

»Mladi za napredek Maribora 2019«

36. srečanje

**VPLIV SOLNEGA STRESA NA KOLIČINO VITAMINA C V DROBNJAKU,
KALJENJE SEMEN DROBNJAKA (*Allium schoenoprasum*) IN
PŠENICE (*Triticum aestivum* L.), ŠTEVILO IN DOLŽINO KORENIN TER
MITOTSKI INDEKS CELIC KORENINSKEGA VRŠIČKA ČEBULE (*Allium
cepa* L.)**

Raziskovalno področje: BIOTEHNOLOGIJA, KMETIJSTVO IN ŽIVILSTVO

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO

Avtor: LUKA GAŠPARIČ, NIKA BIŠKUP

Mentor: TAMARA ŠIŠKO

Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

Število točk: 160

Mesto: 1

Priznanje: zlato

Maribor, 2019

»Mladi za napredek Maribora 2019«

36. srečanje

**VPLIV SOLNEGA STRESA NA KOLIČINO VITAMINA C V DROBNJAKU,
KALJENJE SEMEN DROBNJAKA (*Allium schoenoprasum*) IN
PŠENICE (*Triticum aestivum* L.), ŠTEVILO IN DOLŽINO KORENIN TER
MITOTSKI INDEKS CELIC KORENINSKEGA VRŠIČKA ČEBULE (*Allium
cepa* L.)**

Raziskovalno področje: BIOTEHNOLOGIJA, KMETIJSTVO IN ŽIVILSTVO

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO

Maribor, 2019

KAZALO

POVZETEK.....	8
ZAHVALE.....	9
1 UVOD.....	10
1.1 Raziskovalno vprašanje	13
1.2 Hipoteze	13
2 TEORETIČNO OZADJE	15
2.1 Sol (natrijev klorid – NaCl).....	15
2.2 Vitamin C	15
2.2.1 Pomen vitamina C za ljudi	16
2.2.2 Vitamin C v rastlinah.....	17
2.3 Rastline	18
2.3.1 Drobniak (<i>Allium schoenoprasum</i>)	18
2.3.2 Pšenica (<i>Triticum aestivum</i> L.)	20
2.3.3 Čebula (<i>Allium cepa</i> L.)	20
2.4 Metode	21
2.4.1 Titracija	21
2.4.2 Mitotski indeks	21
3 METODA IN MATERIAL.....	22
3.1 Gojenje drobnjaka (<i>Allium schoenoprasum</i>) pod solnim stresom in določanje vsebnosti vitamina C.....	22
3.1.1 Material	22
3.1.2 Metoda	23
3.1.2 Spremenljivke	25
3.2 Kaljenje semen drobnjaka (<i>Allium schoenoprasum</i>) in pšenice (<i>Triticum aestivum</i> L.) in merjenje dolžin poganjkov	26
3.2.1 Material	26
3.2.2 Metoda	26
3.2.3 Spremenljivke	27
3.2 Gojenje (pod solnim stresom) čebulic sorte Sturon (<i>Allium cepa</i> L.) in merjenje dolžine korenin	27
3.2.1 Material	27

3.2.2 Metoda	28
3.2.3 Spremenljivke	29
3.3 Določanje mitotskega indeksa čebulic (<i>Allium cepa</i> L.) namakanih v 3 g/L in 5 g/L koncentracije soli	29
3.3.1 Material	29
3.3.2 Metode	30
3.4 Obdelava podatkov	30
4 REZULTATI	31
4.1 Vsebnost vitamina C.....	31
4.2 Število vzkaljenih semen drobnjaka (<i>Allium schoenoprasum</i>) in pšenice (<i>Triticum aestivum</i> L.) ter dolžina njihovih poganjkov	32
4.3 Gojenje (pod solnim stresom) čebulic sorte Sturon (<i>Allium cepa</i> L.) in merjenje dolžine korenin	37
4.4 Določanje mitotskega indeksa čebule (<i>Allium cepa</i> L.) namakanih v destilirano vodo, 3 g/L in 5 g/L koncentracije soli.....	41
5 RAZPRAVA	46
Hipoteza 1	46
Hipoteza 2	50
Hipoteza 3	52
Hipoteza 4	53
Hipoteza 5	54
6 OCENA METODE DELA	55
6.1 Titracija.....	55
6.2 Ocena metode gojenja čebulic.....	56
6.3 Ocena metode določanja mitotskega indeksa	56
7 DRUŽBENA ODGOVORNOST	57
8 ZAKLJUČEK.....	58
9 VIRI	60
10 VIRI SLIK.....	65
11 PRILOGE.....	66

KAZALO TABEL

Tabela 1: Vsebnost askorbinske kisline (vitamina C) v mg na 100 g listov v drobnjakih (<i>Allium schoenoprasum</i>) po štiritedenskem zalivanju z destilirano vodo oziroma 5, 10 ali 15 g/L NaCl .	31
Tabela 2: Število vzkaljenih semen drobnjaka (<i>Allium schoenoprasum</i>) po sedmih dneh zalivanja s šestimi različnimi koncentracijami NaCl oziroma destilirano vodo	32
Tabela 3: Procent vzkaljenih semen drobnjaka (<i>Allium schoenoprasum</i>) po sedmih dneh zalivanja s šestimi različnimi koncentracijami NaCl oziroma destilirano vodo	33
Tabela 4: Število vzkaljenih semen pšenice (<i>Triticum aestivum</i> L.) po sedmih dneh zalivanja s šestimi različnimi koncentracijami NaCl oziroma destilirano vodo.....	34
Tabela 5: Procent vzkaljenih semen pšenice (<i>Triticum aestivum</i> L.) po sedmih dneh zalivanja s šestimi različnimi koncentracijami NaCl oziroma destilirano vodo.....	34
Tabela 6: Povprečna dolžina vzkaljenih semen drobnjaka (<i>Allium schoenoprasum</i>) po sedmih dneh zalivanja s šestimi različnimi koncentracijami NaCl oziroma destilirano vodo(SD $\pm$ 1).....	35
Tabela 7: Povprečna dolžina vzkaljenih semen pšenice (<i>Triticum aestivum</i> L.) po sedmih dneh zalivanja z destilirano vodo in šestimi različnimi koncentracijami NaCl (SD $\pm$ 1)	36
Tabela 8: Število in dolžine korenin čebule (<i>Allium cepa</i> L.) po tridnevnem namakanju v šestih različnih koncentracijah NaCl in destilirani vodi.....	37
Tabela 9: Število in dolžine korenin čebule (<i>Allium cepa</i> L.) po petdnevnem namakanju v šestih različnih koncentracijah NaCl ter destilirani vodi	39
Tabela 10: Število celice čebule (<i>Allium cepa</i> L.) po petdnevnem namakanju v destilirani vodi pregledanih pri 400-kratni povečavi	41
Tabela 11: Odstotek faz celice čebule (<i>Allium cepa</i> L.) po petdnevnem namakanju v destilirani vodi pregledanih pri 400-kratni povečavi	41
Tabela 12: Število celic čebule (<i>Allium cepa</i> L.) po petdnevnem namakanju v 3 g/L NaCl pregledanih pri 400-kratni povečavi	42
Tabela 13: Odstotek celice čebulic (<i>Allium cepa</i> L.) po petdnevnem namakanju v 3 g/L NaCl pregledanih pri 400-kratni povečavi	42
Tabela 14: Število celic čebule (<i>Allium cepa</i> L.) po petdnevnem namakanju v 5 g/L NaCl pregledanih pri 400-kratni povečavi	43

