep (MP Biomedicals, ZDA) in jih homogenizirali 60 s pri hitrosti 6,5 m/s. Potem smo vzorce inkubirali 5 min v termobloku (Kambič laboratorijska oprema, d. o. o., Slovenija) pri  $56^{\circ}\text{C}$  in jih enkrat vmes približno za 5 s pomešali na vorteksu.

Sledilo je centrifugiranje vzorcev (5 min, 14 000 x g, sobna temperatura). Vzorci so bili med postopkom na ledu.

V nove mikrocentrifugirke smo odpipetirali 225 µl homogenata in 225 µl pufra RLT ter vse skupaj približno 5 s mešali na vorteksu. Sledila je izolacija RNA po navodilih proizvajalca, le da smo dodali dodatna koraka čiščenja s pufroma RW in RPE.

Izolacijo smo izvedli tako, da smo vzorce prenesli na kolono QIAshredder in jih centrifugirali 2 min pri 14 000 x g, da smo odstranili preostale grobe delce. V novo mikrocentrifugirko smo odpipetirali 200 µl absolutnega etanola (Sigma, Nemčija) in 400 µl vzorca ter dobro premešali s pipetiranjem. Mešanico smo prenesli na novo kolono RNeasy Mini spin in centrifugirali 30 s pri 18 000 x g in sobni temperaturi. Filtrat smo zavrgli, na kolono dodali 700 µl pufra RW1 in centrifugirali 30 s pri 18 000 x g in sobni temperaturi. Postopek s pufrom RW1 smo ponovili še enkrat, skupno 2-krat. Nato smo dodali 500 µl pufra RPE in vzorce centrifugirali 30 s pri 18 000 x g in sobni temperaturi. Postopek s pufrom RPE smo ponovili še dvakrat, skupno 3-krat. Zatem smo kolono prestavili v novo zbirno mikrocentrifugirko in centrifugirali 2 min pri najvišji hitrosti (20 718 x g oz. 14 000 rpm) in sobni temperaturi. Nato smo kolono prestavili v novo 1,5-ml mikrocentrifugirko in na sredino kolone dodali 50 µl na 65 °C segrete vode brez RNaz ter inkubirali 10 min na sobni temperaturi. Vzorce smo centrifugirali 30 s pri 18 000 x g, kolono zavrgli in shranili mikrocentrifugirke z RNA pri -80 °C.

Čistost in koncentracijo RNA smo preverili s spektrofotometrom NanoDrop (Nano Drop Technologies Inc., ZDA), kamor smo prenesli 1 µl vzorca, in gelsko elektroforezo (1 µl vzorca in 7 µl nanašalne raztopine), ki je potekala na 1 % agaroznem gelu s TAE pufrom in etidijevim bromidom 60 min pri napetosti 100 V. Kot kontrolo smo v eno progo na gelu nanесли 5 µl označevalca fragmentov velikosti MassRuler DNA Ladder Mix (ThermoFisher Scientific, ZDA).

### 3.10.3 Odstranitev genomske DNA

Genomsko DNA smo iz vzorcev odstranili s kompletom DNase I (Zymo Research, ZDA).

Pripravili smo reakcijsko mešanico, ki je za en vzorec vsebovala:

- 49 µl vzorca RNA (volumen vseh vzorcev smo poenotili z dodatkom vode brez RNA)
- 1 µl RNase inhibitorja (Applied Biosystems, ZDA)
- 6,1 µl reakcijskega pufra 10x DNaza I
- 5 µl DNaza I, Amp Grade

Vzorce z reakcijsko mešanico smo inkubirali pri sobni temperaturi 5 min, vmes smo jih enkrat centrifugirali (program »short spin«).

### 3.10.4 Dodatno čiščenje in meritev koncentracije RNA

Dodatno čiščenje RNA je potekalo s kompletom RNase Clean in Concentration Kit (Zymo Research, ZDA). Pri postopku smo sledili navodilom proizvajalca.

Vzorcem smo dodali dvakratni volumen pufru RNA Binding Buffer (v našem primeru 122,2  $\mu$ l pufru) in premešali s pipetiranjem. Nato smo dodali absolutni etanol, enako količino kot je bil celotni volumen vzorca in pufru (v našem primeru 183,3  $\mu$ l etanola), ter premešali s pipetiranjem. Celotno mešanico smo nato prenesli na kolono Zymo-Spin IC Column in jo 30 s centrifugirali pri najvišji hitrosti (20 718 x g oz. 14 000 rpm). Kolono smo prestavili v novo mikrocentrifugirko in dodali 400  $\mu$ l pufru RNA Prep Buffer ter centrifugirali pri najvišji hitrosti 30 s. Postopek smo ponovili še enkrat in filtrat vmes zavrgli. Nato smo ponovno dodali 400  $\mu$ l pufru RNA Prep Buffer ter centrifugirali pri najvišji hitrosti 2 min. Kolono smo prestavili v novo mikrocentrifugirko in ponovno centrifugirali pri najvišji hitrosti 2 min. Nato smo kolono ponovno prestavili v novo mikrocentrifugirko in jo sprali s 50  $\mu$ l vode brez RNaz, ki je bila predhodno segreta na 80 °C, ter jo 2 min centrifugirali pri najvišji hitrosti. Potem smo vzorce inkubirali 2 min pri sobni temperaturi, jih nato centrifugirali pri najvišji hitrosti 1 min in jih shranili pri -80 °C.

Koncentracijo RNA v očiščenih vzorcih smo po navodilih proizvajalca preverili na čipih RNA 600 Nano Kit na sistemu Agilent BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, ZDA), ki deluje na podlagi kapilarnega elektroforeznega sistema in ovrednoti kvaliteto in integriteto (vrednost RIN) ribosomalne RNA (rRNA). Kvaliteta RNA se lahko vizualno razbere iz elektroferograma. Pri rastlinskem materialu sta na grafih najpogosteje vidna dva vrhova, ki predstavljata 18 S in 28 S rRNA, ter še vrhovi plastidne RNA. Glede na obliko in velikost vrhov 18 S in 12 S rRNA na elektroferogramu lahko iz grafa določimo, ali je RNA razgrajena.

### 3.10.5 Transkriptomaska analiza

Z visokozmogljivim sekvenciranjem RNA (RNA-Seq) smo vzorce RNA z dovolj visoko kakovostjo poslali v podjetje Novogene (Hong Kong, Kitajska). Koncentracija RNA je bila med 67 do 236 ng/ $\mu$ l, vsebovala pa je preko 1500 ng RNA. V podjetju so iz celokupne RNA pripravili mRNA knjižnice za sekvenciranje (ang. *stranded mRNA library*, eukaryotic strand-specific transcriptome library). Te so sekvencirali z metodo pair-end poly-A enrichment 250 do 300 nukleotidov dolgih odčitkov mRNA-Seq na sekvenatorju naslednje generacije Illumina HiSeq 4000 (Illumina, ZDA). V povprečju smo dobili 48 816 492 milijonov odčitkov na vzorec. Pridobljenim sekvencam so odstranili zaporedja Illumina adapterjev za sekvenciranje. Tako obdelane podatke smo dobili v obliki fastq datotek.

Poravnava odčitkov na gensko zaporedje referenčnega genoma vrtno redkvice (Shirasawa in sod., 2021) in anotacijo transkriptomov smo naredili z uporabo programa CLC Genomics Workbench 12.0.3 (Qiagen, Nemčija).

Diferencialno analizo izražanja genov smo naredili v programu R v3.6.3 (<https://www.R-project.org/>) z uporabo paketa limma v3.42.2 (Ritchie in sod., 2015) in edgeR v3.28.1 (Robinson in sod., 2010). Podatke za vsak vzorec posebej smo najprej filtrirali glede na izražanje genov tako, da smo odstranili vse odčitke, ki se niso pojavili najmanj 50-krat v vsaj treh vzorcih. Nato smo odčitke normalizirali na velikost posamezne knjižnice (vzorci smo pomnožili z normalizacijskim faktorjem za lažjo primerjavo) in logaritmirali (da so razlike bolj linearne). Normalizirane in logaritmirane podatke smo vnesli v linearni model s funkcijo lm v paketu limma in izražanje primerjali z uporabo kontrastov. Geni, ki so bili različno izraženi, so bili predstavljeni kot  $\log_2$  razmerja normaliziranih odčitkov med tretiranimi in kontrolnimi vzorci (logFC). Vsaki posamezni primerjavi med izražanjem genov je bila pripisana tudi P-vrednost, ki je bila popravljena za hkratno testiranje mnogih hipotez po metodi Benjamini in Hochberg. Statistično različno izražanje je bilo tam, kjer je bila popravljena P-vrednost (adj. p) nižja ali enaka 0,05. Nefiltrirane normalizirane in logaritmirane podatke smo uporabili za analizo glavnih komponent (ang. *principal component analysis*, PCA), analizo in grafe smo pripravili v programu R s paketom ggbiplot v0.55 (Wickham, 2016). Nato smo naredili obogatitveno analizo (ang. *Gene Set Enrichment Analysis*, GSEA), s katero dobimo vpogled v posamezne funkcionalne skupine genov, ki so bili v tretiranih vzorcih bolj ali manj obogateni glede na kontrolo (Mootha in sod., 2003). Kot vir genskih setov smo uporabili ontologijo MapMan v3, ki smo jo pridobili z orodjem Mercator software: 3.6 (Lohse in sod., 2014). Analizo smo izvajali, kot je opisano v Ramšak in sod. (2021). Rezultati so prikazani kot vrednosti TAG, ki predstavljajo delež genov v genskem setu, ki je prispeval k njegovi pozitivni ali negativni obogatitvi. Za statistično značilne smo smatrali tiste rezultate, ki so imeli q-vrednost (ang. *false discovery rate*, FDR) manjšo ali enako 0,25.

Za vizualizacijo izražanja posameznih genov glede na metabolne poti smo uporabili program MapMan (Thimm in sod., 2004), kamor smo prenesli vrednosti podatkov v obliki logFC. Za predstavitev smo uporabili slike, ki predstavljajo pregled celičnega metabolizma.

### 3.11 DOLGOTRAJNEJŠI RASTNI POSKUS

#### 3.11.1 Zasnova poskusa in spremljanje rasti

Za dolgotrajnejši poskus smo uporabili rizobokse (ang. *rhizobox*, Vienna Scientific Instruments, Avstrija). Rizoboks je podolgovata plastična škatla (širina: 21 cm, višina: 30 cm, globina: 1 cm) s prozorno sprednjo stranjo in črno zadnjo stranjo, ki ima na dnu luknje



za odtekanje vode (Sl. 6 B). Rizoboks je bil po sredini predeljen na dva enaka predelka širine 10 cm.

En dan pred začetkom poskusa smo v oba predelka na notranjo črno stran položili foliji za prosojnice (širina: 10 cm, višina: 29,5 cm), ki sta omogočili, da smo po koncu poskusa lažje in brez poškodb izvlekli rastline. Nato smo rizoboks napolnili z vermikulitom (Agra-Vermiculite, RHP, Nizozemska). V vsak predelek smo nasuli približno 45 g vermikulita, skupno na posamezen rizoboks torej približno 90 g. Nato smo vermikulit zalili s 100 ml Hoaglandove raztopine na predelek, skupno na posamezen rizoboks torej 200 ml.

Za 1 l Hoaglandove raztopine smo v 985 ml destilirane vode dodali 5 ml 0,5 M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 5 ml 0,5 M  $\text{KNO}_3$ , 2 ml 0,5 M  $\text{MgSO}_4$ , 1 ml 0,5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 ml  $\text{FeNaEDTA}$  ter 1 ml raztopine mikroelementov, ki je bila sestavljena iz: 25 mM  $\text{KCl}$ , 12,5 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1 mM  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 1 mM  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,25 mM  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  in 0,25 mM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ .

Približno 50 semen redkvice smo en dan kalili na filtrirnem papirju v plastičnih petrijevkah (kot je opisano za kratkotrajni poskus v poglavju 3.4). Vse tretmaje smo zalili z 10 ml destilirane vode. Po enem dnevu, ko so bile korenine kalic dolge približno 1 cm, smo izbrali kalice s podobno dolgimi koreninami in jih s pinceto prenesli v rizobokse. V vsak predelek s predhodno omočenim vermikulitom smo prenesli 3 kalice, skupno na posamezen rizoboks 6. Za vsak tretma smo uporabili po 5 rizoboksov s skupno 30 kalicami. Med posameznimi kalicami je bilo približno 2 cm razdalje. Nato smo vsak razdelek zalili s 50 ml vodnega izvlečka dresnika, skupno torej 100 ml na posamezen rizoboks. Za kontrolo smo uporabili destilirano vodo. Naredili smo dva ločena poskusa za 10 % in nato še 1 % vodna izvlečka japonskega in češkega dresnika.

Sprednjo (prozorno) stran rizoboksa smo prelepili s črno lepenko, tako da so korenine rastle v temi. Rizobokse smo položili v nosilce tako, da so bili pod kotom  $45^\circ$  (Sl. 6 C). Poskus je naslednjih 22 dni potekal v rastni komori (LTH Škofja Loka, Slovenija), s fotoperiodo 16 ur svetloba – 8 ur tema, temperaturo podnevi  $22^\circ\text{C}$  in ponoči  $20^\circ\text{C}$  ter 50 % zračno vlažnostjo.

Med poskusom smo vse rastline zalivali 2-krat na teden samo z destilirano vodo. V prvem tednu s 50 ml na posamezen predelek, v drugem in tretjem tednu pa s 30 ml.

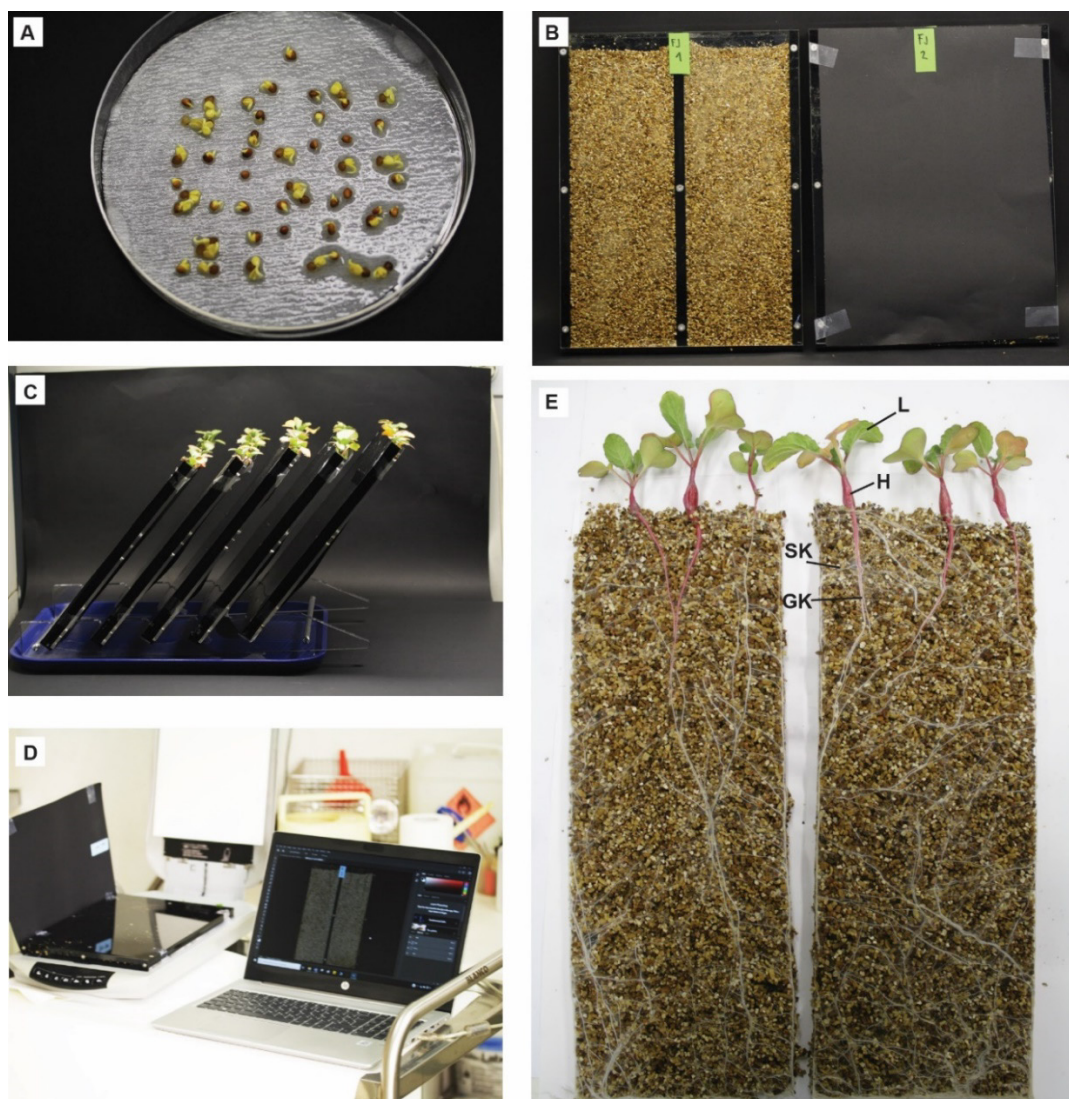
Na koncu poskusa smo rastline previdno odstranili iz rizoboksov, s korenin pod tekočo vodo sprali vermikulit in jih osušili s papirnatimi brisačkami. S skalpelom smo ločili korenine, hipokotil in liste ter jih stehali na laboratorijski tehtnici Kern ALJ 160-4NM (Kern, Nemčija), da smo določili svežo maso. Približno 100 mg korenin in hipokotila smo ločeno zamrznili s tekočim dušikom in shranili pri  $-20^\circ\text{C}$ . Spektrofotometrično smo nato v njih analizirali vsebnost MDA, TAC in aktivnost G-POD. Postopek je bil enak, kot je opisan v poglavju 3.5. Za posamezen tretma smo imeli po 5 ponovitev.

### **3.11.2 Morfološke in histološke analize koreninskega sistema**

Med poskusom smo 2-krat na teden posamezen rizoboks skenirali z digitalnim skenerjem Canon SCAN 4400F (Canon, Japonska) (Sl. 6 D). Rizobokse smo skenirali pri resoluciji 600 dpi. Slike rastlin smo nato uredili z računalniškima programoma Adobe Illustrator CS5 in Adobe Photoshop CS5 (Adobe System, ZDA).

Na skeniranih fotografijah smo z računalniškim programom ImageJ 1.x (Schneider in sod., 2012) izmerili dolžino glavne korenine. Hkrati smo prešteli število rastlin z razvitimi stranskimi koreninami in število stranskih korenin pri posamezni rastlini.

Takoj po koncu poskusa smo fiksirali koreninske vršičke redkvice, jih dehidrirali in vklopili v smolo, kot je opisano v podpoglavju 3.9. Nato smo pripravili poltanke rezine, jih pobarvali in pregledali s svetlobnim mikroskopom, kot je opisano v podpoglavju 3.9.1. Na digitalnih slikah koreninskih vršičkov smo z računalniškim programom ImageJ 1.x (Schneider in sod., 2012) izmerili dolžino in širino celic v prvih treh zunanjih slojih koreninske čepice ter prešteli število celičnih slojev koreninske čepice, kot je opisano v podpoglavju 3.9.1.



**Slika 6:** Prikaz dolgotrajnejšega poskusa v rizoboksih: semena redkvice so vzkli v petrijevki na omočenem filtrirnem papirju (A), po 3 dneh so jih prestavili v rizoboks, napolnjen z vermikulitom. Na dnu rizoboksa so bile luknje za odtekanje vode. Sprednja stran (levo) je bila prozorna, med poskusom smo jo prekrili s črno lepenco (desno), da so korenine rastle v temi (B). Rizobokse smo postavili v stojalo pod kotom 45 ° (C). Med poskusom smo večkrat na teden skenirali koreninski sistem (D). Na koncu poskusa smo rastline vzeli iz rizoboksov in jih analizirali (E). Oznake: glavna korenina (GK), hipokotil (H), list (L), stranska korenina (SK).

### 3.11.3 Analiza elementov v koreninah in hipokotilu vrtno redkvice

Elementno sestavo smo analizirali v koreninah in odebeljenem hipokotilu redkvic, ki smo jih za 22 dni izpostavili 1 % izvlečku japonskega oz. češkega dresnika. Najprej smo ločili korenine od hipokotila (Sl. 6 E), material zamrznili s tekočim dušikom in liofilizirali. Nato smo korenine in hipokotil ločeno homogenizirali v terilnici z dodatkom tekočega dušika. Približno 100 mg tako dobljenega prahu smo s pomočjo hidravlične stiskalnice stisnili v tabletko (premer: 13 mm) in jih stežali. Nato smo z energijsko disperzijsko

rentgensko fluorescenčno spektrometrijo (ang. *energy dispersive X-ray fluorescence*, EDXRF) določili koncentracijo elementov (P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Cu, Zn in Rb) po metodi, ki je opisana v Nečemer in sod. (2008).

### 3.12 STATISTIČNE ANALIZE IN OBDELAVA SLIK

Podatke smo uredili s pomočjo računalniškega programa Microsoft Excel 2020. Z njim smo izvedli tudi osnovne statistične analize: izračunali smo povprečno vrednost ( $\bar{x}$ ), standardno deviacijo (SD), standardno napako (SN) in koeficient variacije. Pri poskusih z metanolnimi izvlečki in posameznimi alelokemikalijami smo zaradi lažje primerjave med poskusi vse podatke normalizirali glede na kontrolo iz posameznega poskusa.

Tretmaje smo nadalje analizirali z enosmerno analizo variance (ANOVA) in Tuckeyevim multiplim primerjalnim post hoc testom (vodni izvlečki in dolgotrajnejši poskus). Naredili smo tudi Dunnettov post hoc test in Duncanov multipli post hoc test (za metanolna izvlečka in posamezne alelokemikalije). Za te statistične analize smo uporabili programe XLSTAT, verzija 2020.3.1 (Addinsoft, Francija), GraphPad Prism 9.2.0 (GraphPad Software Inc., ZDA) in R x64 3.6.3 (<http://cran.r-project.org>). Razlika je bila statistično značilna pri vrednosti  $p < 0,05$ .

Za grafični prikaz rezultatov smo uporabili program GrapPad Prism. Vse fotografije smo uredili in oblikovali s programoma Adobe Illustrator in Adobe Photoshop (Adobe System, ZDA). Nekatere sheme smo pripravili tudi s pomočjo programa BioRender (<https://biorender.com/>).

## 4 REZULTATI

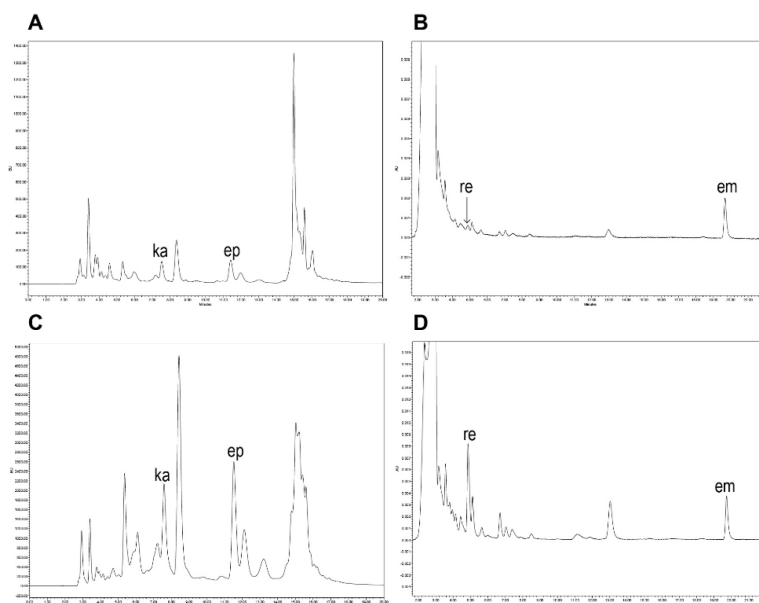
### 4.1 ANALIZA IZVLEČKOV KORENIK DRESNIKOV

Izвлеčke korenin japonskega in češkega dresnika smo analizirali s HPLC, NMR in TXRF.

#### 4.1.1 Analiza vsebnosti izvlečkov s HPLC

Vodne in metanolne izvlečke korenin japonskega in češkega dresnika smo analizirali s HPLC. Uporabili smo korenike dresnikov, ki smo jih vzorčili jeseni 2018. Iz kromatogramov HPLC (Sl. 7) je razvidno, da korenike obeh dresnikov vsebujejo resveratrol, epikatehin, katehin in emodin. Metanolni izvlečki so vsebovali višjo koncentracijo vseh štirih alelokemikalij kot vodni izvlečki ( $p < 0,05$ ). Tako v vodnih kot metanolnih izvlečkih je več resveratrola vseboval izvleček japonskega dresnika, ostalih alelokemikalij pa je bilo več v izvlečku češkega dresnika (Preglednica 1). Metanolni izvlečki japonskega dresnika so v primerjavi z vodnimi vsebovali 5,5-krat več resveratrola, 5,2-krat več epikatehina, 9,4-krat več katehina in 3,2-krat več emodina (pri vseh  $p < 0,05$ ). Metanolni izvlečki češkega dresnika pa so v primerjavi z vodnimi vsebovali 10,7-krat več resveratrola, 1,8-krat več tako epikatehina kot katehina in 3,3-krat več emodina (pri vseh  $p < 0,05$ ).

Vodni izvleček (Sl. 7) češkega dresnika je vseboval 26,1-krat več katehina, 18,2-krat več epikatehina in 1,8-krat več emodina kot izvleček japonskega dresnika. Po drugi strani pa je bilo v vodnem izvlečku japonskega dresnika 2,8-krat več resveratrola kot v izvlečku češkega dresnika (Preglednica 1).



**Slika 7:** Kromatogrami HPLC vodnih izvlečkov korenin japonskega dresnika (A, B) in češkega dresnika (C, D). Posamezni vrhovi predstavljajo štiri alelokemikalije. Volumen injiciranega vzorca za detekcijo resveratrola in emodina je bil 15  $\mu$ l, za katehin in epikatehin pa 10  $\mu$ l. Oznake: emodin (em), epikatehin (ep), katehin (ka), resveratrol (re).

Metanolni izvleček češkega dresnika je vseboval 4,9-krat več katehina, 6,4-krat več epikatehina in 1,9-krat več emodina kot izvleček japonskega dresnika. Po drugi strani pa je bilo v vodnem izvlečku japonskega dresnika 1,5-krat več resveratrola kot v izvlečku češkega dresnika (Preglednica 1).

Preglednica 1: Koncentracija emodina, resveratrola, katehina in epikatehina v izvlečkih korenin japonskega (*F. japonica*) in češkega dresnika (*F. ×bohemica*), ki smo jih analizirali s HPLC. Prikazano je povprečje  $\pm$  SN (N = 3).

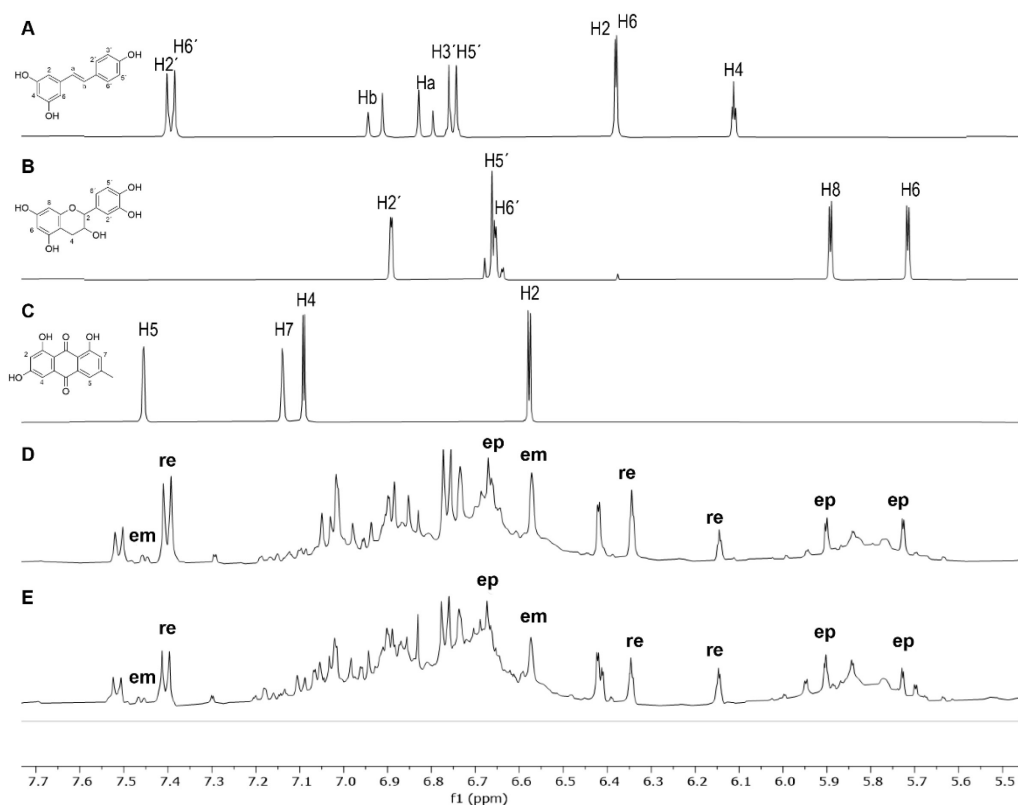
Izvleček	Koncentracija (mg ml <sup>-1</sup> )							
	Emodin		Resveratrol		Katehin		Epikatehin	
<i>F. japonica</i>								
Metanolni izvleček	2,36	$\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	8,45	$\pm$ 0,003 <sup>a</sup>	3,96	$\pm$ 0,02 <sup>c</sup>	10,42	$\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
Vodni izvleček	0,73	$\pm$ 0,01 <sup>d</sup>	1,54	$\pm$ 0,004 <sup>c</sup>	0,42	$\pm$ 0,003 <sup>d</sup>	1,99	$\pm$ 0,01 <sup>d</sup>
<i>F. ×bohemica</i>								
Metanolni izvleček	4,39	$\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	5,77	$\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	19,25	$\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	66,58	$\pm$ 0,16 <sup>a</sup>
Vodni izvleček	1,34	$\pm$ 0,01 <sup>c</sup>	0,54	$\pm$ 0,02 <sup>d</sup>	10,95	$\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	36,28	$\pm$ 0,15 <sup>c</sup>

Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike med obema dresnikoma in med obema vrstama izvlečkov za vsako alelokemikalijo posebej (enosmerna ANOVA, Holm post hoc test,  $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2 Analiza izvlečkov z <sup>1</sup>H nuklearno magnetno resonančno spektroskopijo

Kvantifikacijo resveratrola, epikatehina in emodina v koreninah japonskega in češkega dresnika smo izvedli tudi z bolj natančno spektrometrično metodo NMR. Uporabili smo korenike dresnikov, ki smo jih vzorčili poleti 2020.

Za resveratrol se signali v <sup>1</sup>H NMR-spektrometru pojavljajo pri 7,39 ppm, 6,37 ppm in 6,11 ppm (Sl. 8 A), za epikatehin pri 5,89 ppm in 5,71 ppm (Sl. 8 B) ter za emodin pri 7,45 ppm (Sl. 8 C). Ostali navedeni signali se prekrivajo z ostalimi signali in za naše izračune niso bili relevantni. Signale za vse alelokemikalije smo potrdili tudi v koreninah japonskega (Sl. 8 D) in češkega dresnika (Sl. 8 E). Za nadaljnje analize smo izbrali tiste signale, ki se niso prekrivali z ostalimi v spektru prisotnimi signali.



**Slika 8:** <sup>1</sup>H NMR-spektri za posamezne čiste spojine resveratrol (A), epikatehin (B) in emodin (C) ter za izvlečka korenin japonskega (*F. japonica*) (D) in češkega dresnika (*F. ×bohemica*) (E). Oznake: emodin (em), epikatehin (ep), resveratrol (re).

Po etanolni ekstrakciji je bil celokupni izkoristek izvlečka za korenike japonskega dresnika  $Y = 58,50$  mg/g glede na začetno suho maso korenin in za korenike češkega dresnika  $Y = 62,08$  mg/g. Prevladujoča alelokemikalija v koreninah obeh dresnikov je bil epikatehin, ki je predstavljal približno polovico vseh analiziranih spojin. Sledil je resveratrol, ki je zavzemal približno tretjino, najmanj je bilo v koreninah emodina, približno petino (Preglednica 2).

V suhi masi korenin po ekstrakciji z etanolom je bilo tako pri japonskem kot pri češkem dresniku približno  $\sim 36$  mg/g epikatehina, 21 mg/g resveratrola pri japonskem in 26 mg/g resveratrola pri češkem dresniku ter pri obeh  $\sim 14$  mg/g emodina (Preglednica 2).

Pri koreninah japonskega dresnika je bilo razmerje med resveratrolom, epikatehinom in emodinom 1,5 : 2,6 : 1,0; pri češkem dresniku pa je bilo razmerje 1,9 : 2,6 : 1,0, pri čemer so korenike češkega dresnika vsebovale 5 mg/g več resveratrola kot korenike japonskega dresnika.

Preglednica 2: Vsebnost izbranih alelokemikalij v koreninah japonskega (*F. japonica*) in češkega dresnika (*F. ×bohemica*), analiziranih z <sup>1</sup>H NMR-spektroskopijo. Prikazano je povprečje ± SN (N = 3).

Alelokemikalija	Vsebnost (%)		Masa (mg/g suhe mase izvlečka)	
	<i>F. japonica</i>	<i>F. ×bohemica</i>	<i>F. japonica</i>	<i>F. ×bohemica</i>
Resveratrol	30	34	21.2±0.9 <sup>a</sup>	26.2±0.9 <sup>b</sup>
Epikatehin	51	47	36.4±1.7 <sup>c</sup>	36.0±1.9 <sup>c</sup>
Emodin	19	18	13.9±0.6 <sup>d</sup>	14.0±0.8 <sup>d</sup>

Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike med obema dresnikoma in posameznimi alelokemikalijami (enosmerna ANOVA, Duncanov post hoc test,  $p < 0,05$ ).

#### 4.1.3 Analiza elementne sestave izvlečkov z rentgensko fluorescenčno spektroskopijo s popolnim odbojem

S TXRF smo v vodnih izvlečkih korenin japonskega in češkega dresnika, ki smo jih vzorčili poleti 2020, izmerili koncentracijo 14 elementov. Njihova koncentracija je bila od manj kot 0,1 ppm do skoraj 500 ppm (Preglednica 3). Najpogostejša elementa v izvlečkih obeh dresnikov sta bila K in Ca, pri katerih je bila koncentracija več kot 100 ppm. Sledili so Cl, Fe in S, pri katerih se je koncentracija gibala v območju med 10 in 100 ppm. Cr in Mn sta bila zastopana v koncentraciji približno 1 ppm, medtem ko je bilo vsebnosti Zn, Cu, Sr, Rb in Se manj kot 1 ppm.

V 10 % izvlečku japonskega dresnika so bile koncentracije elementov od 1,2- do 15,7-krat višje kot v 1 % izvlečku japonskega dresnika. V 10 % izvlečku češkega dresnika pa so bile koncentracije elementov od 1,3- do 31,7-krat višje kot v 1 % izvlečku češkega dresnika.



Preglednica 3: Elementna sestava 1 % in 10 % vodnih izvlečkov korenin japonskega (*F. japonica*) in češkega dresnika (*F. ×bohemica*). Podatki so predstavljeni v enotah ppm, ki so preračunani glede na 10 ppm galijevega standarda.

Konc. elementa (ppm)	Izvleček			
	<i>F. japonica</i>		<i>F. ×bohemica</i>	
	1 %	10 %	1 %	10 %
S	6,71	10,50	7,30	10,10
Cl	3,64	50,00	4,79	152,00
K	47,60	476,00	65,20	407,00
Ca	8,44	132,00	14,30	230,00
Cr	1,13	1,54	0,83	1,07
Mn	0,22	0,57	0,12	1,07
Fe	4,48	14,40	2,23	16,30
Cu	0,10	0,22	0,11	0,17
Zn	0,45	0,70	0,26	0,67
Se	0,06	0,05	0,01	0,03
Br	0,04	0,11	0,02	0,04
Rb	0,06	0,16	0,01	0,23
Sr	0,04	0,23	0,05	0,36

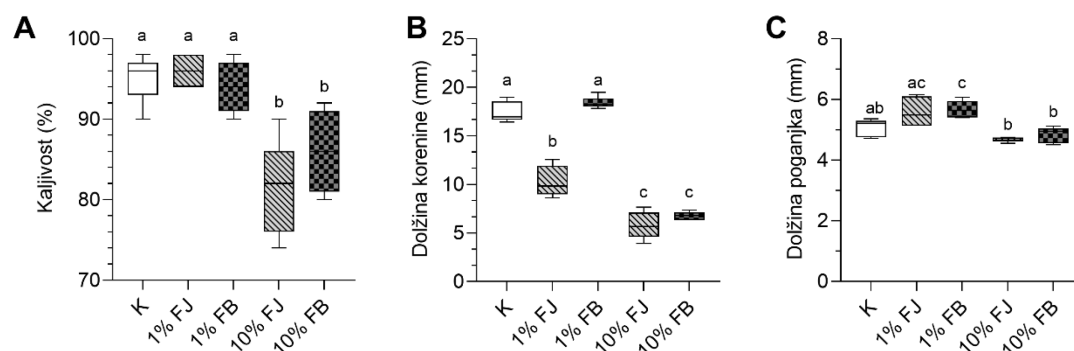
## 4.2 KALITVENI POSKUSI Z VODNIMI IZVLEČKI

### 4.2.1 Kalitev in začetna rast kalic redkvice

Vodni izvlečki korenin japonskega in češkega dresnika so vplivali na kalitev in začetno rast kalic vrtno redkvice. Kalitev semen je bila zavrta za 14 % po izpostavitvi 10 % izvlečku japonskega dresnika ( $p < 0,001$ ) in za 9 % po izpostavitvi 10 % izvlečku češkega dresnika ( $p = 0,016$ ), medtem ko 1 % izvlečka obeh dresnikov same kalitve semen nista prizadela. Med obema dresnikoma ni bilo razlik glede vpliva na delež kaljivosti semen redkvice (Sl. 9 A).

Po 3-dnevni izpostavitvi je bila le pri tretmaju z 1 % izvlečkom češkega dresnika korenina vrtno redkvice podobne dolžine kot pri kontrolnih kalicah, pri vseh ostalih tretmajih so bile korenine statistično značilno krajše v primerjavi s kontrolo (Sl. 9 B). Korenine kalic, ki so bile izpostavljene 10 % izvlečku češkega dresnika, so bile za 62 % krajše, tiste, ki so bile izpostavljene 1 % in 10 % izvlečku japonskega dresnika, pa za 41 % in 61 % krajše v primerjavi s koreninami kontrolnih kalic (za vse  $p < 0,001$ ).

Vpliv izvlečkov na dolžino poganjkov kalic redkvice je bil precej manjši kot pri koreninah (Sl. 9 C), pri nižji koncentraciji izvlečkov pa smo opazili celo stimulativen vpliv: pri 1 % izvlečku češkega dresnika so bili poganjki za 12 % višji v primerjavi s kontrolnimi kalicami ( $p = 0,040$ ).



**Slika 9:** Delež kaljivosti semen (A) ter dolžina korenine (B) in poganjka (C) vrtno redkvice po 3-dnevni izpostavitvi izvlečkom japonskega (*F. japonica*) in češkega dresnika (*F. ×bohemica*) (1 %, 10 %). Box plot sega od 25 do 75 percentila, črta v njem je mediana, repi predstavljajo najvišjo in najnižjo vrednost ( $N = 5$ ). Različne črke predstavljajo statistično značilno razliko med tretmaji ( $p < 0,05$ ). Oznake: kontrola (K), izvleček japonskega dresnika (FJ), izvleček češkega dresnika (FB).

#### 4.2.2 Sveža masa korenin kalic redkvice

Izvlečki so vplivali tudi na biomaso korenin izpostavljenih redkvic (Preglednica 4). Po 3 dneh je bila sveža masa korenin vrtno redkvice, ki so bile izpostavljene 10 % izvlečku japonskega dresnika, za 57 % nižja ( $p = 0,007$ ), pri tretmaju z 10 % izvlečkom češkega dresnika pa za 71 % nižja ( $p = 0,001$ ) v primerjavi z maso korenin kontrolnih rastlin. Po drugi strani pa so imele nižje koncentracije stimulativen vpliv, kar je bilo še posebej opazno pri tretmaju z 1 % izvlečkom japonskega dresnika, kjer je bila biomasa korenin po 3 dneh za 57 % višja ( $p = 0,007$ ) v primerjavi s kontrolo.

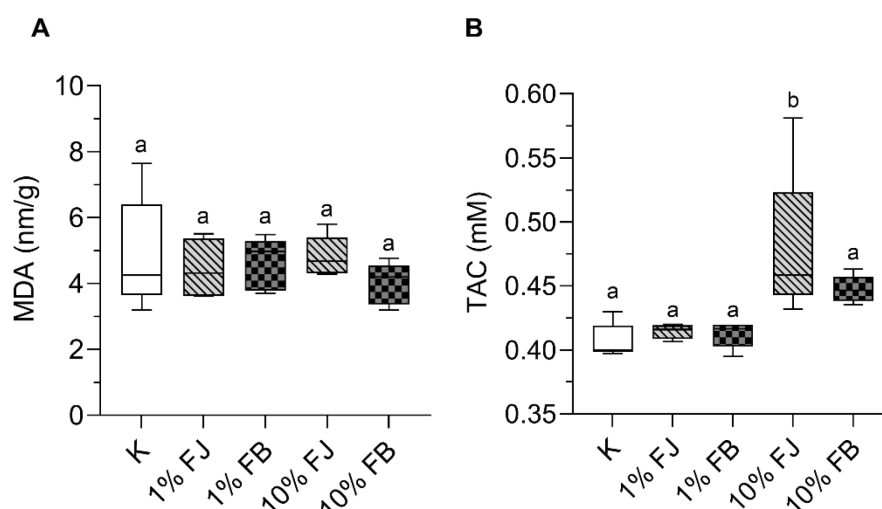
Preglednica 4: Sveža biomasa korenine kalic redkvice po 3-dnevni izpostavitvi vodnim izvlečkom korenin japonskega in češkega dresnika (*F. japonica* in *F. ×bohemica*). Prikazano je povprečje  $\pm$  SN ( $N = 500$ ). Različne črke predstavljajo statistično značilno razliko med tretmaji ( $p < 0,05$ ). Oznake: kontrola (K), izvleček japonskega dresnika (FJ), izvleček češkega dresnika (FB).

Tretma	Sveža biomasa (mg)
Kontrola	470,56 $\pm$ 84,67 <sup>b</sup>
1 % FJ	740,54 $\pm$ 30, <sup>a</sup>
1 % FB	566,24 $\pm$ 59,47 <sup>ab</sup>
10 % FJ	203,06 $\pm$ 12,18 <sup>c</sup>
10 % FB	136,60 $\pm$ 7,66 <sup>c</sup>

### 4.2.3 Biokemijski parametri oksidativnega stresa v koreninah redkvice

Vodni izvlečki dresnikov so na nekatere biokemijske parametre oksidativnega stresa vplivali bolj, na druge manj.

Vsebnost MDA, ki nakazuje lipidno peroksidacijo, je bila v koreninah kalic redkvice podobna pri vseh tretmajih in v območju kontrolnih kalic (Sl. 10 A), koncentracija TAC (Sl. 10 B) pa je bila za 17 % višja v koreninah kalic redkvice, ki so bile izpostavljene 10 % izvlečku japonskega dresnika ( $p = 0,005$ ).