Tabela 15: Odstotek celice čebulic (<i>Allium cepa</i> L.) po petdnevnom namakanju v 5 g/L NaCl pregledanih pri 400-kratni povečavi	43
--	----

Tabela 16: Povprečni mitotski indeks celic čebule (<i>Allium cepa</i> L.) po petdnevnom namakanju v destilirani vodi, 3 g/L oziroma 5 g/L NaCl	44
---	----

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Vsebnost askorbinske kisline (vitamina C) v mg na 100 g listov v drobnjakih (<i>Allium schoenoprasum</i>) po štiritedenskem zalivanju z destilirano vodo oziroma 5, 10 ali 15 g/L NaCl .	32
Graf 2: Povprečno število pognanih korenin čebule (<i>Allium cepa</i>) po tridnevnom namakanju v šestih različnih koncentracijah NaCl in destilirani vodi	38
Graf 3: Povprečna dolžina pognanih korenin čebule (<i>Allium cepa</i>) po tridnevnom namakanju v šestih različnih koncentracijah NaCl in destilirani vodi	38
Graf 4: Povprečno število pognanih korenin čebule (<i>Allium cepa</i>) po petdnevnom namakanju v šestih različnih koncentracijah NaCl in destilirani vodi	39
Graf 5: Povprečna dolžina pognanih korenin čebule (<i>Allium cepa</i>) po petdnevnom namakanju v šestih različnih koncentracijah NaCl in destilirani vodi	40
Graf 6: Povprečni delež celic čebule (<i>Allium cepa</i> L.) v vsaki fazi delitve po petdnevnom namakanju v destilirani vodi	42
Graf 7: Povprečni mitotski indeks celic čebule (<i>Allium cepa</i> L.) po petdnevnom namakanju v destilirani vodi, 3 g/L oziroma 5 g/L NaCl	45

KAZALO SLIK

Slika 1: Vpliv slanosti na rast rastlin (vir: Stopar, 2018).....	10
Slika 2: Reverzibilna oksidacijo-redukcijska reakcija askorbinske kisline in dehidroaskorbinske kisline (vir: Vitamin C, 2018)	16
Slika 3: Gojenje semen drobnjaka (<i>Allium schoenoprasum</i>) v šotnih diskih (lastni vir).....	23
Slika 4: Zalivanje odraslih drobnjakov (<i>Allium schoenoprasum</i>) z različnimi koncentracijami soli (lastni vir)	23

Slika 5: Odstranitev listov drobnjaka in priprava na sekljanje (lastni vir)	25
Slika 6: Titriranje 10 mL vzorca z modro raztopino 2,6-diklorindofenola do roza barvnega preskoka (lastni vir)	25
Slika 7: Priprava semen drobnjaka (<i>Allium schoenoprasum</i>) in pšenice (<i>Triticum aestivum</i> L.) na kaljenje (lastni vir)	27
Slika 8: Vidno polje 1 pri 400- kratni povečavi – celice koreninskega vršička čebule (<i>Allium cepa</i> L.) po petdnevnem namakanju v 3 g/L (lastni vir)	71
Slika 9: Vidno polje 2 pri 400- kratni povečavi – celice koreninskega vršička čebule (<i>Allium cepa</i> L.) po petdnevnem namakanju v 3 g/L (lastni vir)	71
Slika 10: Vidno polje 3 pri 400- kratni povečavi – celice koreninskega vršička čebule (<i>Allium cepa</i> L.) po petdnevnem namakanju v 3 g/L (lastni vir)	72
Slika 11: Vidno polje 1 pri 400- kratni povečavi – celice koreninskega vršička čebule (<i>Allium cepa</i> L.) po petdnevnem namakanju v 5 g/L (lastni vir)	72
Slika 12: Vidno polje 2 pri 400- kratni povečavi – celice koreninskega vršička čebule (<i>Allium cepa</i> L.) po petdnevnem namakanju v 5 g/L (lastni vir)	73
Slika 13: Vidno polje 3 pri 400- kratni povečavi – celice koreninskega vršička čebule (<i>Allium cepa</i> L.) po petdnevnem namakanju v 5 g/L (lastni vir)	73

POVZETEK

Mnoge raziskave potrjujejo, da solni stres vpliva na količino vitamina C, a hkrati zavira rast in razvoj rastlin. V raziskovalni nalogi smo se osredotočili na dokazovanje, da se z višanjem koncentracije soli dvigne raven vitamina C v drobnjaku (*Allium schoenoprasum*) kot odziv na oksidativni stres. Visoke koncentracije soli pa bi naj zmanjšale kaljivost semen drobnjaka (*Allium schoenoprasum*) in pšenice (*Triticum aestivum* L.) ter zavirale rast korenin čebule (*Allium cepa*).

Rezultati so pokazali, da se je raven vitamina C po zalivanju drobnjaka z nižjimi koncentracijami soli povišala. Prav tako smo ugotovili, da so z višanjem koncentracij soli poganjki semen drobnjaka in pšenice vse krajši. Glede na uspešnost kaljivosti pa lahko sklepamo, da je pšenica tolerantnejša vrsta kot drobnjak. Enako velja tudi za čebule, ki smo jih namakali v različnih koncentracijah soli. Mitotski indeks in dolžina korenin sta obratnosorazmerno upadala z višanjem koncentracije soli.

ZAHVALE

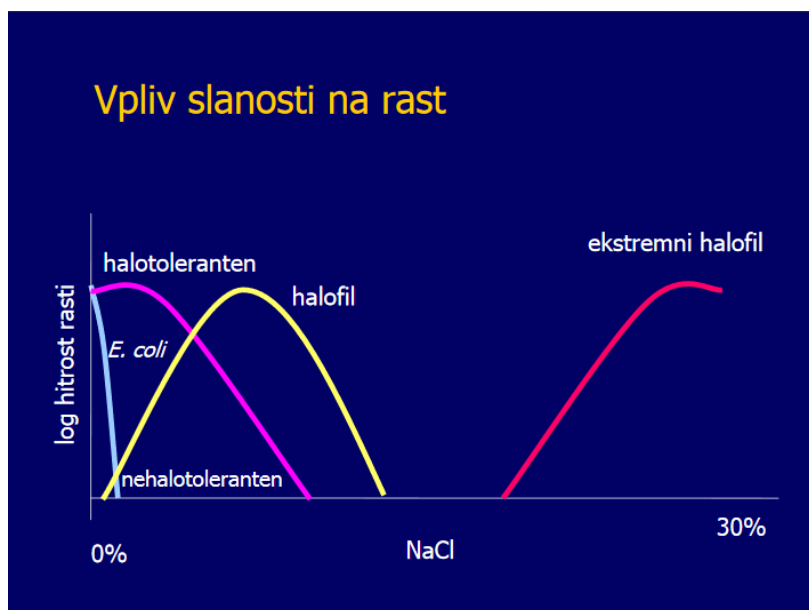
Avtorja naloge bi se rada zahvalila mentorju za razlago, pomoč in usmerjanje pri izpeljavi poskusov ter izdelavi raziskovalne naloge. Prav tako bi se avtorja želela zahvaliti kolektivu kemikov za dovoljeno uporabo pripomočkov, potrebnih za izvedbo poskusa.

Zahvaljujeva se tudi bližnjemu prijatelju in družinama za vso podporo.

1 UVOD

V raziskovalni nalogi smo rastline tretirali z različnimi koncentracijami soli (NaCl) in opazovali kako se rastline nanje odzivajo. Spremljali smo spremembe v količini vitamina C v drobnjaku (*Allium schoenoprasum*) po štiritedenskem zalivanju z različnimi koncentracijami NaCl (5 g/L, 10 g/L, 15 g/L), vpliv zalivanja semen drobnjaka (*Allium schoenoprasum*) in pšenice (*Triticum aestivum* L.) s 3g/L, 5g/L, 8g/L, 10g/L, 13g/L in 15g/L NaCl na kaljenje in dolžino poganjkov, vpliv namakanja čebul sorte Sturon (*Allium cepa* L.) v 3g/L, 5g/L, 8g/L, 10g/L, 13g/L in 15g/L koncentracijah NaCl na rast števila korenin in njihovo dolžino za vsakega izmed petih preizkušancev za določeno koncentracijo po treh in petih dnevih.

Glede na odzive rastlin na visoke koncentracije soli v okolici, jih lahko razdelimo v dve večji skupini: halofiti in glikofiti. Halofiti uspevajo na slanih tleh in za svoj razvoj potrebujejo velike količine soli iz okolice. Glikofiti pa so občutljivejše vrste, ki nad pragom določene koncentracije soli začnejo propadati; zavrtja je rast, listi ovenijo, izgubljajo na masi itd. (Schulze, 2002)



Slika 1: Vpliv slanosti na rast rastlin (vir: Stopar, 2018)

Vitamin C ali askorbinska kislina je izjemno pomembna za rastline pri spopadanju z velikimi količinami soli. Igra namreč ključno vlogo pri halofitih, rastlinah ki prenesajo velike koncentracije soli iz okolice. V splošnem pa prispeva k vzdrževanju procesa fotosinteze, razvoju celičnega cikla,

širjenju celičnih sten, izražanju genov, sintezi mnogih hormonov, antocianov in flavonoidov. (Schulze, 2002)

Pomen askorbinske kisline v živalih je sodelovanje v raznih fizioloških procesih kot so spodbujanje imunske odpornosti, absorpcija železa, sinteza kolagena, hormonov, nevrotransmitorjev itd. Primanjkljaj tega vitamina v naših telesih lahko privede do večjih možnosti infekcij, izčrpanosti, nespečnosti, hujšanja in drugih zdravstvenih težav. S primanjkovalcem vitamina C v prehrani se srečujejo tudi v razvitih državah, kjer sicer so zadostne količine in zelo raznolike ponudbe prehranskih izdelkov. Ta problem pomanjkanja skušajo odpraviti s prehranskimi dopolnili, vendar ti niso enakovredni naravnim virom vitamina C. Prav zaradi želje po izboljšanju našega zdravja se raziskovalci trudijo odkriti nove metode s katerimi bi lahko povečali količino vitamina C v užitnih rastlinah. Razne raziskave pa so že potrdile, da rastline pod vplivom stresnih dejavnikov proizvajajo več vitamina C. (Locato, 2013) Kljub temu pa je še veliko neznanega na področju genske manipulacije rastlin z različnimi stresorji, čigar namen je ohranjanje in akumuliranje visokih koncentracij vitamina C. (Akram, 2017)

V raziskovalni nalogi smo uporabili rastline roda *Allium* iz poddružine čebulnica. Česen, čebula, drobnjak in druge čebulnice imajo razne zdravilne učinke, med drugim zavirajo nenadzorovano širjenje mutiranih celic in jih lahko uporabljamo za preventivno preprečevanje razvoja tumorjev. Predhodne raziskave drugih *Allium* vrst so pokazale intenzivno aktivnost antioksidativnih encimov in drugih naravnih rastlinskih antioksidantov, med katere spada tudi askorbinska kislina ali vitamin C. V zaključku članka *Allium schoenoprasum* L., *As a Natural Antioxidant* so povzeli, da drobnjak (*Allium schoenoprasum*) vsebuje največ antioksidantov v listih in predstavlja odličen vir naravnih antioksidantov zaradi česar sva ga tudi izbrala kot poskusno rastlino. (Štajner, 2004)

Čeprav solni stres poviša raven vitamina C, lahko previsoke koncentracije povzročijo zaviranje rasti in morebitne mutacije. To smo poskušali dokazati s pomočjo Allium testa, kjer smo računali MI pri različnih koncentracijah ter opazovali morebitne spremembe v odstotkovnem deležu celic v posamezni fazi.

Mitotski indeks se uporablja za merjenje hitrosti razmnoževanja celične populacije. Definiran je kot razmerje med številom celic v mitози in skupnim številom celic. Mitotski indeks lahko razberemo s preparata, tudi s svetlobno mikroskopijo. Indeks je število celic, ki vsebujejo vidne kromosome, deljeno s skupnim številom celic v vidnem polju. Mitotski indeks je pogosto izražen v %. Celična populacija raste, ko celice preidejo skozi interfazo in mitozo ter zaključijo celični cikel. Mnoge celice s staranjem izgubijo zmožnost delitve ali se le redko delijo. Druge celice so se sposobne hitro deliti. Npr., ko korenine rastline rastejo, se celice na koreninskem rastnem vršičku, apikalnem meristemu, delijo hitreje, zato da potisnejo korenino skozi zemljo. Korenina zazna silo gravitacije in ukaže hitro delitev celic v bližini koreninskega ravnega vršička. Z merjenjem rasti celične populacije lahko opazujemo, kako se celice razlikujejo po hitrosti delitve. V preizkusih lahko spremenimo lastnosti celičnega okolja in izmerimo vpliv na delitev celic. Pri skupini celic, ki redko dopolnijo celični cikel, pričakujemo, da bo velik delež celic v interfazi v celičnem ciklu (G1). Pri celični populaciji, ki se hitro deli, pa lahko pričakujemo, da bo velik delež celic v fazi mitoze. Delitev celic lahko izračunamo s pomočjo mitotskega indeksa. Večanje MI je ponavadi povezana s krajšanjem interfaze. (Jagodič, 2014)