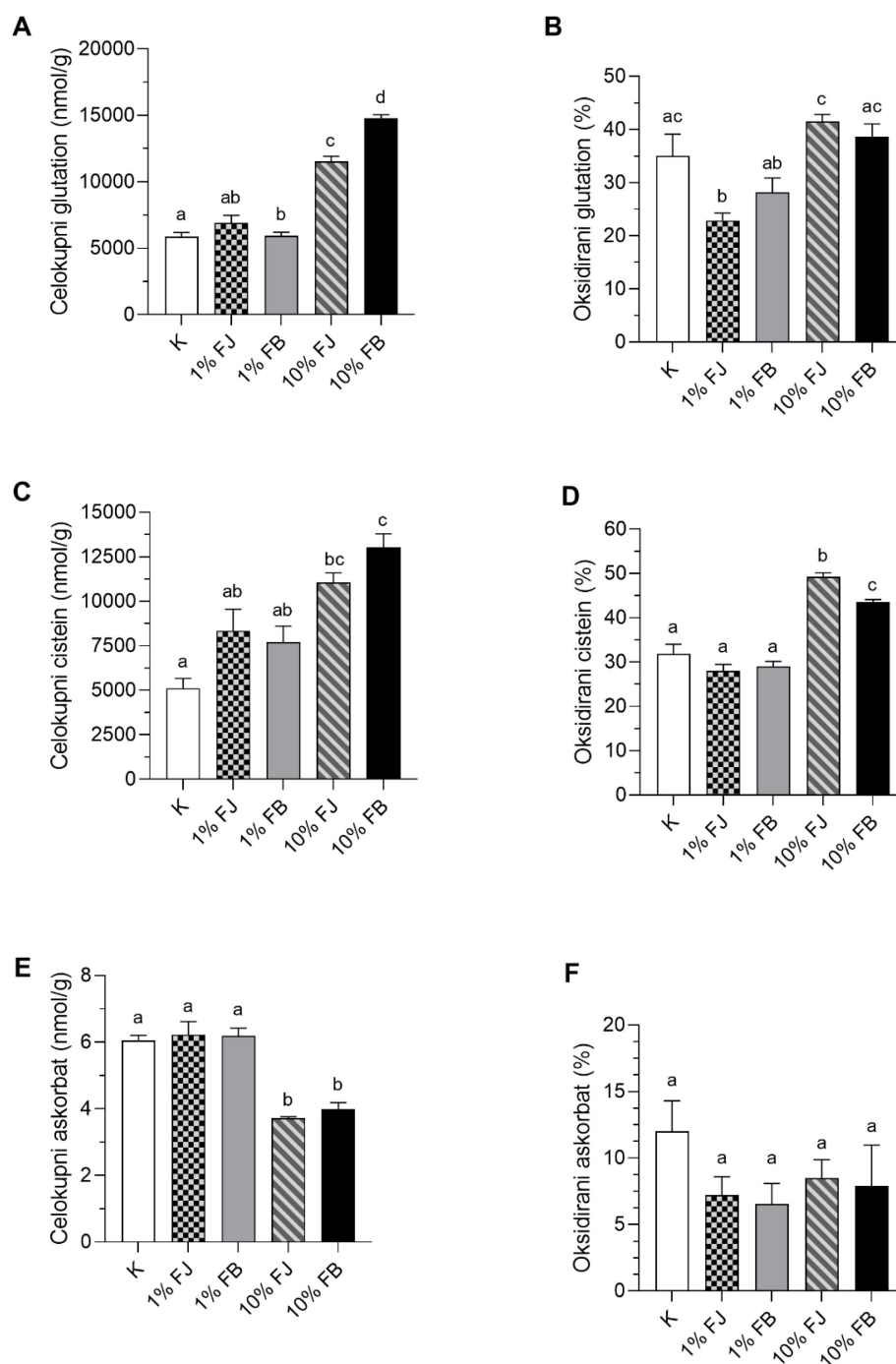
**Slika 10:** Vsebnost malondialdehida (MDA) in neencimskih antioksidantov (TAC) v koreninah 3 dni starih kalic vrtno redkvice po izpostavitvi izvlečkom japonskega in češkega dresnika (*F. japonica* in *F. ×bohemica*) (1 %, 10 %). Box plot sega od 25 do 75 percentila, črta v njem je mediana, repi predstavljajo najvišjo in najnižjo vrednost ( $N = 5$ ). Različne črke predstavljajo statistično značilno razliko med tretmaji ( $p < 0,05$ ). Oznake: kontrola (K), izvleček japonskega dresnika (FJ), izvleček češkega dresnika (FB).

Koncentracija celokupnega glutationa (Sl. 11 A) se je v koreninah kalic redkvic, ki so bile izpostavljene 10 % izvlečku japonskega dresnika, povišala za 96 %, pri tretmaju z 10 % izvlečkom češkega dresnika pa za 152 % (pri obeh  $p < 0,0001$ ). Pri 1 % izvlečkih je bila koncentracija celokupnega glutationa v koreninah redkvice podobna kot pri kontrolnih rastlinah. Delež oksidirane glutationa (Sl. 11 B) je bil pri tretmaju z 1 % izvlečkom japonskega dresnika 23 %, kar je za 36 % nižje kot v koreninah kontrolnih rastlin ( $p = 0,026$ ). Pri ostalih tretmajih se je sicer kazal trend povišanja deleža oksidirane glutationa, a razlike niso bile statistično značilne.

Koncentracija celokupnega cisteina (Sl. 11 C) se je v koreninah kalic redkvic, ki so bile izpostavljene 10 % izvlečku japonskega dresnika, povišala za 116 % ( $p < 0,001$ ), pri tretmaju z 10 % izvlečkom češkega dresnika pa za 155 % ( $p < 0,0001$ ). Delež oksidirane cisteina (Sl. 11 D) je bil v koreninah kalic, izpostavljenih 10 % izvlečku

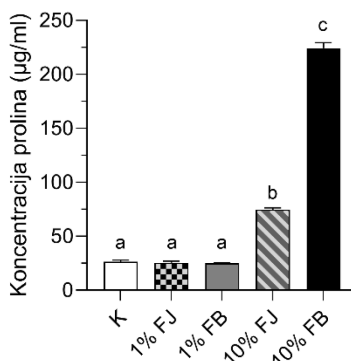
japonskega dresnika, povišan na 49 %, kar je za 55 % več kot pri kontrolnih rastlinah ( $p < 0,0001$ ). Prav tako se je delež oksidirane cisteina pri tretmaju z 10 % izvlečkom češkega dresnika povišal na 44 %, kar je za 37 % več kot pri kontrolnih rastlinah ( $p < 0,0001$ ). Pri 1 % izvlečkih je bila koncentracija celokupnega cisteina in delež oksidirane cisteina podobna kot pri kontrolnih rastlinah.

Koncentracija celokupnega askorbata (Sl. 11 E) je bila v koreninah kalic redkvic, ki so bile izpostavljene 10 % izvlečku japonskega dresnika, povišana za 29 % ( $p = 0,002$ ), pri tretmaju z 10 % izvlečkom češkega dresnika pa za 34 % ( $p = 0,005$ ). Delež oksidirane askorbata (Sl. 11 F) je pri vseh tretmajih ostal na ravni kontrole.



**Slika 11:** Celokupni glutation (A), oksidirani glutation (B), celokupni cistein (C), oksidirani cistein (D), celokupni askorbat (E) in oksidirani askorbat (F) v koreninah 3 dni starih kalic redkvice po izpostavitvi izvlečkom japonskega in češkega dresnika (*F. japonica* in *F. ×bohemica*) v 1 % in 10 % koncentraciji. Prikazano je povprečje ± SN (N = 5). Pri oksidiranih oblikah gre za odstotni delež od celokupne vrednosti posamezne spojine. Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike med tretmaji ( $p < 0,05$ ). Oznake: kontrola (K), izvleček japonskega dresnika (FJ), izvleček češkega dresnika (FB).

Koncentracija prolina (Sl. 12) je bila v koreninah kalic redkvice, ki so bile izpostavljene 10 % izvlečku japonskega dresnika, povišana za 185 % ( $p < 0,001$ ), pri tretmaju z 10 % izvlečkom češkega dresnika pa za 754 % ( $p < 0,0001$ ). Pri tretiranju z 1 % izvlečkoma je prolin ostal na ravni kontrole.



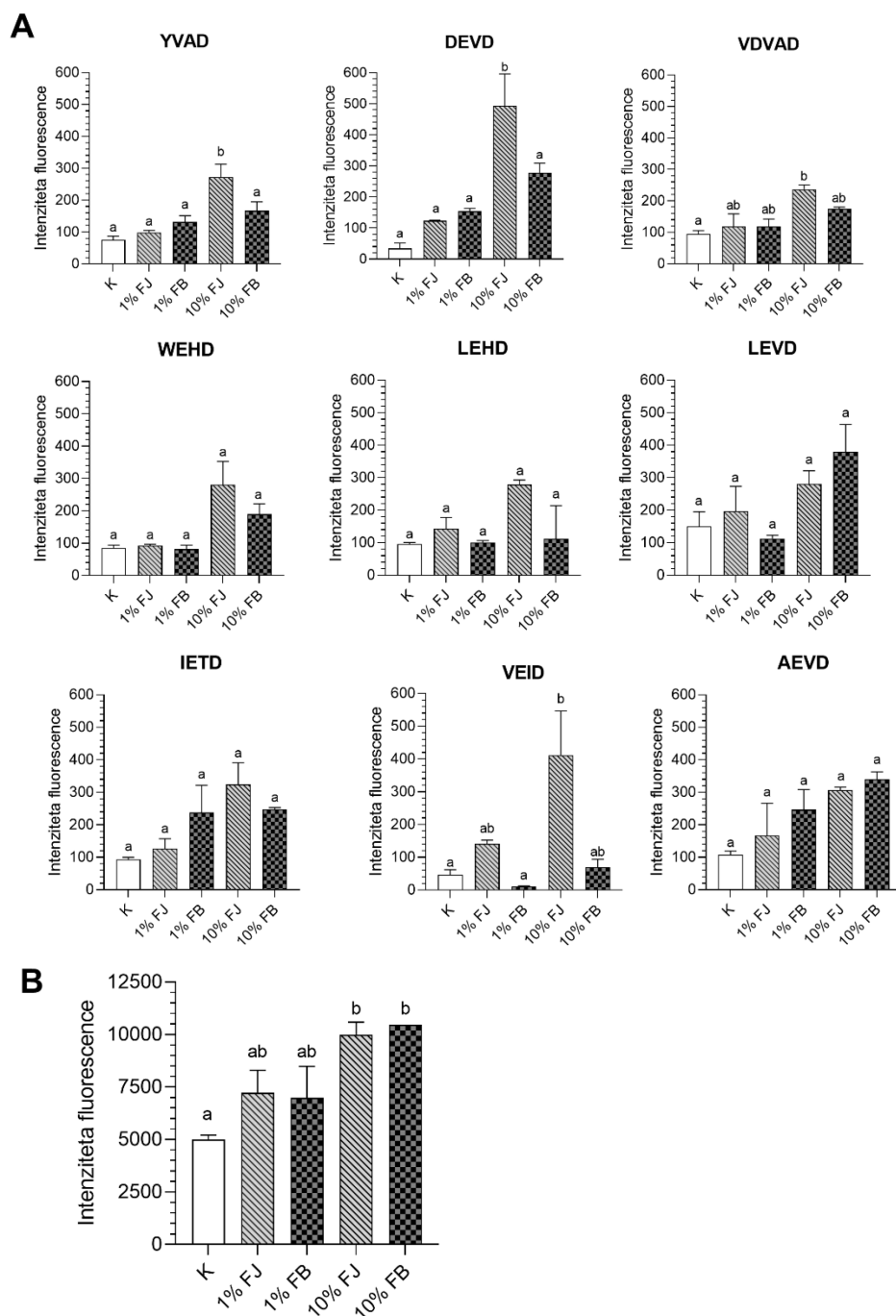
**Slika 12:** Koncentracija prolina v koreninah 3 dni starih kalic redkvice po izpostavitvi izvlečkom japonskega in češkega dresnika (*F. japonica* in *F. ×bohemica*) v 1 % in 10 % koncentraciji. Prikazano je povprečje  $\pm$  SN ( $N = 5$ ). Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike med tretmaji ( $p < 0,05$ ).

Oznake: kontrola (K), izvleček japonskega dresnika (FJ), izvleček češkega dresnika (FB).

#### 4.2.4 Aktivnost proteaz v koreninah redkvice

V koreninah kalic vrtno redkvice smo analizirali proteolitično aktivnost z 10 kaspaznimi substrati in enim metakaspaznim substratom ter vse primerjali glede na kontrolne rastline. Pri analizi aktivnosti kaspazam podobnih proteaz smo ugotovili, da samo tretma z 10 % izvlečkom japonskega dresnika statistično značilno poviša njihovo aktivnost (Sl. 13 A). Najvišja aktivnost je bila pri substratu DEVD, kjer je bila aktivnost kaspazam podobnih proteaz 14,4-krat višja v primerjavi s kontrolo ( $p = 0,006$ ). Statistično značilno višja aktivnost je bila tudi pri substratu VEID in sicer 8,8-krat v primerjavi s kontrolo ( $p = 0,043$ ), pri substratu YVAD je bila višja 3,6-krat ( $p = 0,012$ ) in pri substratu VDVAD 2,5-krat ( $p = 0,035$ ).

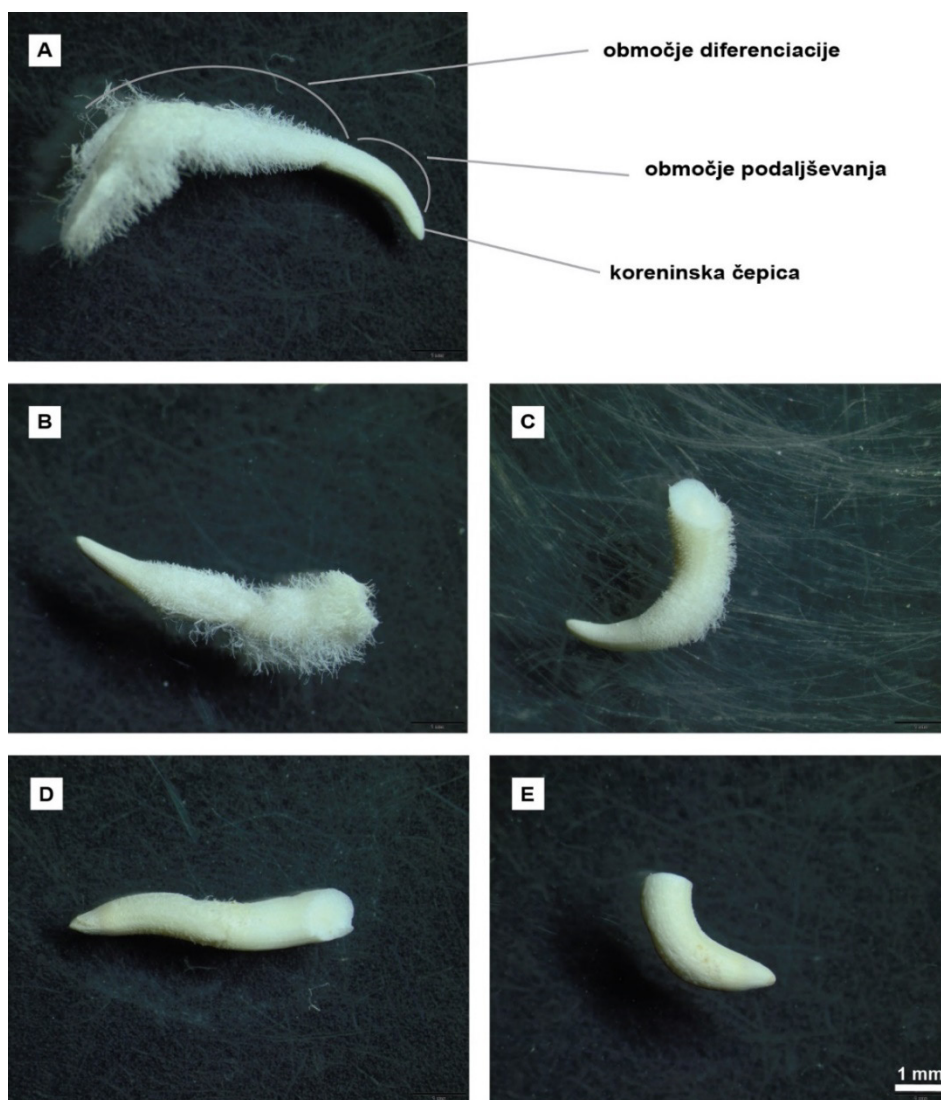
Pri substratu za določanje metakaspazne aktivnosti (Sl. 13 B) je bila najvišja aktivnost metakaspazam podobnih proteaz v koreninah kalic redkvice, ki so bile izpostavljene 10 % izvlečku japonskega dresnika. Pri tem tretmaju je bila aktivnost metakaspazam podobnih proteaz višja 2-krat v primerjavi s kontrolo ( $p = 0,048$ ). V koreninah kalic redkvice, ki so bile izpostavljene 10 % izvlečku češkega dresnika, pa je bila aktivnost metakaspazam podobnih proteaz višja 2,1-krat v primerjavi s kontrolo ( $p = 0,034$ ). Izvlečka z 1 % koncentracijo na proteazno aktivnost nista vplivala.



**Slika 13:** Kaspazam podobna proteazna aktivnost (A) in metakaspazam podobna proteazna aktivnost (B) v koreninah 3 dni starih kalic vrtno redkvice, ki so bile tretirane z izvlečki japonskega in češkega dresnika (*F. japonica* in *F. ×bohemica*) (1 %, 10 %). Prikazano je povprečje ± SN (N = 2). Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike med tretmaji ( $p < 0,05$ ). Oznake: kontrola (K), izvleček japonskega dresnika (FJ), izvleček češkega dresnika (FB).

#### 4.2.5 Analiza površine korenine

Površino korenine smo analizirali pri kalicah vrtno redkvice, ki smo jih izpostavili izvlečkom japonskega in češkega dresnika v 1 % in 10 % koncentraciji. Korenine tretiranih kalic so bile krajše in v primeru obeh 10 % izvlečkov tudi precej manj razvite v primerjavi s koreninami kontrolnih kalic (Sl. 14). S SEM smo nadalje analizirali površino treh koreninskih območij: koreninsko čepico, območje podaljševanja in območje diferenciacije.



**Slika 14:** Korenine 3 dni starih kalic vrtno redkvice po fiksaciji in sušenju pri kritični točki, ki smo jih nadalje uporabili za analize s SEM. Tretmaji: kontrola (A), 1 % izvleček japonskega dresnika (*F. japonica*) (B), 1 % izvleček češkega dresnika (*F. ×bohemica*) (C), 10 % izvleček japonskega dresnika (*F. japonica*) (D), 10 % izvleček češkega dresnika (*F. ×bohemica*) (E).

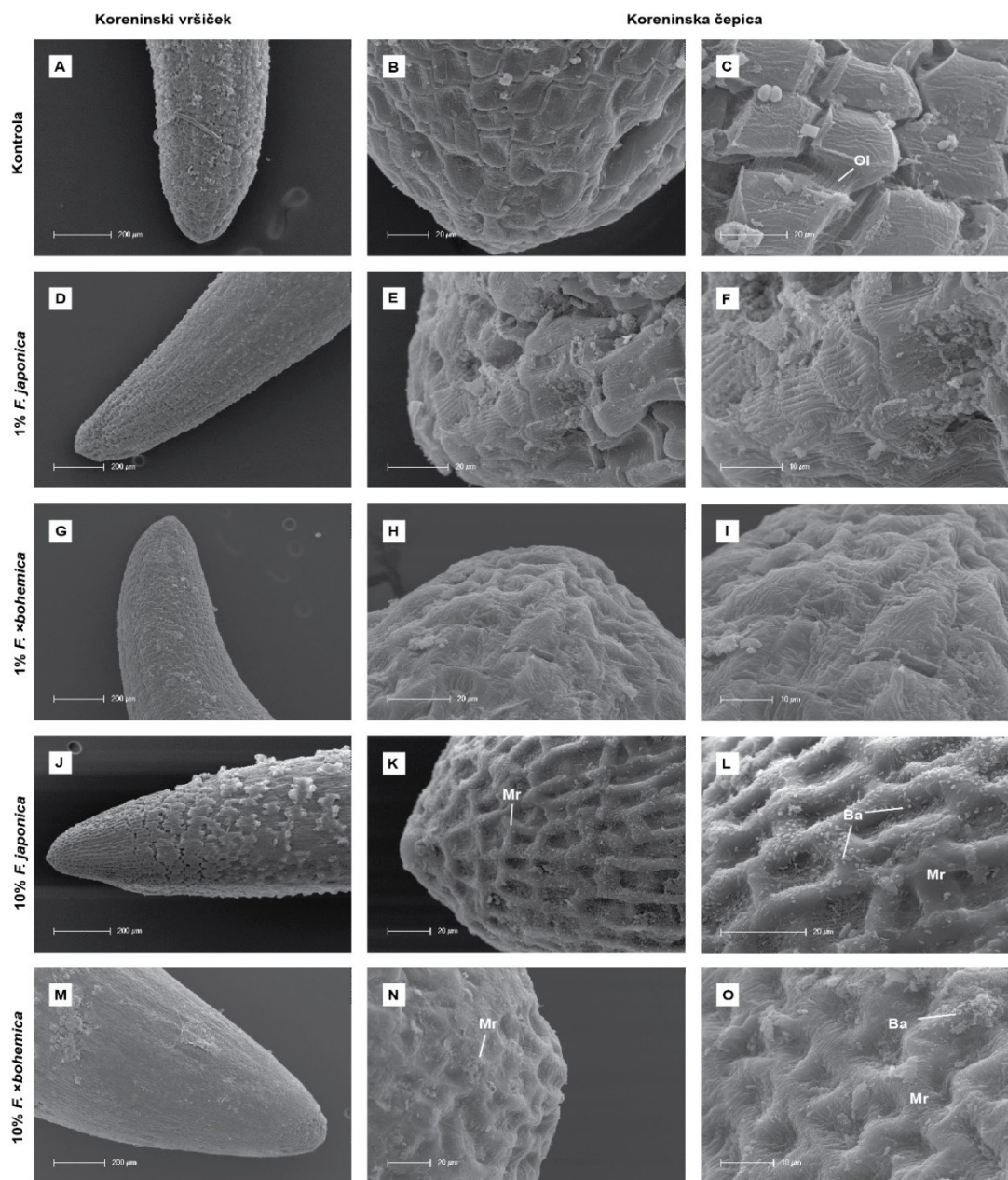


Površino koreninske čepice pri kontrolnih kalicah (Sl. 15 A) so sestavljale velike celice z napeto in večinoma ravno površino (Sl. 16 B). Med celicami so bile vidne osrednje lamele (Sl. 16 C).

Pri kalicah, ki so bile izpostavljene 1 % izvlečku japonskega dresnika (Sl. 15 D–F) in 1 % izvlečku češkega dresnika (Sl. 15 G–I), je bila površina koreninske čepice podobna kot pri kontrolnih kalicah, le da je bila površina celic manj napeta in je izgledala rahlo konkavno.

Tretma z 10 % izvlečkom japonskega dresnika (Sl. 15 J) pa je precej opazneje vplival na površino koreninske čepice: osrednji del celic se je ugreznil v notranjost, tako da so na površini ostale samo odebeljene celične stene. Izgledalo je tako, kot bi bila celotna koreninska čepica obdana z mrežo (Sl. 15 K). Površina koreninske čepice je bila tudi na gosto prekrita s paličastimi bakterijami (Sl. 15 L).

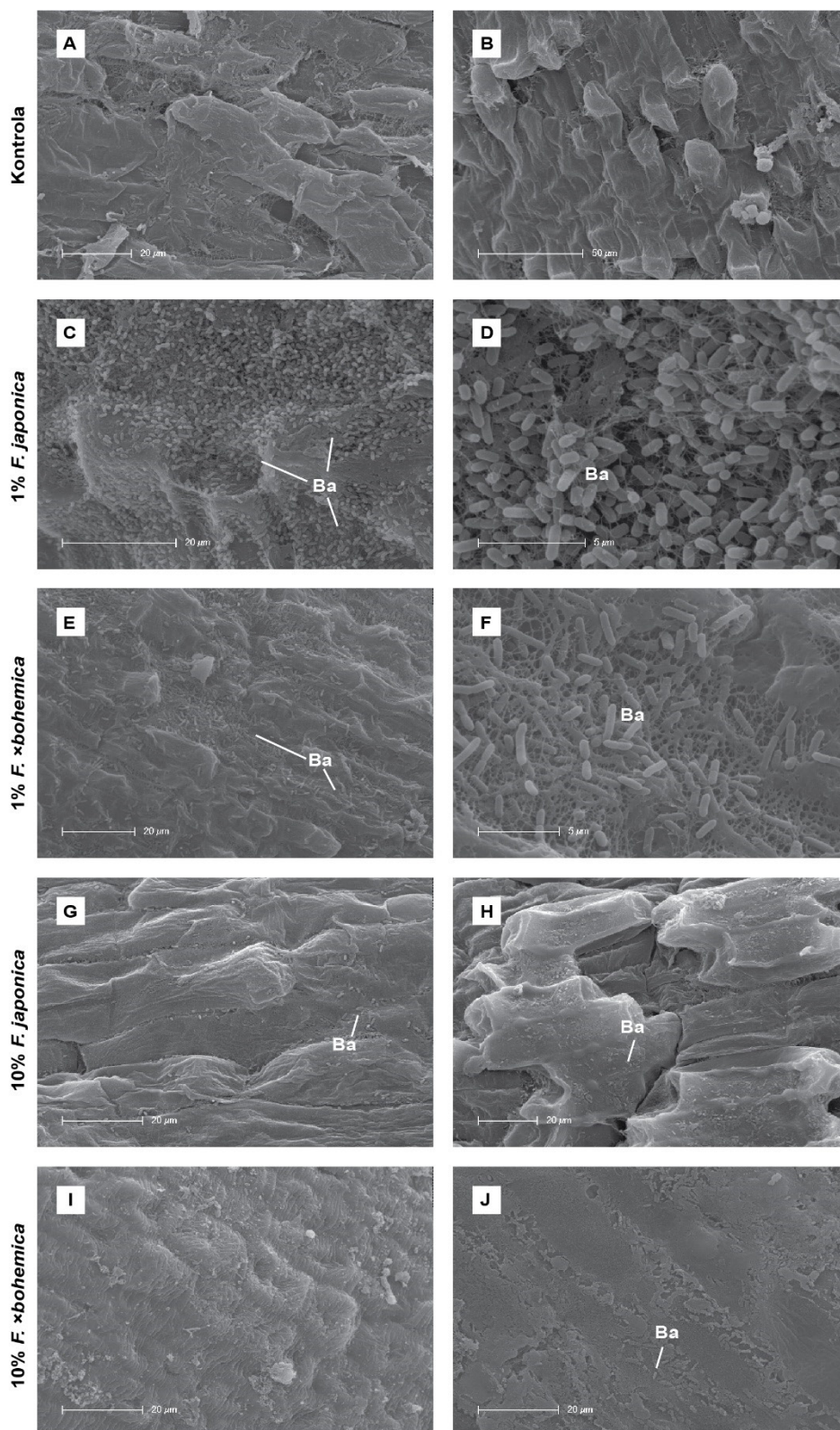
Podoben, a ne tako izrazit vpliv smo opazili tudi pri tretmaju z 10 % izvlečkom češkega dresnika (Sl. 15 M): celice koreninske čepice so imele odebeljene celične stene (Sl. 15 N), na njihovi površini so bile bakterije (Sl. 15 O), a manj na gosto kot pri tretmaju z 10 % izvlečkom japonskega dresnika.



**Slika 15:** Površina koreninskega vršička (levo) in koreninske čepice (sredina, desno) pri 3 dni starih kalih vrtno redkvice. Tretmaji: kontrola (A–C), 1 % izvleček japonskega dresnika (*F. japonica*) (D–F), 1 % izvleček češkega dresnika (*F. xbohemica*) (G–I), 10 % izvleček japonskega dresnika (*F. japonica*) (J–L), 10 % izvleček češkega dresnika (*F. xbohemica*) (M–O). Oznake: bakterije (Ba), osrednja lamela (Ol), mrežasto odebeljene celične stene (Mr).

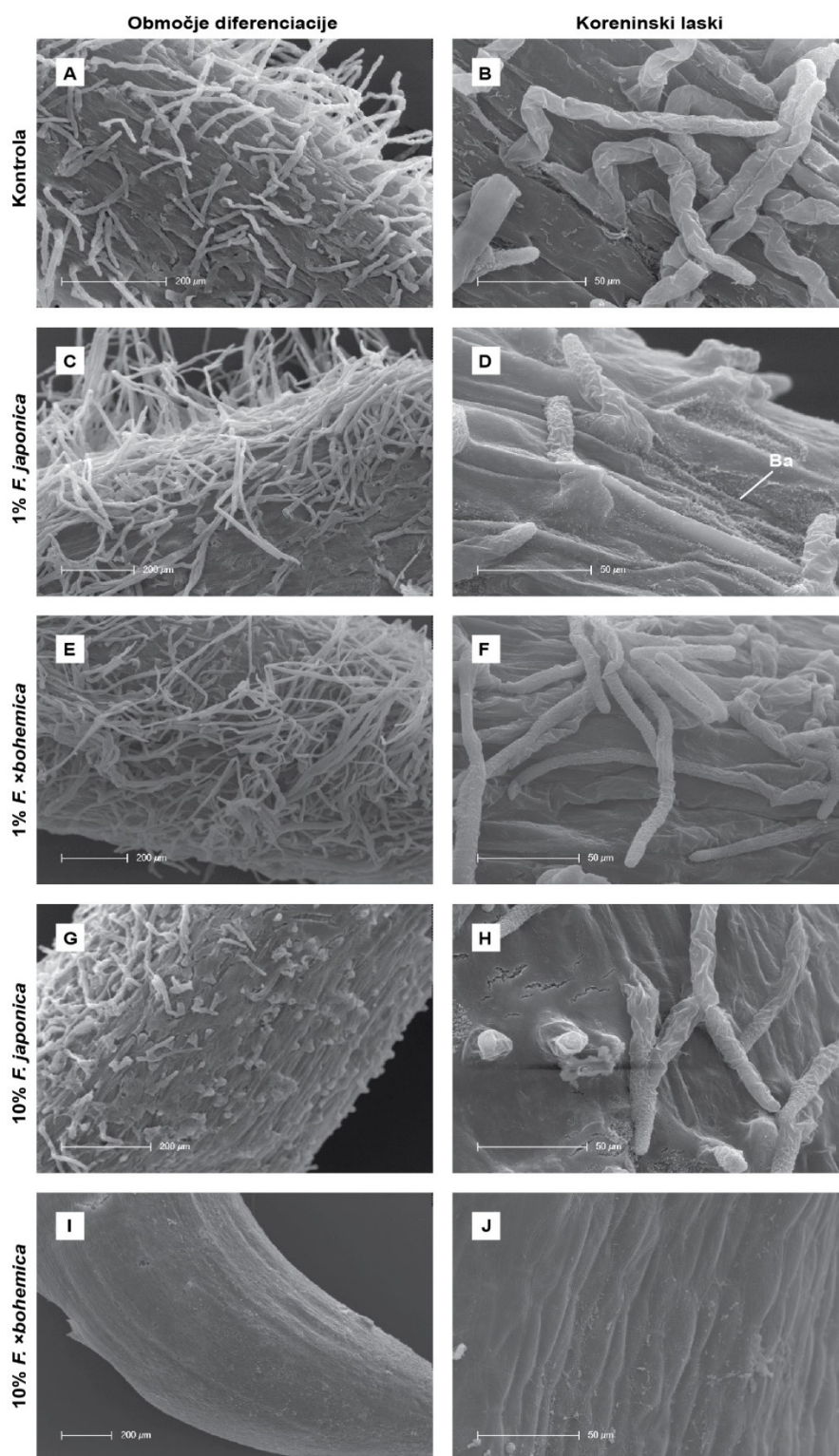
V območju podaljševanja so bile koreninske celice pri kontrolnih kalicah podaljšane v smeri osi apeks – baza (Sl. 16 A). Med seboj so bile tesno sprijete (Sl. 16 B). V primerjavi s kontrolnimi kalicami, kjer je bilo v tem območju zelo malo bakterij na površini, je bilo bakterij pri tretmaju z 1 % izvlečkom japonskega dresnika zelo veliko, saj je bila skoraj celotna površina prekrita s paličastimi bakterijami (Sl. 16 C, D). Bakterije so bile prisotne tudi na površini koreninske čepice in v območju diferenciacije, a jih je bilo največ v območju podaljševanja. Bakterije na površini tega območja so se pojavljale tudi pri tretmaju z 1 % izvlečkom češkega dresnika (Sl. 16 E, F), a manj kot pri tretmaju z izvlečkom japonskega dresnika.

Pri tretmajih z 10 % izvlečki so bile celice v območju podaljševanja tako močno zbite skupaj, da se je meja med posameznimi celicami slabo razločila (Sl. 16 G–J). Ponekod se je površina luščila (Sl. 16 H). Površino so tudi prekrivale bakterije (Sl. 16 J), a manj kot pri 1 % izvlečkih.



**Slika 16:** Površina območja podaljševanja pri koreninah kalice redkvice. Tretmaji: kontrola (A, B), 1 % izvleček japonskega dresnika (*F. japonica*) (C, D), 1 % izvleček češkega dresnika (*F. xbohemica*) (E, F), 10 % izvleček japonskega dresnika (*F. japonica*) (G, H), 10 % izvleček češkega dresnika (*F. xbohemica*) (I, J). Oznaka: bakterije (Ba).

V območju diferenciacije so imele korenine kontrolnih kalic (Sl. 17 A) številne dobro razvite koreninske laske (Sl. 17 B). Kalice, ki so bile tretirane z 1 % izvlečki (Sl. 17 C–F), so imele prav tako dobro razvite koreninske laske, med katerimi smo pri 1 % izvlečku japonskega dresnika opazili številne bakterije (Sl. 17 D). Kalice, ki so bile izpostavljene 10 % izvlečku japonskega dresnika (Sl. 17 G) so imele opazno manj koreninskih laskov, ki so bili približno za polovico krajši v primerjavi z laski kontrolnih rastlin in rahlo poškodovani (Sl. 17 H). Pri tretmaju z 10 % izvlečkom češkega dresnika (Sl. 17 I) pa koreninski laski sploh niso bili razviti (Sl. 17 J).



**Slika 17:** Površina območja diferenciacije korenine (levo) in koreninski laski (desno) pri koreninah kalic redkvice. Tretmaji: kontrola (A, B), 1 % izvleček japonskega dresnika (*F. japonica*) (C, D), 1 % izvleček češkega dresnika (*F. xbohemica*) (E, F), 10 % izvleček japonskega dresnika (*F. japonica*) (G, H), 10 % izvleček češkega dresnika (*F. xbohemica*) (I, J). Oznaka: bakterije (Ba).

#### 4.2.6 Histološke značilnosti korenin

Strukturne spremembe v zgradbi korenin smo analizirali po tretiranju redkvice z 10 % izvlečkoma obeh dresnikov. Medtem ko so bile korenine kontrolnih rastlin tanke in dolge (Sl. 18 A), so bile korenine tretiranih rastlin kratke in odebeljene (Sl. 18 B, C).

Izvlečka sta imela najizrazitejši vpliv na najbolj distalni del korenine, na koreninski vršiček. V koreninah kontrolnih rastlin so bile celice razporejene v značilnih slojih, z jasno ločeno koreninsko čepico, apikalnim meristemom korenine, povrhnjico in skorjo (Sl. 18 D). Izvlečka japonskega (Sl. 18 E) in češkega dresnika (Sl. 18 F) sta najbolj prizadela zgradbo koreninske čepice in apikalnega meristema korenine, prav tako ni bilo mogoče določiti jasne meje med meristemom in celicami skorje.

Pri koreninah kontrolnih rastlin je koreninsko čepico sestavljalo 6–7 celičnih slojev. Največje celice so bile zunanje, njihova velikost se je proti notranjosti postopoma zmanjševala (Sl. 18 G), kar je razvidno tudi iz meritev velikosti celic (Preglednica 5). Pri koreninah tretiranih rastlin so bili zunanji sloji koreninske čepice pogosto poškodovani in tako propadli oz. spremenjeni, da je bilo včasih težko določiti število slojev koreninske čepice. Korenine kalic, ki so bile izpostavljene izvlečku japonskega dresnika, so imele koreninsko čepico s 7–8 sloji celic (Sl. 18 H), pri tretmaju z izvlečkom češkega dresnika pa je bilo število slojev 4–5 (Sl. 18 I).

Vpliv izvlečkov na celice koreninske čepice smo podrobneje analizirali za zunanje tri sloje, kjer smo kot prvi sloj definirali zunanji sloj. Ugotovili smo, da izpostavitve izvlečkom dresnikov vpliva na velikost celic koreninske čepice vrtna redkvice (Preglednica 5). Celice v prvem, zunanjem sloju koreninske čepice so bile pri rastlinah, tretiranih z izvlečkom japonskega dresnika, za 48 % krajše v primerjavi s kontrolo, pri tretmaju z izvlečkom češkega dresnika pa za 28 % krajše (pri obeh  $p < 0,001$ ). Izvlečka sta se po svojem vplivu na velikost celic v prvem sloju med seboj statistično značilno razlikovala ( $p = 0,004$ ), medtem ko razlika med njima pri vplivu na dolžino celic drugega in tretjega sloja ni bila značilna. V drugem sloju so bile celice redkvic, tretiranih z izvlečkoma japonskega in češkega dresnika, za 28 % ( $p < 0,001$ ) oz. 24 % ( $p = 0,004$ ) krajše in za 19 % ( $p = 0,009$ ) oz. 27 % ( $p < 0,001$ ) ožje. Podobno so bile tudi v tretjem sloju koreninske čepice celice redkvic za 19 % ( $p = 0,010$ ) oz. 17 % ( $p = 0,027$ ) krajše, le pri tretmaju z izvlečkom češkega dresnika so bile celice v tem sloju tudi za 26 % ožje ( $p = 0,003$ ) v primerjavi s kontrolnimi rastlinami.

Obliko celic koreninske čepice v prvih treh slojih smo ovrednotili glede na razmerje med dolžino in širino celic (Preglednica 5), pri čemer je razmerje okoli 1 pomenilo, da je celica izodiametrična (kockasta), višje vrednosti pa, da je celica podaljšana (visokoprizmatska).

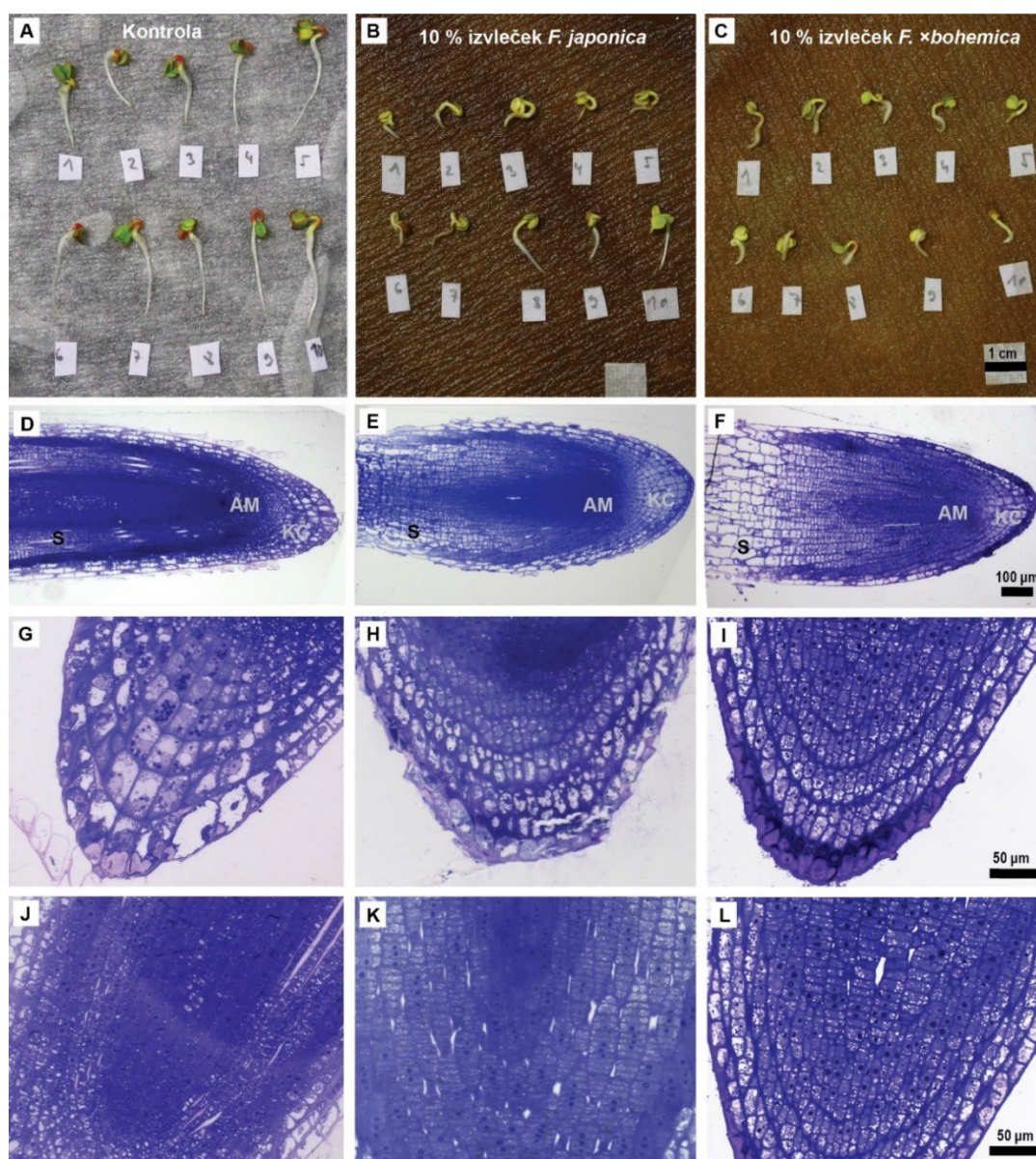
Glede na razmerje med dolžino in širino so celice v koreninski čepici večinoma podaljšane (pravokotne v prerezu), razen pri tretmaju z izvlečkom japonskega dresnika ( $p = 0,005$ ). Med tretmaji večinoma ni bilo statistično značilnih razlik, kar nakazuje, da izvlečki dresnikov ne vplivajo izrazito na razmerje med dolžino in širino celic koreninske čepice. Opazili pa smo, da so bile nekatere celice tretiranih rastlin nepravilnih oblik (Sl. 18 H).

Preglednica 5: Velikost celic ter razmerje med njihovo dolžino in širino (D : Š) v prvih treh zunanjih slojih koreninske čepice pri kalicah vrtno redkvice po 3-dnevni izpostavitvi 10 % izvlečkom japonskega (*F. japonica* – FJ) in češkega dresnika (*F. ×bohemica* – FB). Povprečje ± SN (N = 30). Različne črke predstavljajo statistično značilno razliko med tretmaji znotraj posameznih stolpcev ( $p < 0,05$ ).

	Velikost celic ( $\mu\text{m}$ )								
	1. sloj			2. sloj			3. sloj		
	Dolžina	Širina	D : Š	Dolžina	Širina	D : Š	Dolžina	Širina	D : Š
Kontrola	40,6±2,3 <sup>a</sup>	27,8±1,8 <sup>a</sup>	1,6±0,1 <sup>a</sup>	37,4±2,2 <sup>a</sup>	26,2±1,3 <sup>a</sup>	1,5±0,2 <sup>a</sup>	32,0±1,4 <sup>a</sup>	23,7±1,1 <sup>a</sup>	1,4 ± 0,1 <sup>ab</sup>
FJ	21,1±1,0 <sup>b</sup>	24,1±1,3 <sup>a</sup>	1,0±0,1 <sup>b</sup>	26,9±1,1 <sup>b</sup>	21,1±1,1 <sup>b</sup>	1,4±0,1 <sup>a</sup>	26,0±0,8 <sup>b</sup>	21,5±1,3 <sup>a</sup>	1,3±0,1 <sup>a</sup>
FB	29,2±2,2 <sup>c</sup>	24,9±1,3 <sup>a</sup>	1,3±0,1 <sup>ab</sup>	28,5±2,1 <sup>b</sup>	19,2±1,0 <sup>b</sup>	1,7±0,2 <sup>a</sup>	26,7±1,7 <sup>b</sup>	17,5±1,1 <sup>b</sup>	1,8±0,2 <sup>b</sup>

Območje apikalnega meristema korenine smo pri kontrolnih rastlinah prepoznali po majhnih in temno modro obarvanih celicah v notranjosti koreninskega vršička, ki so imele veliko jedro z jedrcem (Sl. 18 J). Težje je bilo prepoznati območje meristema v koreninah kalic, ki smo jih tretirali z izvlečkom japonskega (Sl. 18 K) in češkega dresnika (Sl. 18 L), saj so bile celice na pričakovanem območju meristema precej bolj diferencirane kot pri kontrolnih rastlinah. Celice v regiji meristema so bile pri tretiranih rastlinah bolj podaljšane (v prerezu so bile pravokotne namesto tipično kvadratne oblike), poleg tega so vsebovale veliko vakuolo.





**Slika 18:** 3 dni stare kalice vrtno redkvice (A–C), kontrolne (1. stolpec) ter tretirane z 10 % izvlečkom japonskega (*F. japonica*) (2. stolpec) in 10 % izvlečkom češkega dresnika (*F. ×bohemica*) (3. stolpec), vzdolžni prerezi njihovega koreninskega vršička (D–F), vzdolžni prerez koreninske čepice (G–I) in vzdolžni prerez apikalnega meristema korenine (J–L). Oznake: apikalni meristem (AM), koreninska čepica (KČ), skorja (S).

#### 4.2.7 Ultrastrukturne značilnosti koreninskega vršička

##### *Koreninska čepica*

S TEM smo analizirali ultrastrukturne spremembe v prvih treh zunanjih slojih koreninske čepice.