Mitotski indeks smo izračunali po formuli:

$$MI[\%] = \frac{\sum_1^3 (Pph + Mph + Eaph + Aph + Tph) \times 100\%}{D}$$

$$D = \sum_1^3 Pph, Mph, Eaph, Aph, Tph$$

D= vsota vseh opazovanih celic

Pph= frekvenca profaz

Mph= frekvenca metafaz

Eaph= frekvenca zgodnjih anafaz

Aph= frekvenca anafaz

Tph= frekvenca telofaz

1.1 Raziskovalno vprašanje

1. Kako zalivanje z različnimi koncentracijami NaCl (5 g/L, 10 g/L in 15 g/L) vpliva na količino vitamina C v drobnjaku (*Allium schoenoprasum*)
2. Koliko semen drobnjaka (*Allium schoenoprasum*) in pšenice (*Triticum aestivum* L.) bo vzkalilo po sedmih dneh zalivanja z različnimi koncentracijami NaCl (3 g/L, 5 g/L, 8 g/L, 10 g/L, 13 g/L in 15 g/L)?
3. Kako vpliva zalivanje z različnimi koncentracijami NaCl (0 g/L, 3 g/L, 5 g/L, 8 g/L, 10 g/L, 13 g/L in 15 g/L) na dolžino poganjkov drobnjaka (*Allium schoenoprasum*) in pšenice (*Triticum aestivum* L.) po sedmih dnevih kaljenja.
4. Kakšen je vpliv 3 g/L, 5 g/L, 8 g/L, 10 g/L, 13 g/L in 15 g/L koncentracije NaCl na gojenje čebulic sorte Sturon (*Allium cepa* L.), s poudarkom na številu uspešnosti rasti preko pognanih korenin in njihovi dolžini in ali bo imel MI večjo vrednost pri nižjih koncentracijah NaCl.

1.2 Hipoteze

1. Pri koncentraciji 5 g/L NaCl, bo koncentracija askorbinske kisline v drobnjaku (*Allium schoenoprasum*) narastla.
V povzetku članka *Effects of salinity and ascorbic acid on growth, water status and antioxidant system in a perennial halophyte* so zapisali, da je povečanje količine askorbinske kisline antioksidacijski odziv rastline na povišano količino soli. (Hameed, 2015)
2. Ker drobnjak (*Allium schoenoprasum*) spada med rastline, ki so občutljive na solne stresorje (Arslan, 2018), pričakujemo da se bo pri višjih koncentracijah soli 10 g/L in 15 g/L NaCl količina vitamina C zmanjšala in rastline bodo začele vidno propadati (vidne bodo spremembe v barvi listov in zmanjšana bo masa rastlinskega materiala).
3. Po sedemdnevem zalivanju semen drobnjaka (*Allium schoenoprasum*) in pšenice (*Triticum aestivum* L.) s 3 g/L, 5 g/L, 8 g/L, 10 g/L, 13 g/L in 15 g/L NaCl, bo več semen vzkalilo pri nižjih koncentracijah soli kot pri višjih. Tudi dolžina poganjkov bo upadala z višanjem koncentracije soli. Rastline lahko prenesejo le določeno koncentracijo soli v

okolici. Ko preseže ta koncentracija prag tolerance sta zavrti proces kaljenja in rasti. (Schulze, 2002)

4. Pri tridnevnem in petdnevnem namakanju čebul sorte Sturon (*Allium cepa* L.) bo tako po številu korenin kot tudi po njihovi dolžini pri nižjih koncentracijah soli rast uspešnejša kot pri višjih koncentracijah. Sol, natrijev klorid, ki ga absorbirajo rastline in zemlja, vpliva na sprejem hranil in vode. Natrij ovira dostopnost kalija, kalcija in magnezija, ki postanejo zato rastlinam nedostopni. Zaradi osmotskega pritiska, ki zadržuje vodo v tleh, je ta rastlinam težko dostopna. V tleh s povišano vsebnostjo soli pa korenine še težje sprejemajo vodo, lahko se celo zgodi, da prične voda iz celic prehajati nazaj, saj sol dobesedno izsuši listne celice.

(Bejo, 2015)

5. Mitotski indeks (MI) bo obratno sorazmeren s koncentracijo raztopine NaCl v vodi. Pri višjih koncentracijah soli bo mitotski indeks nižji, saj bo sol zavirala rast korenin, pri nižjih koncentracijah pa bo mitotski indeks višji, saj bo sol lažje sprejemala hranilne snovi. Povišan mitotski indeks kaže, da se več celic deli, zato lahko povišan mitotski indeks utemeljimo s potrebnimi procesi življenja, kot je normalna rast rastlin ali živali, kot tudi celično obnavljanje mesta poškodbe. (Urry, 2014)

2 TEORETIČNO OZADJE

2.1 Sol (natrijev klorid – NaCl)

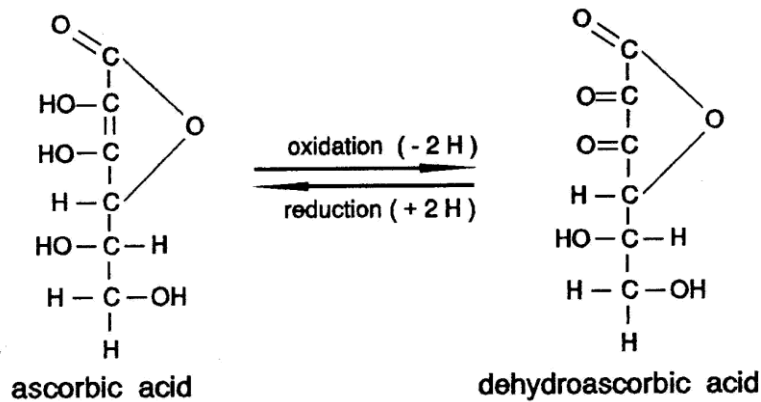
Natrijev klorid, imenovan tudi sol, navadna sol, namizna sol ali halit, je ionska spojina s kemijsko formulo NaCl. Natrijev klorid je sol, ki največ prispeva k slanosti oceanov in zunajceličnih tekočin številnih večceličnih organizmov. Kot glavna sestavina kuhinjske soli se uporablja kot začimba in kot konzervans. (Martel, 2004)

Številni mikroorganizmi v čezmerno slanem okolju ne preživijo, saj sol z osmozo iz njihovih celic potegne vodo. Zato se sol uporablja kot konzervans za nekatera živila, na primer ribe ali šunko. Uporablja se tudi za odstranjevanje pijavk, ki so se pritrdile na plen. Poleg tega se uporablja za razkuževanje ran. (Wood, 1999)

Sol se dodaja pri vsakovrstni pripravi hrane kot začimba, konzervans, vezalec, snov za nadzor teksture ali za obarvanje hrane. Poraba soli v prehranski industriji je največja pri predelavi hrane, pakiranju mesta, konzerviranju, peki ter mlečnih in žitnih izdelkih. Kot konzervans sol zavira rast bakterij. V klobasah ima vlogo vezalca v vezalnem gelu, ki ga tvorijo meso, maščoba in vlaga. (Wood, 1999)