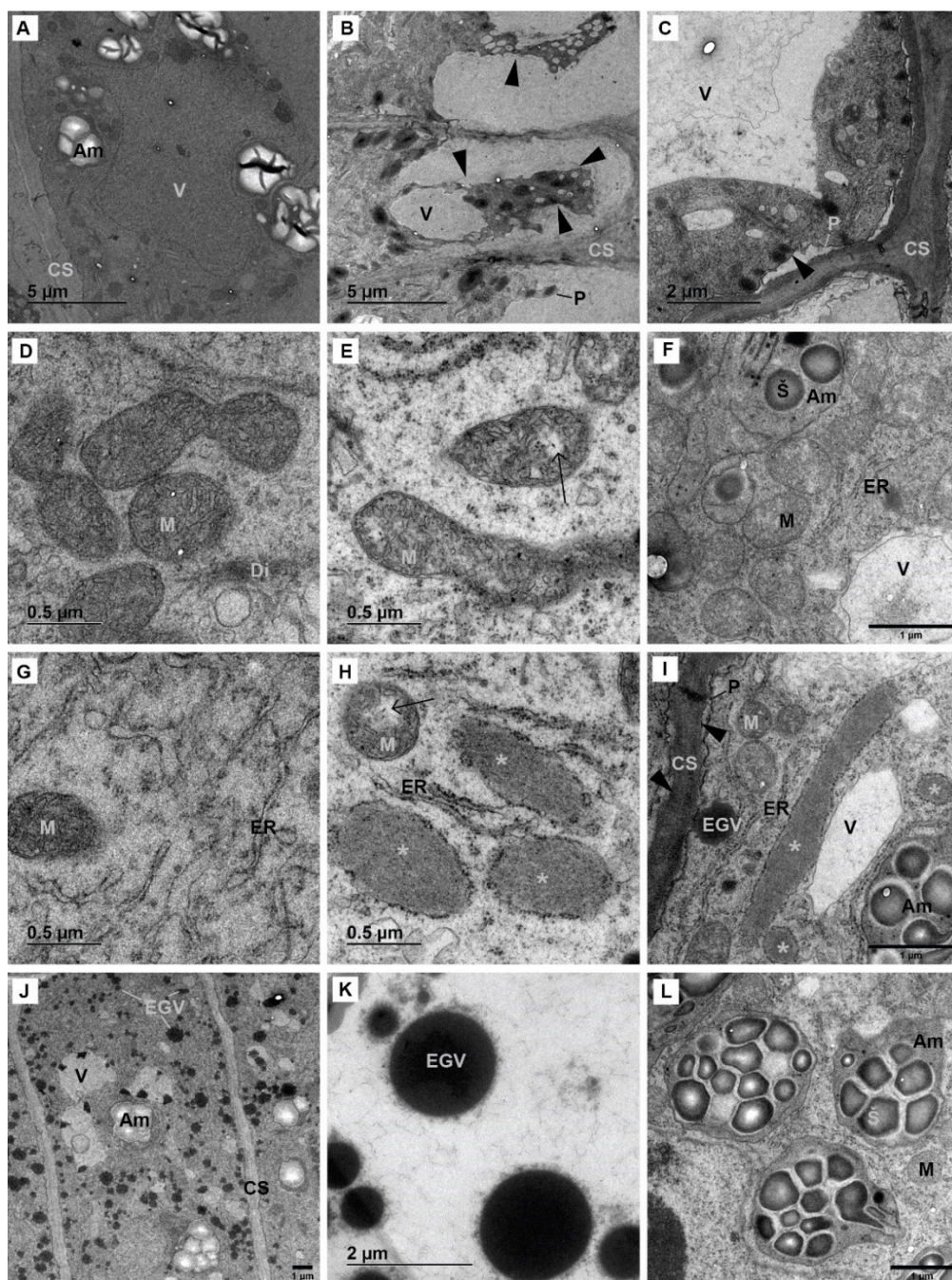
Pri kontrolnih rastlinah so celice koreninske čepice vsebovale veliko osrednjo vakuolo, mitohondrije srednje elektronske gostote, cisterne ER in številne diktiosome (Sl. 19 A). Pri tretiranih rastlinah pa so bile v celicah koreninske čepice razvidne ultrastrukturne spremembe: v zunanji plasti celic koreninske čepice je plazmalema močno odstopila od celične stene, protoplast je bil skrčen in posamezne celične organele je bilo v citoplazmi težko razpoznati (Sl. 19 B). V notranjih slojih čepice je plazmalema prav tako odstopila od celične stene (Sl. 19 C), vidne so bile spremembe v strukturi mitohondrijev in ER.

Medtem ko so celice koreninske čepice kontrolnih rastlin vsebovale številne mitohondrije, v prerezu večinoma podolgovate, z dobro razvitimi kristami in srednje gostim matriksom (Sl. 19 D), smo pri redkvicah, tretiranih z izvlečkoma japonskega dresnika, pogosto opazili spremenjene in v celoti manj goste mitohondrije, z manjšimi elektronsko prosojnimi regijami v mitohondrijskem matriksu (Sl. 19 E). Podobno spremenjene mitohondrije smo opazili tudi pri redkvicah, tretiranih z izvlečkom češkega dresnika (Sl. 19 F).

Pri kontrolnih rastlinah je bil ER v celicah koreninske čepice razviden kot prerezi dolgih in ozkih cistern, z dobro vidnimi ribosomi na površini (Sl. 19 G). Po drugi strani pa so pri tretiranih rastlinah prevladovali prerezi ER v obliki razširjenih cistern, napolnjenih z elektronsko gostim materialom, kar je v literaturi opredeljeno kot ER-telesca (ang. *ER bodies*). Medtem ko smo pri kontrolnih rastlinah v koreninski čepici ER-telesca opazili le redko (0–1 na celico v prerezu), so bile te strukture pri tretiranih rastlinah zelo pogoste: pri tretmaju z izvlečkom japonskega dresnika smo opazili do 15 ER-telesc, pri tretmaju z izvlečkom češkega dresnika pa do 8 ER-telesc v posameznem prerezu celice. Pri tretmaju z izvlečkom japonskega dresnika so bila ER-telesca v prerezu večinoma okrogle oblike in velikosti približno 1  $\mu\text{m}$  (Sl. 19 H), medtem ko so bila ER-telesca pri tretmaju z izvlečkom češkega dresnika bolj podolgovata in so zavzemala precej večji del celice, saj so v dolžino merila tudi do 4  $\mu\text{m}$  (Sl. 19 I).

Samo v citoplazmi tretiranih rastlin smo opazili številne okrogle in elektronsko goste vključke (Sl. 19 J). Vključki so bili v premeru dolgi od 0,5 do 2  $\mu\text{m}$  in ni bilo videti, da bi bili jasno obdani z membrano (Sl. 19 K).

Diktiosomi so bili pri tretiranih rastlinah podobni kot pri kontrolnih. Poleg tega so bili tako pri kontrolnih kot pri tretiranih rastlinah v celicah koreninske čepice številni amiloplasti z dobro vidnimi škrobnimi zni. Kalice, tretirane z izvlečkom češkega dresnika, so imele v celicah koreninske čepice elektronsko gosta škrobna zrna (Sl. 19 L), medtem ko so bila škrobna zrna pri kontrolnih kalicah in kalicah, tretiranih z izvlečkom japonskega dresnika, svetla.



**Slika 19:** Ultrastruktura celic koreninske čepice pri kontrolnih kalicah vrtno redkvice (A, D, G) in pri kalicah, ki smo jih tretirali z 10 % izvlečkom japonskega dresnika (*F. japonica*) (B, E, H, K) in češkega dresnika (*F. ×bohemica*) (C, F, I, J, L). TEM-mikrografije prikazujejo celice koreninske čepice v kontrolnih rastlinah (A), močan odstop plazmaleme od celične stene in skrčen protoplast (B), odstop plazmaleme v notranjih slojih koreninske čepice (C), mitohondrije v kontrolnih rastlinah (D), mitohondrije z elektronsko prosojnimi regijami v matriksu (E, F), cisterne ER v kontrolnih rastlinah (G), ER-telesca (H, I), okrogle elektronsko goste vključke (J, K) in amiloplaste s škrobnimi zrni (L). Oznake: amiloplast (Am), celična stena (CS), diktiosom (Di), elektronsko gosti vključki (EGV), endoplazemski retikulum (ER), mitohondrij (M), plazmalema (P), škrobno zrno (Š), vakuola (V). Z zvezdico (\*) so označena ER-telesca; odebeljena puščica (▲) označuje mesta, kjer je plazmalema odstopila od celične stene; ozka puščica (↑) označuje elektronsko prosojne regije v matriksu mitohondrijev.

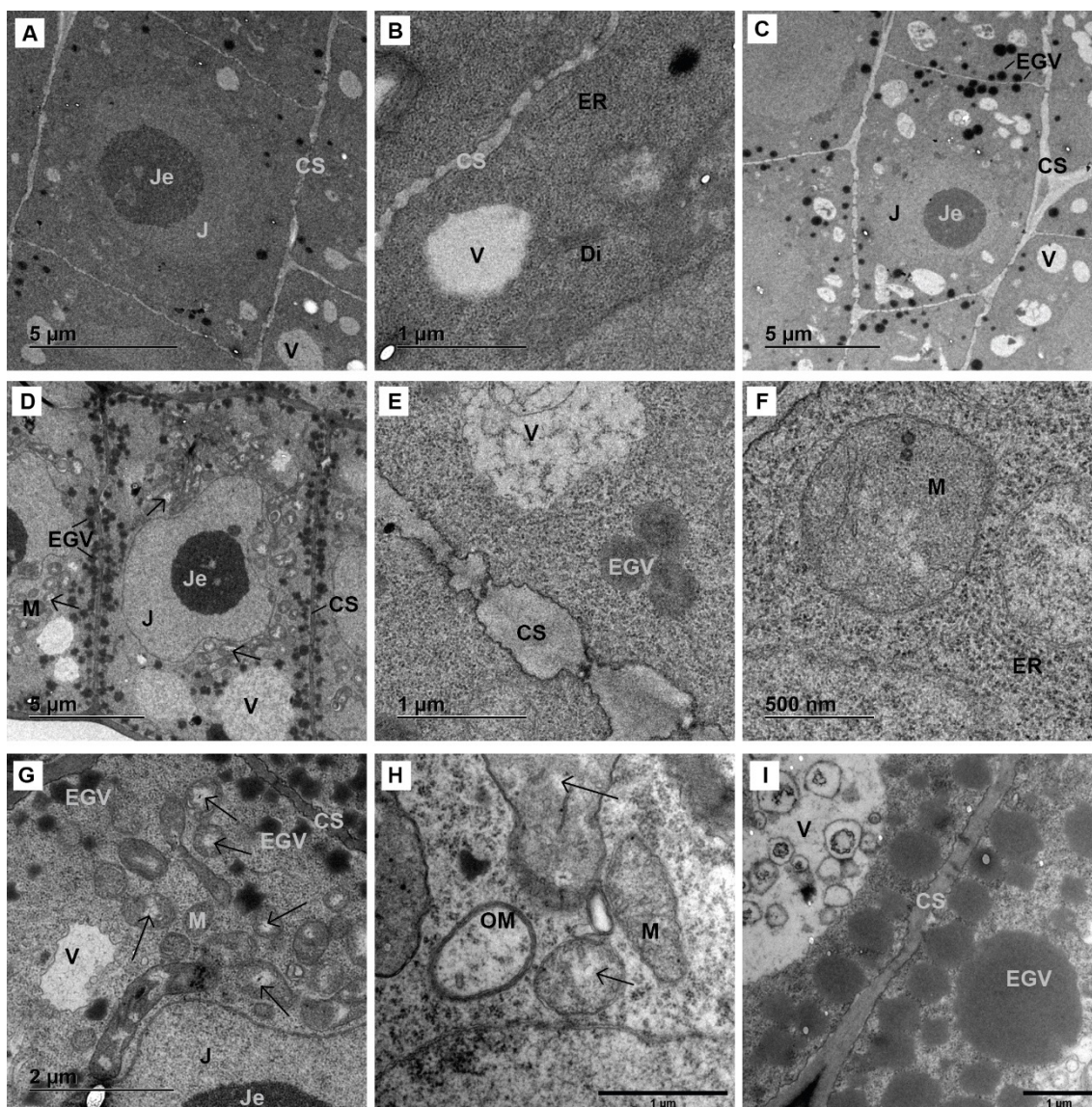
### *Apikalni meristem korenine*

Meristemske celice v osrednjem delu koreninskega vršička so bile pri kontrolnih kalicah jasno prepoznavne: majhne in v prerezu kvadratne celice z velikim jedrom in obsežnim jedrcem ter gosto citoplazmo s številnimi organeli (Sl. 20 A), mitohondriji, ER, diktiosomi in manjšimi vakuolami (Sl. 20 B).

Pri koreninah, ki so bile izpostavljene izvlečku japonskega (Sl. 16 C) in izvlečku češkega dresnika (Sl. 20 D), smo meristemske celice prav tako prepoznali po velikem osrednjem jedru z jedrcem, a je bila njihova oblika v prerezu bolj podolgovata, na nekaterih delih je bila celična stena nagubana (Sl. 20 E).

Najbolj opazna sprememba organelov v meristemskih celicah je bila vidna pri mitohondrijih: pri tretiranih rastlinah so imeli mitohondriji (Sl. 20 F) izrazite elektronsko prosojne regije v matriksu, večinoma je bilo razvidnih malo krist (Sl. 20 G). Pri rastlinah, tretiranih z izvlečkom češkega dresnika, smo v meristemskih celicah opazili tudi obročaste mitohondrije (Sl. 20 H).

Meristemske celice pri tretiranih kalicah so imele v primerjavi s kontrolnimi kalicami tudi več manjših vakuol. Poleg tega so se pri tretiranih rastlinah v citoplazmi meristemskih celic pojavljali številni okrogli elektronsko gosti vključki (Sl. 20 I).

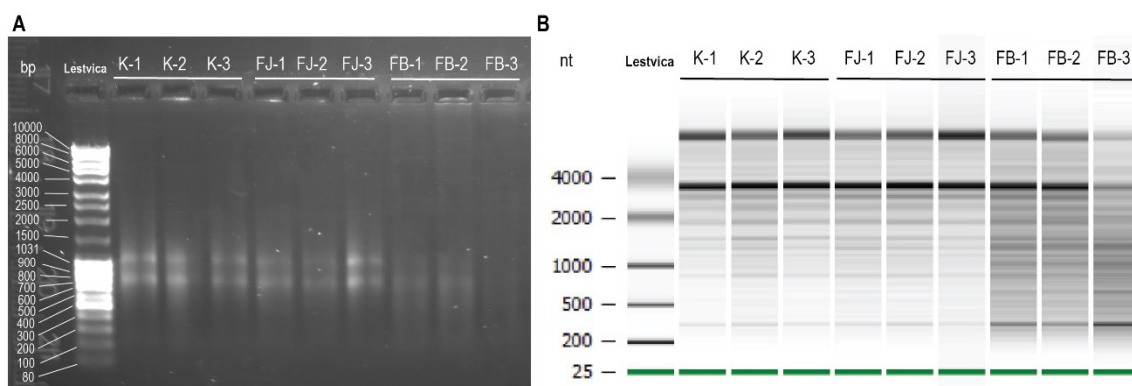


**Slika 20:** Ultrastruktura celic apikalnega meristema korenine pri kontrolnih kalicah vrtno redkvice (A, B) in pri kalicah, ki smo jih tretirali z 10 % izvlečkom japonskega (*F. japonica*) (C, E, F) in češkega dresnika (*F. ×bohemica*) (D, G, H, I). TEM-mikrografije prikazujejo nagubano celično steno (E), mitohondrije z maloštevilnimi kristami (F), mitohondrije z izrazitimi elektronsko prosojnimi regijami v matriksu (G), obročaste mitohondrije (H) in okrogle elektronsko goste vključke (I). Oznake: celična stena (CS), diktiosom (Di), elektronsko gosti vključki (EGV), endoplazemski retikulum (ER), mitohondrij (M), jedro (J), jedrce (Je), obročasti mitohondrij (OM), vakuola (V). Ozka puščica (↑) označuje elektronsko prosojne regije v mitohondriju.

#### 4.2.8 Molekulske značilnosti koreninskih vršičkov

Z elektronsko gelsko elektroforezo (Sl. 21 A) izolirane RNA iz koreninskih vršičkov kalice vrtno redkvice, ki smo jih za 3 dni izpostavili 10 % vodnima izvlečkoma japonskega in češkega dresnika, smo potrdili ustrezno kvaliteto izolirane RNA. Na sliki vidimo dve

podenoti rRNA, 18 S in 28 S (Sl. 21). Kvaliteto smo nadalje potrdili tudi z Bioanalyzerjem (Sl. 21 B)

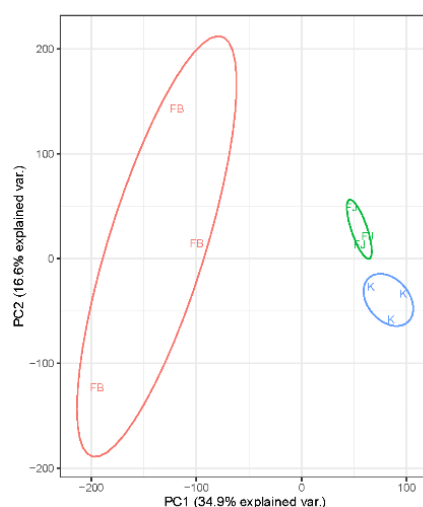


**Slika 21:** Prikaz izolirane RNA na gelu (A) in z Bioanalyzerjem (B) iz koreninskih vršičkov redkvice po 3-dnevni izpostavitvi 10 % izvlečku japonskega (*F. japonica*) in 10 % izvlečku češkega dresnika (*F. ×bohemica*). Tretmaji: kontrola (K), izvleček japonskega dresnika (FJ), izvleček češkega dresnika (FB). Pri vsakem tretmaju smo analizirali po 3 vzorce, ki so označeni z zaporednimi številkami od 1 do 3.

Z metodo RNA-Seq smo v povprečju dobili 30 568 598 parnih odčitkov na vzorec. Od 46 511 genov, anotiranih v genomu redkvice, je bilo 17 430 genov izraženih v zadostni količini, da je bila z njimi možna diferencialna analiza izražanja genov.

V koreninskem vršičku vrtna redkvice, tretirane z izvlečkom češkega dresnika, je bilo 5938 genov, ki so bili statistično značilno različno izraženi glede na kontrolo. Od tega je bilo 52 % genov s povišano ravno izražanja in 48 % z znižano ravno. Tudi pri tretmaju z izvlečkom japonskega dresnika so bile razlike pri izražanju genov v primerjavi s kontrolo, a te razlike niso bile statistično značilne. Med tretmajema z obema izvlečkoma je bilo statistično značilno različno izraženih 3967 genov ( $p < 0,05$ ).

Tudi glede na analizo glavnih komponent (PCA) je razvidno, da se skupine med seboj razlikujejo. Izmed tretmajev najbolj izstopa izvleček češkega dresnika, medtem ko je izražanje genov v rastlinah, tretiranih z izvlečkom japonskega dresnika, bližje kontrolni skupini (Sl. 22).



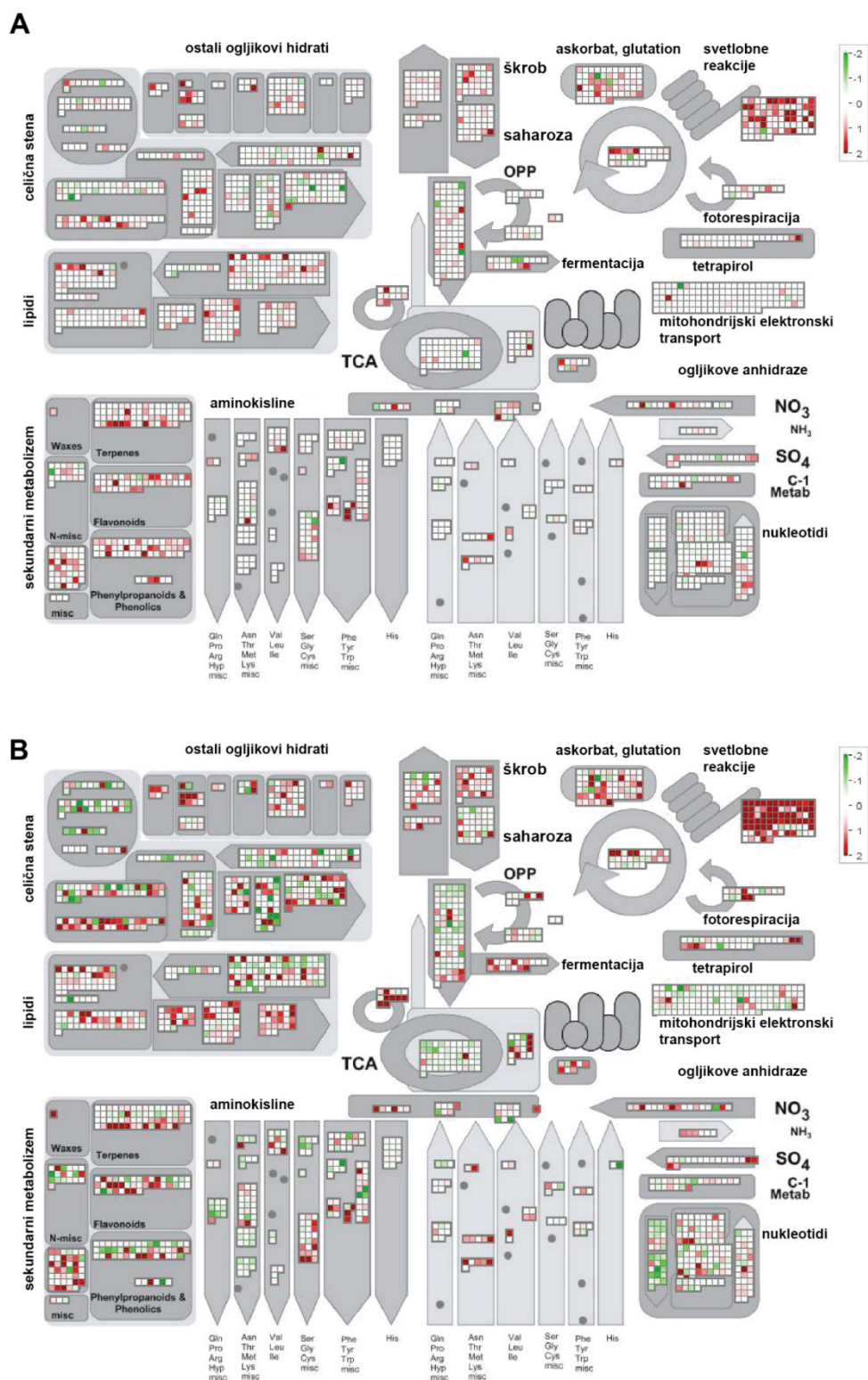
**Slika 22:** Analiza izražanja genov v koreninskem vršičku 3 dni stare vrtno redkvice po metodi glavnih komponent (PCA). Kalice so bile izpostavljene 10 % izvlečku japonskega (*F. japonica*) in 10 % izvlečku češkega dresnika (*F. ×bohemica*). Tretmaji: kontrola (K), izvleček japonskega dresnika (FJ), izvleček češkega dresnika (FB). Pri vsakem tretmaju smo analizirali po 3 vzorce. Prikazani sta prva (x-os) in druga (y-os) glavna komponenta.

Geni, ki so najbolj vplivali na ločitev med tretmaji pri PCA, so prikazani v Preglednici 6. Največji vpliv so imeli geni s področja sinteze proteinov (23 %), Ca-signalizacije (21 %) in Calvinovega cikla (17 %). Poleg njih so v manjšem deležu vplivali tudi geni iz metabolizma aminokislin in geni za heat-shock proteine.

Preglednica 6: Deset genov v koreninskem vršičku vrtno redkvice z največjim vplivom glede na Eigenvektorje na ločitev pri PCA med kalicami, ki so bile izpostavljene destilirani vodi, ter kalicami, ki so bile izpostavljene izvlečku japonskega in češkega dresnika (*F. japonica* in *F. ×bohemica*). Funkcionalne skupine so določene glede na ontologijo MapMan.

Ime gena	Funkcionalna skupina	Eigenvektorji
Rs137380	Sinteza proteinov, elongacija	0,23
Rs487060	Ca-signalizacija	0,21
Rs009910	Neznano, ni definirano	0,18
Rs258110	Calvinov cikel	0,17
Rs005690	Sinteza proteinov, elongacija	0,14
Rs410610	Ca-signalizacija	0,13
Rs150910	Sinteza ribosomalnih proteinov	0,10
Rs419480	Sinteza proteinov, elongacija	0,09
Rs479820	Metabolizem aminokislin	0,09
Rs134790	Heat-shock proteini, abiotski stres	0,09

Pregled sprememb v izražanju posameznih genov v okviru glavnih metabolnih poti je prikazan v Sl. 23, kjer so z rdečo obarvani geni, ki so bolj, z zeleno pa geni, ki so manj izraženi v tretiranih vzorcih glede na kontrolo.



**Slika 23:** Pregled izražanja genov osnovnih metabolnih poti v koreninah kalic vrtno redkvice, tretirane z 10 % izvlečkom japonskega (*F. japonica* – FJ) in češkega dresnika (*F. ×bohemica* – FB). Za kontrolo (K) smo uporabili destilirano vodo. Primerjave smo naredili med FJ – K (A) in FB – K (B). Intenziteta barve sovпада z logFC. Rdeča: povečano izražanje genov, zelena: zavrto izražanje genov. Prikazane so vse razlike, ne glede na statistično značilnost.



### *Splošen pregled obogatenih genskih skupin*

Z obogatitveno analizo (ang. *Gene Set Enrichment Analysis*, GSEA) smo dobili splošen pregled nad pozitivno obogatenimi genskimi skupinami (z večjim izražanjem v tretmajih) oz. negativno obogatenimi genskimi skupinami (z manjšim izražanjem v tretmajih). Za prikaz smo izbrali najbolj relevantne genske skupine, pri katerih je prišlo do sprememb. Prikazane so v Preglednici 7. Skupine genov so bile pri tretmaju z izvlečkom japonskega in češkega dresnika večinoma obogatene v isto smer, največ je bilo pozitivno obogatenih skupin. Največ obogatenih genskih skupin je bilo pri tretmaju z izvlečkom češkega dresnika. Izvlečka sta vplivala na obogatitev različnih genskih skupin, ki so povezane s celičnim metabolizmom.

Pozitivno obogateni seti pri obeh tretmajih so bili pri genskih skupinah, ki pri fotosintezi uravnavajo svetlobne reakcije in Calvinov cikel, metabolizem ogljikovih hidratov, glikolatni cikel, aktivnost encimov za razgradnjo celične stene (celulaz), sintezo fosfolipidov in lipaz ter transport sladkorjev in fosfatov. Samo pri tretmaju z izvlečkom japonskega dresnika so bili v koreninah redkvice pozitivno obogateni seti, ki regulirajo metabolizem aminokislin in njihov transport, cikel citronske kisline in transport kalcija. Samo pri tretmaju z izvlečkom češkega dresnika so bili v koreninah redkvice pozitivno obogateni seti, ki uravnavajo vrenje, oksidativno fosforilacijo, modifikacijo celične stene,  $\beta$ -oksidacijo maščobnih kislin, dušikov metabolizem, transport nitratov in celični cikel.

Negativno obogateni seti pri obeh tretmajih so bili le pri genski skupini, ki uravnavajo sintezo DNA in strukturo kromatina. Pri tretmaju z izvlečkom češkega dresnika so bili negativno obogateni seti genov še pri sintezi nukleotidov, procesiranju in transkripciji RNA, sintezi ribosomov in mikrotubulov.

V koreninah tretiranih redkvic so bile skupine genov, ki sodelujejo pri sekundarnem metabolizmu, pozitivno obogatene: sinteza tokoferola, karotenoidi, terpenoidi, sinteza lignina, razgradnja glukozinolatov ter metabolizem antocianov, dihidroflavonolov in flavonolov. Le pri tretmaju z izvlečkom japonskega dresnika je bila pozitivno obogatena še skupina genov, ki regulira metabolizem enostavnih fenolov.

Tako pri tretmaju z izvlečkom japonskega kot pri tretmaju z izvlečkom češkega dresnika so bili pozitivno obogateni seti genov, ki uravnavajo metabolizem abscizinske kisline, avksinov, giberelinov in jasmonske kisline. Večinoma je bila aktivirana razgradnja hormonov. Le pri izvlečku češkega dresnika so bile v korenini redkvice pozitivno obogatene tudi genske skupine, povezane z etilenom.

Pri tretmajih z izvlečkoma obeh dresnikov so bile v koreninah redkvice pozitivno obogatene tako skupine genov, ki sodelujejo pri odzivu na biotski stres, kot tiste, ki sodelujejo pri odzivu na abiotski stres, in sicer skupine, ki uravnavajo proteinazne

inhibitorje in nespecifičen odgovor na abiotski stres. Pri tretmaju z izvlečkom češkega dresnika so bile v okviru odgovora na biotski stres pozitivno obogatene še skupine genov za receptorje, signalizacijo in PR-proteine, v okviru odgovora na abiotski stres pa skupina genov za mraz.

V okviru redoks homeostaze je bila pri obeh tretmajih pozitivno obogatena skupina genov za askorbat, pri koreninah redkvic, ki so bile izpostavljene izvlečku češkega dresnika pa tudi skupina genov za glutation.

Pri skupinah genov za razgradnjo proteinov in programirano celično smrt so bile obogatene samo skupine genov pri koreninah, tretiranih z izvlečkom češkega dresnika. Pozitivno obogatene so bile skupine genov za avtofagijo, cisteinske proteaze in ubikvitin E2. Negativno obogatena je bila skupina genov za proteasom.

Preglednica 7: Pregled izbranih obogatenih genskih skupin v celicah korenine kalic vrtno redkvice, tretiranih z 10 % izvlečkom japonskega (*F. japonica* – FJ) in češkega dresnika (*F. ×bohemica* – FB). Vrednosti TAG predstavljajo delež genov v setu, ki prispeva k obogatitvi. Prikazana je statistično značilna obogatitev glede na kontrolo (K). Pozitivno obogateni seti genov so obarvani rdeče, negativno obogateni zeleno. Kjer razlike niso bile statistično značilne, so celice prazne.

Št. BIN	Opis genske skupine	Vrednost TAG	
		FJ – K	FB – K
<b>METABOLNI PROCESI</b>			
1.1	Fotosinteza – svetlobne reakcije	0,39	0,49
1.3	Fotosinteza – Calvinov cikel	0,38	0,42
2	Glavni metabolizem ogljikovih hidratov	0,56	0,41
3	Stranski metabolizem ogljikovih hidratov	0,35	0,35
5	Fermentacija		0,39
6	Glukoneogeneza/glikolatni cikel	0,65	0,5
7.1	Oksidativna fosforilacija		0,28
8	Cikel citronske kisline	0,38	
10.5	Celična stena – proteini		-0,26
10.6.1.	Celična stena – celulaze in β-1,4-glukanaze	0,27	0,43
10.7	Celična stena – modifikacija		0,38
11.3	Metabolizem lipidov – sinteza fosfolipidov	0,21	0,42
11.9.2	Metabolizem lipidov – lipaze	0,44	0,41
11.9.4	Metabolizem lipidov – β-oksidacija		0,53
12	Dušikov metabolizem		0,55
13	Metabolizem aminokislin	0,26	
14	Asimilacija žvepla		0,44

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 7:

Št. BIN	Opis genske skupine	Vrednost TAG	
		FJ – K	FB – K
<b>METABOLNI PROCESI</b>			
18	Co-faktor in metabolizem vitaminov		-0,47
23.1	Metabolizem nukleotidov – sinteza		-0,48
27.1	Procesiranje RNA		-0,4
27.2	Transkripcija RNA		-0,45
28.1	Sinteza DNA/struktura kromatina	-0,67	-0,64
29.2.2	Sinteza proteinov – biogeneza ribosomov		-0,6
31.1.1.2	Citoskelet – mikrotubuli		-0,41
31.3	Celični cikel		0,59
33.1	Razvojni založni proteini		0,25
34.2	Transport sladkorjev	0,28	0,38
34.3	Transport aminokislin	0,22	
34.4	Transport nitratov		0,35
34.7	Transport fosfatov	0,19	0,19
34.21	Transport kalcija	0,34	
34.22	Transport cikličnih nukleotidov, s Ca reguliranih kanalčkov		0,34
<b>SEKUNDARNI METABOLITI</b>			
16.1.3	Biosinteza tokoferola	0,63	0,69
16.1.4	Karotenoidi	0,57	0,33
16.1.5	Terpenoidi	0,37	0,33
16.2.1	Biosinteza lignina	0,4	0,24
16.5.1.3	Razgradnja glukozinolatov	0,31	0,35
16.8.1	Antocianini	0,4	0,48
16.8.3	Dihidroflavonoli	0,39	0,5
16.8.4	Flavonoli	0,39	0,33
16.10	Enostavni fenoli	0,34	
<b>HORMONI</b>			
17.1.1	Abscizinska kislina – razgradnja	0,47	0,47
17.1.2	Abscizinska kislina – signalna transdukcija	0,48	
17.1.3	Abscizinska kislina – aktivacija reguliranega odziva		0,4
17.2.1	Avksin – razgradnja	0,41	0,36
17.2.3	Avksin – aktivacija reguliranega odziva		0,32
17.5.1	Etilen – razgradnja		0,29
17.5.2	Etilen – signalna transdukcija		0,48
17.5.3	Etilen – aktivacija reguliranega odziva		0,17
17.6.1.11	Giberelin – razgradnja (GA20 oksidaza)	0,27	0,33
17.7.1	Jasmonat – razgradnja		0,33

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 7:

Št. BIN	Opis genske skupine	Vrednost TAG	
		FJ – K	FB – K
	<b>ODZIV NA BIOTSKI STRES</b>		
20.1.2	Receptorji		0,48
20.1.3	Signalizacija		0,53
20.1.7	PR-proteini		0,4
20.1.7.6	PR-proteini – proteinazni inhibitorji	0,49	0,41
	<b>ODZIV NA ABIOTSKI STRES</b>		
20.2.2	Mraz		0,45
20.2.99	Nespecifičen odziv	0,43	0,4
	<b>REDOKS HOMEOSTAZA</b>		
21.2.1	Askorbat	0,37	0,37
21.2.2	Glutation		0,5
	<b>RAZGRADNJA</b>		
29.5.2	Razgradnja proteinov – avtofagija		0,4
29.5.3	Razgradnja proteinov – cisteinske proteaze		0,17
29.5.11.3	Razgradnja proteinov – ubikvitin E2		0,57
29.5.11.20	Razgradnja proteinov – ubikvitin proteasom		-0,75

#### *Vpliv izvlečkov na izražanje posameznih genov v koreninah redkvice*

V nadaljevanju smo izbrali gene, ki so povezani z rastjo celic, oksidativnim stresom in programirano celično smrtjo, glede na predhodno dobljene rezultate ostalih mikroskopskih in biokemijskih analiz. Vzorec izražanja genov v koreninah tretiranih redkvic je bil pri izvlečkih obeh dresnikov podoben, a so bile razlike statistično značilne večinoma le pri tretmaju z izvlečkom češkega dresnika.

Z analizo RNA-Seq smo ugotovili, da se je v koreninah tretiranih redkvic spremenilo izražanje genov, ki so povezani z rastjo celice (Preglednica 8). Vpliv se je kazal predvsem na gene, povezane s celulozo: izvleček češkega dresnika je povišal izražanje genov, ki so povezani s sintezo celuloze, ter hkrati zavrl gene za celulazo. Pri izvlečku japonskega dresnika so bili geni, povezani s celulozo, statistično neznačilno manj izraženi. Izvleček češkega dresnika je povišal izražanje genov za pektin liaze, medtem ko se je izražanje pri tretmaju z izvlečkom japonskega dresnika znižalo. Oba tretmaja sta povišala izražanje več genov, ki so povezani z ekspanzini, ter gen, ki je povezan z ligazo. Prav tako sta izvlečka obeh dresnikov v koreninah redkvice povišala izražanje genov, ki so povezani z metabolizmom avksina, a so bile razlike statistično značilne le pri izvlečku češkega dresnika. Oba tretmaja sta večinoma zmanjšala izražanje genov, ki so povezani z mikrotubuli.

Preglednica 8: Pregled izražanja izbranih genov, povezanih z rastjo celic, v koreninah vrtno redkvice po 3-dnevni izpostavitvi 10 % izvlečku japonskega in češkega dresnika (*F. japonica*, *F. ×bohemica*). Vrednosti tretmajev so primerjane s kontrolnimi vrednostmi (logFC). Prikazane so p-vrednosti (p), kjer so statistično značilne razlike s  $p < 0,05$ . Rdeča barva predstavlja povečano izražanje genov glede na kontrolo, zelena zmanjšano izražanje genov.

Ime gena	Opis gena	Št. BIN	Opis BIN	Tretma			
				<i>F. japonica</i>		<i>F. ×bohemica</i>	
				logFC	p	logFC	p
Rs062950	Celuloza sintaza, podobna D2	10.2.1	Sinteza – celulozna sintaza	-0,52	0,722	2,39	0,002
Rs140880	Celuloza sintaza, podobna A11	10.2.1	Sinteza – celulozna sintaza	-0,49	0,384	-1,33	0,005
Rs454560	Celulaza 3	10.6.1	Razgradnja – celulaze	0,27	0,903	2,15	0,016
Rs276670	Protein iz družine pektin liazam podobnih proteinov	10.6.3	Razgradnja – pektat liaze	-2,46	0,622	4,79	0,012
Rs020470	Ekspanzin A10	10.7	Modifikacija celične stene	1,91	0,001	1,10	0,157
Rs097710	Ekspanzin A1	10.7	Modifikacija celične stene	3,62	0,009	1,40	0,548
Rs060340	Ekspanzin B3	10.7	Modifikacija celične stene	3,16	0,002	1,60	0,281
Rs231190	Ekspanzin 12	10.7	Modifikacija celične stene	3,43	0,003	-0,55	0,822
Rs237090	4-kumarat: CoA ligaza 5	16.2.1.3	Sekundarni metaboliti – fenilpropanoidi	1,53	0,176	1,14	0,038
Rs029100	IAA aminokislinske hidrolaze, podobne ILR1 6 (ang. <i>IAA amino acid hydrolase ILR1-like 6</i> )	17.2.1	Hormoni – razgradnja avksina	1,21	0,295	1,36	0,032
Rs107110	Avksinski vezni protein endoplazemskega retikuluma 1 (ang. <i>Endoplasmic reticulum auxin binding protein 1</i> )	17.2.2	Hormoni – signalna transdukcija avksina	0,28	0,841	2,06	0,005

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 8:

Ime gena	Opis gena	Št. BIN	Opis BIN	Tretma			
				<i>F. japonica</i>		<i>F. ×bohemica</i>	
				logFC	p	logFC	p
Rs041120	Protein iz družine avksinsko odzivne GH3 (ang. <i>auxin responsive GH3 family protein</i> )	17.2.3	Hormoni – aktivacija avksinsko sproženega odziva	0,37	0,866	3,57	0,003
Rs304300	Indol-3-očetna kislina 7	27.3.40	Regulacija RNA transkripcije AUX/IAA družine	0,19	0,900	2,61	0,002
Rs163960	Proteini, povezani z mikrotubuli 70-5	31.1	Celična organizacija	-0,20	0,879	-3,65	0,041
Rs167130	Tubulin beta 8	31.1	Celična organizacija	0,38	0,567	-0,94	0,027

Izвлеčki dresnikov so v koreninah tretiranih redkvic spremenili tudi izražanje nekaterih genov, ki so povezani z oksidativnim stresom (Preglednica 9). Pri obeh tretmajih je bilo povišano izražanje genov, ki so povezani z askorbat-glutationskim ciklom: gen za askorbat peroksidazo (APX3), gen za dehidroaskorbat reduktazo (DHAR) ter več genov za glutation peroksidazo (GPX2, GPX6, GPX7, GPX8). Razlike so bile statistično značilne samo pri tretmaju z izvlečkom češkega dresnika. Noben tretma ni vplival na izražanje gena za glutation reduktazo (GR). V koreninah tretiranih redkvic je bilo povišano izražanje genov za *de novo* sintezo glutationa: gen za glutamat-cistein ligazo in gen za glutation sintazo. Razlika je bila statistično značilna le pri tretmaju z izvlečkom češkega dresnika. Tudi izražanje več genov za katalaze (CAT2 in CAT3) je bilo pri obeh tretmajih povišano, a so bile razlike statistično značilne le pri tretmaju z izvlečkom češkega dresnika. Prav tako je bilo v koreninah redkvice, tretiranih z izvlečkom češkega dresnika, povišano izražanje gena za proteinu NPR-1-podoben protein 3.

Preglednica 9: Izbrani geni, povezani z oksidativnim stresom, v koreninah vrtno redkvice po 3-dnevni izpostavitvi 10 % izvlečku japonskega in češkega dresnika (*F. japonica* in *F. ×bohemica*). Prikazane so p-vrednosti (p), kjer so statistično značilne razlike s  $p < 0,05$ .

Ime gena	Opis gena	Št. BIN	Opis BIN	Tretma			
				<i>F. japonica</i>		<i>F. ×bohemica</i>	
				logFC	p	logFC	p
Rs274120	Askorbat peroksidaza 3	21.2.1	Redoks – askorbat in glutation	0,30	0,942	3,50	0,016
Rs014260	Dehidroaskorbat reduktaza	21.2.1	Redoks – askorbat in glutation	1,12	0,176	2,18	0,001

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 9:

Ime gena	Opis gena	Št. BIN	Opis BIN	Tretma			
				<i>F. japonica</i>		<i>F. ×bohemica</i>	
				logFC	p	logFC	p
Rs130850	Glutation peroksidaza 2	21.2.2	Redoks – askorbat in glutation	1,51	0,202	1,63	0,012
Rs154370	Glutation peroksidaza 7	21.2.2	Redoks – askorbat in glutation	0,23	0,849	1,32	0,018
Rs355830	Glutation peroksidaza 2	21.2.2	Redoks – askorbat in glutation	1,23	0,259	1,87	0,006
Rs486210	Glutation peroksidaza 8	21.2.2	Redoks – askorbat in glutation	0,25	0,538	0,48	0,038
Rs587910	Glutation peroksidaza 6	21.2.2	Redoks – askorbat in glutation	1,21	0,211	2,03	0,002
Rs260090	Glutation reduktaza	21.2.2	Redoks – askorbat in glutation	0,07	0,860	-0,18	0,329
Rs055540	Glutamat-cistein ligaza	21.2.2	Redoks – askorbat in glutation	0,53	0,326	1,27	0,002
Rs170130	Glutation sintaza 2	21.2.2	Redoks – askorbat in glutation	0,37	0,559	0,71	0,048
Rs414540	Katalaza 3	21.6	Redoks – dismutaze in katalaze	0,34	0,771	3,30	0,001
Rs430200	Katalaza 2	21.6	Redoks – dismutaze in katalaze	-0,37	0,860	1,58	0,038
Rs524890	Katalaza 3	21.6	Redoks – dismutaze in katalaze	1,36	0,241	4,61	0,001
Rs016930	Katalaza 3	21.6	Redoks – dismutaze in katalaze	1,51	0,571	4,47	0,008
Rs177310	Proteinu NPR-1-podoben protein 3	27.3.61	Regulacija in transkripcija RNA	-0,38	0,567	0,94	0,014

Izvečka sta vplivala na izražanje genov v korenini, ki so povezani s programirano celično smrtjo, predvsem na izražanje genov za kaspazam in metakaspazam podobnih proteaz (Preglednica 10). Izveček češkega dresnika je povišal izražanje genov, ki so povezani z

družino podobnih cisteinskih proteaz, proteinsko družino subtilaz, proteinsko družino subtilizinu podobnih serinskih endopeptidaz ter več genov za proteinsko družino cisteinskih proteaz. Izvleček japonskega dresnika je statistično neznačilno znižal izražanje genov za proteinsko družino subtilizinu podobnih serinskih endopeptidaz ter nekatere gene iz družine cisteinskih proteaz. Ostalo izražanje genov je bilo pri tretmaju z japonskim dresnikom podobno kot pri tretmaju s češkim, a statistično neznačilno.

Izvlečka obeh dresnikov sta povišala izražanje gena za metakaspaze 1, a so bile razlike statistično značilne le pri izvlečku češkega dresnika.

Preglednica 10: Izbrani geni, povezani z razgradnjo proteinov in programirano celično smrtjo, v koreninah vrtno redkvice po 3-dnevni izpostavitvi 10 % izvlečku japonskega in češkega dresnika (*F. japonica* in *F. ×bohemica*). Prikazane so p-vrednosti (p), kjer so statistično značilne razlike s  $p < 0,05$ .

Ime gena	Opis gena	Št. BIN	Opis BIN	Tretma			
				<i>F. japonica</i>		<i>F. ×bohemica</i>	
				logFC	p	logFC	p
Rs061720	Protein iz družine papainu podobnih cisteinskih proteaz	29.5.3	Razgradnja proteinov – cisteinske proteaze	1,20	0,195	1,74	0,003
Rs421450	Protein iz družine papainu podobnih cisteinskih proteaz	29.5.3	Razgradnja proteinov – cisteinske proteaze	0,45	0,335	1,60	0,001
Rs027020	Protein iz družine subtilaz	29.5.1	Razgradnja proteinov – subtilaze	0,63	0,624	2,10	0,007
Rs027070	Protein iz družine subtilizinu podobnih serinskih endopeptidaz	29.5.1	Razgradnja proteinov – subtilaze	-1,14	0,356	1,40	0,016
Rs001020	Protein iz družine cisteinskih proteaz	29.5.3	Razgradnja proteinov – cisteinske proteaze	0,12	0,958	1,74	0,026
Rs079240	Protein iz družine cisteinskih proteaz	29.5.3	Razgradnja proteinov – cisteinske proteaze	1,21	0,126	1,77	0,001
Rs074480	Protein iz družine cisteinskih proteaz	29.5.3	Razgradnja proteinov – cisteinske proteaze	-0,09	0,976	2,33	0,013

se nadaljuje



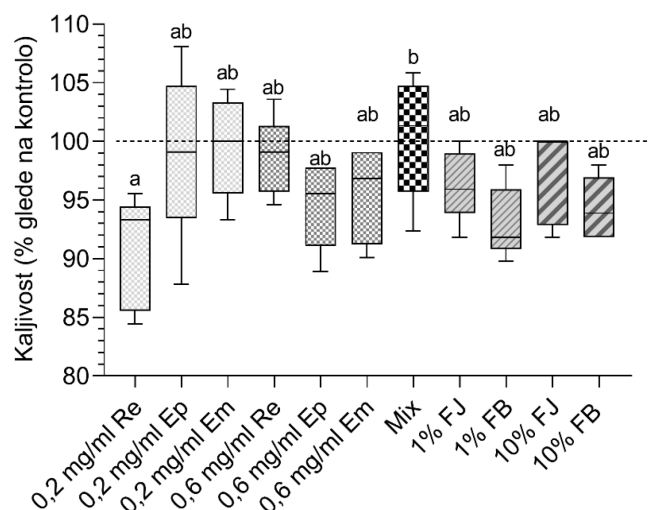
Nadaljevanje Preglednice 10:

Ime gena	Opis gena	Št. BIN	Opis BIN	Tretma			
				<i>F. japonica</i>		<i>F. ×bohemica</i>	
				logFC	p	logFC	p
Rs147130	Protein iz družine cisteinskih proteaz	29.5.3	Razgradnja proteinov – cisteinske proteaze	-0,40	0,621	1,47	0,003
Rs255540	Metakaspaza 1	29.5	Razgradnja proteinov	0,33	0,392	0,48	0,032

### 4.3 KALITVENI POSKUSI Z METANOLNIMI IZVLEČKI IN IZBRANIMI DRESNIKOVIMI ALELOKEMIKALIJAMI

#### 4.3.1 Kalitev in začetna rast kalic redkvice

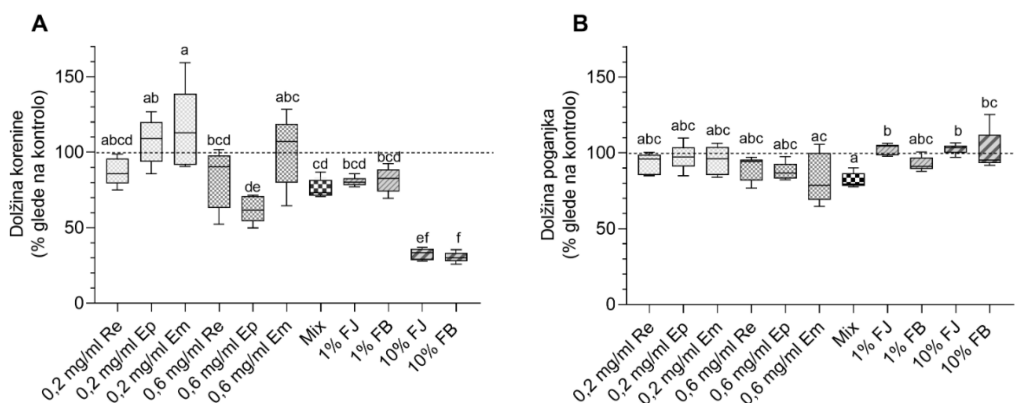
Metanolni izvlečki češkega dresnika so statistično značilno zavrli kalitev semen vrtno redkvice tako pri 1 % izvlečkih (inhibicija kalitve za 6,9 %,  $p = 0,011$ ) kot pri 10 % koncentraciji (inhibicija kalitve za 5,7 %,  $p = 0,041$ ), medtem ko metanolni izvlečki japonskega dresnika niso vplivali na kalitev. Kalitev semen je bila zavrta tudi pri tretmaju z 0,2 mg/ml resveratrola (za 9,3 %,  $p = 0,007$ ), ostali tretmaji z dresnikovimi alelokemikalijami pa na kalitev niso vplivali (Sl. 24).



**Slika 24:** Delež kaljivosti semen redkvice po 3-dnevni izpostavitvi dresnikovim alelokemikalijam (koncentraciji 0,2, 0,6 mg/ml), njihovi mešanici ter metanolnim izvlečkom japonskega in češkega dresnika (*F. japonica* in *F. ×bohemica*) (koncentraciji 1 %, 10 %). Prikazani so normalizirani podatki glede na kontrolo. Povprečje ± SN (N = 5). Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike med tretmaji ( $p < 0,05$ ) (enosmerna ANOVA, Dunnettov post hoc test). Okrajšave: resveratrol (Re), epikatehin (Ep), emodin (Em), mešanica (Mix), izvleček japonskega (FJ), izvleček češkega dresnika (FB).

Metanolni izvlečki obeh dresnikov so vplivali tudi na dolžino korenine kalic vrtno redkvice (Sl. 25 A). Korenine, ki so bile izpostavljene 1 % metanolnima izvlečkoma japonskega in češkega dresnika, so bile za 19,5 % oz. 18,4 % krajše v primerjavi s koreninami kontrolnih kalic ( $p < 0,001$ ). Še bolj zaviralen učinek sta imela izvlečka z 10 % koncentracijo: pri izvlečku japonskega dresnika so bile korenine krajše za 67,4 %, pri izvlečku češkega dresnika pa za 69,5 % (pri obeh  $p < 0,001$ ). Med vplivoma obeh dresnikov na dolžino korenine redkvice ni bilo statistično značilnih razlik. Izmed tretmajev z alelokemikalijami je bila samo pri 0,6 mg/ml epikatehinu za 37,6 % ( $p = 0,010$ ) in pri mešanici alelokemikalij za 24,2 % ( $p = 0,045$ ) dolžina korenine kalic krajša glede na kontrolo.

Metanolni izvlečki in posamezne dresnikove alelokemikalije niso vplivali na dolžino poganjka (Sl. 25 B), le mešanica alelokemikalij je zavrnila dolžino poganjka za 18,2 % v primerjavi s kontrolo ( $p = 0,032$ ).

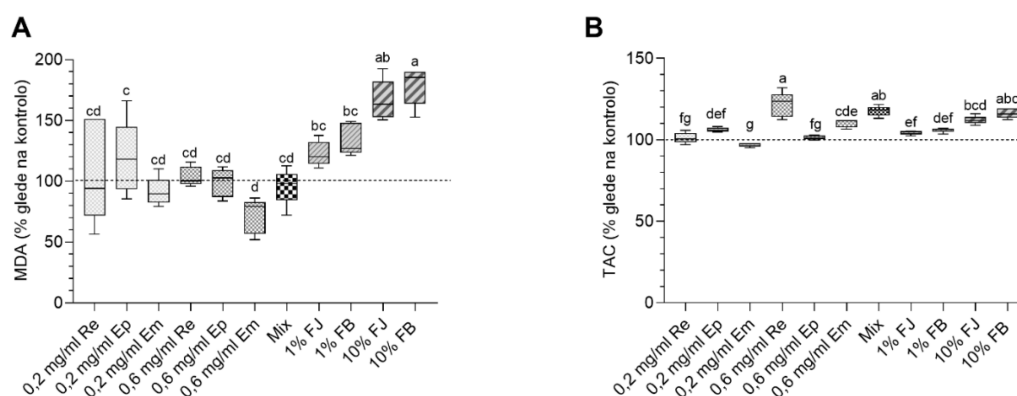


**Slika 25:** Dolžina korenine (A) in poganjka (B) pri kalicah vrtno redkvice po 3-dnevni izpostavitvi dresnikovim alelokemikalijam (0,2, 0,6 mg/ml), njihovi mešanici ter metanolnim izvlečkom japonskega in češkega dresnika (*F. japonica* in *F. ×bohemica*) (1 %, 10 %). Prikazani so normalizirani podatki glede na kontrolo. Povprečje  $\pm$  SN ( $N = 5$ ). Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike med tretmaji ( $p < 0,05$ ) (enosmerna ANOVA, Dunnettov post hoc test). Okrajšave: resveratrol (Re), epikatehin (Ep), emodin (Em), mešanica (Mix), izvleček japonskega dresnika (FJ), izvleček češkega dresnika (FB).

#### 4.3.2 Biokemijski parametri oksidativnega stresa v koreninah redkvice

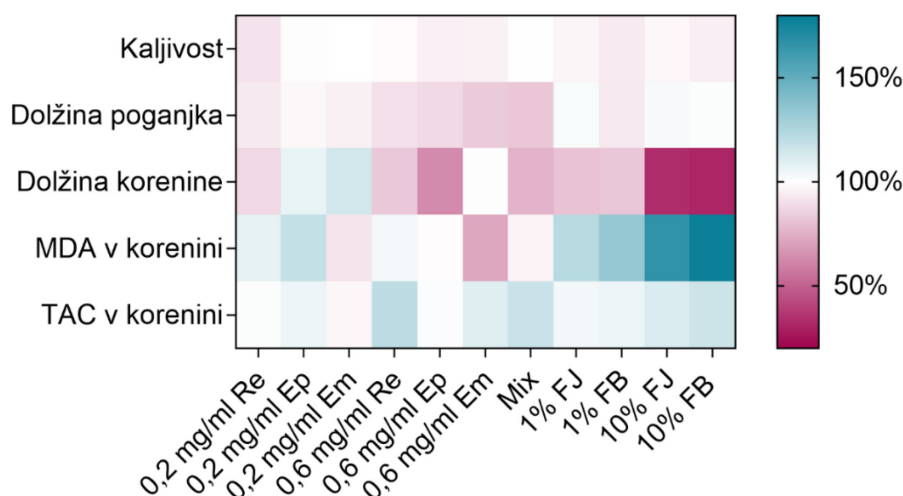
Vsebnost MDA je bila v koreninah kalic redkvice, ki so bile izpostavljene metanolnim izvlečkom dresnikov, povišana pri obeh koncentracijah (Sl. 26 A). Pri 1 % izvlečku japonskega dresnika je bila povišana za 23 % ( $p = 0,059$ ) in pri izvlečku češkega za 34 % ( $p = 0,004$ ). Pri 10 % koncentraciji pa je bila pri tretmaju z izvlečkom japonskega dresnika vsebnost MDA povišana za 66 % in pri tretmaju z izvlečkom češkega dresnika za 79 % (pri obeh  $p < 0,001$ ). Posamezne dresnikove alelokemikalije niso vplivale na vsebnost MDA v koreninah, le pri tretmaju z 0,6 mg/ml emodina je vsebnost MDA upadla za 28 % ( $p = 0,055$ ).

Vsebnost TAC (Sl. 26 B) je bila povišana za 12 % oz. 16 % v koreninah redkvic, ki so bile izpostavljene 10 % izvlečku japonskega oz. češkega dresnika (pri obeh  $p < 0,001$ ). Tretma z 1 % izvlečkom češkega dresnika je povišal TAC za 6 % ( $p = 0,001$ ), medtem ko 1 % izvleček japonskega dresnika na TAC ni vplival. Največje povišanje TAC smo opazili pri tretmaju z 0,6 mg/ml resveratrolom, kjer je bil TAC višji za 22 % v primerjavi s kontrolo ( $p < 0,0001$ ). Tretma z 0,6 mg/ml emodinom je povišal TAC za 10 % ( $p = 0,005$ ), mešanica alelokemikalij pa za 18 % ( $p < 0,0001$ ).



**Slika 26:** Vsebnost malondialdehida (MDA) (A) in vsebnost neencimskih antioksidantov (TAC) (B) v koreninah 3 dni starih kalic vrtno redkvice po izpostavitvi dresnikovim alelokemikalijam (0,2, 0,6 mg/ml), njihovi mešanici ter metanolnim izvlečkom japonskega in češkega dresnika (*F. japonica* in *F. ×bohemica*) (1 %, 10 %). Prikazani so normalizirani podatki glede na kontrolo. Povprečje ± SN (N = 150). Različne črke predstavljajo statistično značilne razlike med tretmaji ( $p < 0,05$ ) (enosmerna ANOVA, Dunnettov post hoc test). Okrajšave: resveratrol (Re), epikatehin (Ep), emodin (Em), mešanica (Mix), izvleček japonskega dresnika (FJ), izvleček češkega dresnika (FB).

Povišana vsebnost MDA sovpadajo z močno zavrto rastjo korenin kalic redkvice, kar se še posebej vidi pri tretmajih z dresnikovimi izvlečki (Sl. 27), medtem ko je bilo delovanje alelokemikalij bolj nespecifično.



**Slika 27:** Heat map sprememb različnih parametrov pri kalicah redkvice po 3-dnevni izpostavitvi dresnikovim alelokemikalijam (0,2, 0,6 mg/ml), njihovi mešanici ter metanolnim izvlečkom japonskega in češkega dresnika (*F. japonica* in *F. ×bohemica*) (1 %, 10 %). Barvna lestvica: rdeča – znižane vrednosti glede na kontrolo, zelena – povišane vrednosti glede na kontrolo. Okrajšave: malondialdehid (MDA), vsebnost neencimskih antioksidantov (TAC), resveratrol (Re), epikatehin (Ep), emodin (Em), mešanica (Mix), izvleček japonskega dresnika (FJ), izvleček češkega dresnika (FB).

### 4.3.3 Lokalizacija vodikovega peroksida v tkivih kalic

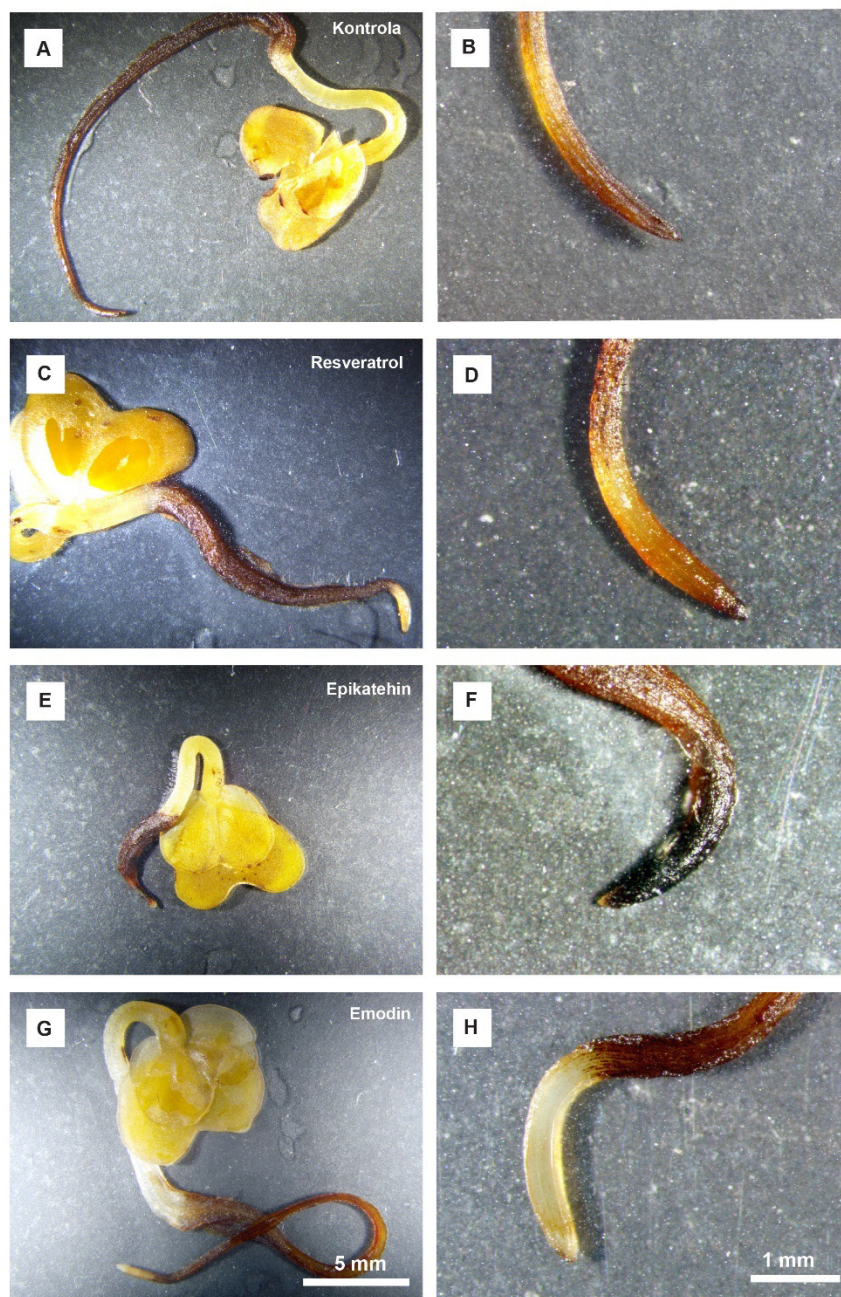
V kalicah redkvice smo po 3 dneh z DAB določili prisotnost in razporeditev vodikovega peroksida ( $H_2O_2$ ). Rastlinska tkiva, v katerih je bil prisoten  $H_2O_2$ , so se po barvanju z DAB obarvala temno rjavo. Za lokalizacijo  $H_2O_2$  smo preizkusili sledeče tretmaje: 10 % metanolna izvlečka japonskega in češkega dresnika, 0,2 mg/ml resveratrola, 0,6 mg/ml epikatehina in 0,2 mg/ml emodina.

Pri kalicah redkvice so se najbolj temno rjavo obarvale korenine, medtem ko je bila obarvanost ostalih rastlinskih organov (hipokotil, klični listi) zelo blede (Sl. 28, Sl. 29). Korenine kontrolnih rastlin (Sl. 28 A) so bile obarvane svetlo rjavo, kar nakazuje, da vsebujejo manj  $H_2O_2$ . Korenine kalic, ki so bile tretirane z izvlečkom japonskega (Sl. 28 C) in češkega dresnika (Sl. 28 E), so bile obarvane svetlo rjavo, koreninski vršički so bili obarvani temno rjavo (Sl. 28 F). Razlik v obarvanosti med tretmajema ni bilo.



**Slika 28:** Kalice vrtno redkvice (A, C, E) in njihove korenine (B, D, F), obarvane z DAB, po 3-dnevni izpostavitvi kontrolnemu tretmaju (A, B) in tretmajema z 10 % metanolnima izvlečkoma japonskega (*F. japonica*) (C, D) in češkega dresnika (*F. ×bohemica*) (E, F).

Še bolj izrazito obarvanost korenin z DAB smo opazili po izpostavitvi posameznim dresnikovim alelokemikalijam, še posebej pri resveratrolu (Sl. 29 C) in epikatehinu (Sl. 29 E), kjer so bile korenine obarvane temno rjavo, koreninski vršički pa so bili skoraj črni (Sl. 29 F). Korenine pri tretmaju z emodinom so bile obarvane le rahlo svetlo rjavo (Sl. 29 H).

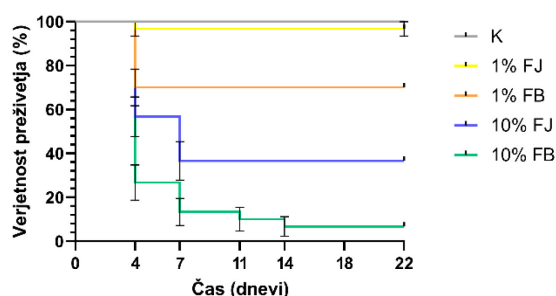


**Slika 29:** Kalice vrtno redkvice (A, C, E, G) in njihove korenine (B, D, F, H), obarvane z DAB, po 3-dnevni izpostavitvi kontrolnemu tretmaju (A, B) in tretmajem z 0,2 mg/ml resveratrola (C, D), 0,6 mg/ml epikatehina (E, F) in 0,2 mg/ml emodina (G, H).

## 4.4 DOLGOTRAJNEJŠI RASTNI POSKUS

### 4.4.1 Preživetje rastlin

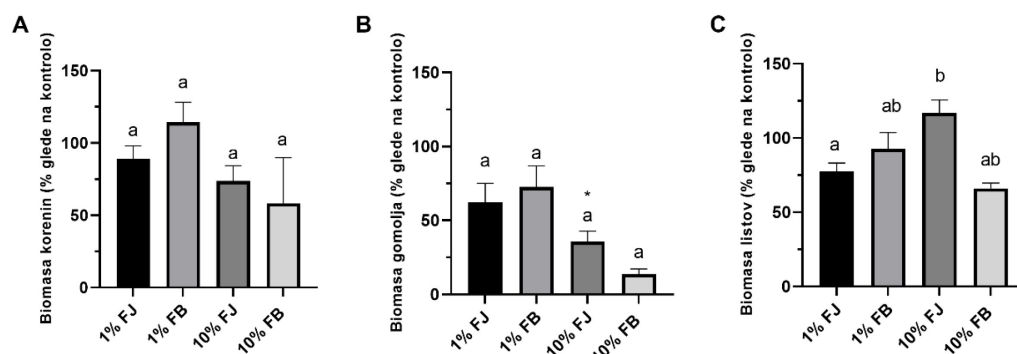
Pri dolgotrajnejšem ravnem poskusu smo 3 dni stare kalice vrtno redkvice zalili z vodnimi izvlečki japonskega in češkega dresnika v koncentraciji 1 % in 10 %. V nadaljevanju smo jih zalivali samo z destilirano vodo ter jih pustili rasti 22 dni. Največji upad preživetja rastlin smo opazili v prvem tednu od izpostavitve (Sl. 30). Pri tretmaju z 10 % izvlečkom japonskega dresnika je po 4 dneh propadlo 43 % kalic, po 7 dneh pa skupno 63 %. Podobno smo opazili pri tretmaju z 10 % izvlečkom češkega dresnika, le da je bil negativen učinek še bolj izrazit: po 4 dneh je propadlo 73 % vseh kalic, po 7 dneh 87 %, po 11 dneh 90 % in po 22 dneh skupno 93 % vseh rastlin. Nekoliko milejši učinek je imela 1 % koncentracija: pri izvlečku češkega dresnika ni preživelo 28 % vseh rastlin, izvleček japonskega dresnika pa ni vplival na preživetje.



**Slika 30:** Krivulja preživetja vrtnih redkvic, ki so bile ob kalitvi izpostavljene 1 % in 10 % izvlečku japonskega (*F. japonica* – FJ) in češkega dresnika (*F. ×bohemica* – FB) in nato zalivane z destilirano vodo. Kontrolne rastline (K) smo zalivali le z destilirano vodo.

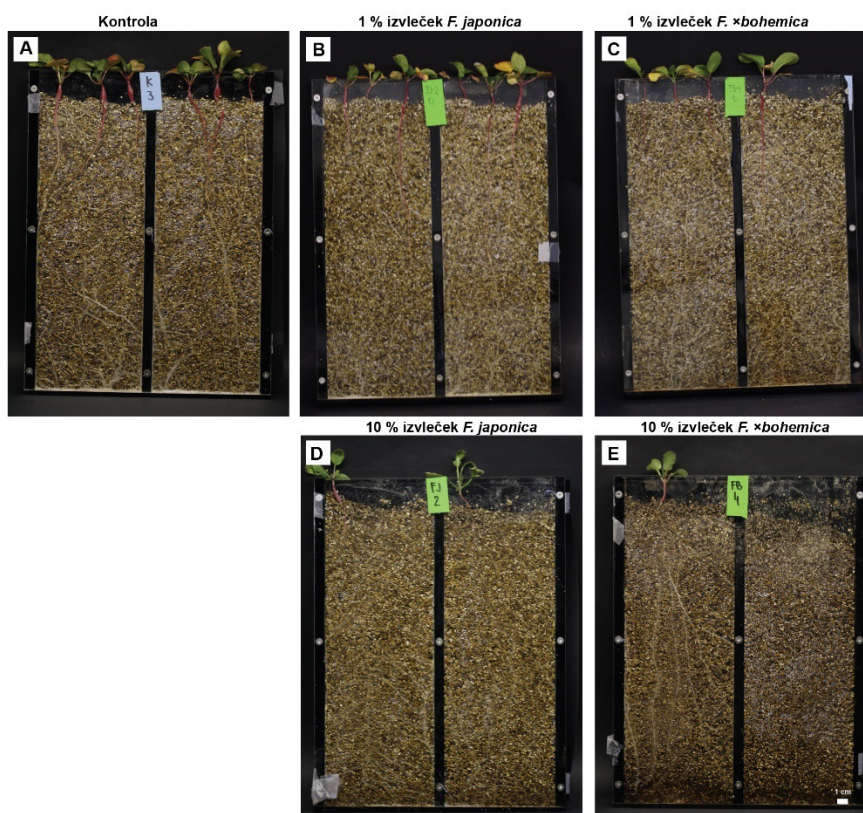
### 4.4.2 Biomasa rastlin

Biomasa korenine in gomoljasto odebeljenega hipokotila je bila pri vrtnih redkvicah, ki smo jih na začetku tretirali z izvlečki dresnikov, večinoma nižja v primerjavi s kontrolno skupino, medtem ko je bila biomasa listov primerljiva kontrolni (Sl. 31). Biomasa korenin je bila od 26 % do 42 % nižja pri 10 % izvlečku japonskega dresnika in 10 % izvlečku češkega dresnika. Pri tretmaju z 10 % izvlečkom češkega dresnika je bila masa hipokotila za 86 % nižja v primerjavi s kontrolnimi, vendar zaradi nizkega numerusa, saj večina rastlin ni preživela do konca poskusa, nekatere sicer precejšnje razlike niso bile statistično značilne. Edina statistično značilna razlika je bila pri tretmaju z 10 % izvlečkom japonskega dresnika (Sl. 31), kjer je bila biomasa hipokotila za 60 % nižja v primerjavi s kontrolo ( $p = 0,016$ ).



**Slika 31:** Sveža biomasa korenin (A), hipokotila (B) in listov (C) vrtno redkvice po 22 dneh izpostavitve vodnim izvlečkom korenin japonskega (*F. japonica* – FJ) in češkega dresnika (*F. xbohemica* – FB) z 1 % in 10 % koncentracijo. Prikazani so normalizirani podatki glede na kontrolo. Povprečje ± SN (N = 30). Različne črke predstavljajo statistično značilno razliko med tretmaji (enosmerna ANOVA, Tuckeyev post hoc test,  $p < 0,05$ ). Zvezdica (\*) označuje statistično značilno razliko med tretmaji in kontrolo.

Rastline, ki smo jih na začetku zalili z izvlečki dresnikov, so razvile ožje gomolje, poleg tega so bili njihovi listi bolj rumeni v primerjavi s kontrolnimi rastlinami, pri katerih so bili listi bolj zeleni (Sl. 32).



**Slika 32:** Vrtne redkvice po 22 dneh od izpostavitve destilirani vodi (A), 1 % izvlečku japonskega dresnika (*F. japonica*) (B), 1 % izvlečku češkega dresnika (*F. xbohemica*) (C), 10 % izvlečku japonskega dresnika (*F. japonica*) (D) in 10 % izvlečku češkega dresnika (*F. xbohemica*) (E).

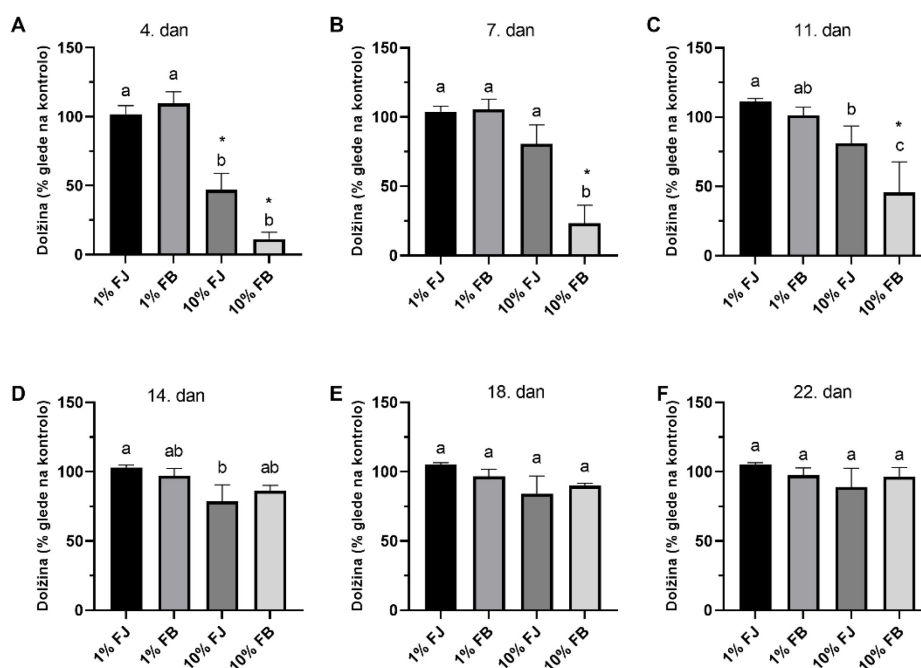


#### 4.4.3 Dolžina glavne korenine

Dresnikovi izvlečki z 10 % koncentracijo so imeli predvsem v prvi polovici poskusa močan zaviralni vpliv na rast glavne korenine, medtem ko je bila dolžina glavne korenine pri 1 % koncentraciji v času trajanja poskusa ves čas na ravni kontrolnih rastlin (Sl. 33).

Zaviralni vpliv na rast korenine se je kazal bolj pri 10 % izvlečku češkega dresnika kot pri izvlečku japonskega. Korenine rastlin, ki smo jih tretirali z 10 % izvlečkom češkega dresnika so bile po 4 dneh za 89 % krajše v primerjavi s kontrolnimi ( $p < 0,001$ ), po 7 dneh za 77 % ( $p = 0,001$ ) in po 11 dneh za 54 % ( $p = 0,001$ ) (Sl. 33 A–C). Pri tretmaju z 10 % izvlečkom japonskega dresnika je bila glavna korenina po 4 dneh za 53 % krajša v primerjavi s kontrolo ( $p < 0,001$ ) (Sl. 33 A).

Po 14 dneh rasti in 4-kratnem zalivanju vseh tretmajev z destilirano vodo je bila dolžina glavne korenine pri vseh tretmajih znotraj kontrolnega območja, kar se je potem ohranilo do konca poskusa (Sl. 33 D–F).



**Slika 33:** Dolžina glavne korenine vrtno redkvice po 4 dneh (A), 7 dneh (B), 11 dneh (C), 14 dneh (D), 18 dneh (E) in 22 dneh (F) po tretmaju z 1 % in 10 % izvlečkoma japonskega (*F. japonica* – FJ) in češkega dresnika (*F. ×bohemica* – FB). Prikazani so normalizirani podatki glede na kontrolo. Povprečje ± SN (N = 2–30, odvisno od preživetja rastlin). Različne črke predstavljajo statistično značilno razliko med tretmaji (enosmerna ANOVA, Tuckeyev post hoc test,  $p < 0,05$ ). Zvezdica (\*) označuje statistično značilno razliko med tretmaji in kontrolo.

#### 4.4.4 Prisotnost in število stranskih korenin

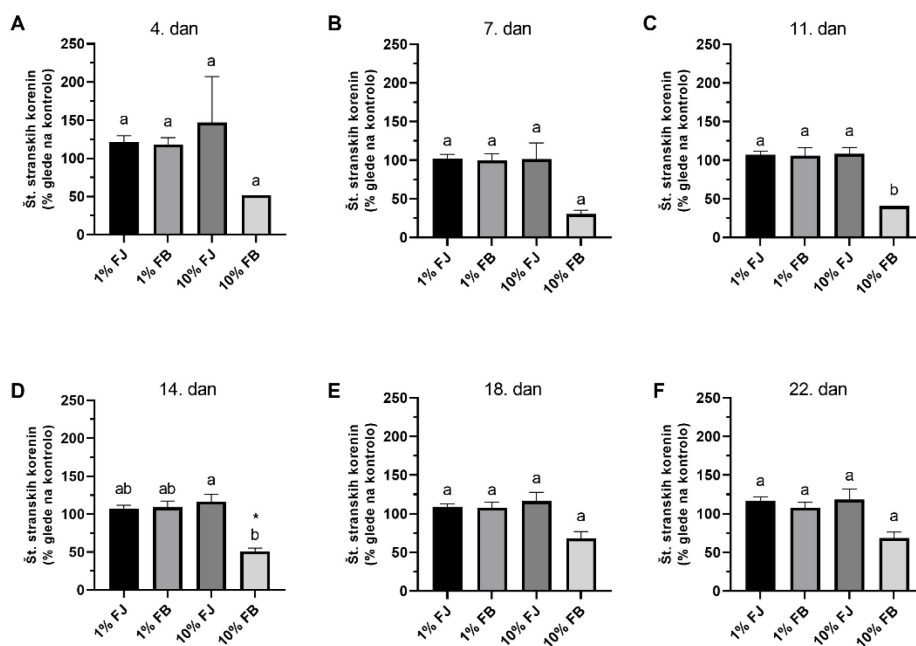
Izвлеčki korenin dresnikov so vplivali tako na nastanek kot na število stranskih korenin pri vrtnih redkvicah. Pri rastlinah, ki so bile tretirane z 1 % izvlečkom japonskega dresnika, so stranske korenine začele izraščati hitreje v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. Pri tretmaju z 10 % izvlečkom japonskega dresnika je bil nastanek zakasnjeno za 3 dni, pri 10 % izvlečku češkega dresnika pa za 10 dni (Preglednica 11) glede na kontrolne rastline.

Najbolj zaviralen učinek na nastanek stranskih korenin je imel 10 % izvleček češkega dresnika, kjer je po 4 dneh od izpostavitve izvlečku le 12,5 % vseh rastlin razvilo stranske korenine. Tudi pri tretmaju z 10 % izvlečkom japonskega dresnika je bil delež rastlin s stranskimi koreninami nizek, le 24 %. Po 7 dneh pa je delež rastlin s stranskimi koreninami začel naraščati.

Preglednica 11: Delež redkvic z razvitimi stranskimi koreninami prvega reda med 22-dnevno izpostavitvijo vodnim izvlečkom korenin japonskega in češkega dresnika (*F. japonica* in *F. ×bohemica*).

Št. dni od začetka tretmaja	Delež rastlin z razvitimi stranskimi koreninami [%]				
	Kontrola	1 % izvleček <i>F. japonica</i>	1 % izvleček <i>F. ×bohemica</i>	10 % izvleček <i>F. japonica</i>	10 % izvleček <i>F. ×bohemica</i>
4. dan	77	93	95	24 %	12,5 %
7. dan	93	100	100	82 %	50 %
11. dan	97	100	100 %	82 %	67 %
14. dan	97	100	100 %	82 %	100 %
18. dan	97	100	100 %	82 %	100 %
22. dan	100	100	100 %	82 %	100 %

Na število stranskih korenin sta vplivala dva dejavnika: čas rasti in tretma (Sl. 34). Rastline, ki so bile izpostavljene 1 % in 10 % izvlečku japonskega dresnika, so imele v času trajanja celotnega poskusa podobno število stranskih korenin kot kontrolne rastline. Po drugi strani pa je tretma z 10 % izvlečkom češkega dresnika povzročil, da so imele rastline za 49 % manj stranskih korenin v primerjavi z drugimi tretmaji skozi celoten čas trajanja poskusa ( $p = 0,051$  v primerjavi s kontrolo).



**Slika 34:** Število stranskih korenin prvega reda med 22-dnevno rastjo po izpostavitvi 1 % in 10 % izvlečkom dresnikov. Prikazani so normalizirani podatki glede na kontrolo. Povprečje  $\pm$  SN (N = 2–30, odvisno od preživetja rastlin). Različne črke predstavljajo statistično značilno razliko med tretmaji (enosmerna ANOVA, Tuckeyev post hoc test,  $p < 0,05$ ). Zvezdica (\*) označuje statistično značilno razliko med tretmaji in kontrolo.

#### 4.4.5 Histološke značilnosti koreninskega vršička

Dresnikovi izvlečki so vplivali tudi na histološke značilnosti koreninskih vršičkov vrtno redkvice, osredotočili smo se predvsem na najbolj izpostavljena dela: koreninsko čepico in apikalni meristem korenine (Sl. 35).

V koreninah kontrolnih rastlin (Sl. 35 A, B) in rastlinah, tretiranih z 1 % izvlečkoma (Sl. 35 C–F), so bile po 22 dneh poskusa koreninske celice razporejene v pravilne sloje, z jasno ločeno mejo med koreninsko čepico in apikalnim meristemom korenine. Pri rastlinah, ki so bile izpostavljene 10 % izvlečkoma (Sl. 35 G–J), pa je bila meja med mlajšimi celicami koreninske čepice in apikalnim meristemom korenine pogosto zabrisana in težko določljiva. Tkiva smo zato identificirali na podlagi lege v koreninskem vršičku glede na kontrolne rastline.

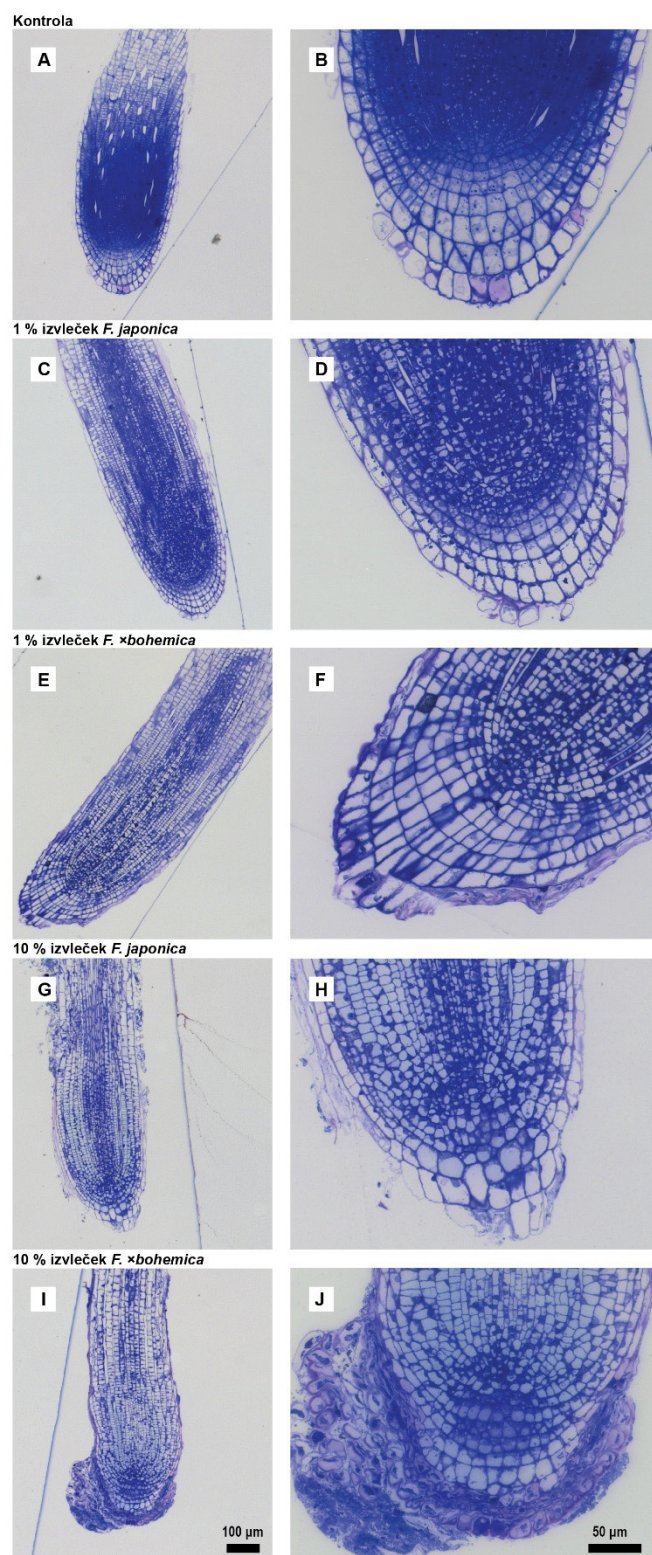
##### *Koreninska čepica*

Koreninska čepica je bila pri kontrolnih rastlinah (Sl. 35 A) sestavljena iz 6 slojev celic, z jasno ločeno mejo med koreninsko čepico in apikalnim meristemom korenine. Celice koreninske čepice so bile visokoprizmatske oblike. Najbolj zunanje celice koreninske

čepice so se luščile, notranje celice pa so vsebovale veliko osrednjo vakuolo, jedro in citoplazmo.

Izvlački dresnikov so vplivali na strukturo koreninske čepice pri redkvici. Razlika je bila predvsem v številu celičnih slojev in poškodbah celic.

Pri tretmaju z 1 % izvlečkom japonskega dresnika so koreninsko čepico sestavljali samo 4 celični sloji (Sl. 35 C, D). Pri tretmaju z 1 % izvlečkom češkega dresnika je bilo precej več propadlih celic kot pri kontrolnih rastlinah, pri nekaterih so ostale samo celične stene, oblika celic je bila povsem deformirana (Sl. 35 E, F). Pri tretmaju z 10 % izvlečkom japonskega dresnika (Sl. 35 G, H) so koreninsko čepico sestavljali 3 celični sloji, celice pa so bile v primerjavi s kontrolnimi rastlinami povsem deformirane. Koreninska čepica pri rastlinah, ki so bile tretirane z 10 % izvlečkom češkega dresnika, je bila sestavljena iz 6 slojev, a so bili zunanji trije sloji večinoma propadli in povsem deformirani (Sl. 35 I, J).



**Slika 35:** Vzdolžni prerezi koreninskega vršička (levo) in koreninske čepice (desno) pri vrtni redkviči po 22 dneh od izpostavitve tretmajem: kontrola (A, B), 1 % izvleček japonskega dresnika (*F. japonica*) (C, D), 1 % izvleček češkega dresnika (*F. bohemica*) (E, F), 10 % izvleček japonskega dresnika (*F. japonica*) (G, H) in 10 % izvleček češkega dresnika (*F. bohemica*) (I, J). Merilo: 100  $\mu\text{m}$  (levo), 50  $\mu\text{m}$  (desno).

Izvečki so imeli nespecifičen vpliv na velikost celic koreninske čepice v prvih treh zunanjih slojih (Preglednica 12), a so pri tem izvzete korenine že prej propadlih rastlin pri obeh tretmajih z 10 % izvlečkoma. V nadaljevanju so zato opisane samo spremembe preživelih rastlin. Pri tretmaju z 10 % izvlečkom češkega dresnika in 1 % izvlečkom japonskega dresnika so bile celice manjše, medtem ko so bile celice pri 1 % izvlečku češkega dresnika in 10 % izvlečku japonskega dresnika večinoma večje.

Pri 10 % izvlečku češkega dresnika so bile celice koreninske čepice v prvem sloju za 32 % krajše ( $p = 0,016$ ) in za 28 % ožje v primerjavi s kontrolo ( $p = 0,035$ ). V drugem sloju so bile celice za 38 % krajše ( $p < 0,001$ ), v tretjem sloju pa za 35 % krajše v primerjavi s kontrolo ( $p = 0,002$ ). Pri tretmaju z 1 % izvlečkom japonskega dresnika je bila celična širina v drugem in tretjem sloju za 31 % ožja ( $p = 0,018$  in  $p = 0,008$ ), dolžina celic pa je bila v tretjem sloju za 24 % krajša v primerjavi s kontrolo ( $p = 0,038$ ).

Obraten učinek na celično velikost smo opazili pri 1 % izvlečku češkega dresnika, kjer so bile celice koreninske čepice v prvem sloju za 42 % daljše ( $p < 0,001$ ), in pri 10 % izvlečku japonskega dresnika, kjer so bile celice v prvem sloju daljše za 33 % v primerjavi s kontrolo ( $p = 0,012$ ).

Preglednica 12: Velikost celic v zunanjih slojih koreninske čepice pri vrtni redkvi po 22 dneh od izpostavitve vodnim izvlečkom korenin japonskega (*F. japonica* – FJ) in češkega dresnika (*F. ×bohemica* – FB) v 1 % in 10 % koncentraciji. Povprečje ± SN (N = 20). Različne črke prikazujejo statistično značilne razlike znotraj posameznih stolpcev ( $p < 0,05$ ).