2.2 Vitamin C

Vitamin C ali askorbinska kislina je ketolakton s šestimi ogljikovimi atomi. Je nenasičen lakton, ki ima dve hidroksilni skupini z reduktivnimi lastnostmi. V organizmu se reverzibilno oksidira do dehidroaskorbinske kisline, ki je biološko aktivna oblika vitamina C. (Medić-Šarić, 2002)



Slika 2: Reverzibilna oksidacijo-redukcijska reakcija askorbinske kisline in dehidroaskorbinske kisline (vir: Vitamin C, 2018)

Je vitamin, ki se dobro topi v vodi in alkoholu. Askorbinska kislina je bel prašek s kislim okusom in brez vonja. Je občutljiva na svetlobo, na zraku pa hitro oksidira in preide v dehidrokislino. (Medić-Šarić, 2002)

2.2.1 Pomen vitamina C za ljudi

Za človeka je pomemben antioksidant in sodeluje v raznih bioloških procesih, kot so sinteza kolagena in karnitina, pretvorba folne kisline v folinsko kislino, opravljanje vloge koencima pri številnih reakcijah hidroksiliranja in amidiranja, pospeševanje aktivnosti encimov, redukcija Fe^{3+} v Fe^{2+} in baker, omogočanje absorpcije železa ter sodelovanje v metabolizmu maščobnih kislin. Priporočen dnevni vnos za moške je 90 mg, za ženske pa 75 mg. Kadilci pa bi naj vnašali 35 mg več vitamina C. Največ ga lahko najdemo v sadju in zelenjavi. Najbogatejši vir so šipek, citrusi (pomaranče, mandarine, limone), češnje, črni ribez, krompir, paradižnik, paprika, zelje. Povečane potrebe po vitaminu C se pojavljajo pri dolgotrajnih diarejah, tuberkulozi, stresu, travmah, gastrektomiji, nosečnicah (zaradi kopičenja v materinem mleku), alkoholikih, kadilcih itd. (Medić-Šarić, 2002)

Če pride do pomanjkanja vitamina C v telesu, se pojavi hipovitaminoza. Izrazito pomanjkanje pa privede do bolezni imenovane skorbut. Posledica je nezmožnost nastajanja kolagena, ki je pomemben medcelični vezivni material. Pojavijo se naslednji simptomi: vnetje dlesni in krvavitve iz njih, izpadanje zob, izčrpanost, počasno celjenje ran, vnetje sklepov, visoka vročina, anemija,

osteoporoza. Prve raziskave iz leta 1747 je izvajal James Lind, ki je bil zdravnik britanske mornarice. Med britanskimi mornarji je bila ta bolezen najpogostejša, saj so večino časa preživali na ladjah, kjer niso imeli dostopa do sadja in zelenjave. Med poskusi zdravljenja, je Lind ugotovil da najbolje učinkujejo plodovi in sokovi citrusov. (Medić-Šarić, 2002)

2.2.2 Vitamin C v rastlinah

2.2.2.1 Pomen

Največ askorbinske kisline (vitamina C) najdemo v zelenih delih rastline oziroma natančneje v kloroplastih kjer njihova koncentracija lahko presega 20 mM. Veliko se je nahaja tudi v plodovih. Na celičnem nivoju se v splošnem pojavlja v vseh celičnih »oddelkih« vključno v celični steni rastlinskih celic. Deluje kot antioksidant, encimski kofaktor in je osnova za sintezo oksalata ter tartrata. Sodeluje tudi pri raznih procesih kot so fotosinteza, uravnavanje zaščitnih mehanizmov pred močno svetlobo, rast celice in širjenje celične stene, celična delitev, razvijanje odpornosti na okolijske stresorje, sinteza etilena, giberelinov, antocianov ter hidroksiprolina, (Smirnov, 2000) cvetenje, staranje in odmiranja celic ter pri odzivih na patogene organizme preko kompleksne celične tranzicije. (Barth, 2006)

2.2.2.2 Sinteza

Kot že omenjeno je vitamin C obstojen v dveh oblikah, in sicer kot L-askorbinska kislina in dehidro-L-askorbinska kislina. Biološka aktivnost askorbinske kisline temelji na njeni oksidaciji in kasnejši regeneraciji v reducirano obliko. Oba procesa zahtevata usklajen nadzor izražanja genov, katera posredno nadzorujejo nekateri rastlinski hormoni. Fiziološko aktivna oblika askorbinske kisline je stabilni anion, ki se imenuje askorbat in je dobro topen antioksidant. (Akram, 2017)

Trenutno sta znana dva možna načina sinteze L-askorbinske kisline v rastlinah, ki pa nista dokazana. Prva je *via* L-galactono-1,4-lactone, pri kateri se ogljikov skelet zasuka, druga pa je »via the osones D-glucosone and L-sorbosone«. (Smirnov, 1996)

L-askorbinsko kislino sintetizira L-galakton-1,4-lakton dehidrogenaza iz L-galakton-1,4-laktona. Ko se askorbinska kislina oksidira v monodehidroaskorbat, jo lahko nazaj reducira nazaj v osnovno

stanje monodehidroaskorbat reduktaza ali pa se reducira brez pomoči encimov in disproporcionira¹ v askorbinsko kislino in dehidroaskorbinsko kislino. (Gallie, 2012)

2.2.2.3 Količina vitamina C v odvisnosti od stresorjev ki delujejo na rastlino

Podatki iz literature navajajo, da obstaja pozitivna korelacija med toleranco rastline, ko je izpostavljena neugodnim okolijskim dejavnikom in povečano biosintezo ter aktivnostjo askorbinske kisline. (Locato, 2013)

V članku *L-Ascorbic Acid: A Multifunctional Molecule Supporting Plant Growth and Development*, ki povzema rezultate raznih raziskavo vitaminu C, so zapisali, da so na tobaku dokazali, da je povečana ekspresija sinteze monodehidroaskorbata reduktaze izboljšala toleranco rastline na solne in osmotske stresorje. (Gallie, 2012)

V raziskavi *Antioxidative responses of Calendula officinalis under salinity conditions* so testirali razmerje med askorbinsko kislino in dehidroaskorbinsko kislino v listih in koreninah vrtnega ognjiča (*Calendula officinalis*) po zalivanju z različnimi koncentracijami soli. Rezultati so pokazali, da se je skupna vsebnost askorbatov v listih in koreninah pri nižjih koncentracijah soli znižala, medtem ko se je pri višji slanosti zvišala. Ugotovili pa so da se razmerje med askorbinsko kislino in dehidroaskorbinsko kislino razlikuje, glede na rastlinski organ, ki so ga testirali. V listih se je pri nižji slanosti razmerje med njima povečalo in znižalo pri večji slanosti. V koreninah so preverjali razmerje le pri višji slanosti in ugotovili, da je prišlo prav do nasprotnega pojava kot v listih, saj se je razmerje pri višjih koncentracijah soli povečalo. (*Antioxidative responses of Calendula officinalis under salinity conditions*)