Tretma	Velikost celic koreninske čepice (µm)					
	1. sloj		2. sloj		3. sloj	
	Dolžina	Širina	Dolžina	Širina	Dolžina	Širina
Kontrola	22,2 ± 1,0 <sup>a</sup>	17,4 ± 1,1 <sup>ab</sup>	22,2 ± 1,7 <sup>ab</sup>	15,7 ± 1,2 <sup>a</sup>	22,0 ± 1,4 <sup>a</sup>	14,4 ± 0,9 <sup>a</sup>
1 % FJ	20,4 ± 1,0 <sup>ac</sup>	12,7 ± 0,7 <sup>ad</sup>	18,7 ± 0,7 <sup>a</sup>	10,8 ± 0,6 <sup>b</sup>	15,3 ± 0,4 <sup>bc</sup>	10,9 ± 0,6 <sup>b</sup>
1 % FB	31,6 ± 1,5 <sup>b</sup>	12,8 ± 0,7 <sup>ad</sup>	26,7 ± 1,1 <sup>b</sup>	13,7 ± 1,0 <sup>ab</sup>	22,3 ± 0,9 <sup>a</sup>	11,5 ± 0,6 <sup>ab</sup>
10 % FJ	29,7 ± 1,8 <sup>c</sup>	16,9 ± 1,6 <sup>b</sup>	25,3 ± 1,6 <sup>b</sup>	15,4 ± 1,1 <sup>a</sup>	19,2 ± 1,9 <sup>ab</sup>	13,7 ± 0,7 <sup>a</sup>
10 % FB	15,2 ± 0,7 <sup>d</sup>	12,5 ± 0,9 <sup>cd</sup>	13,8 ± 0,6 <sup>c</sup>	12,2 ± 0,9 <sup>ab</sup>	14,4 ± 0,7 <sup>c</sup>	11,5 ± 0,9 <sup>ab</sup>

### Apikalni meristem korenine

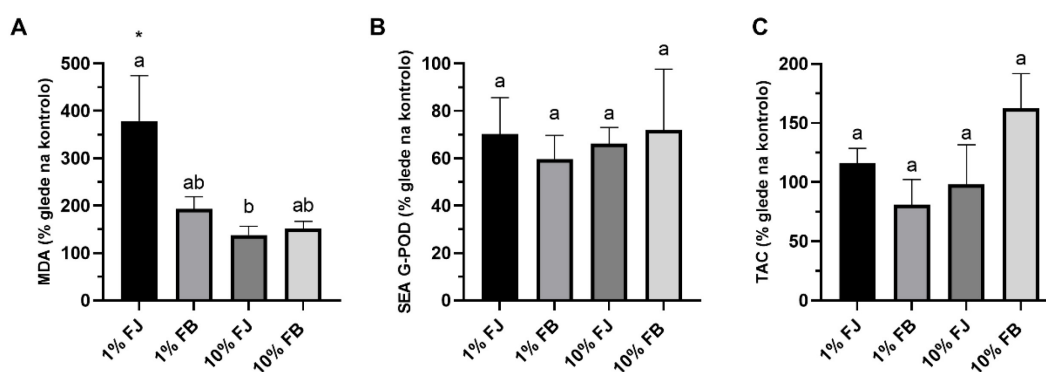
Apikalni meristem korenine smo pri kontrolnih rastlinah (Sl. 35 A, B) prepoznali po temno obarvanih celicah na sredini koreninskega vršička. Celice so bile majhne in po obliki kvadratne v prerezu. V citoplazmi so imele veliko jedro z jedrcem in nekaj manjših vakuol.

Pri tretiranih rastlinah pa je področje apikalnega meristema izgledalo kot že diferencirano tkivo, saj so celice imele veliko vakuolo in precej manjših vakuol. Najbolj spremenjene celice na poziciji meristema so bile vidne pri tretmaju z 10 % izvlečkom japonskega dresnika (Sl. 35 H) in 10 % izvlečkom češkega dresnika (Sl. 35 J).

#### 4.4.6 Biokemijski parametri oksidativnega stresa v koreninah

Lipidno peroksidacijo smo merili posredno preko vsebnosti MDA (Sl. 36 A) v koreninah po 22 dneh od izpostavitve izvlečkom. Pri 1 % izvlečku japonskega dresnika je bila MDA povišana za 378 % v primerjavi s kontrolo ( $p = 0,015$ ). Čeprav so bile tudi pri ostalih tretmajih vrednosti vsaj za polovico višje od kontrole, razlike niso bile statistično značilno različne. To je lahko posledica manjšega numerusa zaradi propadanja rastlin med poskusom.

Aktivnost antioksidativnega encima gvajakol peroksidaze (Sl. 36 B) in vsebnost neencimskih antioksidantov (Sl. 36 C) sta bila pri vseh tretmajih v območju kontrolne vrednosti.



**Slika 36:** Lipidna peroksidacija, merjena kot vsebnost MDA (A), specifična encimska aktivnost gvajakol peroksidaze (SEA G-POD) (B) in vsebnost neencimskih antioksidantov (TAC) (C) v koreninah vrtno redkvice po 22 dneh od izpostavitve 1 % in 10 % vodnim izvlečkom japonskega (*F. japonica* – FJ) in češkega dresnika (*F. ×bohemica* – FB). Prikazani so normalizirani podatki glede na kontrolo. Povprečje ± SN (N = 5). Različne črke predstavljajo statistično značilno razliko med tretmaji (enosmerna ANOVA, Tuckeyev post hoc test,  $p < 0,05$ ). Zvezdica (\*) označuje statistično značilno razliko med tretmaji in kontrolo.

#### 4.4.7 Elementna sestava korenin in redkvice

Biomasa rastlin je bila pri tretmajih z 10 % izvlečkom japonskega in češkega dresnika prenizka za analizo EDXRF, zato smo za analizo elementne sestave korenin in hipokotila uporabili samo kontrolne rastline in rastline, ki smo jih izpostavili 1 % izvlečkom (Preglednica 13).

Koncentracija elementov je bila v tretiranih rastlinah večinoma podobna kot pri kontrolnih rastlinah. Statistično značilne razlike so bile pri koncentraciji Cl v koreninah in hipokotilu, kjer so bile vrednosti od 109 % do 170 % višje v primerjavi s kontrolo ( $p = 0,001$  in  $p < 0,001$ ). Tretirane rastline so imele v svojih koreninah tudi do 79 % manj Ti ( $p = 0,002$ ) in do 16 % manj Fe ( $p = 0,011$ ) v primerjavi s kontrolo.

Preglednica 13: Koncentracija elementov v koreninah in hipokotila pri vrtni redkvice po 22 dneh od izpostavitve 1 % vodnim izvlečkom japonskega (*F. japonica* – FJ) in češkega dresnika (*F. ×bohemica* – FB). Prikazano je povprečje ± SN (N = 3). Različne črke predstavljajo statistično značilno razliko med posameznimi elementi in znotraj posameznega rastlinskega organa (enosmerna ANOVA, Tuckeyev post hoc test,  $p < 0,05$ ).

Konc. elementov (ppm)	<i>Korenina</i>			<i>Hipokotil</i>		
	Kontrola	1 % FJ	1 % FB	Kontrola	1 % FJ	1 % FB
P	997±256 <sup>a</sup>	1087±111 <sup>a</sup>	1010±69 <sup>a</sup>	1161±207 <sup>a</sup>	1315±9 <sup>a</sup>	1745±3 <sup>a</sup>
S	1900±508 <sup>a</sup>	1925±3 <sup>a</sup>	2010±6 <sup>a</sup>	1895±136 <sup>a</sup>	2220±283 <sup>a</sup>	2115±78 <sup>a</sup>
Cl	<b>645±75<sup>c</sup></b>	<b>1345±130<sup>b</sup></b>	<b>1740±69<sup>a</sup></b>	<b>678±60<sup>c</sup></b>	819±14 <sup>c</sup>	<b>1255±14<sup>b</sup></b>
K	27250±5110 <sup>a</sup>	29650±260 <sup>a</sup>	29200±1443 <sup>a</sup>	28250±1646 <sup>a</sup>	28950±1068 <sup>a</sup>	29500±577 <sup>a</sup>
Ca	4325±765 <sup>a</sup>	4445±43 <sup>a</sup>	4300±179 <sup>a</sup>	2110±29 <sup>a</sup>	1675±66 <sup>a</sup>	1790±191 <sup>a</sup>
Ti	<b>585±140<sup>a</sup></b>	<b>126±4<sup>b</sup></b>	<b>286±59<sup>b</sup></b>	33±7 <sup>a</sup>	21±1 <sup>a</sup>	24±0,2 <sup>a</sup>
Mn	201±24 <sup>a</sup>	154±0,3 <sup>a</sup>	185±11 <sup>a</sup>	62±2 <sup>a</sup>	55±4 <sup>a</sup>	68±4 <sup>a</sup>
Fe	<b>6205±1071<sup>a</sup></b>	<b>2140±335<sup>b</sup></b>	3810±462 <sup>ab</sup>	721±242 <sup>a</sup>	177±12 <sup>a</sup>	238±19 <sup>a</sup>
Cu	111±3 <sup>a</sup>	94±3 <sup>b</sup>	119±5 <sup>a</sup>	11±0,4 <sup>a</sup>	9±0,7 <sup>a</sup>	17±1,7 <sup>a</sup>
Zn	224±45 <sup>a</sup>	133±6 <sup>a</sup>	151±13 <sup>a</sup>	9±0,4 <sup>a</sup>	8±0,6 <sup>a</sup>	12±2 <sup>a</sup>
Rb	155±0,3 <sup>a</sup>	127±9 <sup>a</sup>	145±16 <sup>a</sup>	91±9 <sup>a</sup>	71±2 <sup>a</sup>	71±10 <sup>a</sup>



## 5 RAZPRAVA

### 5.1 ANALIZA IZVLEČKOV KORENIK DRESNIKOV

Invazivne tujerodne rastline so v novem okolju velikokrat uspešnejše pri tekmovanju za naravne vire v primerjavi z domorodnimi rastlinskimi vrstami, posledično se lahko v kratkem času zelo hitro razširijo (Inderjit in sod., 2011). Ena izmed hipotez o uspešnosti invazivnih rastlin je »hipoteza novega orožja«, ki predvideva, da imajo invazivne rastline drugačne sekundarne metabolite kot domorodne vrste ter posledično večji in bolj zaviralen vpliv na bližnje rastline kot v svoji domovini (Hiero in Callaway, 2003).

Invazivna dresnika, japonski in češki, vsebujeta številne sekundarne metabolite, ki so prisotni v vseh rastlinskih delih, od spomladanskih poganjkov (Vrchotova in sod., 2007) do stebela, listov (Chen in sod., 2013; Frantík in sod., 2013) in cvetov (Chen in sod., 2013), največ pa jih vsebujejo korenike (Chen in sod., 2013; Frantík in sod., 2013). Zato smo se odločili, da bomo za svoje raziskave alelopatije pripravili izvlečke iz korenik, ki imajo glede na naše predhodne raziskave (Dolenc Koce in Šoln, 2018) večji alelopatski potencial kot listi. S kromatografsko tehniko HPLC in spektroskopsko NMR smo analizirali vsebnost najpogostejših fenolov v izvlečkih korenik japonskega in češkega dresnika ter nato s TXRF primerjali še njuno elementno sestavo.

V okviru svoje raziskave smo s HPLC analizirali vodne in metanolne izvlečke korenik obeh dresnikov in v njih potrdili prisotnost štirih fenolov: (-)-epikatehina, katehina, resveratrola in emodina, vendar je bila njihova vsebnost različna. Korenike japonskega dresnika so vsebovale več resveratrola, medtem ko je bilo v korenikah češkega dresnika več epikatehina, katehina in emodina.

Resveratrol je eden izmed glavnih sekundarnih metabolitov pri japonskem in češkem dresniku (Frantík in sod., 2013). V študiji Chen in sod. (2013), kjer so za ekstrakcijo uporabili 50 % metanol, je bila razlika med dresnikoma v vsebnosti resveratrola tudi 10-kratna. Tudi primerjava vseh treh invazivnih dresnikov je pokazala, da japonski dresnik vsebuje več resveratrola kot češki in sahalinski dresnik (*F. sachalinensis*) (Frantík in sod., 2013). Fenolni profil v korenikah češkega dresnika je bližje japonskemu kot sahalinskemu dresniku, saj korenike sahalinskega dresnika ne vsebujejo resveratrola (Piola in sod., 2013).

Poleg resveratrola je v korenikah dresnikov prisoten tudi resveratrolov glikozid, resveratrolozid, ki je v primerjavi z resveratrolom bolj topen v vodi in posledično bolj dostopen drugim rastlinam. Dvoletne korenike japonskega in češkega dresnika vsebujejo do 0,7 kg resveratrola in kar 4 kg resveratrolozida. Slednji se lahko hitro pretvori v resveratrol, kar še poveča dresnikovo alelopatsko moč (Frantík in sod., 2013). V naši raziskavi resveratrolozida nismo merili.

Vsebnost emodina je bila višja v koreninah češkega dresnika, tako pri vodnih kot pri metanolnih izvlečkih. V primerjavi z našim rezultatom se v študiji Frantík in sod. (2013) korenike japonskega in češkega dresnika po 2-letni kultivaciji glede na vsebnost emodina niso razlikovale, po 3 letih pa je bila vsebnost emodina več kot dvakrat višja v koreninah japonskega dresnika. Poleg rastne sezone in starosti rastline (Chen in sod., 2013; Frantík in sod., 2013) lahko na vsebnost sekundarnih metabolitov v rastlinskih tkivih vpliva tudi geografsko območje nahajališča (Fan in sod., 2010; Chen in sod., 2013). Korenike japonskega dresnika iz Kitajske, kjer je dresnik domorodna vrsta, so vsebovale več emodina kot invazivna populacija japonskega dresnika v Kanadi, medtem ko je bila vsebnost resveratrola, polidatina in pisciona visoka, a podobna v obeh populacijah (Chen in sod., 2013). Podobno bi lahko veljalo tudi za vsebnost sekundarnih metabolitov v koreninah dresnikov, ki rastejo v Sloveniji. Zaradi drugačnih klimatskih in geografskih značilnosti se sestava njihovih sekundarnih metabolitov lahko razlikuje od dresnikov, ki rastejo drugje.

Tako korenike japonskega kot češkega dresnika so izmed preučevanih sekundarnih metabolitov vsebovale največ epikatehina in katehina. Obeh je bilo več v koreninah češkega dresnika. Ravno obratno pa je pri poganjkih, kot je pokazala študija Vrchotove in sod. (2007): poganjki japonskega dresnika vsebujejo več katehina kot poganjki češkega, medtem ko je vsebnost epikatehina pri obeh taksonih podobna. Sekundarni metaboliti se v različnih rastlinskih organih namreč shranjujejo različno (Weir in sod., 2004). Podobno kot v primeru emodina bi lahko tudi na različno vsebnost epikatehina in katehina vplivale drugačne rastne razmere sestoja japonskega oz. češkega dresnika ter sama razvojna stopnja rastline.

Na samo učinkovitost ekstrakcije močno vpliva vrsta topila. Naši rezultati so pokazali, da se pri ekstrakciji v 33 % metanolu sprosti od 3- do 10-krat več spojin kot pri ekstrakciji z destilirano vodo. Fenoli se namreč bolje raztapljajo v organskih topilih (Li in sod., 2010). Zaradi tega so v preteklih študijah dresnikovih sekundarnih metabolitov uporabili metanolne (Vrchotova in sod., 2007; Fan in sod., 2010; Chen in sod., 2013; Piola in sod., 2013), etanolne (Frantík in sod., 2013) in acetonske izvlečke (Glavnik in sod., 2017). V okviru te doktorske naloge smo kljub temu glavno poskusov o vplivu dresnikovih izvlečkov na kalitev in rast vrtna redkvice opravili z vodnimi izvlečki. Slednji so namreč bolj podobni razmeram v naravi, ko se alelokemikalije z dežjem iz listnega opada ali korenin sperejo v rizosfero (Weir in sod., 2004). Z analizo HPLC smo potrdili, da se tudi v vodnih izvlečkih nahajajo vsi štirje dresnikovi najpogostejši fenoli v dovolj visokih koncentracijah, da jih lahko s HPLC izmerimo.

Nadalje smo vsebnost resveratrola, epikatehina in emodina v koreninah japonskega in češkega dresnika analizirali tudi z NMR.

Do zdaj so dresnikove sekundarne metabolite identificirali večinoma z uporabo različnih kromatografskih tehnik (Fan in sod., 2009; Chen in sod., 2013; Frantík in sod., 2013; Šoln in sod., 2021a) ali masnega spektrofotometra (Fan in sod., 2009). Le Xiao in sod. (2002) so v svoji študiji z NMR identificirali nekatere nove spojine iz korenin japonskega dresnika iz Kitajske. S svojo raziskavo pa smo bili prvi, ki smo uporabili NMR za kvantifikacijo glavnih sekundarnih metabolitov v koreninah japonskega in češkega dresnika iz Evrope.

Tako kot s HPLC smo tudi z NMR potrdili, da korenike japonskega in češkega dresnika vsebujejo resveratrol, epikatehin in emodin. Tudi razmerja so bila podobna: korenike obeh dresnikov so vsebovale največ epikatehina, njegova masa je zavzemala približno polovico izmed analiziranih fenolov, resveratrola je bilo približno tretjino, najmanj pa je bilo emodina, približno petino.

Korenike obeh dresnikov se po količini epikatehina in emodina med seboj niso razlikovale, je bila pa masa resveratrola v koreninah češkega dresnika nekoliko višja kot v koreninah japonskega. To je ravno obratno, kot smo določili z metodo HPLC. Na to sta verjetno vplivala dva dejavnika: ekstrakcijsko topilo in čas vzorčenja. Za analizo z NMR so potrebni popolnoma topni vzorci, zato smo v preliminarnih poskusih zmlet material korenin raztopili samo v organskem topilu metanolu oz. etanolu. Ker med obema ekstrakcijama ni bilo razlik v detekciji fenolov, smo v nadaljevanju uporabili samo etanolno ekstrakcijo, ki je omogočala boljšo identifikacijo dresnikovih fenolov z NMR. Drugačno topilo je poleg same metode lahko vplivalo na različno maso resveratrola, izmerjeno z obema metodama. Poleg tega smo za analizo s HPLC uporabili korenike dresnikov, ki smo jih vzorčili jeseni 2018, medtem ko smo analizo z NMR opravili kasneje in uporabili korenike, nabrane poleti 2020. V svoji študiji Chen in sod. (2013) opisujejo, da imajo korenike japonskega dresnika več resveratrola jeseni kot poleti, kar bi lahko bil prav tako razlog za razlike med našimi vzorci pri vsebnosti resveratrola.

V vodnih izvlečkih korenin japonskega in češkega dresnika smo s TXRF analizirali tudi elementno sestavo. Ugotovili smo, da v koreninah obeh dresnikov prevladujejo K, Ca, Cl, Fe in S. V svoji študiji Mráz in Šoltés (2015) navajata, da je pri japonskem dresniku na Slovaškem v koreninah nižja koncentracija Cl in K ter hkrati večja koncentracija Ca. To smo potrdili tudi s svojo raziskavo, tako za korenike japonskega kot češkega dresnika. Pri dresnikih se glavna elementa kopiči v koreninah (Dassonville in sod., 2007; Berchová-Bimová in sod., 2014; Mráz in Šoltés, 2015; Böhmová in Šoltés, 2017), med samo rastno sezono pa se elementi razporejajo po rastlini. Pri japonskem dresniku se med rastno sezono dogaja 5 poti premikanja elementov: (1) S, K, Zn, Cr, Rb in Mn se v vseh rastnih obdobjih prenašajo navzdol v korenike; (2) Fe in Cu se navzdol prenašata do začetka cvetenja jeseni; (3) Ba, Pb, Cl se tudi prenašajo navzdol, jeseni, v času nastanka cvetov, pa se njihova koncentracija v zgornjih delih rastline močno poveča; (4) Ca in Sr se v vseh rastnih obdobjih prenašata po rastlini navzgor; (5) Mo in Sb se po rastlini

premikata neodvisno od rastne sezone (Böhmová in Šoltés, 2017). Glede na podobno ekologijo češkega dresnika (Bailey in sod., 2009) predvidevamo, da tudi pri njem transport elementov poteka podobno.

Naša raziskava je pokazala, da se korenike obeh dresnikov razlikujejo glede na vsebnost Cr, ki ga je bilo več v koreninah japonskega dresnika, medtem ko je bilo Cl, Ca, Fe in Mn več v koreninah češkega dresnika. Razlika med njima bi lahko bila posledica različne lokacije in s tem tudi različne sestave tal. Poleg tega je sestoj češkega dresnika rasel ob cesti, kjer je prisotnih več onesnažil. Elementna sestava dresnikovih korenin je namreč neposredno povezana z elementno sestavo tal: japonski dresnik je imel npr. na različnih lokacijah na Slovaškem različno elementno sestavo (Mráz in Šoltés, 2015). Dresniki lahko hitro absorbirajo elemente iz tal, tako da postane prst okoli njih elementno precej homogena in posledično manj primerna za rast drugih rastlin. Hkrati pa lahko dresniki ravno zaradi intenzivne bioakumulacije skupaj s koristnimi elementi v svojih rastlinskih organih kopičijo tudi težke kovine (Dassonville in sod., 2007). V raziskavi, kjer so preučevali japonski dresnik kot potencialni bioakumulator onesnažil, so ugotovili, da se pri njem največ Pb in Rb akumulira v cvetovih, v koreninah prevladuje Fe, v listih pa Ca (Mráz in Šoltés, 2015). V študiji Berchová-Bimová in sod. (2014), kjer so primerjali sposobnost bioakumulacije težkih kovin med japonskim in češkim dresnikom, pa so ugotovili, da oba dresnika enako dobro privzemata težke kovine, kar je verjetno posledica tega, da imata oba taksona podobno ekologijo, rastejo na podobnih rastiščih (Bailey in sod., 2009) in hkrati oba izkazujeta zelo visoko toleranco za okoljsko onesnaženje (Berchová-Bimová in sod., 2014).

V splošnem sta bila sestava izvlečkov korenin japonskega in češkega dresnika podobna, razlikovala pa sta se glede na vsebnost posameznih fenolov. Oba preučevana dresnika sicer v naravi kažeta podoben invazivni potencial, križanec češki dresnik celo še večjega (Bailey in sod., 2009). Oba pa tudi naseljujeta ekološko podobne habitate. Za svojo raziskavo smo oba dresnika nabrali v Ljubljani, a na različnih lokacijah. Sestoj japonskega dresnika se je nahajal v bližini reke, medtem ko je bil sestoj češkega dresnika zraven ceste. Različni mikrolokaciji sta lahko vplivali tudi na nekatere razlike v vsebnosti njunih sekundarnih metabolitov v koreninah, predvsem na vsebnost resveratrola. Znano je namreč, da lahko sicer taksonomsko sorodne vrste, ki rastejo v podobnih naravnih razmerah, v svojih organih sintetizirajo in kopičijo različne koncentracije sekundarnih metabolitov (Imatomi in sod., 2013).

Fitotoksičen učinek posamezne alelopatske rastline je odvisen od številnih dejavnikov, med katerimi so najpomembnejši starost in fiziološko stanje rastline, rastna sezona, okoljske razmere in koncentracija alelopatskih spojin, ki se dejansko sprosti v okolje. Znano je, da lahko že zelo nizke koncentracije alelokemikalij, tudi  $10^{-10}$  M, negativno vplivajo na rast bližnjih rastlin (Gniazdowska in Bogatek, 2005). A bolj kot sama prisotnost alelokemikalij v okolju je pomembna njihova dostopnost za druge rastline.

Tako je Tucker Serniak (2016) v svoji študiji odkrila, da so redkvice, ki so jih izpostavili dresnikovim alelokemikalijam, privzele 0,018  $\mu\text{g/ml}$  resveratrola in 0,03  $\mu\text{g/ml}$  emodina, medtem ko (-)-epikatehina niso privzele oz. je bil ta pod mejo zaznave. Sicer pa je takih raziskav zelo malo, zato bi bilo v prihodnje smiselno analizirati sproščanje, biodostopnost in razgradnjo posameznih alelopatskih spojin, s čimer bi lahko bolje predvidevali fitotoksičnost posamezne alelopatske rastline.

S svojimi analizami izvlečkov smo potrdili, da tako metanolni kot vodni izvlečki vsebujejo vse štiri glavne dresnikove alelokemikalije, in to v koncentracijah, ki jih lahko izmerimo. V nadaljevanju poskusov smo nato preverili dejanski alelopatski potencial vodnih in metanolnih izvlečkov obeh dresnikov ter njunih posameznih alelokemikalij na kalitev in rast vrtna redkvice.

## 5.2 KALITVENI POSKUSI Z VODNIMI IZVLEČKI

V okviru doktorske naloge smo preučevali alelopatski vpliv vodnih izvlečkov korenin japonskega in češkega dresnika na kalitev in rast vrtna redkvice. Želeli smo analizirati najzgodnejše spremembe v izpostavljenih kalicah, ki se zgodijo v prvih treh dneh kalitve. Osredotočili smo se predvsem na korenine kalic, saj je korenina prvi rastlinski organ, ki pride v stik s potencialno strupenimi snovmi (Šoln in Dolenc Koce, 2021). Dresnikov vpliv na korenine smo zato ovrednotili na različnih nivojih: morfološkem, histološkem, biokemijskem, ultrastrukturnem in molekulskem.

Na morfološkem nivoju se je vpliv dresnikovih izvlečkov razlikoval predvsem glede na uporabljeno koncentracijo. Pri 1 % koncentraciji izvlečkov je bil delež kaljivosti semen podoben kot pri kontrolnih skupinah, izvlečki pa so imeli celo rahlo stimulativen vpliv na poganjke, ki so bili višji kot poganjki kontrolnih kalic. Pojav, ko imajo sicer škodljive snovi v nizkih koncentracijah blagodejni učinek na rast rastlin, se imenuje hormeza (Agathokleous in sod., 2019). Tak prehodno pozitiven učinek bi lahko bil posledica dodatka hranil, kot so K, Ca, Cl, S, Fe ter drugih makro- in mikroelementov, katerih prisotnost smo s TXRF določili v izvlečkih obeh dresnikov. Poleg tega lahko alelokemikalije na rast rastlin vplivajo tudi posredno, preko vpliva na mikrobne združbe v rizosferi ter pH tal (Qu in sod. 2021). Taka mikrobna združba bi lahko potencialno pozitivno vplivala na kaljivost semen. Tudi semena navadne kostrebe (*Echinochloa crus-galli*), ki so bila v zemlji, pomešani z listi sahalinskega dresnika, so imela skoraj 2-krat višjo kaljivost v primerjavi s kontrolo (Šerá, 2012). Podoben stimulativen vpliv na rast smo opazili tudi pri predhodnem dolgotrajnejšem ravnem poskusu (Dolenc Koce in Šoln, 2018): odebeljeni hipokotili vrtnih redkvic, ki so tri tedne rasle v zemlji, pomešani s koščki posušenih listov češkega dresnika, so bili po treh tednih 2-krat večji v primerjavi s kontrolno skupino.

Če 1 % koncentracija izvlečkov ni imela vpliva oz. je bil vpliv celo stimulativen, pa je imela 10 % koncentracija izvlečkov japonskega in češkega dresnika močan zaviralni učinek na kalitev in rast vrtno redkvice. Najbolj prizadeta je bila rast korenine. Eden izmed razlogov za več kot 60 % krajše korenine tretiranih rastlin bi lahko bila poškodba koreninskega vršička, kar so študije že pokazale pri rastlinah, ki so bile izpostavljene različnim abiotičnim stresnim dejavnikom: od slanosti (Baranova in sod., 2019), nizkih temperatur (Lee, 2002) do izpostavitve težki kovini, kot je W (Adamakis in Eleftheriou, 2019). Koreninska čepica se nahaja v vršičku korenine in služi predvsem kot mehanska zaščita apikalnega meristema, ko korenina prodira skozi prst. Posledično lahko vsaka sprememba koreninske čepice močno vpliva na samo rast korenine (Kumpf in Nowack, 2015).

S SEM smo analizirali površino koreninske čepice redkvic. Medtem ko je bila površina koreninske čepice pri tretmajih z 1 % koncentracijo izvlečkov podobna kot pri kontrolnih kalicah, je bila pri 10 % izvlečkov japonskega in češkega dresnika močno spremenjena. Na površini so bili vidni samo ostanki močno odebeljenih celičnih sten. S transkriptomsko analizo (RNA-Seq) smo ugotovili, da se v koreninah tretiranih redkvic spremeni izražanje več genov, ki so povezani s celično steno: poveča se izražanje genov, ki so povezani s sintezo celuloze ter hkrati zavre izražanje gena za celulozo. To bi lahko vodilo k povečanemu nalaganju celuloze v celične stene in s tem ustvarjanju videza mreži podobne strukture na površini koreninske čepice.

Že pri predhodni 7-dnevni raziskavi vpliva dresnikovih izvlečkov na koreninski vršiček redkvice smo s TEM opazili, da 10 % izvlečka poleg zavrite rasti korenine povzročita tudi poškodbe celic v zunanjih slojih koreninske čepice. Celični organeli so bili v celicah koreninske čepice tretiranih kalic ponekod tako močno razgrajeni, da jih nismo več mogli identificirati (Šoln in sod., 2021b). Spremembe v zgradbi celic koreninske čepice smo opazili tudi pri 3 dni starih redkvicah. Celice v prvih treh zunanjih slojih so bile pri tretiranih rastlinah krajše v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. Izvleček češkega dresnika je poleg tega vplival tudi na širino celic koreninske čepice, celice so bile ožje, in na število celičnih slojev, ki so sestavljali koreninsko čepico. Mehanizem, ki vpliva na tako rast celic, ni povsem jasen, so pa podobne spremembe opazili pri celicah koreninske čepice kalic graha (*Pisum sativum*), ki so bile izpostavljene težki kovini W (Adamakis in Eleftheriou, 2019), in tobaka (*Nicotiana tabacum*), izpostavljenega povišani slanosti (Baranova in sod., 2019). Celice koreninske čepice imajo kratko življenjsko dobo, njihov nastanek je hiter in natančno reguliran. Vsakršen okoljski stres ima lahko nanje močan vpliv in posledično povzroči spremembe v strukturi koreninske čepice (Kumpf in Nowack, 2015). V okviru svoje raziskave smo ugotovili, da se v koreninah tretiranih redkvic poviša izražanje več genov za ekspanzine, kar bi lahko vodilo do spremenjene rasti celic koreninske čepice. Ekspanzini so proteini v celični steni, ki cepijo vodikove vezi med molekulami celuloz in hemiceluloz, s čimer rahljajo celične stene in povečujejo

njihovo prožnost. Spremembe v izražanju genov za ekspanzine so opazili tudi v koreninah paradižnika po izpostavitvi cianimidu (Soltys in sod., 2012).

Spremembe v celični elongaciji bi lahko bile tudi posledica reorganizacije citoskeleta. Pravilna razporeditev citoskeleta, ki se dogaja med delitvijo celice, je ključna za normalen potek mitoze. Vsako odstopanje pa lahko zavre celične delitve (Soltys in sod., 2011). S svojo raziskavo smo ugotovili, da izvlečka dresnikov vplivata na izražanje genov, ki so povezani z mikrotubuli. Izvleček češkega dresnika je v koreninah redkvice zavrl izražanje gena, ki nosi zapis za proteine, povezane z mikrotubuli, in gena za tubulin  $\beta$ . Podoben trend smo opazili tudi pri kalicah, tretiranih z izvlečkom japonskega dresnika, a razlike niso bile statistično značilne. Ultrastrukturnih sprememb mikrotubulov pri svoji raziskavi sicer nismo opazili, so pa za alelokemikalijo cianimid Soltys in sod. (2011) pokazali, da v koreninskem vršičku kalic čebule (*Allium cepa*) spremeni organizacijo citoskeleta (mikrotubulov), kar se je najbolj odražalo kot odsotnost metafazne plošče. To nakazuje, da lahko alelopatske snovi preko citoskeleta vplivajo tudi na razvrščanje kromosomov med mitozo (Soltys in sod., 2011). Poleg tega so (kortikalni) mikrotubuli pomembni za usmerjanje sintaze celuloze in orientacijo celuloznih mikrofibril, kar je povezano s smerjo podaljševanja celic. Celice se tako vedno podaljšujejo v smeri, ki je pravokotna na orientacijo celuloznih mikrofibril v celični steni (Bringmann in sod., 2012).

Za normalno rast korenine so pomembni tudi hormoni. Nekatere alelokemikalije, kot je weisiensin B, lahko vplivajo na avksinski transport, kar poviša koncentracijo avksina v apikalnem delu korenine. Višja koncentracija avksina v vršičku zavre rast glavne korenine in spodbudi razvoj stranskih korenin (Li in sod., 2019). Tudi v okviru svoje raziskave smo ugotovili, da izvlečka dresnikov v koreninah redkvice povišata raven izražanja nekaterih genov, ki so povezani z delovanjem avksina in uravnavanjem transkripcije genov za indol-3-ocetno kislino (IAA). Zato sklepamo, da bi lahko bila za zavrtost rasti korenin pomembna tudi morebitna višja raven avksina v koreninah tretiranih kalic.

Poleg tega avksinska homeostaza močno vpliva tudi na nastanek koreninskih laskov: povišana raven avksina v epidermalnih celicah sproži razvoj koreninskih laskov, hkrati avksin vpliva tudi na njihovo podaljševanje (Kohli in sod., 2022). Tudi alelokemikalije, kot je npr. kumarin, lahko pri rastlinah spremenijo nastanek koreninskih laskov, predvsem preko vpliva na avksinski polarni transport (Lupini in sod., 2014). Povišane koncentracije artemisinina so pri koreninah navadnega repnjakovca zmanjšale tako dolžino koreninskih laskov kot njihovo gostoto (Yan in sod., 2018). Tudi s svojo raziskavo smo potrdili, da izvlečki dresnikov vplivajo na rast koreninskih laskov. S SEM smo ugotovili, da 10 % izvleček japonskega dresnika zmanjša število koreninskih laskov pri testnih kalicah, medtem ko korenine kalic, tretirane z 10 % izvlečkom češkega dresnika, koreninskih laskov sploh niso imele. To kaže na stresno induciran morfološki odziv. Rastline

poskušajo s spremembo rasti in morfologijo umiliti učinke stresnega dejavnika (Potters in sod., 2007).

Avksinski gradient v korenini je pomemben tudi za gravitropizem. V celicah koreninske čepice se nahajajo posebna škrobna zrna, imenovana statoliti, ki zaznavajo težnost (Zhang in Friml, 2020). Za izvleček brazilskega drevesa cagaita (*Eugenia dysenterica*) so dokazali, da vpliva na diferenciacijo in razporeditev statolitov v kalicah redkvice (Pereira in sod., 2017). Izpostavitvev solnemu stresu pa je povzročila, da je število statolitov v koreninski čepici kalic tobaka upadlo (Baranova in sod., 2019). V naši raziskavi izvlečka japonskega in češkega dresnika nista imela tako drastičnega vpliva na amiloplaste v celicah koreninske čepice redkvice. Ugotovili pa smo, da imajo kalice, tretirane z izvlečkom češkega dresnika, v koreninski čepici elektronsko gosta škrobna zrna, medtem ko so bila škrobna zrna kontrolnih kalic svetla.

Izvečka dresnikov sta pomembno vplivala tudi na ultrastrukturo mitohondrijev v koreninski čepici. V večini mitohondrijev so bili vidni znaki poškodb, tj. manjše, elektronsko prosojne regije v matriksu, predvsem pri tretmaju z izvlečkom japonskega dresnika. Poleg tega je bilo število njihovih krist manjše kot v mitohondrijih pri kontrolnih rastlinah. Spremembe strukture mitohondrijev so bile še veliko bolj izrazite po 7-dnevni izpostavitvi dresnikovim izvlečkom, ko je bilo v celicah koreninske čepice zelo veliko obročastih mitohondrijev (Šoln in sod., 2021b). Kakršnakoli sprememba v strukturi mitohondrija negativno vpliva tudi na njegovo funkcijo, kar se kaže kot manjša sinteza ATP in posledično slabša rast korenine. Za alelokemikalijo juglon so ugotovili, da v koreninskem vršičku kalic solate (*Lactuca sativa*) zmanjša mitohondrijski membranski potencial in tako posledično poruši normalen potek celičnega dihanja (Babula in sod., 2014). BOA in DIBOA zmanjšata število mitohondrijev v koreninskih celicah kalic kumare (*Cucumis sativus*) (Burgos in sod., 2004), izpostavitvev fižola (*Phaseolus vulgaris*) izvlečku tujerodne bučke (*Sicyos deppei*) pa v celicah koreninske čepice povzroči nastanek nabreklih mitohondrijev z razširjenimi kristami (Cruz-Ortega in sod., 1998). Tudi izpostavitvev tobaka slanosti je vplivala na ultrastrukturo mitohondrijev v njegovi koreninski čepici (Baranova in sod., 2019).

Eden izmed razlogov za poškodbe mitohondrijev bi lahko bil oksidativni stres. Alelopatske snovi v celicah bližnjih rastlin izzovejo povečano sintezo in akumulacijo ROS, kar vodi do nastanka oksidativnega stresa in porušene redoks homeostaze (Gniazdowska in sod., 2015). Eno izmed mest nastanka ROS so tudi mitohondriji. Na reakcije z ROS so še posebej občutljivi membranski lipidi. Ko ROS reagirajo z njimi, se sproži radikalska verižna reakcija, imenovana lipidna peroksidacija, ki vodi v poškodbe membrane (Das in Roychoudhury, 2014). Lipidna peroksidacija je zato eden izmed najpogostejše uporabljenih stresnih markerjev pri rastlinah in se pogosto meri posredno preko vsebnosti MDA, stranskega produkta lipidne peroksidacije (Šoln in Dolenc Koce, 2021). Povečane vsebnosti MDA v koreninah tretiranih kalic redkvice nismo zaznali, kar



nakazuje, da v 3 dneh kalitve do poškodb membrane še ne pride. Se je pa po izpostavitvi izvlečkom v koreninah kalic spremenil drug biokemijski marker, TAC. Vsebnost neencimskih antioksidantov je bila povišana predvsem v koreninah kalic, tretiranih z 10 % izvlečkom japonskega dresnika. Neencimski antioksidanti, kot so askorbinska kislina, reduciran glutation,  $\alpha$ -tokoferol, karotenoidi, flavonodi in prolin, skupaj z encimskimi antioksidanti predstavljajo pomembno zaščito pred ROS (Das in Roychoudhury, 2014; Gechev in sod., 2006). Ena izmed možnosti je, da visoka stopnja TAC predstavlja mehanizem za odstranitev ROS in posledično MDA ostaja na kontrolni ravni. Naši rezultati se ujemajo s študijo Sánchez-Moreno in sod. (1998), ki poročajo o povišani vsebnosti neencimskih antioksidantov in hkrati upadu lipidne peroksidacije. Podoben učinek smo opazili tudi pri 7 dni starih kalicah redkvice po izpostavitvi izvlečkom iz dresnikovih listov (Dolenc Koce in Šoln, 2018) in korenik (Šoln in sod., 2021a). Po drugi strani je bila MDA povišana po 3-dnevni izpostavitvi kalic redkvice metanolnim izvlečkom japonskega in češkega dresnika. Ena izmed možnih razlag za ta pojav je, da se v organskem topilu fenoli bolje raztapljajo (Li in sod. 2010). To smo potrdili tudi z analizo HPLC, kjer so dresnikovi metanolni izvlečki vsebovali do 10-krat več posameznih fenolov kot vodni izvlečki.

Prolin je osmolit in neencimski antioksidant, ki sodeluje pri nevtralizaciji ROS ( $\text{OH}^{\bullet}$  in  $^1\text{O}_2$ ) ter preprečuje poškodbe zaradi lipidne peroksidacije (Das in Roychoudhury, 2014). To bi lahko bil prav tako razlog, da je bila vsebnost MDA v koreninah izpostavljenih kalic na ravni kontrole. Ugotovili smo namreč, da 10 % izvlečka dresnikov zelo močno povišata vsebnost prolina v koreninah tretiranih redkvic, izvleček japonskega dresnika za 185 %, izvleček češkega pa celo za več kot 750 %. To nakazuje, da so bile tretirane kalice v stresu. Prolin se namreč v rastlinah akumulira v zelo velikih količinah predvsem takrat, ko so rastline izpostavljene močnemu stresu. Koncentracija prolina naraste bodisi zaradi povečane sinteze ali zavrte razgradnje (Das in Roychoudhury, 2014). Povišano koncentracijo prolina sta pri kalicah solate (*Lactuca sativa*) sprožila tako umbeliferon kot dapnoretin, alelokemikaliji azijske rastline *Stellera chamaejasme* (Yan in sod., 2016). Pri kalicah redkvice so visoko raven prolina zaznali po izpostavitvi vodnim izvlečkom poprove mete (*Mentha  $\times$  peppermint*) (Mahdavia in sod., 2017), pri zelenem mungo fižolu (*Phaseolus aureus*) pa je povišano vsebnost prolina izzvala izpostavitvev alelokemikaliji BOA (Batish in sod., 2006). Podobno kot pri naši raziskavi je tudi v raziskavi Batish in sod. (2006) koncentracija prolina v izpostavljenih rastlinah naraščala skupaj z naraščanjem koncentracije alelokemikalije, a hkrati je pri njihovi raziskavi v testnih rastlinah narasla tudi MDA.

Dva izmed najpomembnejših neencimskih antioksidantov pri rastlinah sta askorbat in glutation, ki hkrati delujeta tudi kot koencima in sodelujeta pri postranslacijskih modifikacijah (Gasperl in sod., 2022). V okviru svoje raziskave smo preučili askorbat-glutationski cikel, ki ga sestavlja vrsta redoks reakcij, s katerimi se v rastlinski celici odstranjuje strupeni  $\text{H}_2\text{O}_2$  in s tem zavaruje celice pred oksidativnimi poškodbami.

Glutation je prisoten v kloroplastih, mitohondrijih, peroksisomih in v citosolu. Sestavljajo ga glutaminska kislina, glicin in cistein (Gasperl in sod., 2022). Ugotovili smo, da se v koreninah redkvic pri tretmajih z 10 % izvlečki dresnikov raven celokupnega in oksidirane cisteina močno poveša. Ravno cisteinski ostanek je tisti, ki s svojimi nukleofilnimi značilnostmi daje molekuli glutaciona (GSH) velik reducirajoči potencial (Hasanuzzaman in sod., 2017). Ista izvlečka sta močno povešala tudi raven celokupnega glutaciona, kar je značilno za rastline v stresu (Das in Roychoudhury, 2014; Hasanuzzaman in sod., 2017; Gasperl in sod., 2022).

Glutation se v celicah nahaja v reducirani (GSH) in oksidirani obliki (GSSG). Encim glutation peroksidaza (GPX) pretvarja GSH v GSSG, pri tem pa razgradi strupeni  $H_2O_2$  do kisika in vode (Das in Roychoudhury, 2014). Z RNA-Seq smo ugotovili, da se v koreninah izpostavljenih redkvic poveša izražanje več genov, ki so povezani z glutation peroksidazo (GPX), predvsem GPX2, GPX6, GPX7, GPX8. Pri obeh dresnikih je bil trend podoben, a je bilo signifikantno povešano izražanje le pri tretmaju z izvlečkom češkega dresnika. Večje izražanje genov za GPX bi lahko bila posledica večje količine celokupnega glutaciona v koreninah redkvic, ki so bile izpostavljene izvlečku češkega dresnika. Najvišje izražanje je bilo pri genih za GPX6. Spremenjeno izražanje genov GPX, med katerimi je bil prav tako najbolj izražen gen za GPX6, so ugotovili tudi v koreninah navadnega repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*) po izpostavitvi različnim abiotičnim stresnim dejavnikom, od povečane svetlobne intenzitete do mraza. Podobno kot pri naši raziskavi je bilo tudi pri navadnem repnjakovcu spremenjeno izražanje genov za GPX2, GPX7 in GPX8. Mraz je izražanje večine genov za GPX zavrnil, medtem ko je bilo pri močnejši svetlobi povešano izražanje predvsem genov za GPX6 in GPX7, pri vročini pa za GPX5 (Filiz in sod., 2019). Tudi pri alelopatskih študijah poročajo o spremenjenem izražanju genov za GPX, tako npr. izpostavitve riža (*Oryza sativa*) juglonu v njegovih koreninah poveša izražanje petih genov za GPX (Chi in sod., 2011).

Pomembnejšo zaščitno vlogo kot GSSG ima GSH, ker lahko reagira z ROS in s tem zmanjša oksidativni stres, prepreči lipidno peroksidacijo in zaščiti celične membrane (Hasanuzzaman in sod., 2017). V svoji raziskavi smo ugotovili, da je delež GSSG večinoma ostal na kontrolni ravni, kar glede na povešanje celokupnega glutaciona kaže na to, da je bilo v celicah več GSH. To smo potrdili tudi z analizo RNA-Seq, saj izpostavitve izvlečkom poveša izražanje genov za *de novo* sintezo glutaciona, kot je gen za glutamat-cistein ligazo in gen za glutation sintazo. Razlika je bila sicer statistično značilna le pri tretmaju z izvlečkom češkega dresnika. Hkrati pa povešana raven GSH nakazuje, da v koreninah tretiranih redkvic dobro deluje tudi encim glutation reduktaza (GR), ki oksidirano obliko (GSSG) pretvarja nazaj v reducirano (GSH) v odvisnosti od NADPH. S tem se prepreči kopičenje oksidirane oblike znotraj celic ter hkrati zagotavlja dovolj reducirane oblike, ki omogoča nove reakcije in nevtralizacije radikalov (Das in Roychoudhury, 2014). Povešano aktivnost GR so opazili v koreninah kalic zelenega mungo fižola (*Phaseolus aureus*) po izpostavitvi alelokemikaliji BOA (Batish in sod.,

2006), izpostavitve riža (*Oryza sativa*) juglonu pa je v njegovih koreninah povečala izražanje genov za GR (Chi in sod., 2011). V naši raziskavi izražanje genov za GR v koreninah tretiranih redkvic ni bilo spremenjeno, iz česar sklepamo, da v celicah korenin kljub alelopatskemu stresu glutationski del cikla še vedno učinkovito deluje.