2.3 Rastline

2.3.1 Drobnjak (*Allium schoenoprasum*)

Drobnjak (znanstveno ime *Allium schoenoprasum*) je začimbna rastlina trajnica iz rodu *Allium* (luk) družine lukovk (*Alliaceae*). V višino zrastejo od 20 do 40 cm. Na vrhu cevastih, votlih in v prerezu okroglih listov cveti do 5 cm veliko kroglasto socvetje iz približno 50-ih cvetov. Za

¹Disproporcionacija - hkratna oksidacija in redukcija

drobnjak so prav tako značilne podolgovate bele čebulnice. Okoli glavne čebulnice na gosto rastejo majhne hčerinske čebulice. (Hofmann, 2014)

V naravi drobnjak raste v Aziji in Severni Ameriki do Arktike na severu v času od junija do avgusta. Uspeva na vlažnih gruščnatih tleh nad gozdno mejo. V srednji Evropi je priljubljena začimbna rastlina, ki jo gojimo na vrtovih. (Spohn, 2008) Žveplove spojine, ki jih proizvaja v velikih količinah, pomagajo odgnati insekte in razne škodljivce, ki jih najdemo na vrtovih, zato drobnjak pogosto sadijo kot »družabnike«, ki ščitijo druge rastline pred žuželkami. Veliko pa se ga uporablja v kulinariki zaradi blagega pekočega okusa, njegov vonj pa spominja na por. (Gööck, 1979)

Uspeva v dobro izsušeni organsko bogati prsti, s pH 6-7 in potrebuje veliko sončne svetlobe. Zraste iz semen in dozori poleti ali zgodaj jeseni. Za kalitev je potrebna temperatura 15-20 °C in stalna vlaga. Lahko vzklije tudi v hladnejšem notranjem prostoru, vendar ga je kasneje potrebno posaditi zunaj. Po vsaj štirih tednih so mladi poganjki pripravljeni za posaditev na vrt. Prav tako se zlahka razmnoži z delitvijo. V hladnejših pokrajinah se tekom zime ohrani v obliki čebulic, spomladi pa poženejo novi listi. Drobnjak, ki zgleda star, lahko porežemo za 2–5 cm. Pri žetvi pa je potrebno stebela porezati do same osnove, kar lahko v obdobju rasti delamo neprestano, saj listi vsakič ponovno zrastejo. (Gööck, 1979)

Drobnjak vsebuje žveplene spojine, ki vključujejo metilne sulfide in disulfide. Podobne snovi lahko najdemo v česnu, vendar v veliko manjših količinah. Znano je, da imajo nekatere zdravilne učinkovine (npr. proti glivni in protimikrobni vpliv ter znižuje krvni pritisk itd.), vendar je njihova uporaba za zdravstvene namene omejena. Zaradi velikega števila žveplovih sestavin, kot so alil sulfidi in alkil sulfoksidi, ima drobnjak blagodejen učinek na cirkulacijski sistem. Uporablja se tudi kot spodbujevalec teka, poživilo, diuretik, antiseptik ter blag antibiotik. (Gööck, 1979)

Poleg sulfidnih spojin pa vsebuje tudi veliko vitamina C (prb. 56.48 mg/100g svežega drobnjaka), vitamina A in B, železa, fosforja, kalija, joda, natrija, vitamina B6 in E, magnezija, kalcija, selenija, cinka, proteinov, ogljikovih hidratov, maščob itd. (Iosin, 2017)

Zakaj smo izbrali drobnjak kot poskusno rastlino?

Drobnjak vsebuje relativno veliko količino askorbinske kisline, ki znaša okoli 56,48 mg/100 g (Iosin, 2017) zaradi česar je omogočeno lažje kvantitativno opazovanje vsebnosti vitamina C. Prav tako so v kratkem povzetku študije o drobnjaku kot naravnem antioksidantu *Allium schoenoprasum L.*, *As a Natural Antioxidant* ugotovili, da se je v listih drobnjaka, ki so ga izpostavili abiotskemu stresu povečala količina antioksidativnih encimov in neencimskih antioksidantov (flavonoidov, vitamin C in karotenoidov). (Štajner, 2004)

2.3.2 Pšenica (*Triticum aestivum L.*)

Pšenica je enoletnica, ki raste v zmernem podnebju. V višino zraste do 1,5 m. Ima značilne šopaste korenine, tanko steblo ojačano s kolenci, na vrhu stebela pa ima razvita ensotavna socvetja (klaski), ki se povezujejo v klas.

Minimalna vlaga, ki jo potrebujejo semena pšenice za kaljenje znaša od 35% do 45%, optimalna temperatura pa niha med 12 in 25°C. Minerali potrebni za uspešen in hiter razvoj rastline so dušik, kalij in fosfor. V predhodnjih raziskavah so ocenili, da dve toni pšeničnih zrn na hektar za razvoj, iz zemlje izčrpa 42 kg dušika, 9 kg fosforja, 10 kg kalija in 2,5 kg žvepla. (Office of Gene, 2008)

Zaradi nezahtevnih pogojev za uspešno rast in velike vsebnosti kalorij, je pomemben pridelek v industrijski prehrani. Letno se na svetu proizvede več kot 650 milijonov ton pšenice. Večino jo zmeljejo v moko, uporablja pa se tudi za industrijsko pridobivanje škroba, sladkorja in alkohola. (Snape, 2013)

Zrno pšenice v povprečju vsebuje od 8-15% vode, 10-15 % beljakovin, do 2% maščob ter 68-74% ogljikovih hidratov. Druge pomembne komponente so tudi kalij, kalcij, železo, provitamin A, vitamin B1, B2, B5, B6, B9, vitamin D in E. Glavna beljakovina v zrnu pa je gluten, ki je pogost alergen. (Koželj, 2018)

2.3.3 Čebula (*Allium cepa L.*)

Čebula (*Allium cepa L.*) vrste Sturon je podolgovata in rumene barve, po dolžini rasti srednje zgodnja, priljubljena zaradi visokih pridelkov, skladiščenje pa je zelo dobro in dolgo. Čebula Sturon ima rumeno rjave ovojne liste. Meso je bele barve. Okus je aromatičen z blago ostrino.

Uporabna je za pripravo golaža, omak in kot dodatek k solatam. Čebulček Sturon potrebuje sončno lego in lažja tla. Dobro prenaša sušo in vročino, primeren čas sajenja pa je oktober-november in februar-april. (ROKO, 2015)

2.4 Metode

2.4.1 Titracija

Titracija je kvantitativna metoda določanja neznane koncentracije znane snovi. Postopek ponavadi poteka tako, da neznani koncentraciji snovi v raztopini, katere volumen poznamo, v kapljicah s pomočjo birete dodajamo raztopino z znano koncentracijo. Titriramo do ekvivalentne toče oziroma barvnega preskoka v vzorcu. Odčitamo volumen porabljene raztopine in s pomočjo enačb izračunamo iskano koncentracijo snovi v vzorcu. (Titration, 2018)