Drugi pomemben antioksidant v askorbat-glutationskem ciklu je askorbat. Askorbat se prav tako kot glutacion nahaja v citosolu, kloroplastih, mitohondrijih in v peroksisomih. Encim askorbat peroksidaza (APX) pretvarja  $H_2O_2$  do vode in kisika, pri tem kot donor elektronov sodeluje askorbat, ki se ob tem pretvori v monodehidroaskorbat (MDHA). Ta se nato spontano pretvori v dehidroaskorbat (DHA) (Hasanuzzaman in sod., 2019). V koreninah tretiranih kalic se je povišala raven celokupnega askorbata, kar kaže, da so bile rastline v stresu. Hkrati pa je raven oksidirane askorbata ostala na ravni kontrole, kar pomeni, da v celicah še vedno prevladuje reducirana oblika askorbata, ki zagotavlja nemoteno detoksifikacijo ROS. V koreninah tretiranih kalicah redkvice se je pri tretmaju z izvlečkom tako japonskega kot češkega dresnika povišalo izražanje gena za encim askorbat peroksidaza (APX3), a je bila razlika statistično značilna le pri slednjem. Med alelopatskim stresom se aktivnost encimov, ki razgrajujejo  $H_2O_2$ , poveča. Tako Batish in sod. (2006) opisujejo, da izpostavitve kalic zelenega mungo fižola (*Phaseolus aureus*) alelokemikaliji BOA poveča aktivnost APX v njihovih koreninah. Prav tako izvlečki poprove mete (*Mentha  $\times$  piperita*) povečajo aktivnost APX v kalicah redkvice (Mahdavia in sod., 2017). S svojo raziskavo smo ugotovili tudi, da se poveča izražanje več genov za katalaze, predvsem CAT3.

Pri zagotavljanju reducirane oblike askorbata ima pomembno vlogo encim dehidroaskorbat reduktaza (DHAR), ki povezuje askorbatni in glutationski cikel. DHAR namreč katalizira reakcijo pretvorbe dehidroaskorbata (DHA) nazaj v askorbat, pri čemer se GSH oksidira v GSSG (Hasanuzzaman in sod., 2019). Ugotovili smo, da se je v tretiranih koreninah redkvice povišalo izražanje gena za dehidroaskorbat reduktazo (DHAR). Razlike v izražanju gena za DHAR so bile statistično značilne le pri tretmaju z 10 % izvlečkom češkega dresnika, pri enakem tretmaju z izvlečkom japonskega pa ne. Iz tega sklepamo, da je izvleček češkega dresnika predstavljal večji stres za testne rastline, saj je bila pri njih za zagotavljanje zadostne količine (reduciranega) askorbata in s tem ustrezne zaščite pred ROS potrebna večja aktivnost DHAR, ki jo v našem primeru nakazuje povečana ekspresija genov za DHAR. Hkrati to pomeni, da kljub dresnikovi alelopatiji askorbatno-glutationski cikel v koreninah izpostavljenih redkvic še vedno dobro deluje.

Redoks stanje ima pri rastlinah pomembno vlogo pri uravnavanju izražanja z obrambo povezanih genov. Eden izmed tipičnih odzivov je aktivacija proteinov NPR1 (*nonexpressor of pathogenesis-related genes 1*) in z njimi povezano izražanje genov. Za redukcijo proteinov NPR1 je namreč pomemben glutacion. Reduciran NPR1 se nato akumulira v jedru in tam reagira s transkripcijskim faktorjem TGA, ki inducira ekspresijo

PR-genov, s tem pa tudi pot, ki vodi do PCD (Foyer in Noctor, 2005). S svojo raziskavo smo pokazali, da se v koreninah redkvic, ki so bile izpostavljene 10 % izvlečku češkega dresnika, poveča izražanje gena za paralog NPR1, NPR-1-podoben protein 3 (NPR3). To sovпада s povišano ravno glutationa v koreninah kalic, tretiranih z 10 % izvlečkom češkega dresnika. A dobra obramba ima tudi svojo ceno. Zaradi spreminjajočega se okolja morajo rastline neprestano iskati ravnotežje med metabolnimi potmi, povezanimi s stresnim odzivom, in med metabolnimi potmi, povezanimi z rastjo in razvojem. Če rastline zaradi stresnega dejavnika vse več energije vlagajo v obrambo, se to pozna predvsem v njihovi (zmanjšani) rasti. Eden izmed takšnih elementov z dvojno vlogo je žveplo, ki je sestavni del glutationa in hkrati sestavni del pri translaciji proteinov. Pri mutantih navadnega repnjakovca z zavrti sintezo GSH so bile korenine daljše (Speiser in sod., 2018). Zaradi vlaganja v obrambo pred alelopatskim stresom sklepamo, da so zato pri tretiranih kalicah redkvice korenine precej krajše kot pri kontrolnih kalicah.

Za preživetje rastlin je zelo pomembna uspešna odstranitev ROS. Če je rastlina pri tem neuspešna ali če deluje stresni dejavnik zelo dolgo in je njegova intenzivnost zelo visoka, lahko koncentracija ROS v celicah močno naraste. To je sprožilec za naslednji korak, ki vodi v PCD (Gechev in sod., 2006). Tako pri oksidativnem stresu kot pri PCD uravnava celični odziv skupina encimov, ki se imenujejo proteaze. Njihovo delovanje je najbolj poznano in preučeno pri PCD živalskih celic, apoptozi. Ker pa imajo rastlinske celice v primerjavi z živalskimi drugačno zgradbo (npr. prisotnost celične stene in velikega litičnega organela – vakuole), je splošno sprejeto mnenje, da se v rastlinskih celicah apoptoza ne odvija (Van Doorn in sod., 2011). Poleg tega so kaspaze, proteazni encimi, prisotne samo pri živalih, pri vseh ostalih kraljestvih pa jih ni (Uren in sod., 2000). Med rastlinsko PCD so odkrili aktivnost strukturnih homologov kaspaz, ki se imenujejo metakaspaze oz. proteaze s kaspazam podobno aktivnostjo. Kaspazam podobna aktivnost se pogosto povezuje z aktivnostjo vakuolnih procesivnih encimov (ang. *vacuolar processing enzymes*) (Hatsugai in sod., 2015), fitaspazami (Chichkova in sod., 2010) in saspazami (Vartapetian in sod., 2011). V primerjavi z njimi metakaspaze ne cepijo substrata glede na negativno nabite aminokislinske ostanke na poziciji P1, ampak na poziciji P1 preferirajo bazične aminokislinske ostanke lizina ali arginina (Minina in sod., 2020).

Ugotovili smo, da 10 % vodna izvlečka povečata aktivnost metakaspazam podobnih proteaz tudi do dvakrat glede na kontrolo. Poleg tega je bilo v koreninah pri obeh tretmajih povišano izražanje gena za metakaspazo 1, a so bile razlike statistično značilne le pri izvlečku češkega dresnika. Čeprav metakaspazno aktivnost v nekaterih organizmih povezujejo s celično smrtjo, povezano z oksidativnim stresom (npr. tip metakaspaze AtMCA-IIe pri stresnem odzivu navadnega repnjakovca na UV-svetlobo (He in sod., 2008)), je lahko povečana metakaspazna aktivnost tudi posledica drugih skupin proteaz, kot so npr. papainu podobne cisteinske proteaze (ang. *papain-like cystein proteases*). Na

to kaže tudi povečano izražanje dveh genov za papainu podobne cisteinske proteaze v koreninah kalic redkvice, tretiranih z 10 % izvlečkoma japonskega in češkega dresnika.

V okviru svoje raziskave smo preučevali tudi proteolitično aktivnost z nekaterimi kaspaznimi substrati. Ugotovili smo, da je bila pri substratu DEVD za več kot 10-krat povišana proteolitična aktivnost v koreninah redkvice, tretiranih z 10 % izvlečkom japonskega dresnika. To nakazuje, da se po izpostavitvi temu izvlečku v koreninah aktivirajo proteaze s kaspazam-3-podobno aktivnostjo. Pri rastlinah je njihova aktivnost povezana z delovanjem proteasomov (Han in sod., 2012). Nekaterе študije pa so pokazale, da je povišana aktivnost teh proteaz povezana tudi z nastankom ROS v mitohondrijih, razpadom zunanje mitohondrijske membrane in sprostitvijo citokroma c pri stresno inducirani PCD pri navadnem repnjakovcu (Li in Xing, 2011). Tretma z 10 % izvlečkom japonskega dresnika je v koreninah redkvice povišal proteazno aktivnost za približno 6-krat pri substratu VEID in 1,6-krat pri substratu YVAD. Oba substrata se pri rastlinah pogosto uporabljata za preučevanje procesov, povezanih s PCD. Substrat VEID najpogosteje cepijo proteaze, ki se imenujejo fitaspaze. To so Asp-specifične, subtilizinu podobne rastlinske proteaze, za katere so pred kratkim odkrili, da v paradižniku sodelujejo pri PCD, povezani z oksidativnim stresom (Reichardt in sod., 2018), ter igrajo ključno vlogo pri procesih PCD po okužbi z mozaičnim virusom tobaka in izpostavitvi abiotskemu stresu (Chichkova in sod., 2010).

Z RNA-Seq smo ugotovili, da se v koreninah redkvice, tretirane z 10 % izvlečkom češkega dresnika, poviša izražanje genov iz proteinske družine subtilaz (ang. *subtilase protein*) in iz proteinske družine subtilizinu podobnih serinskih endopeptidaz (ang. *subtilisin-like serine endopeptidase family protein*). Pri tretmaju z izvlečkom japonskega dresnika razlike niso bile statistično značilne, a je bil trend podoben pri genih za proteinsko družino subtilaz.

Za substrat YVAD so dokazali, da ga primarno cepijo vakuolni procesivni encimi, cisteinske proteaze, ki imajo pri številnih kopenskih rastlinah pomembno vlogo pri odzivu na biotski in abiotski stres (Vorster in sod., 2019). Povišana aktivnost v tretiranih koreninah redkvice lahko podkrepimo tudi z rezultati transkriptomske analize, kjer smo ugotovili, da je bilo v koreninah kalic, tretiranih z 10 % izvlečkoma obeh dresnikov, povišano izražanje več genov za proteine iz družine cisteinskih proteaz (ang. *cysteine proteinases superfamily protein*), a so bile razlike statistične le pri tretmaju z izvlečkom češkega dresnika.

Čeprav še ne moremo z gotovostjo postaviti enačaja med izpostavitvijo alelopatskim tretmajem in PCD, smo na ultrastrukturnem nivoju v koreninskih celicah tretiranih redkvic prav tako opazili nekatere spremembe, ki so lahko povezane s celično smrtjo. To so predvsem odstop membrane od celične stene in številne nepravilnosti v strukturi celičnih organelov. Najbolj spremenjen celični organel je bil endoplazemski retikulum

(ER), ki se je v celicah koreninske čepice tretiranih kalic pogosto pojavljal v obliki razširjenih cistern ER, napolnjenih z elektronsko gosto snovjo, t. i. telesce ER (ang. *ER body*). Enako spremembo oblike ER smo v celicah koreninske čepice redkvice opazili tudi po 7-dnevni izpostavitvi dresnikovim izvlečkom (Šoln in sod., 2021b). Vloga telesc ER je predvsem v biokemijski zaščiti pred biotskim stresom, kot je objedanje (Hara-Nishimura in Matsushima, 2003). Glavna komponenta v njihovi notranjosti so namreč  $\beta$ -glukozidaze. Do zdaj so telesca ER odkrili samo pri rastlinah iz družine *Brassicaceae* (Yamada in sod., 2020).

Tako v celicah koreninske čepice kot v meristemskih celicah smo pri tretiranih redkvicah v citoplazmi odkrili okrogle in elektronsko goste vključke. Zanimivo je, da tega po 7-dnevni izpostavitvi izvlečkom dresnikov v koreninah redkvice nismo opazili, čeprav so bili po enem tednu ostali znaki propadanja celic bolj izraziti (Šoln in sod., 2021b). Takih elektronsko gostih vključkov pri drugih alelopatskih študijah ne opisujejo, so pa podobne strukture opazili v povrhnjici korenine rožlina (*Althaea rosea*). Te citoplazemske domene, poimenovane lipotubuloidi, vsebujejo skupke lipidnih telesc, ki so med seboj povezani z mikrotubuli in obdani s tonoplastom. Njihova vloga je predvsem pri lipidni homeostazi (Kwiatkowska in sod., 2011), iz česar sklepamo, da bi njihova prisotnost lahko nakazovala na motnje razvoja korenine.

Koreninska čepica predstavlja pomembno zaščito za meristemske celice, ki se nahajajo v osrednjem delu koreninskega vršička. Vsaka poškodba koreninske čepice ima zato lahko velik vpliv tudi na samo meristemsko območje (Kumpf in Nowack, 2015). V okviru svoje raziskave smo opazili, da izpostavitve izvlečkom japonskega in češkega dresnika zabiše mejo med meristemskim območjem in koreninsko čepico na eni strani ter med meristemom in območjem podaljševanja na drugi. Ta učinek je bil še bolj izrazit po 7 dneh izpostavitve izvlečkom dresnikov (Šoln in sod., 2021b). Podobno spremembo so opazili tudi v koreninah kalic kumare (*Cucumis sativus*), ki so jih izpostavili delovanju BOA in DIBOA, alelokemikalijama iz rži (*Secale cereale*) (Burgos in sod., 2004).

Naši rezultati so pokazali, da so meristemske celice pri tretiranih kalicah redkvice v prerezu bolj pravokotne oblike in ne kvadratne kot pri kontrolnih kalicah. Sprememba oblike celic je povezana s spremembo mikrotubulov (Araniti in sod., 2017). S svojo raziskavo smo ugotovili, da sta tako izvleček japonskega kot izvleček češkega dresnika v koreninah izpostavljenih redkvic večinoma zmanjšala izražanje genov, ki so povezani z mikrotubuli, predvsem  $\beta$ -tubulin. To bi lahko imelo vpliv tudi na samo obliko meristemskih celic. S transmisijskim elektronskim mikroskopom sicer sprememb mikrotubulov nismo opazili, a bi za bolj natančne rezultate morali narediti še dodatne analize, npr. imunohistolabeling.

Meristemske celice pri tretiranih kalicah so imele poleg tega v citoplazmi več manjših vakuol. Podobno vakuolizacijo v meristemskih celicah so opazili tudi pri kalicah redkvic,

tretiranih s kumarinom (Aliotta in sod., 1993) ter pri kalicah fižola (*Phaseolus vulgaris*) in smokvolistne buče (*Cucurbita ficifolia*), ki so bile izpostavljene izvlečku tujerodne bučke (*Sicyos deppei*) (Cruz-Ortega in sod., 1998). Alelokemikalije pa lahko vplivajo tudi na samo velikost meristema v koreninah. Za benzojsko kislino (Zhang in sod., 2018) in farnezen (Araniti in sod., 2017) so že poročali, da zmanjšata velikost meristema v koreninah navadnega repnjakovca, kar kaže, da bi lahko alelopatski stres vodil v prezgodnjo diferenciacijo meristemskih celic (Araniti in sod., 2017).

Poleg tega lahko alelopatski stres vodi tudi do poškodb celičnih organelov, predvsem mitohondrijev (Gniazdowska in Bogatek, 2005). V meristemu korenin, tretiranih z izvlečkoma japonskega in češkega dresnika, smo opazili poškodbe mitohondrijev, ki so bile vidne kot izrazite elektronsko prosojne regije v matriksu. Spremembe mitohondrijev, kot je npr. nabrekanje, so se zgodile tudi v meristemskih celicah korenin kalic fižola, tretiranih z izvlečkom tujerodne bučke (Cruz-Ortega in sod., 1998). Vse te nepravilnosti celičnih struktur bi lahko bile povezane s PCD (Šoln in sod., 2022).

S tem sklopom raziskav smo ugotovili, da izpostavitve kalic vrtna redkvice vodnim izvlečkom japonskega in češkega dresnika povzroči spremembe celičnih organelov v koreninskem vršičku, v celicah pa sproži oksidativni stres ter znake programirane celične smrti. Histološke, ultrastrukturne, biokemijske in molekulske spremembe se na nivoju rastline kažejo kot zavrta rast glavne korenine.

### 5.3 KALITVENI POSKUSI Z METANOLNIMI IZVLEČKI IN IZBRANIMI DRESNIKOVIMI ALELOKEMIKALIJAMI

Analiza metanolnih izvlečkov korenin japonskega in češkega dresnika je pokazala, da oba vsebujeta resveratrol, epikatehin in emodin v višji vsebnosti v primerjavi z vodnimi izvlečki. Vse tri alelokemikalije imajo potrjen negativen vpliv na rastline, npr. vrtno krešo (*Lepidium sativum*) (Fan in sod., 2010) in na 14 dni stare vrtna redkvice (*Raphanus sativus*) (Tucker Serniak, 2016), učinek se je izrazil predvsem kot zavrta rast. Čeprav je bilo v preteklosti že nekaj študij o vplivu dresnikovih posameznih alelokemikalij (Fan in sod., 2010; Tucker Serniak, 2016) in izvlečkov iz njegovih rastlinskih organov (Vrchotová in Šerá, 2008; Moravcová in sod., 2011; Dolenc Koče in Šoln, 2018) na testne rastline, pa do zdaj še ni bilo raziskave, ki bi hkrati primerjala učinek posameznih alelokemikalij in izvlečkov. V okviru tega doktorskega dela smo zato analizirali vpliv metanolnih izvlečkov japonskega in češkega dresnika ter njihovih najpogostejših alelokemikalij: resveratrola, epikatehina, emodina in njihove mešanice na 3 dni stare kalice vrtna redkvice.

Metanolni izvlečki češkega dresnika, tako pri 1 % kot pri 10 % koncentraciji, so rahlo zavrli kalitev semen redkvice, medtem ko izvlečki japonskega dresnika na kalitev niso imeli vpliva. Različno delovanje obeh dresnikov bi lahko bilo povezano z različno

vsebnostjo resveratrola, ki smo jo ugotovili z analizo NMR. V seriji tretmajev z alelokemikalijami dveh različnih koncentracij je le 0,2 mg/ml resveratrola zavrlo kalitev semen. Zaviralni vpliv resveratrola na kalice kreše v svoji študiji opisujejo tudi Fan in sod. (2010). Zanimivo je, da ostale dresnikove alelokemikalije na kaljivost semen niso imele bistvenega vpliva. Tudi sicer je bila inhibicija kalitve z resveratrolom v tem poskusu relativno nizka, manj kot 10 %, medtem ko je za nekatere alelokemikalije, kot je sorgoleon, znano, da zelo močno zavrejo kalitev številnih plevelnih rastlin (Uddin in sod., 2014). Odziv na alelopatski stres se med rastlinskimi vrstami razlikuje, saj so nekatere nanj bolj občutljive kot druge (Cruz-Ortega in sod., 2002). Tako npr. v svoji študiji Šerá (2012) poroča o močnem zaviralnem učinku dresnikovih listov na kalitev semen bele gorčice (*Leucosinapis alba*), medtem ko kalitev semen navadne kostrebe (*Echinochloa crus-galli*) ni bila prizadeta.

Na kalitev semen ima lahko vpliv tudi koncentracija tretmaja in trajanje izpostavitve alelopatskim snovem. V svojih prejšnjih raziskavah z vodnimi izvlečki korenin (Šoln in sod., 2021a) ter listov (Dolenc Koce in Šoln, 2018) japonskega in češkega dresnika smo ugotovili, da kalitev tretiranih semen pogosto še vedno poteče, a zakasnjeno. Tako po nekoliko daljšem času opazovanja, npr. 7 dneh, kali večina semen, kar le potrjuje majhne razlike pri plivu na kalitev med tretmaji v tem poskusu.

Metanolni izvlečki japonskega in češkega dresnika so najbolj vplivali na dolžino korenine redkvice, ki je bila v primerjavi s kontrolnimi kalicami krajša tudi do 70 %. Zavrta rast korenine je pogosto opažen učinek v alelopatskih raziskavah, tako po tretiranju s posameznimi alelokemikalijami (Fan in sod., 2010; Soltys in sod., 2011; Tucker Serniak, 2016; Yan in sod., 2016; Araniti in sod., 2018) kot rastlinskimi izvlečki (Vrchotová in Šerá, 2008; Moravcová in sod., 2011; Dolenc Koce in Šoln, 2018; Šoln, in sod., 2021a; Šoln in sod., 2021b). V primerjavi z odraslimi rastlinami so kalice precej bolj občutljive na alelopatski stres, saj njihov koreninski sistem še ni v celoti razvit. Številne potencialno fitotoksične snovi imajo velik vpliv predvsem na redoks homeostazo (Lara-Nuñez in sod., 2006; Yan in sod., 2016), hormonsko regulacijo (Lupini in sod., 2014) ter na morfologijo in ultrastrukturo korenin (Šoln in sod., 2021b).

Izmed testiranih alelokemikalij sta samo epikatehin in mešanica vseh treh alelokemikalij zavrta rast korenine kalic redkvice, a manj kot npr. 10 % izvlečki dresnikov, čeprav so tako za resveratrol in epikatehin (Fan in sod., 2010; Tucker Serniak, 2016) kot emodin (Tucker Serniak, 2016) že pokazali, da imajo z njimi tretirane kalice krajšo korenino. Rezultati naše raziskave so torej pokazali, da imajo najbolj zaviralen učinek na dolžino korenine redkvice izvlečki in ne posamezne alelokemikalije. Podoben učinek je opisan tudi za etanolne izvlečke lubja korenine breskve (*Prunus persica*), ki je v 6 tednih preučevanja bolj zavrta rast poganjkov in korenin kalic breskve kot benzojska kislina (Zhu in sod., 2017). Iz tega sklepamo, da k dresnikovemu alelopatskemu potencialu pomembno pripomorejo tudi druge alelokemikalije v njegovih koreninah, ki jih nismo preučevali.



Kombinacija različnih sekundarnih metabolitov v dresnikovih koreninah lahko tako vodi do učinka sinergizma, kar poveča dresnikovo alelopatsko moč, kot predlaga v svoji študiji Tucker Serniak (2016). Po drugi strani pa je lahko zavrta rast korenine izpostavljenih rastlin samo začasna, saj je rast korenine precej plastičen proces in se ob umiku stresnega dejavnika lahko ponovno obnovi (Soltys in sod., 2011). Tak učinek na rast korenine smo opazili v svoji pretekli raziskavi (Šoln in sod., 2021a), kjer je bila dolžina korenine kalic redkvice, ki so bile izpostavljene nizkim koncentracijam (do 2 %) vodnih izvlečkov korenin dresnikov, po 7 dneh na ravni kontrolnih rastlin, kljub nekoliko počasnejši rasti na začetku kalitve. Hkrati pa smo ugotovili, da višje koncentracije izvlečkov (5 % in 10 %) proces regeneracije korenine onemogočijo, saj so korenine ostale kratke tudi po 7 dneh (Šoln in sod., 2021a).

Na dolžino poganjka redkvice niso vplivali ne izvlečki dresnikov ne posamezne alelokemikalije, so bili pa poganjki krajši pri tretmaju z mešanico alelokemikalij. Podobno je v svoji študiji pokazala tudi Tucker Serniak (2016): 14-dnevna izpostavitve epikatehinu, emodinu in polidatinu ne vpliva na dolžino poganjkov pri vrtnih redkvicah, medtem ko ima izpostavitve resveratrolu celo stimulativen učinek na poganjke. Kombinacije učinkov mešanice alelokemikalij na dolžino poganjkov pa ni testirala. V primerjavi s koreninami poganjke po navadi alelopatski stres manj prizadene, saj z alelopatskimi snovmi niso v neposrednem stiku (Gniazdowska in Bogatek, 2005). Odziv poganjkov na alelopatski stres je odvisen tudi od rastlinske vrste in samega alelopatskega potenciala posamezne alelokemikalije. Nekatere raziskave namreč poročajo tudi o močnem zaviralnem učinku na rast poganjkov. Tako je bila npr. rast poganjkov kalic navadne kumare (*Cucumis sativus*), ki so bile tretirane z BOA, močno zavrta, medtem ko je bila rast korenine zavrta precej manj (Burgos in sod., 2004). Rastline se razlikujejo tudi glede na svojo občutljivost za določeno alelokemikalijo: korenine in poganjki srhkodlakavega ščira (*Amaranthus retroflexus*) so bili po tretmaju z eteričnim oljem jezičastoplodnega razhudnika (*Solanum rostratum*) precej bolj zavrti kot pri enako tretirani travi, enoletni latovki (*Poa annua*) (Shixing in sod., 2021).

Na celični ravni alelopatske snovi pogosto izzovejo povečano sintezo reaktivnih kisikovih spojin (ROS) v celicah izpostavljenih rastlin (Yan in sod., 2016; Araniti in sod., 2018; Šoln in sod., 2021a). ROS reagirajo z lipidi v celični membrani in s tem sprožijo radikalsko verižno reakcijo, ki se imenuje lipidna peroksidacija. Ta vodi do poškodb in uničenja celične membrane (Das in Roychoudhury, 2014). Pri svoji raziskavi smo v koreninah tretiranih redkvic spektrofotometrično analizirali vsebnost MDA, ki je stranski produkt propadanja membran (Šoln in Dolenc Koce, 2022). Ugotovili smo, da je bila vsebnost MDA povišana v koreninah kalic, izpostavljenih metanolnemu izvlečku tako japonskega kot češkega dresnika, pri obeh preučevanih koncentracijah, 1 % in 10 %. Povišana peroksidacija membrane zmanjša aktivnost membranskega encima  $H^+$ -ATPaza, kar vodi v celično smrt, so v svoji študiji na primeru kalic kumare, ki so jih tretirali s cimetno kislino, pokazali Ding in sod. (2007). Povišana lipidna peroksidacija bi lahko

bila eden izmed razlogov za zavrto rast korenin kalic redkvice, ki smo jih tretirali z metanolnimi izvlečki dresnikov. Podoben pojav, tj. povišano lipidno peroksidacijo in hkrati zavrto rast korenine, so opazili tudi pri testnih rastlinah, ki so jih izpostavili delovanju izvlečka sene (*Senna occidentalis*) (da Silva in Vieira, 2019) in dvema kumarinoma, umbeliferonu in dapnoretinu (Yan in sod., 2016). Posamezne dresnikove alelokemikalije so imele ponovno precej manjši vpliv v primerjavi z izvlečki: večina izmed njih ni imela vpliva na vsebnost MDA, le emodin jo je v koreninah celo znižal. To ponovno kaže na večji alelopatski potencial dresnikovih izvlečkov kot posameznih alelokemikalij. Po drugi strani pa vodni izvlečki japonskega in češkega dresnika niso povišali MDA v koreninah 3 dni starih redkvic. Predvidevamo, da imajo metanolni izvlečki večjo alelopatsko moč kot vodni, saj se fenoli bolje raztapljajo v organskih topilih (Li in sod. 2010).

Eden izmed obrambnih mehanizmov pred ROS so antioksidanti (Das in Roychoudhury, 2014). V okviru svoje raziskave smo preučili vsebnost neencimskih antioksidantov (TAC) v koreninah kontrolnih in tretiranih kalic. TAC se je izkazal za precej bolj občutljiv parameter oksidativnega stresa kot MDA: TAC je bil povišan v koreninah kalic, ki so bile izpostavljene metanolnim izvlečkom dresnikov. Še bolj pa je bil TAC povišan pri tretmajih z resveratrolom, emodinom in mešanico alelokemikalij. Večja vsebnost antioksidantov bi lahko nevtralizirala več ROS in s tem zaščitila korenine kalic, tretiranih z alelokemikalijami, kar bi lahko bil razlog, da njihova rast ni bila tako močno zavrta kot pri tretmajih z metanolnimi izvlečki. Tudi druge študije poročajo o povišani vsebnosti antioksidantov v rastlinah, ki so bile izpostavljene alelopatskemu stresu, povzročenemu z 2-benzoksazolinom (BOA) (Batish in sod., 2006), cimetovo kislino (Ding in sod., 2007) in česnovno alelokemikalijo dialil disulfid (Cheng in sod., 2016). Izpostavitev kalic redkvice izvlečku mete (*Mentha × piperita*) poviša aktivnost antioksidativnih encimov katalaze, askorbat peroksidaze in peroksidaze. Vsi naštetni encimi sodelujejo pri razgradnji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Mahdavia in sod., 2017). S svojo raziskavo smo pokazali, da se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> večinoma akumulira v koreninah tretiranih kalic, predvsem v koreninskem vršičku. To sovпада z našimi preteklimi odkritji, da dresnikovi izvlečki poškodujejo celice koreninske čepice kalic redkvice (Šoln in sod., 2021b). Posledično bi tudi kopičenje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, kot enega izmed ROS, lahko bil razlog za krajše korenine pri tretiranih rastlinah. Poleg tega smo pri vodnih izvlečkih, enake koncentracije, ugotovili, da slednji v celicah koreninske čepice povzročijo spremembe, ki so povezane z lipidno peroksidacijo, kot so odstop plazmaleme in poškodbe mitohondrijev. Predvidevamo, da bi metanolni izvlečki lahko še bolj prizadeli samo ultrastrukturo koreninskega vršička, saj smo s HPLC-analizo izvlečkov ugotovili, da metanolni izvlečki vsebujejo tudi 10-krat več fenolov kot vodni.

Poleg izpostavitve izvlečkom oz. alelokemikalijam je lahko na sintezo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v kalicah redkvice vplival že sam proces kalitve, saj ima H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pomembno vlogo tudi pri rasti in razvoju rastline (Das in Roychoudhury, 2014), ki je zelo hitra predvsem v zgodnjih fazah kalitve. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ima pomembno vlogo pri rasti korenin, saj preko aktivacije Ca<sup>2+</sup> kanalov

vpliva na ekspanzijo celic v rastni coni korenine. Pri kalicah koruze (*Zea mays*) se zato v zgodnjih fazah razvoja največ  $H_2O_2$  akumulira ravno v koreninah (Liszkay in sod., 2004). Poleg tega  $H_2O_2$  sodeluje tudi pri ksilogenezi, saj višje koncentracije  $H_2O_2$  sprožijo PCD med nastankom trahej (Pennell in Lamb, 1997). Eden izmed razlogov za temnejšo obarvanost korenin z barvilom DAB, kar kaže na večjo količino  $H_2O_2$ , je tudi rast kalice na svetlobi. Pri kalitvenih testih so bile korenine nenaravno izpostavljene svetlobi, kar lahko v njih sproži povečano sintezo ROS (Yokawa in sod., 2011). V prihodnje bi bilo zato smiselno primerjati sintezo  $H_2O_2$  pri rastlinah, ki so rastle v temi, in tistimi, ki so rastle na svetlobi.

S tem sklopom poskusov smo ugotovili, da imajo metanolni izvlečki obeh dresnikov višji alelopatski potencial kot dresnikove posamezne alelokemikalije, kar se je kazalo v močnejši zavrti rasti korenine kalic redkvice in višji stopnji oksidativnega stresa. Močnejše alelopatsko delovanje izvlečkov bi lahko pripisali temu, da je v izvlečku prisotnih več različnih alelokemikalij, poleg preučevanih resveratrola, epikatehina in emodina tudi druge, skupaj pa delujejo sinergistično, kar posledično poviša alelopatski potencial izvlečka.

#### 5.4 ALELOPATSKI VPLIV V DALJŠEM ČASOVNEM OBDOBJU

Alelopatija ima pogosto največji učinek na korenine izpostavljenih rastlin, saj so prve, ki pridejo v stik z alelokemikalijami (Aliotta in sod., 1993). Hkrati pa je ravno zaradi narave korenin, ki rastejo v tleh, težko opazovati njihove spremembe skozi daljše časovno obdobje, ne da bi jih pri tem poškodovali. Zaradi tega se večina alelopatskih študij osredotoča predvsem na kratkotrajne izpostavitve, kot je 2 dni (Cruz-Ortega in sod., 1998), 3 dni (Fan in sod., 2010; Li in sod., 2019), 4 dni (Burgos in sod., 2004), 5 dni (Pereira in sod., 2017) in 7 dni (Soltys in sod. 2012; Araniti in sod., 2017; Dolenc Koce in Šoln, 2018; Šoln in sod., 2021a; Šoln in sod. 2021b). Redke so študije, ki preučujejo alelopatski vpliv 14 dni (Tucker Serniak, 2016), 37 dni (Dolenc Koce in Šoln, 2018), 42 dni (Murrell in sod., 2011), 44 dni (Dolenc Koce in Šoln, 2018) ali celo 60 dni (Qu in sod., 2021).

Kalitveni testi se pogosto uporabljajo za ugotavljanje delovanja potencialno škodljivih snovi. Ena izmed prednosti laboratorijskih poskusov so kontrolirane rastne razmere. Po drugi strani pa je kalitev semen na omočenem filtrirnem papirju (ali agarju) zaradi omejenega prostora kratkotrajna in mogoča le, ko so kalice še majhne. S svojimi predhodnimi poskusi smo ugotovili, da so po 7 dneh korenine kalic že tako dolge, da postane petrijevka zanje premajhna in posledično začnejo propadati. Manj očitni razlog za propadanje korenin po določenem času je lahko tudi izpostavitve svetlobi, ki poveča sintezo ROS v njihovih tkivih (Wan in sod., 2019). Tudi mi smo pri 3-dnevem poskusu z vodnimi izvlečki dresnikov ugotovili, da se v koreninah redkvice poviša izražanje genov, ki so povezani s fotosintezo, kar je verjetno posledica rasti na svetlobi. Naslednji

razlog za manj optimalno rast v petrijevkah je, da v njih korenine rastejo vzporedno s podlago in ne – kot je naravno – navzdol zaradi gravitropizma (Šoln in Dolenc Koce, 2021). To ima lahko posledice tako za pravilno oblikovanje koreninske čepice kot za zaznavanje težnosti (Pereira in sod., 2017; Mitić in sod., 2018).

Pri dolgotrajnejših poskusih je tudi zaželeno, da informacij o razvoju koreninskega sistema ne pridobimo zgolj na koncu poskusa, ampak da lahko spremljamo vse spremembe rasti že v času trajanja poskusa. A če korenine med samim poskusom premikamo, da bi jih lažje izmerili ali fotografirali, lahko pri tem nenamerno poškodujemo občutljive dele korenine, kar vpliva na njihovo nadaljnjo rast. V okviru te raziskave smo zato preizkusili metodo, ki omogoča spremljanje razvoja koreninskega sistema v daljšem časovnem obdobju, ne da bi ga pri tem poškodovali. Uporabili smo pravokotne plastične škatle, imenovane rizoboksi, ki imajo na eni strani prozorno steno, kar omogoča pogled na korenine, ki smo jih nekajkrat na teden skenirali. V času trajanja poskusa smo to stran prekrili s črno lepenko, da so korenine rastle v temi. Poleg tega rizoboksi omogočajo, da korenine rastejo navzdol, kar zagotavlja bolj naravne razmere kot npr. rast v petrijevki.

Svoj poskus smo zastavili tako, da smo v rizobokse posadili 3 dni stare kalice, ki so imele vse enako dolge korenine. S tem smo izključili dejavnik slabše kaljivosti semen. Na začetku poskusa smo kalice zalili z 1 % in 10 % vodnima izvlečkoma japonskega in češkega dresnika. Nato pa smo kalice vseh tretmajev 3 tedne zalivali samo še z destilirano vodo. Namen naše raziskave je bil ugotoviti negativen vpliv izvlečkov dresnikov v daljši časovni skali. Hkrati smo preverili tudi, ali in v kakšni meri si korenine redkvice opomorejo po alelopatskem stresu.

Izvečki dresnikov so imeli velik vpliv že na samo preživetje kalic. Več kot 90 % kalic, ki smo jih zalili z 10 % izvlečkom češkega dresnika, je propadlo do polovice poskusa. Podobno število rastlin, a nekoliko manj, je propadlo tudi pri tretmaju z 10 % izvlečkom japonskega dresnika. Močan vpliv na preživelost kalic je imel tudi 1 % izvleček češkega dresnika, pri katerem je do konca poskusa propadla skoraj tretjina rastlin, medtem ko 1 % izvleček japonskega dresnika ni imel vpliva. Razlika v učinku obeh izvlečkov bi lahko bila že v njuni sestavi. Z analizo NMR smo ugotovili, da se sestava dresnikovih korenin razlikuje, predvsem v vsebnosti resveratrola. Tega je bilo več v koreninah, ki smo jih nabrali poleti, pri češkem dresniku. Za resveratrol sta tako Fan in sod. (2010) kot Tucker Serniak (2016) pokazala, da ima močan zaviralni učinek na dolžino korenine kreše oz. redkvice.

Tudi v svoji raziskavi smo opazili, da je bila rast glavne korenine pri tretiranih rastlinah na začetku močno zavirana, korenine so bile po 4 dneh skoraj 90 % krajše v primerjavi s kontrolnimi rastlinami. O krajših koreninah rumene žametnice (*Tagetes erecta*) po 60-dnevni izpostavitvi izvlečku korenin octovca (*Rhus typhina*) poročajo tudi Qu in sod.

(2021), ki so hkrati dokazali, da izvlečki te invazivne rastline zmanjšajo mikrobiološko aktivnost v tleh. V primerjavi z njihovo raziskavo je pri našem poskusu po 14 dneh od izpostavitve izvlečkom dolžina korenin redkvic pri vseh preživelih rastlinah postala podobna kontrolnim. Po drugi strani pa velja izpostaviti, da so rastline z najkrajšimi koreninami v prvi tretjini poskusa večinoma propadle, ostale so le tiste, ki so že prej imele nekoliko daljše korenine. Iz česar sledi, da bi lahko bolj kot o regeneraciji govorili o propadu nekaterih in prilagoditvi ter s tem preživetju drugih rastlin. Regeneracijo rasti korenine po prenehanju alelopatskega stresa sicer opisujejo Soltys in sod. (2011), ki so koreninice čebule (*Allium cepa*) za 1 dan izpostavili različnim koncentracijam cianimida ter jih nato še 5 dni pustili rasti v vodi. Kljub temu da je bil pri višjih koncentracijah mitotski indeks v koreninah močno zmanjšan, je postala dolžina korenin po 5 dneh podobna kontrolnim; nižje kot so bile začetne koncentracije cianimida, boljša je bila regeneracija. To kaže, da je razvoj korenin plastičen proces, ki omogoča njihovo prilagajanje na različnih nivojih, od fiziološkega do strukturnega, glede na dražljaje iz okolja (Agathokleous in sod., 2019). Kljub temu da je bila pri našem poskusu na koncu dolžina glavne korenine tretiranih redkvic podobna kontrolnim, pa se je vpliv alelopatskega stresa vseeno poznal pri masi celotnega koreninskega sistema. Predvsem pri tretmajih z 10 % izvlečkoma je bila masa koreninskega sistema nižja, medtem ko pri 1 % tretmaju ne. Na to so še posebej vplivale stranske korenine, saj smo pri 1 % koncentraciji izvlečkov opazili povečano rast stranskih korenin. Rastline lahko namreč s spremembo rasti omilijo negativne učinke stresnega dejavnika (Potters in sod., 2007). Tudi pri kratkotrajni, 7-dnevni izpostavitvi smo opazili, da nižje koncentracije izvlečkov korenin dresnikov (0,5 %–2 %) pri kalicah redkvice spodbudijo rast stranskih korenin (Šoln in sod., 2021a). Prav tako so bile korenine čebule, ki so bile izpostavljene najnižji koncentraciji cianimida, na koncu celo daljše kot pri kontrolnih rastlinah (Soltys in sod., 2011). Ta pojav se imenuje hormoneza: sicer škodljive snovi imajo v nizkih koncentracijah stimulativen učinek. Po drugi strani pa se ob višjih koncentracijah, ki predstavljajo močnejši stres, ta učinek konča in rastline začnejo propadati (Agathokleous in sod., 2019). Pri naši raziskavi so imele redkvice pri tretmajih z 10 % izvlečki dresnikov zakasnjeno in zavrto rast stranskih korenin. Tudi izpostavitve alelokemikaliji BOA je močno zmanjšala število stranskih korenin pri kalicah kumare (*Cucumis sativus*), predvidoma zaradi zavrte diferenciacije celic pericikla, zaradi česar stranske korenine ne nastanejo (Burgos in sod., 2004).

Zaradi močnega propadanja testnih rastlin pri tretmajih z 10 % izvlečki smo lahko na koncu poskusa preučili le histološke spremembe koreninskega vršička pri preživelih rastlinah. Razlike so bile opazne zlasti pri rastlinah, ki smo jih tretirali z 10 % koncentracijo izvlečkov, pri propadlih pa bi bile histološke spremembe verjetno še bolj očitne. Najbolj zunanji del koreninskega vršička predstavlja koreninska čepica, ki ima pomembno biokemijsko in mehansko zaščito meristema v notranjosti (Kumpf in Nowack, 2015). Ugotovili smo, da so imele redkvice, ki so bile izpostavljene predvsem 10 %

izvlečkom dresnikov, za polovico manj celičnih slojev koreninske čepice. Vpliv na število slojev koreninske čepice in povečano rast celic v širino so opazili tudi pri celicah koreninske čepice kalic kumare (*Cucumis sativus*), ki so jih izpostavili alelokemikaliji DIBOA (Burgos in sod., 2004). Spremembe v celični elongaciji so lahko posledica reorganizacije citoskeleta (Soltys in sod., 2011) ali spremembe v hormonski homeostazi. Na rast korenin vpliva predvsem hormon avksin. Za alelokemikalijo weisiensin B so dokazali, da poviša koncentracijo avksina v apikalnem delu korenine, s čimer posledično zavre rast glavne korenine (Li in sod., 2019). Spremembe celic koreninske čepice so opazili po izpostavitvi težkim kovinam (Adamakis in Eleftheriou, 2019) in povišani slanosti (Baranova in sod., 2019).

Poškodbe koreninske čepice lahko vplivajo tudi na meristemske celice v notranjosti korenine (Šoln in Dolenc Koce, 2021). Čeprav po 22 dneh izpostavitve celice koreninske čepice niso bile tako močno poškodovane kot pri kalicah redkvice, ki so bile 7 dni izpostavljene 10 % izvlečkom japonskega in češkega dresnika (Šoln in sod., 2021b), smo spremembe opazili tudi na območju meristema. Predvsem se je povečala vakuolizacija celic, ki so jo opazili tudi pri tretmaju s kumarinom (Aliotta in sod., 1993) in izvlečkom tujerodne bučke (*Sicyos deppei*) (Cruz-Ortega in sod., 1998). Alelopatski stres bi lahko vodil do prežgodnje diferenciacije meristemskih celic v korenini in s tem do manjše velikosti meristema (Araniti in sod., 2017).

Eden izmed dejavnikov za spremembe celic v koreninskem vršičku redkvice bi lahko bil tudi oksidativni stres. Izpostavitve različnim okoljskim stresnim dejavnikom, med katerimi je tudi alelopatija, lahko poviša sintezo in akumulacijo ROS v celicah tarčnih rastlin, kar vodi do poškodb makromolekul v celicah in s tem posledično tudi do sprememb v rasti (Šoln in sod., 2022). Eden izmed pokazateljev stresa je lipidna peroksidacija (Das in Roychoudhury, 2014). Čeprav je lipidna peroksidacija pogosto razlog za zavrto rast korenin (Yu in sod., 2003; Farhoudi in Lee, 2013), je bila pri naši raziskavi lipidna peroksidacija povišana, a razlike večinoma niso bile statistično značilne. Na to je lahko vplivalo tudi dejstvo, da je bilo zaradi velikega propadanja rastlin po tretmaju z 10 % izvlečki število preživelih rastlin nizko in s tem tudi numerus. Po drugi strani pa se lahko rastline na alelopatski stres odzivajo različno: izvleček modroplodnice (*Callicarpa acuminata*) je skoraj za polovico zavrnil rast korenin paradižnika (*Solanum lycopersicum*) in v njih povišal lipidno peroksidacijo, medtem ko se po tretiranju koruze nista spremenili ne dolžina korenin ne lipidna peroksidacija (*Zea mays*) (Cruz-Ortega in sod., 2002).

Glavni zaščitni mehanizem pred ROS so antioksidanti: encimski antioksidanti katalitično odstranjujejo ROS; neencimski antioksidanti pa delujejo kot lovilci ROS in jih nevtralizirajo (Das in Roychoudhury, 2014). Eden izmed pomembnih elementov, ki vpliva na delovanje antioksidativnega sistema, je Ti (Carbajal-Vázquez in sod., 2022). V okviru svoje raziskave elementne sestave z EDXRF smo ugotovili, da se v koreninah

redkvic, tretiranih z izvlečki dresnikov, zmanjša koncentracija Ti. To bi lahko vplivalo tudi na neencimske antioksidante, saj je vrednost TAC v koreninah tretiranih redkvic kljub alelopatskemu stresu ostala na ravni kontrole. Carbajal-Vázquez in sod. (2022) v svoji študiji opisujejo, da Ti poviša antioksidativno aktivnost v koreninah paradižnika, izpostavljenega slanosti.

V koreninah redkvic, tretiranih z izvlečki dresnikov, se je zmanjšala tudi koncentracija Fe. Tudi ta element ima pomembno vlogo pri antioksidativnem obrambnem mehanizmu, predvsem pri encimskih antioksidantih. Peroksidaze so velika družina encimov, ki so pomembne za detoksifikacijo  $H_2O_2$ , v svoji strukturi pa vsebujejo Fe (Imam in sod., 2017). V rastlinskih celicah je katalaza aktivna ob visokih koncentracijah  $H_2O_2$ , nizke koncentracije  $H_2O_2$  pa odstranjujejo peroksidaze (Gechev in sod., 2006; Das in Roychoudhury, 2014). V okviru svoje raziskave smo izmerili encimsko aktivnost G-POD, a je bila aktivnost v koreninah tretiranih redkvic celo pod aktivnostjo pri kontrolnih rastlinah. Čeprav razlike niso bile statistično značilne (verjetno zaradi prej opisanega nizkega numerusa), bi na nižjo aktivnost G-POD vseeno lahko vplivala tudi nižja koncentracija Fe v koreninah in s tem posledično manj delujočih encimov.

Nadalje smo ugotovili, da izvlečki dresnikov v koreninah redkvice močno povešajo vsebnost Cl. Klor je eden izmed esencialnih mikronutrientov pri višjih rastlinah. Sodeluje kot kofaktor pri fotosintezi in regulira aktivnost nekaterih encimov, npr. amilazo in asparagin sintazo, v višjih koncentracijah pa je lahko strupen (Colmenero-Flores in sod., 2019). Iz tega sklepamo, da bi lahko tudi povišana vsebnost Cl v koreninah tretiranih redkvic vplivala na njihovo rast in razvoj. Poleg tega je povišana vrednost Cl znak, ki kaže na poškodbe celičnih membran (Colmenero-Flores in sod., 2019). Vrednost Cl je bila povišana v koreninah redkvic, ki smo jih izpostavili 1 % izvlečkoma, medtem ko redkvic pri tretmajih z 10 % izvlečkoma zaradi propada nismo mogli analizirati. Glede na to, da so bile pri 10 % tretmajih korenine redkvice krajše in z znaki poškodb, sklepamo, da bi bil pri njih dvig Cl še bolj izrazit.

Hkrati je bila povišana koncentracija Cl tudi v hipokotilu tretiranih redkvic, ki se po masi sicer niso razlikovale glede na kontrolne rastline. Le pri tretmaju z 10 % izvlečkom češkega dresnika je bila masa hipokotila za skoraj 90 % nižja. Zanimivo je, da smo pri podobnem dolgotrajnem poskusu, kjer smo redkvice gojili v zemlji s posušenimi listi češkega dresnika, ugotovili, da tak tretma močno poveča maso hipokotila redkvice (Dolenc Koce in Šoln, 2018). A verjetno je bila koncentracija alelopatskih snovi pri obeh poskusih različna. Poleg tega so v primerjavi s posušenim materialom alelopatske snovi v izvlečkih bolj dostopne, ker so raztopljene, posledično pa imajo tudi bolj zaviralen učinek. Pri nadaljnjih analizah bi bilo zato po eni strani smiselno preučiti morebitne blagodejne učinke nižjih koncentracij izvlečkov obeh dresnikov na biomaso korenine in hipokotila redkvice, po drugi strani pa še podrobneje analizirati spremembe glavne korenine, predvsem med 7. in 14. dnem, ko se opazno dogaja regeneracija rasti korenin.

Z dolgotrajnejšim ravnim poskusom smo torej ugotovili, da ima največji alelopatski potencial 10 % vodni izvleček češkega dresnika, ki je v prvih dneh povzročil propad več kot 90 % testnih rastlin. Propad testnih rastlin je povzročil tudi tretma z 10 % izvlečkom japonskega dresnika. Posledično smo lahko preučevali le rastline, ki so preživele, kar je zaradi znižanega numerusa povzročalo težave z zagotavljanjem dovolj velike količine biomase za biokemijske in elementne analize. V prihodnje bi bilo zato smiselno poskus ponoviti le z 10 % koncentracijo obeh izvlečkov, a z večjim številom testnih rastlin.



## 5.5 OVREDNOTENJE LABORATORIJSKIH POSKUSOV ZA PREUČEVANJE ALELOPATIJE Z VIDIKA OKOLJSKE RELEVANTNOSTI

V okviru doktorskega dela smo analizirali alelopatski vpliv izvlečkov japonskega (*F. japonica*) in češkega dresnika (*F. ×bohemica*) v kontroliranih laboratorijskih pogojih. Preučevali smo alelopatski vpliv pri kratkotrajni in dolgotrajni izpostavitvi. Prednost kratkotrajnih poskusov v petrijevkah je prihranek časa in večja možnost za dodatne ponovitve. Po drugi strani pa je rast kalic na filtrirnem papirju in na vodoravni podlagi, vse prej kot približek rasti v naravi. Z molekulskimi analizami smo ugotovili, da se v koreninah kalic poveča izražanje genov, ki so povezani s fotosintezo, kar je prej kot alelopatsko delovanje posledica rasti korenin na svetlobi. Pri dolgotrajnejših raziskavah smo se poskusili bolj približati naravnim razmeram, tako da smo koreninam testnih rastlin omogočili rast v temi in v smeri gravitacije. A pri daljših poskusih je poleg časovne zahtevnosti velik izziv tudi dovolj velik numerus. Tako zaradi velikega propadanja rastlin, kar je bilo posledica izpostavitve izvlečkom, na koncu nismo mogli izvesti vseh biokemijskih in elementnih analiz, ki smo jih želeli. V prihodnjih poskusih z rizoboksi bi bilo zato smiselno podvojiti numerus preučevanih rastlin s 30 na 60.

Pri raziskavah alelopatije je pogosto pomemben dejavnik koncentracija izvlečka oz. posamezne alelokemikalije. V naravi so koncentracije alelokemikalij v tleh praviloma zelo nizke, med  $10^{-5}$  do  $10^{-6}$  M (Gniazdowska in Bogatek, 2005). Pri laboratorijskih poskusih se po navadi pripravi koncentracijsko vrsto, s katero določimo minimalno inhibitorno koncentracijo. V svojih preliminarnih poskusih, ki v tem doktorskem delu niso opisani, smo na kalicah redkvice testirali koncentracije dresnikovih vodnih izvlečkov 0,5 %, 1 %, 2 %, 5 % in 10 %. Izkazalo se je, da sta najbolj reprezentativni 1 % in 10 % koncentracija.

Delovanje alelokemikalij je pogosto koncentracijsko-odvisno. Višje koncentracije imajo praviloma večji (negativni) vpliv na izpostavljene rastline kot nižje koncentracije. Zaradi tega moramo pri interpretaciji rezultatov preučiti, ali gre za fitotoksičen vpliv ali dejansko alelopatski. Ker različne raziskave alelopatije uporabljajo različne koncentracije rastlinskih izvlečkov, je neposredna primerjava med poskusi otežena. Nenamerne spremembe koncentracije pa lahko povzroči tudi dodatno zalivanje z vodo, predvsem pri dolgotrajnejših poskusih.

Na rezultate poskusa pomembno vpliva tudi izbor testne rastline, saj so različne rastlinske vrste na posamezne alelokemikalije različno občutljive. Tako npr. Cruz-Ortega in sod. (2002) v svoji študiji opisujejo, da 1 % izvleček modroplodnice (*Callicarpa acuminata*) skoraj za polovico zavrte rast korenine kalic paradižnika, medtem ko rast korenine kalic fižola in koruze ni bila prizadeta. Tudi izpostavitvev 0,25 mM cimetovi kislini skoraj prepolovi biomaso korenin in poganjkov kalic kumare (*Cucumis sativus*), a hkrati nima

praktično nobenega vpliva na kalice smokvolistne buče (*Cucurbita ficifolia*) (Ding in sod., 2007).

V okviru tega doktorskega dela smo ugotovili, da je redkvice zelo dobra testna rastlina pri raziskavah alelopatije, saj se hitro odzove na alelopatski stres. Poleg občutljivosti je redkvice primerna tudi zato, ker ima hitro kaleča semena. Medtem ko semena koruze v povprečju kalijo po 3-4 dneh, semena redkvice večinoma skalijo v 24 urah (Dolenc Koce in Šoln, 2018), kar omogoča lažjo in hitrejšo izvedbo poskusov. V primerjavi s sicer standardno modelno rastlino, navadni repnjakovec (Araniti in sod. 2018), pa imajo kalice redkvice tudi precej kompaktno in robustno glavno korenino. To omogoča lažjo pripravo vzorcev za analize z elektronskim mikroskopom.

Ker smo vse poskuse izvedli v kontroliranih laboratorijskih pogojih, lahko o morfološkem, biokemijskem, histološkem, ultrastrukturnem in molekulskem odzivu vrtna redkvice govorimo zgolj kot o potencialnem mehanizmu alelopatskega delovanja pri dresnikih. V prihodnje bi bilo ta mehanizem delovanja alelopatije smiselno preizkusiti tudi na drugih testnih rastlinah ter z drugimi alelopatskimi rastlinami. Nadalje bi morali ta potencialni mehanizem alelopatskega delovanja preizkusiti tudi v naravi. Razmere v naravi so namreč precej bolj kompleksne kot v laboratoriju, saj na posamezno rastlino ne vpliva zgolj morebitna alelopatska rastlina v bližini, ampak tudi drugi abiotski in biotski dejavniki. Pred samimi poskusi v naravi (npr. poljski poskusi) bi bilo v laboratorijskih pogojih smiselno testirati tudi hkraten vpliv dveh ali treh spremenljivk, kjer bi npr. poleg alelopatskega stresa preučevali tudi vpliv senčenja. Hitra rasti, gosti sestoji in posledično senčenje bližnjih rastlin je namreč pri dresnikih prav tako zelo učinkovit mehanizem pri kolonizaciji novega okolja (Mincheva in sod., 2016).

Poleg poskusov v naravi bi se torej v prihodnje lahko usmerili tudi v podrobnejše analize propadanja korenin po alelopatskem stresu na celičnem nivoju: ali in kako posamezne alelokemikalije vstopijo v celico, katere signalne poti sprožijo, kje se skladiščijo, kako se razgradijo itd. Podrobneje bi lahko preučili tudi ultrastrukturne spremembe posameznih organelov, predvsem ER in mitohondrijev, za katere smo v okviru tega doktorskega dela ugotovili, da jih alelopatski stres močno spremeni.

## 6 SKLEPI

Analiza izvlečkov – *F. japonica* in *F. ×bohemica*:

Izvlečka korenin japonskega in češkega dresnika, ki smo jih nabrali jeseni in analizirali s HPLC, sta vsebovala resveratrol, epikatehin, katehin in emodin. Metanolni izvlečki so vsebovali več alelokemikalij kot vodni. Izvleček japonskega dresnika je vseboval več resveratrola, v izvlečku češkega dresnika pa je bilo več preostalih preučevanih alelokemikalij. Korenike japonskega in češkega dresnika, ki smo jih nabrali poleti, iz njih pripravili etanolni izvleček in ga analizirali z NMR, so vsebovale resveratrol, epikatehin in emodin (katehina nismo preverjali). Korenike češkega dresnika so vsebovale večjo maso resveratrola kot korenike japonskega, masa epikatehina in emodina pa je bila podobna. Najpogostejši elementi v vodnih izvlečkih korenin japonskega in češkega dresnika so bili K, Ca, Cl, Fe, S. Izvlečka z 10 % koncentracijo sta vsebovala višjo količino elementov kot 1 % izvlečka. Več Cr je bilo v izvlečku japonskega dresnika, medtem ko je bilo v izvlečku češkega dresnika več Cl, Ca, Fe in Mn. S tem smo potrdili prvo hipotezo: »Izvlečka korenin japonskega in češkega dresnika se razlikujeta glede na vsebnost alelopatskih spojin resveratrol, epikatehin in emodin.«

Alelopatski vpliv na morfološke lastnosti kalic vrtno redkvice:

10 % vodna izvlečka japonskega in češkega dresnika sta zavrla kalitev semen redkvice, medtem ko 1 % izvlečka na kalitev nista vplivala. Vodni izvlečki so močno vplivali na dolžino in biomaso korenin redkvice: korenine so bile krajše in lažje pri obeh 10 % izvlečkih in pri 1 % izvlečku japonskega dresnika. Na dolžino in maso poganjka večinoma ni bilo vpliva. Metanolni izvlečki obeh dresnikov so imeli bolj zaviralen vpliv na kalice vrtno redkvice kot posamezne alelokemikalije resveratrol, epikatehin in emodin ter mešanica vseh treh. Izvlečki so zavrli kalitev semen, korenine tretiranih kalic so bile krajše v primerjavi s kontrolnimi. Delovanje tako vodnih kot metanolnih izvlečkov je bilo koncentracijsko pogojeno, razlik med vrstama dresnika ni bilo. Pri tretmajih z alelokemikalijami so imele redkvice krajše korenine pri 0,6 mg/ml epikatehinu in mešanici, dolžina je bila podobno zavrta kot pri 1 % izvlečkih. Najkrajše korenine so bile pri tretmajih z 10 % izvlečki. Poganjki niso bili prizadeti, le pri mešanici je bila njihova dolžina krajša. S tem smo potrdili drugo hipotezo: »Izvlečka korenin japonskega in češkega dresnika ter posamezne alelopatske spojine (resveratrol, epikatehin, emodin) koncentracijsko odvisno vplivajo na morfološke značilnosti korenin vrtno redkvice.«

Alelopatski vpliv na histološke in ultrastrukturne lastnosti korenine kalic vrtno redkvice:

Analiza površine korenine s SEM je pokazala, da izvlečki dresnikov vplivajo na koreninsko čepico, še posebej 10 % izvlečka. Pri slednjih so bile na površini koreninske čepice vidne izrazite odebelitve celične stene. Spremembe so bile tudi na območju

diferenciacije: pri tretmaju z 10 % izvlečkom japonskega dresnika so imele korenine manj koreninskih laskov, pri 10 % izvlečku češkega dresnika pa korenine koreninskih laskov sploh niso imele. Vodna izvlečka obeh dresnikov sta vplivala na zgradbo koreninskega vršička redkvice: število slojev koreninske čepice se je spremenilo (pri tretmaju z izvlečkom češkega dresnika se je število prepolovilo), sloji zunanjih celic koreninske čepice so kazali znake propada, celice so bile manjše. Območje apikalnega meristema korenine je bilo težje prepoznavno, celice so bile večje in bolj vakuolizirane kot pri kontrolni skupini. Vodna izvlečka obeh dresnikov sta vplivala na ultrastrukturne značilnosti korenin pri kalicah redkvice. V celicah koreninske čepice tretiranih redkvic je plazmalema odstopila od celične stene, v matriksu mitohondrijev so bile razvidne elektronsko prosojne regije, številne cisterne ER so bile razširjene in napolnjene z elektronsko gosto vsebino (t. i. ER-telesca), v citoplazmi so bili okrogli in elektronsko gosti vključki. Celice v območju meristema kontrolnih in tretiranih rastlin so se med seboj razlikovale po obliki in prisotnosti vakuol. Celice pri tretiranih kalicah so bile večje in bolj vakuolizirane, pri mitohondrijih so bile opazne elektronsko prosojne regije v matriksu, v citoplazmi so bili prisotni okrogli in elektronsko gosti vključki. S tem smo potrdili tretjo hipotezo: »Izvlečka korenin japonskega in češkega dresnika vplivata na histološke značilnosti koreninskega vršička redkvice ter ultrastrukturne značilnosti apikalnega meristema korenine in koreninske čepice.«

Alelopatski vpliv na oksidativni stres v koreninah kalic vrtna redkvice:

V koreninah kalic redkvice, ki so bile izpostavljene vodnim izvlečkom dresnikov, so se spremenili tudi nekateri biokemijski parametri oksidativnega stresa: TAC je bil povišan pri tretmaju z 10 % izvlečkom japonskega dresnika, MDA je ostal na ravni kontrole. Pri 10 % izvlečkih je bila v koreninah redkvic močno povišana koncentracija celokupnega glutationa in celokupnega cisteina, koncentracija celokupnega askorbata pa se je zmanjšala. Oksidirane oblike glutationa in askorbata so večinoma ostale na ravni kontrole, povišal se je le delež cisteina. Poleg tega smo ugotovili, da izvlečki spremenijo izražanje genov, ki so povezani z askorbatno-glutationskim ciklom. V korenini tretiranih redkvic je bilo povišano izražanje genov za sintezo glutationa *de novo*, gena za encim DHAR, ki povezuje askorbatni in glutationski cikel, ter več genov za antioksidativne encime (APX, GPX, CAT). Pri tretmaju z 10 % vodnim izvlečkom češkega dresnika je bilo izražanje genov bolj izrazito kot pri 10 % izvlečku japonskega dresnika. Koncentracija prolina je bila povišana v koreninah redkvic, tretiranih z 10 % izvlečki, najbolj pri izvlečku češkega dresnika. Metanolni izvlečki dresnikov so v koreninah kalic redkvice povišali MDA in TAC. Manjši vpliv so imeli tretmaji z alelokemikalijami, kjer je bil MDA na ravni kontrole, TAC pa je bil povišan v koreninah redkvic, izpostavljenih 0,6 mg/ml resveratrolu in emodinu ter mešanici. V kalicah redkvic, izpostavljenih metanolnim izvlečkom in alelokemikalijam, so se z DAB najbolj temno obarvale korenine, predvsem območje koreninskega vršička. To nakazuje na povišano sintezo in akumulacijo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v koreninah. S tem smo potrdili četrto hipotezo: »Izvlečka korenin

japonskega in češkega dresnika vplivata na izbrane biokemijske parametre, ki so povezani z oksidativnim stresom (lipidna peroksidacija, vsebnost neencimskih antioksidantov, lokalizacija vodikovega peroksida).«

Alelopatski vpliv na pojav programirane celične smrti v koreninah kalice vrtna redkvice:

Preučili smo tudi povezavo med alelopatskim delovanjem izvlečkov in celično smrtjo. Vodni izvlečki dresnikov so vplivali na aktivnost kaspazam in metakaspazam podobnih proteaz v koreninah redkvice. Pri tretmaju z 10 % vodnim izvlečkom japonskega dresnika se je povišala kaspazam podobna aktivnost pri substratih YVAD, DEVD, VEID in VDVAD. Pri obeh 10 % izvlečkih se je v koreninah izpostavljenih redkvic povišala tudi aktivnost metakaspazam podobnih proteaz. Poleg tega se je v koreninah tretiranih redkvic povišalo izražanje genov, ki so povezani s PCD, predvsem genov iz proteinske družine proteaz in genov za metakaspaze. S tem smo potrdili peto hipotezo: »Izvečka korenin japonskega in češkega dresnika vplivata na aktivnost proteaznih encimov v korenini redkvice in na izražanje genov, ki so povezani s programirano celično smrtjo.«

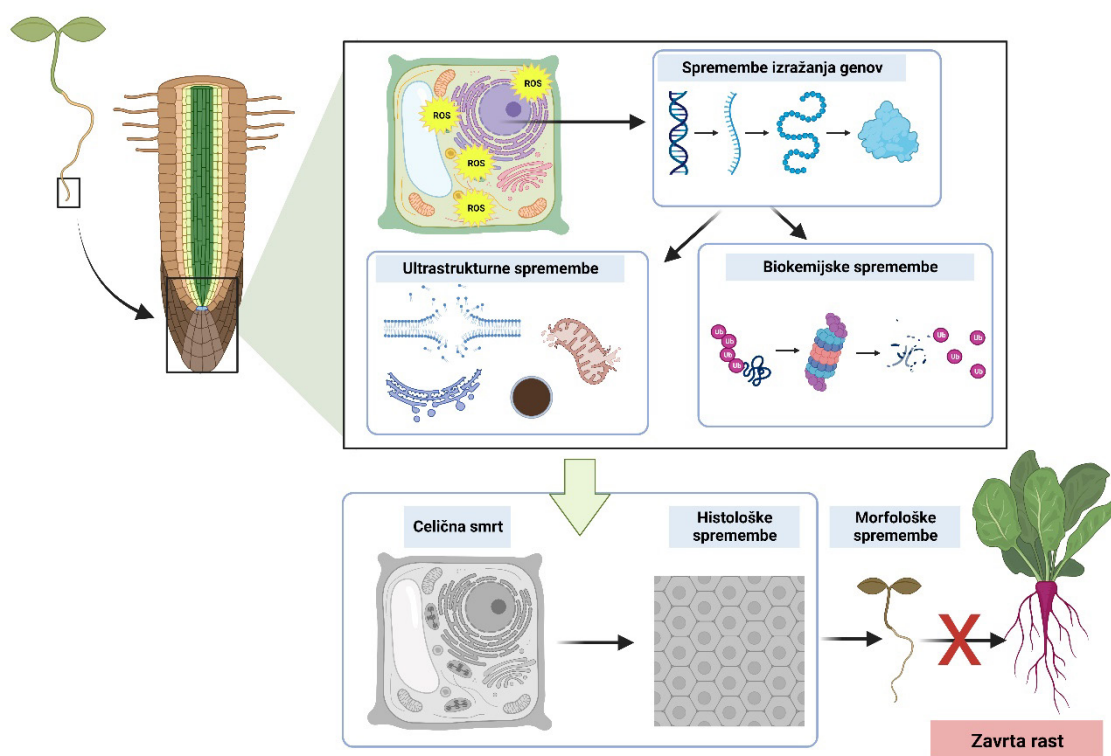
Alelopatski vpliv na vrtna redkvice v daljši časovni skali:

Pri daljši, 22-dnevni izpostavitvi izvlečkom in rasti v rizoboksih so imeli vodni izvlečki dresnikov koncentracijsko pogojen vpliv na rast vrtna redkvice, najbolj zaviralen vpliv je imel 10 % izvleček češkega dresnika, pri katerem je propadla večina redkvic, masa njihovih korenin in hipokotila pa je bila nižja v primerjavi s kontrolo. Podoben zaviralni vpliv je imel tudi 10 % izvleček japonskega dresnika, medtem ko 1 % izvlečki niso imeli takega vpliva. Rast glavne korenine je bila močno zavirana pri obeh 10 % izvlečkih dresnikov. Po 14 dneh (in do konca poskusa) je bila nato dolžina korenine pri preživelih redkvicah podobna kontrolnim. Izvlečki so vplivali tudi na število in čas izraščanja stranskih korenin. Najmanj stranskih korenin so imele redkvice pri 10 % izvlečku češkega dresnika, tudi njihova rast je bila zakasnjena. Redkvice so imele po 22 dneh od izpostavitve izvlečkom najbolj spremenjeno koreninsko čepico: pri tretmajih z 10 % izvlečki se je število slojev koreninske čepice zmanjšalo, opazni so bili znaki propadanja, celice so bile ožje in krajše. Območje apikalnega meristema korenine je bilo pri tretiranih redkvicah manj opazno, v celicah so bile vidne vakuole. Biokemijski parametri oksidativnega stresa (MDA, TAC, G-POD) v koreninah redkvic po 22-dnevni izpostavitvi izvlečkom dresnikov večinoma niso bili značilno različni od kontrole, to je mogoče posledica nizkega numerusa zaradi propadanja rastlin. Tretirane redkvice so imele po 22 dneh v koreninah in hipokotilu povišano koncentracijo Cl ter nižjo koncentracijo Ti in Fe v koreninah v primerjavi s kontrolo. Šesto hipotezo smo delno potrdili: »Po dolgotrajnejši izpostavitvi izvlečkom so negativne spremembe pri testni rastlini bolj izražene kot po kratkotrajni izpostavitvi, kar kaže na alelopatsko delovanje izvlečkov.« Izvlečki višje koncentracije so imeli namreč tako močan vpliv, da je večina vrtnih redkvic propadla v prvi tretjini poskusa. Zaradi tega po koncu dolgotrajnejše

izpostavitve pri njih nismo mogli analizirati histoloških in biokemijskih značilnosti, ampak smo to lahko naredili le pri preživelih rastlinah.

Potencialni mehanizem alelopatije pri invazivnih dresnikih:

Glavna ugotovitev tega doktorskega dela je, da izvlečki dresnikov najbolj prizadenejo rast korenine izpostavljenih rastlin, kar se kaže tako na morfološkem, histološkem in ultrastrukturnem kot na biokemijskem in molekularnem nivoju. Na podlagi poskusov, ki smo jih izvedli v treh sklopih, lahko predpostavimo potencialni mehanizem delovanja alelopatije pri invazivnih dresnikih (Sl. 37). Dresnikove alelokemikalije prizadenejo predvsem koreninski vršiček izpostavljenih rastlin, kjer v celicah koreninske čepice in meristema vplivajo na ultrastrukturo mitohondrijev in ER ter sprožijo oksidativni stres. Alelopatija povzroča tudi aktivnost različnih proteaznih encimov in povzroči izrazite ultrastrukturne spremembe, predvsem celic koreninske čepice. To vodi v celično smrt in propad koreninskega tkiva. Posledično so korenine izpostavljenih rastlin krajše, sčasoma pa lahko celotna rastlina propade.



**Slika 37:** Prikaz potencialnega mehanizma alelopatije pri invazivnih dresnikih. Izvlečki dresnikov so vplivali predvsem na koreninski vršiček vrtna redkvice, kjer so izzvali oksidativni stres, povzročili spremembe izražanja genov ter ultrastrukturne in biokemijske spremembe. To je vodilo v celično smrt, kar je povzročilo propadanje koreninskega tkiva. Posledično je bila korenina krajša, zaradi česar rastlina slabše raste in v nekaterih primerih sčasoma tudi v celoti propade (Slika: K. Šoln).

Dresnikove alelokemikalije vplivajo predvsem na kalitev in zgodnjo rast rastlin. Kasneje pa dresniki omejujejo uspevanje ostalih rastlin s svojo hitro rastjo in senčenjem. V naravi namreč poleg alelopatije na samo rast rastlin vplivajo tudi številni drugi abiotski in biotski dejavniki. S svojimi laboratorijskimi poskusi smo dobili vpogled v potencialni alelopatski mehanizem, v nadaljevanju pa bi pred kakršnokoli aplikativno nadgradnjo svoje zaključke morali preveriti tudi v naravi, npr. s poljskimi poskusi.

Prispevek doktorskega dela k razvoju znanosti in možnost aplikativne nadgradnje:

Pomemben prispevek tega doktorskega dela k razvoju znanosti je predvsem v celovitem vpogledu v delovanje alelopatije, in sicer na različnih ravneh, od morfološkega, histološkega in ultrastrukturnega, do biokemijskega in molekulskega. Poleg tega lahko ultrastrukturne analize koreninskega vršička služijo kot učni pripomoček za odličen vpogled v samo celično strukturo korenine, ki je zaradi svoje občutljivosti in težavnosti pri pripravi vzorcev pogosto prezrta. Preučili smo tudi aktivnost proteaznih encimov in izražanje genov, povezanih s PCD v koreninah tretiranih rastlin, kar nam omogoča boljši vpogled v razumevanje povezave med alelopatijo in PCD. Nenazadnje pa smo preučili alelopatski vpliv v daljši časovni skali in tako postavili osnovo za nadaljnje študije v smeri aplikativne vrednosti alelopatije.

Možnosti v aplikativni nadgradnji tega doktorskega dela so predvsem pri upravljanju z invazivnimi tujerodnimi vrstami ter razvoju bioherbicidov in alelopatskih poljščin.

Boljše poznavanje mehanizma delovanja alelopatije nam bo omogočilo, da lahko pripravimo učinkovitejše strategije za omejitev širjenja invazivnih dresnikov in drugih tujerodnih rastlin, predvsem tistih z dokazanim alelopatskim delovanjem. Smiselno bi bilo tudi preučiti, katere rastline bolje prenašajo dresnikove alelokemikalije in na kakšen način so se rastline na dresnikove alelokemikalije prilagodile v Aziji, od koder dresnik izvira.

Raziskave alelopatije so pomembne tudi za kmetijstvo, saj lahko z znanjem o alelopatiji pripomoremo k večjemu donosu pridelka in zmanjšamo težave s plevelom. Ena izmed možnosti je razvoj bioherbicidov, predvsem iz posameznih izoliranih alelokemikalij. Ker so te snovi naravnega izvora, v primerjavi s komercialnimi herbicidi ne onesnažujejo podtalnice, s čimer se posredno ohranja tako naravo kot zdravje ljudi.

Druga možnost je posaditev alelopatske rastline na polje, da bi po eni strani zavirala rast plevelnih rastlin in hkrati ne bi škodovala zeleni poljski rastlini. Na tak način bi se izognili pletju. Še bolj inovativna rešitev pa bi bilo sajenje alelopatskih poljščin, kar pomeni, da bi posadili rastline z alelopatskim potencialom, ki bi same zavrle rast okoliškega plevela. Problem je, da je tudi veliko plevelnih rastlin alelopatskih. Prav to pa tudi v prihodnje ponuja številne nove izzive tako pri preučevanju mehanizma alelopatije kot pri poskusih v naravi.

## 7 POVZETEK

### 7.1 POVZETEK

Rastline med seboj tekmujejo za naravne vire. Ena izmed strategij, ki jim izboljša možnosti za preživetje, je alelopatija, tj. pojav, ko rastline sproščajo v svojo okolico sekundarne metabolite (alelokemikalije), ki na rast bližnjih rastlin vplivajo večinoma zaviralno. Alelopatija je pogost dodatni mehanizem tudi pri invazivnih tujerodnih rastlinah. V Sloveniji sta precej problematična japonski (*Fallopia japonica*) in češki dresnik (*F. ×bohemica*), ki največ alelokemikalij vsebujeta v koreninah. Namen naše raziskave je bil ugotoviti, kakšen je vpliv izvlečkov korenin obeh dresnikov na korenine kalic vrtno redkvice tako na strukturnem, biokemijskem, molekulskem kot na ultrastrukturnem nivoju. Poleg tega smo z analizo izvlečkov obeh dresnikov želeli primerjati njun alelopatski potencial z vplivom posameznih dresnikovih alelokemikalij na rast kalic redkvice. Naš namen pa je bil tudi preučiti daljši vpliv na korenine redkvice po enkratnem tretiranju z izvlečki.

S tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) in z <sup>1</sup>H nuklearno magnetno resonančno spektroskopijo (NMR) smo analizirali vsebnost izbranih alelokemikalij v izvlečkih korenin japonskega in češkega dresnika, z rentgensko fluorescenčno spektroskopijo s popolnim odbojem (TXRF) pa smo določili njuno elementno sestavo.

Za ugotavljanje vpliva na vrtno redkvico smo iz posušenih, zmletih in liofiliziranih korenin pripravili vodne izvlečke s koncentracijama 1 % in 10 %. Pripravili smo tudi metanolne izvlečke enakih koncentracij ter raztopine alelokemikalij resveratrol, epikatehin in emodin (v koncentracijah 0,2 mg/ml in 0,6 mg/ml ter mešanico). Semena vrtno redkvice (*Raphanus sativus* L.) smo kalili na filtrirnem papirju v plastičnih petrijevkah pri sobnih razmerah. Tretirane rastline smo zalili z izvlečki dresnikov, kontrolne pa z destilirano vodo. V primeru metanolnih izvlečkov in alelokemikalij smo z njimi najprej zalili filtrirni papir, ga posušili, da je metanol izhlapel, nanj položili semena ter nato vse omočili z destilirano vodo. V posamezni petrijevki je bilo 50 semen. Poskus, ki je trajal 3 dni, smo izvedli s 5 neodvisnimi ponovitvami. Po koncu poskusa smo prešteli število kaljenih semen ter kalice fotografirali. Z računalniškim programom ImageJ smo na fotografijah izmerili dolžino korenine in poganjka. Stehtali smo svežo biomaso korenin ter jih zamrznili s tekočim dušikom za nadaljnje biokemijske analize, za nekatere analize pa smo vzorce tudi liofilizirali. V koreninah smo spektrofotometrično izmerili koncentracijo proteinov in biokemijske parametre oksidativnega stresa: vsebnost malondialdehida (MDA) kot pokazatelja lipidne peroksidacije in koncentracijo neencimskih antioksidantov (TAC). Pri tretmajih z metanolnimi izvlečki in alelokemikalijami smo z barvanjem z diaminobenzidinom (DAB) določili prisotnost in razporeditev H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> v kalicah. Vse nadaljnje analize pa smo izvedli le na koreninah kalic redkvice, ki smo jih tretirali z vodnimi izvlečki. S HPLC smo v koreninah izmerili



vsebnost celokupnih in oksidiranih tiolov (glutation in cistein) ter celokupnega in oksidiranega askorbata, spektrofotometrično smo izmerili koncentracijo prolina, fluorimetrično pa kaspazam in metakaspazam podobno aktivnost. Korenine smo fiksirali, posušili pri kritični točki in njihovo površino analizirali z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM). Koreninske vršičke smo prav tako fiksirali ter pripravili poltanke rezine, ki smo jih pregledali s svetlobnim mikroskopom. Z računalniškim programom ImageJ smo na fotografijah izmerili dolžino in širino celic v prvih treh zunanjih slojih koreninske čepice. Iz istih vzorcev koreninskih vršičkov smo pripravili ultratanke rezine, ki smo jih analizirali s presevnim elektronskim mikroskopom (TEM): osredotočili smo se na celice koreninske čepice in apikalnega meristema korenine. Iz koreninskih vršičkov smo izolirali RNA ter z visokozmogljivim sekvenciranjem RNA (RNA-Seq) in anotacijo transkriptoma pridobili informacije o izražanju genskih skupin in genov.

Dolgotrajnejši rastni poskus je potekal v rizoboksih, ozkih plastičnih škatlah z zatemnjenimi stranicami, ki omogočajo rast korenin navzdol. Semena redkvice smo nakalili in po 3 dneh kalice z enako dolgimi koreninami prenesli v vermikulit v rizoboksu. V vsakem rizoboksu je bilo po 6 redkvic, za vsak tretma smo uporabili po 5 rizoboksov. Redkvice smo zalili z 1 % in 10 % vodnimi izvlečki japonskega in češkega dresnika. Poskus je potekal v rastni komori 22 dni, v tem času smo vse rastline zalivali samo z destilirano vodo. Med poskusom smo rizobokse 2-krat na teden skenirali ter z računalniškim programom ImageJ izmerili velikost glavne korenine ter prešteli stranske korenine. Na koncu poskusa smo ločeno stehali korenine, liste in gomoljasto odebeljeni hipokotil. Korenine smo zamrznili s tekočim dušikom za spektrofotometrične analize, povezane z oksidativnim stresom: vsebnost MDA, TAC in aktivnost antioksidativnega encima gvajakol peroksidaze (G-POD). Koreninske vršičke smo fiksirali in pripravili poltanke rezine, ki smo jih pregledali s svetlobnim mikroskopom. Z računalniškim programom ImageJ smo na fotografijah izmerili dolžino in širino celic v prvih treh zunanjih slojih koreninske čepice. Korenine in hipokotil smo po koncu poskusa zamrznili in liofilizirali za analizo elementne sestave z energijsko disperzijsko rentgensko fluorescenčno spektrometrijo (EDXRF).

Izvlečka korenin japonskega in češkega dresnika sta imela podobno sestavo alelokemikalij, razlikovala sta se glede vsebnosti resveratrola pri obeh terminih vzorčenja. S HPLC smo v vodnih in metanolnih izvlečkih potrdili prisotnost resveratrola, epikatehina, katehina in emodina. Največji delež je predstavljal epikatehin, metanolni izvlečki so vsebovali več alelokemikalij kot vodni. Tako vodni kot metanolni izvleček japonskega dresnika sta vsebovala več resveratrola, v izvlečkih češkega dresnika pa je bilo več preostalih preučevanih alelokemikalij. Dodatno smo z NMR v koreninah obeh dresnikov potrdili resveratrol, epikatehin in emodin. Prav tako je bilo največ epikatehina. Korenike češkega dresnika so vsebovale več resveratrola kot korenike japonskega, masa epikatehina in emodina pa je bila podobna. Razlike med rezultati analiz HPLC in NMR so lahko posledica različnih metodoloških postopkov. Poleg tega bi na različno vsebnost

lahko vplivala tudi rastišče in čas vzorčenja (poleti, jeseni). S TXRF smo analizirali elementno sestavo in ugotovili, da v vodnih izvlečkih obeh dresnikov prevladujejo K, Ca, Cl, Fe, S. V izvlečku japonskega dresnika je bilo več Cr, v izvlečku češkega pa več Cl, Ca, Fe in Mn.

Pri kratkotrajnem poskusu smo ugotovili, da 10 % vodni izvlečki zavrejo kalitev semen ter močno vplivajo na dolžino korenine in njeno biomaso. Manjši (negativni) učinek so imeli 1 % izvlečki. Korenine tretiranih redkvic so kazale znake oksidativnega stresa. Spremenili so se predvsem antioksidanti: TAC in celokupni tioli (glutatiton, cistein) so se povišali, medtem ko se je koncentracija celokupnega askorbata znižala, kar sovпада tudi s spremembami v izražanju genov, ki so povezani z askorbatno-glutationskim ciklom. Močno povišana je bila tudi koncentracija prolina, kar prav tako nakazuje na oksidativni stres, ki lahko sčasoma sproži celično smrt. V raziskavi smo ugotovili, da se v koreninah redkvice poviša aktivnost kaspazam podobnih proteaz (predvsem pri substratih YVAD, DEVD, VEID in VDVAD) in metakaspazam podobnih proteaz. Hkrati je bilo v koreninah tretiranih redkvic povišano izražanje genov, ki so povezani z razgradnjo proteinov in celično smrtjo. Spremenjena je bila tudi površina korenin pri redkvicah, tretiranih z 10 % izvlečkoma: na površini koreninske čepice so bile vidne odebelitve celične stene. V območju diferenciacije je bilo pri tretmaju z 10 % izvlečkom japonskega dresnika koreninskih laskov manj, pri 10 % izvlečku češkega dresnika pa jih korenine sploh niso imele. Izvlečki so vplivali tudi na zgradbo koreninskega vršička in povzročili propad zunanjih celic koreninske čepice, hkrati so bile celice tudi manjše. Pri tretmaju z 10 % izvlečkom češkega dresnika je bila koreninska čepica sestavljena iz pol manj slojev kot pri kontrolnih rastlinah. Spremenjena rast je lahko povezana z avksini in citoskeletom, saj se je v koreninah tretiranih redkvic povišalo izražanje nekaterih genov, ki so povezani s transportom avksina, in zavrlo izražanje genov, povezanih z mikrotubuli. V celicah koreninske čepice tretiranih redkvic so se pojavile številne ultrastrukturne spremembe: odstop plazmaleme od celične stene, prosojne regije v matriksu mitohondrijev, prisotnost razširjenih cistern ER, napolnjenih z elektronsko gosto vsebino (ER-telesca). V citoplazmi je bilo tudi veliko okroglih in elektronsko gostih vključkov. Območje apikalnega meristema korenine je bilo pri tretiranih redkvicah težje prepoznavno zaradi večjih in bolj vakuoliziranih celic. Tudi v teh celicah smo opazili poškodovane mitohondrije in okrogle, elektronsko goste vključke v citoplazmi.

Primerjava vpliva metanolnih izvlečkov japonskega in češkega dresnika ter posameznih alelokemikalij je pokazala, da imata izvlečka večji alelopatski potencial, saj sta zavrla kalitev semen, korenine tretiranih redkvic so bile krajše, v njih sta se povišala tako MDA kot TAC, kar kaže na oksidativni stres. Izmed alelokemikalij sta imela na korenino redkvice največji vpliv 0,6 mg/ml epikatehina in mešanica, pri obeh je bila rast zavrta podobno kot pri 1 % izvlečkih. Pri resveratrolu in emodinu (pri obeh 0,6 mg/ml) ter mešanici se je povišal tudi TAC. Pri vseh tretmajih so se po barvanju z DAB najbolj temno obarvali koreninski vršički, kar kaže na povečano sintezo in kopičenje H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Pri dolgotrajnem poskusu z rizoboksi je imel najbolj zaviralen vpliv 10 % izvleček češkega dresnika, pri katerem je propadlo več kot 90 % redkvic. Preživele redkvice so imele v primerjavi s kontrolo manjšo maso korenin in gomoljastega hipokotila. Visok zaviralni vpliv je imel tudi 10 % izvleček japonskega dresnika, medtem ko je bil tretma z 1 % izvlečkoma po vseh izmerjenih značilnostih podoben kot kontrolni. Oba 10 % izvlečka sta pri preživelih redkvicah zavrla rast glavne korenine, od 14. dne dalje pa je ta dosegala podobne dolžine kot pri kontrolnih rastlinah. Tudi biokemijski pokazatelji oksidativnega stresa (MDA, TAC, G-POD) po koncu poskusa v koreninah niso bili povišani. To kaže na veliko plastičnost koreninskega sistema, ki se po prenehanju stresnega dejavnika lahko ponovno obnovi. Izvlečka sta v času trajanja poskusa vplivala tudi na stranske korenine, predvsem na (zakasnen) čas izraščanja in na njihovo število. Nanje je imel najbolj negativen vpliv 10 % izvleček češkega dresnika. Po 22 dneh od izpostavitve izvlečkom so imele korenine redkvic nekoliko spremenjeno koreninsko čepico, kar se je odražalo predvsem kot ožje in krajše celice, z znaki propadanja. Tudi območje apikalnega meristema korenine je bilo pri tretiranih redkvicah manj opazno in bolj diferencirano (tj. bolj vakuolizirano). Tako v koreninah kot v hipokotilu tretiranih redkvic se je povišala koncentracija Cl, kar bi lahko nakazovalo na propadanje celičnih membran. Hkrati je bilo v njihovih koreninah manj Ti in Fe.

V svoji raziskavi smo ugotovili, da imajo izvlečki dresnikov večji alelopatski vpliv na kalice redkvice kot na odrasle rastline. Eden izmed možnih mehanizmov zavrite rasti korenine pri alelopatskem delovanju bi lahko bil preko oksidativnega stresa in programirane celične smrti.

## 7.2 SUMMARY

Plants compete for natural resources. One of their strategies for increasing their chances of survival is allelopathy, i. e. a phenomenon in which plants release secondary compounds (allelochemicals) into the environment, thereby inhibiting the growth of neighboring plants. Allelopathy is also a common additional mechanism for invasive alien plants. In Slovenia, Japanese knotweed (*Fallopia japonica*) and Bohemian knotweed (*F. ×bohemica*), which contain the most allelochemicals in their rhizomes, are very problematic. The aim of our study was to investigate the effect of rhizome extracts of both knotweed on radish root at morphological, biochemical, molecular, and ultrastructural levels. In addition, by analyzing the extracts of both knotweeds we aimed to compare their allelopathic potential with the influence of individual knotweed allelochemicals on radish seedling growth. Our aim was also to investigate the long-lasting influence on radish roots after a single treatment with the extracts.

Using high pressure liquid chromatography (HPLC) and <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), we analyzed the content of selected allelochemicals in rhizome extracts of *F. japonica* and *F. ×bohemica* and estimated their elemental composition using total reflection X-ray fluorescence (TXRF).

To study the effect on radish, aqueous extracts were prepared from dried, ground, and lyophilized rhizomes at concentrations of 1% and 10%. Methanol extracts with similar concentrations were prepared as well as allelochemical solutions of resveratrol, epicatechin and emodin (at concentrations of 0.2 mg/ml and 0.6 mg/ml and the mixture). Radish seeds (*Raphanus sativus* L.) germinated on filter paper in plastic Petri dishes under room conditions. Treated plants were irrigated with knotweed extracts, and control plants were irrigated with distilled water. For the methanol extracts and allelochemicals, the filter paper was first irrigated, then dried so that the methanol evaporated, then the seeds were placed on the filter paper and then everything was irrigated with distilled water. There were 50 seeds in each Petri dish. The experiment lasted for 3 days, 5 independent replicates were performed. After the experiment, all germinated seeds were counted, and the seedlings were photographed. The computer program ImageJ was used to measure root and shoot length from the photographs. The fresh root biomass was weighed and frozen in liquid nitrogen for further biochemical analyzes, and some samples were also lyophilized for some analyzes.

In the roots, protein concentration and some oxidative-stress related parameters were measured spectrophotometrically: malondialdehyde (MDA) content as a marker of lipid peroxidation and total antioxidative capacity (TAC) concentration. In the treatments with methanol extracts and allelochemicals, we also performed staining with diaminobenzidine (DAB) to determine the presence and localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the seedlings. All other analyzes were performed only on seedlings treated with aqueous

extracts. By HPLC, the content of total and oxidized thiols (glutathione and cysteine) and total and oxidized ascorbate was measured, proline concentration was determined spectrophotometrically, and caspase- and metacaspase-like activity was measured fluorometrically. Roots were fixed, critical point dried, and their surface analyzed by scanning electron microscope (SEM). The root tips were also fixed, and semi-thin sections were prepared, which were then examined with the light microscope. The computer program ImageJ was used to measure the length and width of the cells from the first three outer layers of the root cap from the photographs. Ultrathin sections were also made from the same samples of root tips, which were then analyzed using the transmission electron microscope (TEM): we focused on the cells from the root cap and the root apical meristem. RNA was isolated from the root tips, and RNA-Sequencing (RNA-Seq) and transcriptome annotation were used to obtain information on the expression of gene groups and genes.

The long-term growth experiment was conducted in rhizoboxes, narrow plastic boxes, with black sides that allow root grow downwards. Radish seeds were germinated and after 3 days, the seedlings with the same root length were transplanted into vermiculite in the rhizobox. There were 6 radishes in each rhizobox, and 5 rhizoboxes were used for each treatment. The radishes were irrigated with 1% and 10% aqueous extracts of *F. japonica* and *F. ×bohemica*, respectively. The experiment was conducted in the growth chamber for 22 days, and in the meantime the plants were irrigated with the distilled water only. During the experiment, the rhizoboxes were scanned twice a week, and the computer program ImageJ was used to measure the length of the primary root and to count the lateral roots. At the end of the experiment, roots, leaves, and swollen hypocotyl were weighed separately. Roots were frozen with liquid nitrogen to perform spectrophotometrically analyzes associated with oxidative stress: MDA content, TAC, and the activity of the antioxidative enzyme guaiacol peroxidase (G-POD). The root tips were fixed, and semi-thin sections were prepared, which were then examined with the light microscope. The computer program ImageJ was used to measure the length and width of the cells from the first three outer layers of the root cap from the photographs. The roots and hypocotyl were frozen and lyophilized after the experiment for the elemental composition analysis using energy dispersive X-ray fluorescence (EDXRF).

Rhizome extracts of *F. japonica* and *F. ×bohemica* had a similar composition of allelochemicals in both sampling terms, they differed in the content of resveratrol. By HPLC, we confirmed the presence of resveratrol, epicatechin, catechin, and emodin in aqueous and methanol extracts.