2.4.2 Mitotski indeks

Mitotski indeks se uporablja za merjenje hitrosti razmnoževanja celične populacije. Definiran je kot razmerje med številom celic v mitози in skupnim številom celic. Mitotski indeks lahko razberemo s preparata, tudi s svetlobno mikroskopijo. Indeks je število celic, ki vsebujejo vidne kromosome, deljeno s skupnim številom celic v vidnem polju. Mitotski indeks je pogosto izražen v %. Celična populacija raste, ko celice preidejo skozi interfazo in mitozo ter zaključijo celični cikel. Mnoge celice s staranjem izgubijo zmožnost delitve ali se le redko delijo. Druge celice so se sposobne hitro deliti. Npr., ko korenine rastline rastejo, se celice na koreninskem rastnem vršičku, apikalnem meristemu, delijo hitreje, zato da potisnejo korenino skozi zemljo. Korenina zazna silo gravitacije in ukaže hitro delitev celic v bližini koreninskega rastnega vršička. Z merjenjem rasti celične populacije lahko opazujemo, kako se celice razlikujejo po hitrosti delitve. V preizkusih lahko spremenimo lastnosti celičnega okolja in izmerimo vpliv na delitev celic. Pri skupini celic, ki redko dopolnijo celični cikel, pričakujemo, da bo velik delež celic v interfazi v celičnem ciklu. Pri celični populaciji, ki se hitro deli, pa lahko pričakujemo, da bo velik delež celic v fazi mitoze. Delitev celic lahko izračunamo s pomočjo mitotskega indeksa. Večanje MI je po navadi povezana s krajšanjem interfaze. (Jagodič, 2014)

3 METODA IN MATERIAL

3.1 Gojenje drobnjaka (*Allium schoenoprasum*) pod solnim stresom in določanje vsebnosti vitamina C

3.1.1 Material

- semena drobnjaka (*Allium schoenoprasum*)
- šotni diski
- zemlja
- plastične posode s podstavki
- kuhinjska sol - NaCl
- destilirana voda
- 1 L čaše
- steklena palčka
- 15 mg zelenih listov drobnjaka (*Allium schoenoprasum*)
- nož
- terilnica
- 2 in 10 mL pipete
- 25 in 50 mL erlenmajerice
- 10, 50 in 100 mL merilni valji
- 50 mL čaša
- lij
- filter
- bireta
- analitska tehtnica Kern (natančnosti 0,0001 g)
- 2,6-diklorfenol indofenol (100 mg barvila raztopimo v 500 mL vode, zavremo in še vročo raztopino prefiltriramo v temno steklenico, do 1 tedna jo hranimo v hladilniku)
- metafosforna kislina
- čisti vitamin C

3.1.2 Metoda

3.1.2.1 Gojenje drobnjaka

Sajenje smo začeli 7. marca 2018. V vsak šotni disk smo dali 5 semen drobnjaka in jih razvrstili v plastično posodo narejeno za postavitev 36 diskov, v tri vrste po dvanajst, in jih zalili tako da so se napihnili. Plastično posodo smo namestili na okensko polico (sončna stran šole) in jo pokrili. Zalivali smo redno na 2-3 dni z 200mL vode, tako da je zemlja stalno ostajala vlažna. Po osmih tednih smo drobnjake s šotnimi diski presadili v štiri večje posode s premerom 30 cm. Za zadrževanje vode smo namestili tudi podstavke. V vsako posodo smo dali 10 šotnih diskov v razdalji 4 cm in zasipali z univerzalno zemljo. Nadaljevali smo z rednim zalivanjem vsake posode z 200 mL vode na 2-3 dni. Konec maja smo pričeli z zalivanjem drobnjaka z različnimi koncentracijami NaCl (5 g/L, 10 g/L in 15 g/L), razen četrte posode, ki je bila kontrolna zato smo jo zalivali z destilirano vodo. Ostalim posodam z drobnjaki smo na 2 dni dolivali 200 mL izbrane koncentracije NaCl. Po štirih tednih smo končali z gojenjem in rastline pripravili za določanje vsebnosti askorbinske kisline.



Slika 3: Gojenje semen drobnjaka (*Allium schoenoprasum*) v šotnih diskih (lastni vir)



Slika 4: Zalivanje odraslih drobnjakov (*Allium schoenoprasum*) z različnimi koncentracijami soli (lastni vir)

Med gojenjem smo pazili, da je temperatura sobe ostajala stalna med 20 in 25°C, prav tako smo ohranjali normalno vlažnost zraka (med 45% in 50% relativno vlažnostjo zraka).

3.1.2.2 Priprava barvila 2,6-diklorindofenola

Z analitično tehtnico smo odtehtali 0,1032 g 2,6-diklorfenol indofenola in ga raztopili v 500 mL destilirane vode. Čašo z temno modro raztopino smo postavili na električni štedilnik in vsebino zavreli ter jo občasno premešali. Po tem ko se je barvilo raztopilo smo tekočino predhodno ohladili in prelili v bireto za kasnejšo titracijo.

3.1.2.3 Določanje titra barvila 2,6-diklorfenol indofenola

S pomočjo analitične tehtnice smo odtehtali 0,0500 g askorbinske kisline, ki smo jo dodali 200 mL 2% metafosforne kisline. 10 mL standardne raztopine askorbinske kisline smo titrirali z barvilom 2,6-diklorfenol indofenolom 10-krat in nato izračunali srednjo vrednost.

3.1.2.4 Priprava drobnjaka za titracijo

Z nožem smo odstranili liste drobnjaka in jih na deski nasekljali na majhne koščke. Preden smo nadaljevali s pripravo filtrata, smo narezano vsebino stehtali na tehtnici in si vrednost zabeležili za kasnejše izračune vsebnosti askorbinske kisline v vzorcu. Nato smo rastlinski material strli v terilnici in pri tem postopoma dodajali 60 mL 2% metafosforne kisline. Homogenat smo s filter papirjem prefiltrirali v 100 mL valj. Filtrat v valju smo z 2% metafosforno kislino dopolnili do 100 mL. Iz valja smo odpipetirali 10 mL vzorca v 100 mL erlenmajerico. Pred vsakim pipetiranjem 10 mL vzorca, smo vsebino prej dobro premešali. Vzorec smo titrirali z modro raztopino 2,6-diklorindofenol. Pri tem se zaradi kislega pH vsebina obarva roza. Titrirali smo dokler ni začela nežna rozasta barva v vzorcu zastajati. Postopek smo ponovili 10-krat. Po 10-kratnem titriranju 10 mL vzorcev smo izračunali srednjo vrednost.



Slika 5: Odstranitev listov drobnjaka in priprava na sekljanje (lastni vir)



Slika 6: Titriranje 10 mL vzorca z modro raztopino 2,6-diklorindofenola do roza barvnega preskoka (lastni vir)

3.1.2.5 Računanje vsebnost askorbinske kisline v titriranem vzorcu

Natančno vsebnost askorbinske kisline (vitamina C) smo zračunali po tej enačbi:

$$x = \frac{10 \times b}{a \times m} \times 100 \text{ (mg/100g)}$$

x – vsebnost askorbinske kisline v steblih drobnjaka (*Allium schoenoprasum*) (mg/)

a – srednji titer barvila (ml/mg)

b – srednji titer 10 mL vzorca (mL)

m – masa stebel drobnjaka (*Allium schoenoprasum*) (g)

3.1.2 Spremenljivke

Odvisne spremenljivke: količina vitamina C (mg/100g).