Epicatechin accounted for the highest percentage, and methanol extracts contained more allelochemicals than aqueous ones. Both aqueous and methanol extracts of *F. japonica* contained more resveratrol, and extracts of *F. ×bohemica* contained more other allelochemicals studied. In addition, resveratrol, epicatechin, and emodin were confirmed

in the rhizomes of both knotweeds by NMR. Epicatechin similarly accounted for the largest proportion. Rhizomes of *F. ×bohemica* contained more resveratrol than rhizomes of *F. japonica*, the mass of epicatechin and emodin was similar. The difference between the results of HPLC and NMR analysis could be the result of different methodological procedures. In addition, different contents could also be influenced by location, and sampling time (summer, autumn). TXRF analysis of elemental composition showed that K, Ca, Cl, Fe, S predominated in the aqueous extracts of both knotweeds. More Cr was present in the extract of *F. japonica*, and more Cl, Ca, Fe, and Mn were present in the extracts of *F. ×bohemica*.

In the short-term experiment, the 10% aqueous extracts inhibited seed germination and had strong effects on the roots length and their biomass. A lesser (negative) effect was by the 1% extracts. The roots of treated radishes showed signs of oxidative stress. Most of the changes were related to antioxidants: TAC and total thiols (glutathione, cysteine) increased, while the concentration of total ascorbate decreased, which coincided with the changes in the expression of genes related to the ascorbate-glutathione cycle. The concentration of proline was greatly increased, which also indicates on oxidative stress, that can lead to cell death over time. In the study, it was shown that in the radish roots, the activity of caspase-like proteases (especially by the YVAD, DEVD, VEID, and VDVAD substrates) and metacaspase-like proteases was increased. At the same time, the expression of genes related to protein degradation and cell death was up-regulated in the root of treated radishes. The root surface of radishes treated with 10% extracts was also altered: a thickening of the cell wall was observed at the surface of the root cap. In the differentiation zone, fewer root hairs were present when treated with 10% extract of *F. japonica*, while when treated with 10% extract of *F. ×bohemica*, the roots did not even have any. The extracts affected the structure of the root tip by causing the destruction of the outer root cap cells, which were also smaller. When treated with 10% extract of *F. ×bohemica*, the root cap consisted of half fewer cell layers than in the control plants. The altered growth could be related to auxins and the cytoskeleton, as the expression of some genes related to auxin transport was up-regulated, while genes related to microtubules were down-regulated in the roots of treated radishes. Several ultrastructural changes occurred in the root cap cells of treated radishes: the plasmalemma was detached from the cell wall, damage to the mitochondrial matrix was visible, the appearance of dilated ER cisternae with electron dense content (i.e. ER bodies). There were many spherical and electron dense inclusions in the cytoplasm. The zone of the root apical meristem of treated radishes was more difficult to detect due to larger and more vacuolated cells. Transparent regions in mitochondrial matrix and spherical electron dense inclusions in the cytoplasm were also observed in these cells.

Comparison between the effect of *F. japonica* and *F. ×bohemica* methanol extracts and the individual allelochemicals showed that the extracts had higher allelopathic potential, as they inhibited seed germination, the roots of treated radishes were shorter, MDA and

TAC increased, indicating oxidative stress. Of the allelochemicals 0.6 mg/ml epicatechin and the mixture showed the greatest effect on radish root, both inhibited growth to a similar extent as 1% extracts. Resveratrol and emodin (both 0.6 mg/ml) and the mixture also increased TAC. In all treatments, root tips were stained after staining with DAB, indicating increased synthesis and accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

In the long-term rhizobox experiment, 10% extract of *F. ×bohemica* had the strongest inhibitory effect, with more than 90% radishes decayed. The surviving radishes had reduced mass of root and swollen hypocotyl compared to the control. The 10% extract of *F. japonica* also had a high inhibitory effect, while treatments with 1% extracts were comparable to the control for all parameters measured. Both 10% extracts inhibited primary root growth in all surviving radishes, and after 14 days, root remained similar in length to control plants. Biochemical parameters related to oxidative stress (MDA, TAC, G-POD) also did not increase in the roots after the experiment. This indicates a high plasticity of the root system, which can regenerate once the stressor is removed. During the experiment, the extracts also affected the lateral roots, especially the (delayed) timing of their appearance and their number. On them, the 10% extract of *F. ×bohemica* had the strongest negative effect. After 22 days of exposure to the extracts, radish roots showed slight changes in the root cap, mainly in the form of narrower and shorter cells with signs of destruction. The root apical meristem area was also less conspicuous and more differentiated (i.e., more vacuolized) in the treated radishes. In both the roots and hypocotyl, the concentration of Cl increased in the treated radishes, which could indicate on the damage of cell membranes. At the same time, less Ti and Fe were present in their roots.

In our study, we found that knotweed extracts had a stronger allelopathic effect on radish seedlings than on mature plants. One of the mechanisms for the inhibited root growth after allelopathic action could be due to oxidative stress and programmed cell death.

## 8 VIRI

- Abdelmigid H. M., Morsi M. M. 2017. Cytotoxic and molecular impacts of allelopathic effects of leaf residues of *Eucalyptus globulus* on soybean (*Glycine max*). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15, 2: 297-302
- Adamakis I. D. S., Eleftheriou E. P. 2019. Structural evidence of programmed cell death induction by tungsten in root tip cells of *Pisum sativum*. *Plants*, 8, 3: 62, doi: 10.3390/plants8030062: 17 str.
- Agathokleous E., Kitao M., Calabrese E. J. 2019. Hormesis: A Compelling Platform for Sophisticated Plant Science. *Trends in Plant Science*, 24, 4: 318-327
- Aliotta G., Cafiero G., Fiorentino A., Strumia S. 1993. Inhibition of radish germination and root growth by coumarin and phenylpropanoids. *Journal of Chemical Ecology*, 19, 2: 175-183
- Araniti F., Bruno L., Sunseri F., Pacenza M., Forgiione I., Bitonti M. B., Abenavoli M. R. 2017. The allelochemical farnesene affects *Arabidopsis thaliana* root meristem altering auxin distribution. *Plant Physiology and Biochemistry*, 121: 14-20
- Araniti F., Costas-Gil A., Cabeiras-Freijanes L., Lupini A., Sunseri F., Reigosa M. J., Abenavoli M. R., Sánchez-Moreiras A. 2018. Rosmarinic acid induces programmed cell death in *Arabidopsis* seedlings through reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction. *Plos One*, 13, 12: e0208802, doi: 10.1371/journal.pone.0208802: 26 str.
- Babula P., Adam V., Kizek R., Sladký Z., Havel L. 2009. Naphthoquinones as allelochemical triggers of programmed cell death. *Environmental and Experimental Botany*, 65, 2–3: 330-337
- Babula P., Vaverkova V., Poborilova Z., Ballova L., Masarik M., Provaznik I. 2014. Phytotoxic action of naphthoquinone juglone demonstrated on lettuce seedling roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 84: 78-86
- Bailey J. P., Bímová K., Mandák B. 2009. Asexual spread versus sexual reproduction and evolution in Japanese Knotweed s.l. sets the stage for the “battle of the Clones.” *Biological Invasions*, 11, 5: 1189-1203
- Bais H. P., Vepachedu R., Gilroy S., Callaway R. M., Vivanco J. M. 2003. Allelopathy and exotic plant invasion: From molecules and genes to species interactions. *Science*, 301, 5638: 1377-1380



- Baranova E. N., Chaban I. A., Kononenko N. V., Gulevich A. A., Kurenina L. V., Smirnova E. A. 2019. Ultrastructural changes of organelles in root cap cells of tobacco under salinity. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact, and Applied Sciences*, 73, 1: 47-55
- Batish D. R., Singh H. P., Setia N., Kaur S., Kohli R. K. 2006. 2-Benzoxazolinone (BOA) induced oxidative stress, lipid peroxidation and changes in some antioxidant enzyme activities in mung bean (*Phaseolus aureus*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 44, 11–12: 819-827
- Berchová-Bimová K., Soltysiak J., Vach M. 2014. Role of different taxa and cytotypes in heavy metal absorption in knotweeds (*Fallopia*). *Scientia Agriculturae Bohemica*, 45, 1: 11-18
- Bimová K., Mandák B., Pyšek P. 2003. Experimental study of vegetative regeneration in four invasive Reynoutria taxa (Polygonaceae). *Plant Ecology*, 166, 1, doi: 10.1023/A:1023299101998: 11 str.
- Böhmová P., Šoltés R. 2017. Accumulation of selected element deposition in the organs of *Fallopia japonica* during ontogeny. *Oecologia Montana*, 26: 35-46
- Bringmann M., Landrein B., Schudoma C., Hamant O., Hauser M.-T., Persson S. 2012. Cracking the elusive alignment hypothesis: the microtubule-cellulose synthase nexus unraveled. *Trends in Plant Science*, 17, 11: 666-674
- Burgos N. R., Talbert R. E., Kim K. S., Kuk Y. I. 2004. Growth inhibition and root ultrastructure of cucumber seedlings exposed to allelochemicals from rye (*Secale cereale*). *Journal of Chemical Ecology*, 30, 3: 671-689
- Callaway R. M., Aschehoug E. T. 2000. Invasive plants versus their new and old neighbors: A mechanism for exotic invasion. *Science*, 290, 5491: 521-523
- Cappuccino N., Arnason J. T. 2006. Novel chemistry of invasive exotic plants. *Biology Letters*, 2, 2: 189-193
- Carbajal-Vázquez V. H., Gómez-Merino F. C., Alcántar-González E. G., Sánchez-García P., Trejo-Téllez L. I. 2022. Titanium increases the antioxidant activity and macronutrient concentration in tomato seedlings exposed to salinity in hydroponics. *Plants*, 11, 1036: doi: <https://doi.org/10.3390/plants11081036>: 17 str.
- Chen B. M., Liao H. X., Chen W. Bin, Wei H. J., Peng S. L. 2017. Role of allelopathy in plant invasion and control of invasive plants. *Allelopathy Journal*, 41, 2: 155-166
- Chen H., Tuck T., Ji X., Zhou X., Kelly G., Cuerrier A., Zhang J. 2013. Quality

- assessment of Japanese knotweed (*Fallopia japonica*) grown on Prince Edward Island as a source of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 26: 6383-6392
- Cheng F., Cheng Z. 2015. Research progress on the use of plant allelopathy in agriculture and the physiological and ecological mechanisms of allelopathy. *Frontiers in Plant Science*, 6, 11: doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01020>: 16 str.
- Cheng F., Cheng Z. H., Meng H. W. 2016. Transcriptomic insights into the allelopathic effects of the garlic allelochemical diallyl disulfide on tomato roots. *Scientific Reports*, 6, 3: doi: <https://doi.org/10.1038/srep38902>: 14 str.
- Cheng W., Gao J., Yue C., Zhang W. 2013. Simultaneous determination of five active ingredients in yixintong tablet by HPLC. *Asian Journal of Chemistry*, 26, 15: 4782-4784
- Chi W. C., Fu S. F., Huang T. L., Chen Y. A., Chen C. C., Huang H. J. 2011. Identification of transcriptome profiles and signaling pathways for the allelochemical juglone in rice roots. *Plant Molecular Biology*, 77, 6: 591-607
- Chichkova N. V., Shaw J., Galiullina R. A., Drury G. E., Tuzhikov A. I., Kim S. H., Kalkum M., Hong T. B., Gorshkova E. N., Torrance L., Vartapetian A. B., Taliansky M. 2010. Phytaspase, a relocatable cell death promoting plant protease with caspase specificity. *EMBO Journal*, 29, 6: 1149-1161
- Ciniglia C., Mastrobuoni F., Scortichini M., Petriccione M. 2015. Oxidative damage and cell-programmed death induced in *Zea mays* L. by allelochemical stress. *Ecotoxicology*, 24, 4: 926-937
- Colmenero-Flores J. M., Franco-Navarro J. D., Cubero-Font P., Peinado-Torrubia P., Rosales M. A. 2019. Chloride as a beneficial macronutrient in higher plants: New roles and regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 19: doi: <https://doi.org/10.3390/ijms20194686>: 32 str.
- Craine J. M., Dybzinski R. 2013. Mechanisms of plant competition for nutrients, water and light. *Functional Ecology*, 27, 4: 833-840
- Cruz-Ortega R., Anaya A. L., Hernández-Bautista B. E., Laguna-Hernández G. 1998. Effects of allelochemical stress produced by *Sicyos deppei* on seedling root ultrastructure of *Phaseolus vulgaris* and *Cucurbita ficifolia*. *Journal of Chemical Ecology*, 24, 12: 2039-2057
- Cruz-Ortega R., Ayala-Cordero G., Anaya A. L. 2002. Allelochemical stress produced by

- the aqueous leachate of *Callicarpa acuminata*: Effects on roots of bean, maize, and tomato. *Physiologia Plantarum*, 116, 1: 20-27
- da Silva F., Vieira E. A. 2019. Phytotoxic potential of *Senna occidentalis* (L.) Link extracts on seed germination and oxidative stress of Ipê seedlings. *Plant Biology*, 21, 4: 770-779
- Das K., Roychoudhury A. 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2, 53: doi: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>: 13 str.
- Dassonville N., Vanderhoeven S., Gruber W., Meerts P. 2007. Invasion by *Fallopia japonica* increases topsoil mineral nutrient concentrations. *Ecoscience*, 14, 2: 230-240
- Ding J., Sun Y., Xiao C. L., Shi K., Zhou Y. H., Yu J. Q. 2007. Physiological basis of different allelopathic reactions of cucumber and figleaf gourd plants to cinnamic acid. *Journal of Experimental Botany*, 58, 13: 3765-3773
- Dolenc Koce J., Šoln K. 2018. Phytotoxic effects of *Fallopia japonica* and *F. ×bohemica* leaves. *Phyton-Annales Rei Botanicae*, 57, 1–2: 47-58
- Fan P., Hay A. E., Marston A., Lou H., Hostettmann K. 2009. Chemical variability of the invasive neophytes *Polygonum cuspidatum* Sieb. and Zucc. and *Polygonum sachalinensis* F. Schmidt ex Maxim. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37, 1: 24-34
- Fan P., Hostettmann K., Lou H. 2010. Allelochemicals of the invasive neophyte *Polygonum cuspidatum* Sieb. & Zucc. (Polygonaceae). *Chemoecology*, 20, 3: 223-227
- Farhoudi R., Lee D. J. 2013. Allelopathic effects of barley extract (*Hordeum vulgare*) on sucrose synthase activity, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activities of hordeum spontaneum and avena ludoviciana. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 83, 3: 447-452
- Farooq N., Abbas T., Tanveer A., Jabran K. 2020. Allelopathy for Weed Management. V: Co-Evolution of Secondary Metabolites. Mérillon J. M., Ramawat K. G. (eds.). London, Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-96397-6>: 505-519

- Filiz E., Ozyigit I. I., Saracoglu I. A., Uras M. E., Sen U., Yalcin B. 2019. Abiotic stress-induced regulation of antioxidant genes in different *Arabidopsis* ecotypes: microarray data evaluation. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 33, 1: 128-143
- Foyer C. H., Noctor G. 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*, 17, 7: 1866-1875
- Frantík T., Kovářová M., Koblihová H., Bartůňková K., Nývltová Z., Vosátka M. 2013. Production of medically valuable stilbenes and emodin in knotweed. *Industrial Crops and Products*, 50: 237-243
- Gasperl A., Zellnig G., Kocsy G., Müller M. 2022. Organelle specific localisation of glutathione in *Arabidopsis* grown under different light intensities and spectra. *Histochemistry and Cell Biology*, doi: <https://doi.org/10.22443/rms.emc2020.874>: 15 str.
- Gechev T. S., Van Breusegem F., Stone J. M., Denev I., Laloi C. 2006. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays*, 28, 11: 1091-1101
- Ghimire B. K., Ghimire B., Yu C. Y., Chung I.-M. 2019. Allelopathic and Autotoxic Effects of *Medicago sativa*—Derived Allelochemicals. *Plants*, 8, 233, doi:10.3390/plants8070233: 18 str.
- Glavnik V., Vovk I., Albrecht A. 2017. High performance thin-layer chromatography–mass spectrometry of Japanese knotweed flavan-3-ols and proanthocyanidins on silica gel plates. *Journal of Chromatography*, 1482: 97-108
- Gniazdowska A., Bogatek R. 2005. Allelopathic interactions between plants. Multi site action of allelochemicals. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27, 3: 395-407
- Gniazdowska A., Krasuska U., Andrzejczak O., Soltys D. 2015. Allelopathic Compounds as Oxidative Stress Agents: Yes or NO. V: Reactive Oxygen and Nitrogen Species Signaling and Communication in Plants. Gupta A. U., Igamberdiev K. J. (ed.). Švica, Springer International Publishing: 155-176
- Gürbüz O., Göçmen D., Dagdelen F., Gürsoy M., Aydın S., Şahin I., Büyükuysal L., Usta M. 2007. Determination of flavan-3-ols and trans-resveratrol in grapes and wine using HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry*, 100, 2: 518-525
- Han J. J., Lin W., Oda Y., Cui K. M., Fukuda H., He X. Q. 2012. The proteasome is

- responsible for caspase-3-like activity during xylem development. *Plant Journal*, 72, 1: 129–141
- Hara-Nishimura I., Matsushima R. 2003. A wound-inducible organelle derived from endoplasmic reticulum: A plant strategy against environmental stresses? *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 6: 583-588
- Hasanuzzaman M., Borhannuddin Bhuyan M. H. M., Anee T. I., Parvin K., Nahar K., Al Mahmud J., Fujita M. 2019. Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. *Antioxidants*, 8, 9: 384, doi: <https://doi.org/10.3390/antiox8090384>: 50 str.
- Hasanuzzaman M., Nahar K., Anee T. I., Fujita M. 2017. Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23, 2: 249-268
- Hatsugai N., Yamada K., Goto-Yamada S., Hara-Nishimura I. 2015. Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. *Frontiers in Plant Science*, 6, doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00234>: 11 str.
- Hayat S., Cheng Z., Ahmad H., Ali M., Chen X., Wang M. 2016. Garlic, from remedy to stimulant: Evaluation of antifungal potential reveals diversity in phytoalexin allicin content among garlic cultivars; allicin containing aqueous garlic extracts trigger antioxidants in Cucumber. *Frontiers in Plant Science*, 7, doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01235>: 15 str.
- He R., Drury G. E., Rotari V. I., Gordon A., Willer M., Farzaneh T., Woltering E. J., Gallois P. 2008. Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by ultraviolet light and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 2: 774-783
- Hejl A. M., Koster K. L. 2004. Juglone disrupts root plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity and impairs water uptake, root respiration, and growth in soybean (*Glycine max*) and corn (*Zea mays*). *Journal of Chemical Ecology*, 30, 2: 453-471
- Hierro J. L., Callaway R. M. 2003. Allelopathy and exotic plant invasion. *Plant and Soil*, 256, 1: 29-39
- Imam M. U., Zhang S., Ma J., Wang H., Wang F. 2017. Antioxidants mediate both iron homeostasis and oxidative stress. *Nutrients*, 9, 7, doi: <https://doi.org/10.3390/nu9070671>: 19 str.
- Imatomi M., Novaes P., Gualtieri S. C. J. 2013. Interspecific variation in the allelopathic

- potential of the family Myrtaceae. *Acta Botanica Brasilica*, 27, 1: 54-61
- Inderjit, Wardle D. A., Karban R., Callaway R. M. 2011. The ecosystem and evolutionary contexts of allelopathy. *Trends in Ecology and Evolution*, 26, 12: 655-662
- Jambunathan N. 2010. Determination and Detection of Reactive Oxygen Species (ROS), Lipid Peroxidation and Electrolyte Leakage in Plants. V: *Plant Stress Tolerance, Methods in Molecular Biology*. Sunkar R. (ed.). Oklahoma, Humana Press: 295
- Jmii G., Khadhri A., Haouala R. 2020. *Thapsia garganica* allelopathic potentialities explored for lettuce growth enhancement and associated weed control. *Scientia Horticulturae*, 262: 109068, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109068>: 9 str.
- Kohli P. S., Maurya K., Thakur J. K., Bhosale R., Giri J. 2022. Significance of root hairs in developing stress-resilient plants for sustainable crop production. *Plant Cell and Environment*, 45, 3: 677-694
- Kumpf R. P., Nowack M. K. 2015. The root cap: A short story of life and death. *Journal of Experimental Botany*, 66, 19: 5651-5662
- Kwiatkowska M., Stepiński D., Popłońska K., Wojtczak A., Polit J. T. 2011. "Elaioplasts" identified as lipotubuloids in *Althaea rosea*, *Funkia sieboldiana* and *Vanilla planifolia* contain lipid bodies connected with microtubules. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 80, 3: 211-219
- Lara-Núñez A., Romero-Romero T., Ventura J. L., Blancas V., Anaya A. L., Cruz-Ortega R. 2006. Allelochemical stress causes inhibition of growth and oxidative damage in *Lycopersicon esculentum* Mill. *Plant, Cell and Environment*, 29, 11: 2009-2016
- Lara-Núñez A., Sánchez-Nieto S., Luisa Anaya A., Cruz-Ortega R. 2009. Phytotoxic effects of *Sicyos deppei* (Cucurbitaceae) in germinating tomato seeds. *Physiologia Plantarum*, 136, 2: 180-192
- Lee S. H. 2002. Chilling root temperature causes rapid ultrastructural changes in cortical cells of cucumber (*Cucumis sativus* L.) root tips. *Journal of Experimental Botany*, 53, 378: 2225-2237
- Li P., Ding L., Zhang L., He J., Huan Z. 2019. Weisiensin B inhibits primary and lateral root development by interfering with polar auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 139: 738-745
- Li Z. H., Wang Q., Ruan X., Pan C. De, Jiang D. A. 2010. Phenolics and plant allelopathy.

Molecules, 15, 12: 8933-8952

- Li Z., Xing D. 2011. Mechanistic study of mitochondria-dependent programmed cell death induced by aluminium phytotoxicity using fluorescence techniques. *Journal of Experimental Botany*, 62, 1: 331-343
- Liszak A., van der Zalm E., Schopfer P. 2004. Production of reactive oxygen intermediates ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , and  $\cdot OH$ ) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiology*, 136, 2: 3001-3114
- Liu J., Hasanuzzaman M., Wen H., Zhang J., Peng T., Sun H., Zhao Q. 2019. High temperature and drought stress cause abscisic acid and reactive oxygen species accumulation and suppress seed germination growth in rice. *Protoplasma*, 256, 5: 1217-1227
- Lohse M., Nagel A., Herter T., May P., Schroda M., Zrenner R., Tohge T., Fernie A. R., Stitt M., Usadel B. 2014. Mercator: A fast and simple web server for genome scale functional annotation of plant sequence data. *Plant, Cell and Environment*, 37, 5: 1250-1258
- Lowe S., Browne M., Boudjelas S., De Porter M. 2000. 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the global invasive species database. New Zealand, The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN): 11 str. [www.issg.org/booklet.pdf](http://www.issg.org/booklet.pdf) (1. mar. 2022)
- Lupini A., Araniti F., Sunseri F., Abenavoli M. R. 2014. Coumarin interacts with auxin polar transport to modify root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, 74, 1: 23-31
- Mahdavi F., Saharkhiz M. J., Karami A. 2017. Defensive response of radish seedlings to the oxidative stress arising from phenolic compounds in the extract of peppermint (*Mentha × piperita* L.). *Scientia Horticulturae*, 214: 133-140
- Majeed A., Chaudhry Z., Muhammad Z. 2012. Allelopathic assessment of fresh aqueous extracts of *Chenopodium album* L. for growth and yield of wheat (*Triticum Aestivum* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 44, 1: 165-167
- Mincheva T., Barni E., Siniscalco C. 2016. From plant traits to invasion success: Impacts of the alien *Fallopia japonica* (Houtt.) Ronse Decraene on two native grassland species. *Plant Biosystems*, 150, 6: 1348-1357
- Minina E. A., Staal J., Alvarez V. E., Berges J. A., Berman-Frank I., Beyaert R., Bidle K.

- D., Bornancin F., Casanova M., Cazzulo J. J., Choi C. J., Coll N. S., Dixit V. M., Dolinar M., Fasel N., Funk C., Gallois P., Gevaert K., Gutierrez-Beltran E., Hailfinger S., Klemenčič M., Koonin E. V., Krappmann D., Linusson A., Machado M. F. M., Madeo F., Megeney L. A., Moschou P. N., Mottram J. C., Nyström T., Osiewacz H. D., Overall C. M., Pandey K. C., Ruland J., Salvesen G. S., Shi Y., Smertenko A., Stael S., Ståhlberg J., Suárez M. F., Thome M., Tuominen H., Van Breusegem F., van der Hoorn R. A. L., Vardi A., Zhivotovsky B., Lam E., Bozhkov P. V. 2020. Classification and Nomenclature of Metacaspases and Paracaspases: No More Confusion with Caspases. *Molecular Cell*, 77, 5: 927-929
- Mitić N., Stanišić M., Savić J., Čosić T., Stanisavljević N., Miljuš-Đukić J., Marin M., Radović S., Ninković S. 2018. Physiological and cell ultrastructure disturbances in wheat seedlings generated by *Chenopodium murale* hairy root exudate. *Protoplasma*, 255, 6: 1683-1692
- Mohammadkhani N., Servati M. 2017. Nutrient concentration in wheat and soil under allelopathy treatments. *Journal of Plant Research*, 131, 1: 143-155
- Mootha V. K., Lindgren C. M., Eriksson K.-F., Subramanian A., Sihag, S., Lehar J., Puigserver P., Carlsson E., Ridderstråle M., Laurila E., Houstis N., Daly M. J., Patterson N., Mesirov J. P., Golub T. R., Tamayo P., Spiegelman B., Lander E. S., Hirschhorn J. N., Altshuler D., Groop L. C. 2003. PGC-1 $\alpha$ -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature Genetics*, 34, 3: 267-273
- Moravcová L., Pyšek P., Jarošík V., Zákavský P. 2011. Potential phytotoxic and shading effects of invasive *Fallopia* (Polygonaceae) taxa on the germination of native dominant species. *NeoBiota*, 9: 31-47
- Mráz M., Šoltés R. 2015. *Fallopia japonica* (Houtt.) Ronse Decr. as bioindicator of pollution in the experimental study area Ružomberok. *Oecologia Montana*, 24: 41-49
- Murrell C., Gerber E., Krebs C., Parepa M., Schaffner U., Bossdorf O. 2011. Invasive knotweed affects native plants through allelopathy. *American Journal of Botany*, 98, 1: 38-43
- Mustafa G., Ali A., Ali S., Barbanti L., Ahmad M. 2019. Evaluation of dominant allelopathic weed through examining the allelopathic effects of four weeds on germination and seedling growth of six crops. *Pakistan Journal of Botany*, 51, 1: 269-278
- Nečemer M., Kump P., Ščančar J., Jačimović R., Simčič J., Pelicon P., Budnar M., Jeran Z., Pongrac P., Regvar M., Vogel-Mikuš K. 2008. Application of X-ray fluorescence



analytical techniques in phytoremediation and plant biology studies. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 63, 11: 1240-1247

Osredkar J. 2012. Oksidativni stres. *Zdravniški Vestnik*, 81: 393-406

Patni B., Chandra H., Prakash Mishra A., Kumar Guru S., Vitalini S., Iriti M. 2018. Rice allelopathy in weed management - An integrated approach. *Cellular and Molecular Biology*, 64, 8: 84-93

Pennell R. I., Lamb C. 1997. Programmed Cell Death in Plants. *The Plant Cell*, 9, 7: 1157-1168

Pereira L. A. R., Pina G. O., Silveira C. E. S., Gomes S. M., Toledo J. L., Borghetti F. 2017. Effects of *Eugenia dysenterica* L. extracts on roots and gravitropism of *Sesamum indicum* L. and *Raphanus sativus* L. *Allelopathy Journal*, 42, 1: 3-19

Piola F., Bellvert F., Meiffren G., Rouifed S., Walker V., Comte G., Bertrand C. 2013. Invasive *Fallopia × bohémica* interspecific hybrids display different patterns in secondary metabolites. *Ecoscience*, 20, 3: 230-239

Potters G., Pasternak T. P., Guisez Y., Palme K. J., Jansen M. A. K. 2007. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science*, 12, 3: 98-105

Qu T., Du X., Peng Y., Guo W., Zhao C., Losapio G. 2021. Invasive species allelopathy decreases plant growth and soil microbial activity. *PLoS ONE*, 16, 2: e0246685, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246685>: 12 str.

Ramšak Ž., Petek M., Baebler Š. 2021. RNA Sequencing analyses for deciphering potato molecular responses. V: *Solanum tuberosum*. *Methods in Molecular Biology*. Dobnik D., Gruden K., Ramšak Ž., Coll A. (eds.). New York, Humana: 57-94

Reichardt S., Repper D., Tuzhikov A. I., Galiullina R. A., Planas-Marquès M., Chichkova N. V., Vartapetian A. B., Stintzi A., Schaller A. 2018. The tomato subtilase family includes several cell death-related proteinases with caspase specificity. *Scientific Reports*, 8, 1, doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28769-0>: 14 str.

Ritchie M. E., Phipson B., Wu D., Hu Y., Law C. W., Shi W., Smyth G. K. 2015. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43, 7: e47, doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>: 13 str.

Roach, T., Stöggel, W., Baur, T., & Kranner, I. 2018. Distress and eustress of reactive

- electrophiles and relevance to light stress acclimation via stimulation of thiol/disulphide-based redox defences. *Free Radical Biology and Medicine*, 122: 65-73
- Robinson M. D., McCarthy D. J., Smyth G. K. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26, 1: 139-140
- Rossi F. R., Krapp A. R., Bisaro F., Maiale S. J., Pieckenstain F. L., Carrillo N. 2017. Reactive oxygen species generated in chloroplasts contribute to tobacco leaf infection by the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Journal*, 92, 5: 761-773
- Salguero-Linares J., Coll N. S. 2019. Plant proteases in the control of the hypersensitive response. *Journal of Experimental Botany*, 70, 7: 2087-2095
- Sánchez-Moreno C., Larrauri J. A., Saura-Calixto F. 1998. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 2: 270-276
- Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9, 7: 671-675
- Shahzad M., Farooq M., Jabran K., Hussain M. 2016. Impact of different crop rotations and tillage systems on weed infestation and productivity of bread wheat. *Crop Protection*, 89: 161-169
- Shirasawa K., Hirakawa H., Fukino N., Kitashiba H., Isobe S. 2021. Genome sequence and analysis of a Japanese radish (*Raphanus sativus*) cultivar named 'Sakurajima Daikon' possessing giant root. *DNA Research*, 27, 2, doi: <https://doi.org/10.1093/DNARES/DSAA010>: 6 str.
- Shixing Z., Xunzhi Z., Kai S., Caixia H., Kuchkarova N., Chi Z., Hua S. 2021. Chemical composition and allelopathic potential of the invasive plant *Solanum rostratum* Dunal essential oil. *Flora*, 274, 151730. doi: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.flora.2020.151730>: 5 str.
- Siemens T. J., Blossey B. 2007. An evaluation of mechanisms preventing growth and survival of two native species in invasive Bohemian knotweed (*Fallopia ×bohemica*, Polygonaceae). *American Journal of Botany*, 94, 5: 776-783

- Soltys D., Rudzińska-Langwald A., Gniazdowska A., Wiśniewska A., 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: 1629-1638
- Soltys D., Rudzińska-Langwald A., Kurek W., Gniazdowska A., Sliwinska E., 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, 3: 609-621
- Speiser A., Silbermann M., Dong Y., Haberland S., Uslu V. V., Wang S., Bangash S. A. K., Reichelt M., Meyer A. J., Wirtz M., Hell R. 2018. Sulfur Partitioning between glutathione and protein. *Plant Physiology*, 177, 3: 927-937
- Stael S., Van Breusegem F., Gevaert K., Nowack M. K. 2019. Plant proteases and programmed cell death. *Journal of Experimental Botany*, 70, 7: 1991-1995
- Strgulc Krajšek S., Dolenc Koce J. 2015. Sexual reproduction of knotweed (*Fallopia* sect. *Reynoutria*) in Slovenia. *Preslia*, 87, 1: 17-30
- Strgulc Krajšek S., Jogan N. 2011. Rod *Fallopia* Adans. v Sloveniji. *Hladnikia*: 28, 17-40
- Šerá B. 2012. Effect of soil substrate contaminated by knotweed leaves on seed development. *Polish Journal of Environmental Studies*, 21, 3: 713-717
- Šoln K., Dolenc Koce J. 2021. Allelopathic root inhibition and its mechanisms. *Allelopathy Journal*, 52, 2: 181-198
- Šoln K., Dolenc Koce J. 2022. Oxidative Stress in Roots: Detection of Lipid Peroxidation and Total Antioxidative Capacity. V: *Plant Proteases and Plant Cell Death. Methods in Molecular Biology*. Klemenčič M., Stael S., Huesgen P. F. (eds.). New York, Humana Press: 221-231
- Šoln K., Klemenčič M. 2022. Determination of Caspase-Like Activities in Roots by the Use of Fluorogenic Substrates. V: *Plant Proteases and Plant Cell Death. Methods in Molecular Biology*. Klemenčič M., Stael S., Huesgen P. F. (eds.). New York, Humana Press: 119-126
- Šoln K., Klemenčič M., Dolenc Koce J. 2022. Plant cell responses to allelopathy: from oxidative stress to programmed cell death. *Protoplasma*, doi: <https://doi.org/10.1007/s00709-021-01729-8>: 14 str.

- Šoln K., Likar, M., Dolenc Koce, J. 2021a. Effects of rhizome extracts from invasive knotweed species *Fallopia japonica* and *F. ×bohemica* on radish seed germination and root growth of seedlings. *Allelopathy Journal* 52, 1: 103-117
- Šoln K., Žnidaršič N., Dolenc Koce, J. 2021b. Root growth inhibition and ultrastructural changes in radish root tips after treatment with aqueous extracts of *Fallopia japonica* and *F. ×bohemica* rhizomes. *Protoplasma*, doi: <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s00709-021-01668-4>: 13 str.
- Tamás L., Mistrík I., Zelinová V. 2017. Heavy metal-induced reactive oxygen species and cell death in barley root tip. *Environmental and Experimental Botany*, 140: 34-40
- Teuschler L., Gasperl A., Remele K., Pfeifhofer Hartwig W., Müller M. 2021. Asparagine Content is a Key Factor for Acrylamide Formation in Sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) Fries. *Journal of Agriculture Food and Development*, 7: 16-24
- Thimm O., Bläsing O., Gibon Y., Nagel A., Meyer S., Krüger P., Selbig J., Müller L. A., Rhee S. Y., Stitt M. 2004. mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal*, 37, 6: 914-939
- Tucker Serniak L. 2016. Comparison of the allelopathic effects and uptake of *Fallopia japonica* phytochemicals by *Raphanus sativus*. *Weed Research*, 56, 2: 97-101
- Uddin M. R., Park S. U., Dayan F. E., Pyon J. Y. 2014. Herbicidal activity of formulated sorgoleone, a natural product of sorghum root exudate. *Pest Management Science*, 70, 2: 252-257
- Uren A. G., O'Rourke K., Aravind L., Pisabarro M. T., Seshagiri S., Koonin E. V., Dixit V. M. 2000. Identification of paracaspases and metacaspases: Two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Molecular Cell*, 6, 4: 961-967
- Van Doorn W. G., Beers E. P., Dangl J. L., Franklin-Tong V. E., Gallois P., Hara-Nishimura I., Jones A. M., Kawai-Yamada M., Lam E., Mundy J., Mur L. A. J., Petersen M., Smertenko A., Taliansky M., Van Breusegem F., Wolpert T., Woltering E., Zhivotovsky B., Bozhkov P. V. 2011. Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation*, 18, 8: 1241-1246
- Van Doorn W. G., Woltering E. J. 2005. Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends in Plant Science*, 10, 3: 117-122

- Van Hautegeem T., Waters A. J., Goodrich J., Nowack M. K. 2015. Only in dying, life: Programmed cell death during plant development. *Trends in Plant Science*, 20, 2: 102-113
- Vartapetian A. B., Tuzhikov A. I., Chichkova N. V., Taliansky M., Wolpert T. J. 2011. A plant alternative to animal caspases: Subtilisin-like proteases. *Cell Death and Differentiation*, 18, 8: 1289-1297
- Vorster B. J., Cullis C. A., Kunert K. J. 2019. Plant vacuolar processing enzymes. *Frontiers in Plant Science*, 10, 479, doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00479>: 7 str.
- Vrchotová N., Šerá B. 2008. Allelopathic properties of knotweed rhizome extracts. *Plant, Soil and Environment*, 54, 7: 301-303
- Vrchotová N., Šera B., Triska J. 2007. The stilbene and catechin content of the spring sprouts. *Acta Chromatographica*, 19: 21-28
- Wan Y., Yokawa K., Baluška F. 2019. Arabidopsis Roots and Light: Complex Interactions. *Molecular Plant*, 12, 11: 1428-1430
- Weir T. L., Park, S. W., Vivanco J. M. 2004. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology*, 7, 4: 472-479
- Wickham H. 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. 2nd ed.. New York, Springer International Publishing: 260 str.
- Xiao K., Xuan L., Xu Y., Bai D., Zhong D. 2002. Constituents from *Polygonum cuspidatum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50, 5: 605-608
- Yamada K., Goto-Yamada S., Nakazaki A., Kunieda, T., Kuwata K., Nagano A. J., Nishimura M., Hara-Nishimura I. 2020. Endoplasmic reticulum-derived bodies enable a single-cell chemical defense in Brassicaceae plants. *Communications Biology*, 3, 21, doi: <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0739-1>: 10 str.
- Yamada M., Han X., Benfey P. N. 2019. RGF1 controls root meristem size through ROS signalling. *Nature* 577, doi: <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1819-6>: 4 str.
- Yan Z., Wang D., Cui H., Sun Y., Yang X., Jin H., Zhao Y., Li X., Xie M., Liu J., Qin B. 2018. Effects of artemisinin on root gravitropic response and root system development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, 85, 2: 211-220

- Yan Z., Wang D., Cui H., Zhang D., Sun Y., Jin H., Li X., Yang X., Guo H., He X., Pan L., Ren X., Guo K., Qin B. 2016. Phytotoxicity mechanisms of two coumarin allelochemicals from *Stellera chamaejasme* in lettuce seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38, 248, doi: <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2270-z>: 10 str.
- Yu J. Q., Ye S. F., Zhang M. F., Hu W. H. 2003. Effects of root exudates and aqueous root extracts of cucumber (*Cucumis sativus*) and allelochemicals, on photosynthesis and antioxidant enzymes in cucumber. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 2: 129-139
- Zhang W., Lu L. Y., Hu L. Y., Cao W., Sun K., Sun Q. B., Siddikee A., Shi R. H., Dai C. C. 2018. Evidence for the involvement of auxin, ethylene and ROS signaling during primary root inhibition of *Arabidopsis* by the allelochemical benzoic acid. *Plant and Cell Physiology*, 59, 9: 1889-1904
- Zhang Y., Friml J. 2020. Auxin guides roots to avoid obstacles during gravitropic growth. *New Phytologist*, 225, 3: 1049-1052
- Zhu W., Liu J., Ye J., Li G. 2017. Effects of phytotoxic extracts from peach root bark and benzoic acid on peach seedlings growth, photosynthesis, antioxidance and ultrastructure properties. *Scientia Horticulturae*, 215: 49-58

## ZAHVALA

Dolgo odlašam s pisanjem tega poglavja. Ker vem, da je to velikokrat edino, kar preberemo. Tudi pri knjigah najprej preberemo konec, kajne? Torej vam na koncu povem bistvo tega doktorata.

Bistvo so korenine. Korenine vedno rastejo navzdol, v zemljo, v temo, v neznano. Pri rastlinah sicer najprej opazimo poganjek, korenin ne vidimo. A naj bo poganjek še tako bujen in veličastno zelen, če začnejo korenine propadati, kmalu propade cela rastlina. Korenine so namreč tiste, ki rastejo proti vodi. Tudi mi v življenju potrebujemo Vodo, ki so odnosi in je Odnos. To je edino, kar daje rast.

Ob koncu tega doktorata zato ne bom preštevala znanstvenih člankov, konferenc, nagrad, izjemnih rezultatov (oh, sem že omenila, da sem sanjala najmanj o Nobelovi nagradi?), ampak bi se rada zahvalila številnim ljudem, ki ste me spremljali na tej znanstveni poti. Nekateri ste mi pomagali z mikroskopi, epruvetami in petrijevskami, drugi ste mi pomagali gledati s srcem. Vsi smo iskali rast.

Najprej iskrena hvala moji mentorici dr. Jasni Dolenc Koce, ki si me v 1. letniku študija biologije sprejela v svoj laboratorij za Eksperimentalno botaniko, ko sem prišla s prošnjo, da »bi malo raziskovala«. Takrat sem si za temo izbrala alelopatijo, ker se mi je zdelo, da je to edino, kar iz ponujenih rastlinskih tematik razumem (danes sicer vem, da pri alelopatiji ne razumem skoraj ničesar). Predvsem hvala za odprtost do novih idej, prostor, da sem jih lahko preizkusila, in spremljanje, tako skozi vzpone kot padce. Hvala tudi vsem ostalim sodelavcem s Katedre za botaniko in fiziologijo rastlin, še posebej hvala dr. Alešu Kladniku za vse računalniške trike, nasvete pri obdelavi fotografij in mikroskopiranju, dr. Simoni Strgulc Krajšek, dr. Sabini Anžlovar in Tjaši Pogačnik Lipovec za vse nasvete in pomoč v laboratoriju ter dr. Tinki Bačič za spodbude pri pisanju o poljudni znanosti.

Hvala komisiji, ki jo sestavljajo dr. Dominik Vodnik, dr. Andreja Urbanek Kranjc in dr. Matevž Likar, za odzivnost, konstruktivne predloge in aplikativni pogled.

V nadaljevanju bi se rada zahvalila tudi številnim znanstvenikom, ki ste mi v teh štirih letih doktorata odprli vrata v svoje laboratorije, da smo lahko skupaj še podrobneje preučili alelopatijo pri dresnikih. Hvala dr. Maksu Merela in dr. Angeli Balzano z Oddelka za lesarstvo BF UL za pomoč pri mletju dresnikovih korenin. Hvala dr. Moniki Horvat s FKKT UL za NMR-analize dresnikovih korenin. Hvala dr. Matevžu Likarju za analize izvlečkov s HPLC in dr. Katarini Vogel Mikuš za elementne analize, oba z Oddelka za biologijo BF. Hvala študentkam biologije Niki Tivadar, Juliji Horvat, Valentini Bek, Emi Breščak in Clari-Liên Truong za pomoč pri vseh kalitvenih poskusih. Hvala dr. Nadi Žnidaršič, da smo s presevnim elektronskim mikroskopom skupaj začeli

preučevati celice v koreninah – to je res popolnoma nov svet! Hvala tudi vsem ostalim sodelavcem s Katedre za zoologijo Oddelka za biologijo BF za vso pomoč, predvsem dr. Poloni Mrak in Jožici Murko Bulič. Hvala dr. Marini Klemenčič s FKKT, da si mi predstavila delovanje rastlinskih proteaz in da smo jih lahko skupaj preučili v koreninah. Hvala tudi dr. Špeli Baebler in dr. Maruši Pompe Novak z NIB, da smo skupaj preučili molekulske spremembe v koreninah, ter ostalim v laboratoriju, predvsem hvala mag. Teji Grubar za pomoč pri izolaciji RNA in mag. Rebeki Strah za vso pomoč pri transkriptomskih analizah in vsej statistiki, ki je prišla zraven. Res hvala!

Hvala tudi kolegom iz Gradca, kjer sem bila prvič 2014. Lansko leto, 2021, pa sem dobila priložnost, da smo nekaj mesecev ponovno skupaj preučevali alelopatrijo (in to kljub epidemiji koronavirusa). Hvala dr. Marii Müller za gostoljubnost in vse razlage glede oksidativnega stresa, hvala dr. Edith Stabentheiner za pomoč pri vrstičnem elektronskem mikroskopu, razlagi avstrijskih navad in predvsem, ker si me naučila, da bolj kot rezultati šteje, da si Človek. Hvala Regini Willfurth za pomoč pri analizi prolina in vseh ostalih nasvetih – tako laboratorijskih kot glede nemščine. Hvala dr. Anni Gasperl za vse klepete in nasvete glede doktorata. Hvala Klausu Remele za pomoč pri analizah askorbata in glutationa in vsem ostalim z Inštituta za biologijo, Karl-Franzens Universität Graz, lepo je bilo! Hvala tudi profesorici nemščine iz Gradca Andrei Osterer za najboljši nasvet: »Katarina, ti samo govori!«

Hvala tudi vsem prijateljem, ki ste me spremljali v zadnjih letih. Še posebej hvala Alenki, Tini in Luciji. Kako lepo je imeti ob sebi prijatelje, ki verjamejo vate, tudi v trenutkih, ko sam ne. Hvala Anji, da si mi kazala, da se da hoditi tudi po vodi. Da ni jama, ampak tunel.

Hvala staršem, ker sta izrekla svoj *da* mojemu življenju in mi ves čas stala ob strani. In Gašperju – a veš, kakšen tvoj nasvet je pa prav v redu ...

Predvsem pa hvala Njemu, ki ob pravem času pošlje svojo Besedo in odtaja, da vode stečejo. Da vse steče. Naj teče Življenje!