Neodvisne spremenljivke: koncentracija NaCl (0, 5, 10 in 15 g/L).

Kontrolirane spremenljivke: stalna temperatura sobe (med 20 in 25°C), normalna vlažnost zraka (med 45% in 50%), uporabljeni šotni diski in zemlja.

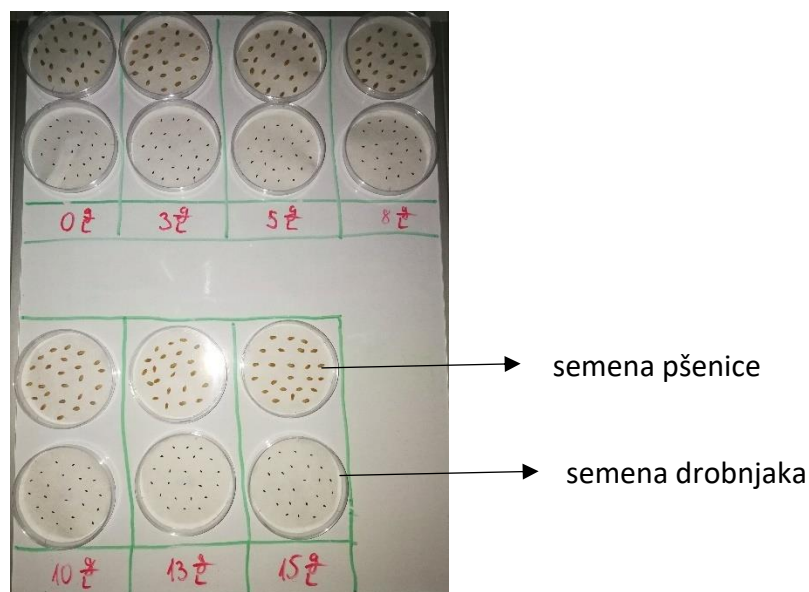
3.2 Kaljenje semen drobnjaka (*Allium schoenoprasum*) in pšenice (*Triticum aestivum* L.) in merjenje dolžin poganjkov

3.2.1 Material

- petrijevke (7 za drobnjak, 7 za pšenico)
- semena drobnjaka (*Allium schoenoprasum*) in pšenice (*Triticum aestivum* L.)
- 7 kapalk
- raztopine NaCl (0 g/L, 3 g/L, 5 g/L, 8 g/L, 10 g/L, 13 g/L in 15 g/L)
- 1 L čaše
- sol
- destilirana voda
- filtrirni papir
- milimetrsko ravnilo

3.2.2 Metoda

Pripravili smo sedem petrijevk za drobnjak in sedem za pšenico. Vanje smo položili filtrirne papirje. V vsako petrijevko smo zložili 25 semen drobnjaka oz. pšenice v razmaku 1,2 cm in jih zalili z različnimi koncentracijami NaCl (0 g/L, 3 g/L, 5 g/L, 8 g/L, 10 g/L, 13 g/L in 15 g/L). Petrijevke smo naslednjih sedem dni hranili v temni omari. Vsaki drugi dan smo dodatno zalili semena s 3mL izbrane koncentracije raztopine NaCl. Vsaki dan smo prešteli število novo vzkaljenih semen. Po sedmih dnevih smo izmerili dolžino vseh poganjkov.



Slika 7: Priprava semen drobnjaka (*Allium schoenoprasum*) in pšenice (*Triticum aestivum* L.) na kaljenje (lastni vir)

3.2.3 Spremenljivke

Odvisne spremenljivke: dolžina poganjkov (mm), število vzkaljenih semen.

Neodvisne spremenljivke: koncentracija NaCl (0, 3, 5, 8, 10, 13 in 15 g/L).

Kontrolirane spremenljivke: stalna temperatura sobe (med 20 in 25°C), normalna vlažnost zraka (med 45% in 50%), semena iste rastline, ki so nepoškodovana.

3.2 Gojenje (pod solnim stresom) čebulic sorte Sturon (*Allium cepa* L.) in merjenje dolžine korenin

3.2.1 Material

- čebule (*Allium cepa* L.)
- destilirana voda
- aluminijasta folija
- kuhinjska sol (NaCl)
- 50mL epruvete
- 250 mL čaše
- žlička

- skalpel
- tehtnica z natančnostjo 0.01 g
- stojalo za epruvete
- flomaster za označevanje
- milimetrski papir za merjenje dolžine korenin

3.2.2 Metoda

3.2.2.1 Priprava čebulic (*Allium cepa* L.)

Najprej smo izbrali 30 primernih, zdravih čebulic, po 5 za vsako koncentracijo, torej za 0 g/L, 3 g/L, 5 g/L, 8 g/L, 10 g/L, 13 g/L in 15 g/L NaCl. Čebulice smo nato z nožem odrezali na strani koreninskega poganjka, da bi s tem sprožili hitrejšo rast koreninic.

3.2.2.2 Priprava poskusa

Čebulice smo postavili na vrh epruvet in sicer tako, da je bil del, kjer rastejo, potopljen v raztopini destilirane vode. Epruvete smo nato postavili na stojalo, ki smo ga ovili za aluminijasto folijo ter s tem ustvarili svetlobne razmere pod zemljo. Preostali del čebulic je bil deležen sončne svetlobe na okenski polici. Prvi poskus je bil opravljen med 12.10.2018 in 15.10.2018, drugi pa med 21.10.2018 in 26.10.2018. Pri poskusu, ki je trajal 5 dni, smo tretji dan dolili ustrezne koncentracije raztopin v tistih epruvetah, kjer čebulice (*Allium cepa* L.) niso bile več namočene v raztopini.

3.2.2.3 Pridobivanje rezultatov

Po treh oziroma petih dnevih smo koncentracije raztopin destilirane vode in kuhinjske soli (NaCl) iz epruvet zlili v umivalnik, nato pa se lotili pridobivanja količinskih podatkov.

Prvi del poskusa je zajemal količino (število) uspešno pognanih korenin. Čebulicam sorte Sturon (*Allium cepa* L.) smo z opazovanjem prešteli število poganjkov in si rezultate zapisali. To smo opravili za vse meritve vsake izmed koncentracij pri obeh poskusih.

Drugi del poskusa je zajemal merjenje dolžine korenin, kjer smo uporabili milimetrski papir. Pri določenih primerkih, ko korenine niso pognale, nam ni bilo treba meriti dolžine korenin. Pri

primerkih, kjer je bilo korenin veliko, smo izmerili vse korenine, njihove dolžine sešteli in jih delili s številom korenin primerka ter tako dobili povprečno dolžino korenin.

Meritve korenin in izračun povprečne dolžine smo opravili dvakrat, da bi s tem čim bolj odpravili merske napake.

3.2.3 Spremenljivke

Neodvisne spremenljivke: hranilo za čebulice sorte Sturon (*Allium cepa* L.), relativna zračna vlažnost, temperatura ozračja

Odvisne spremenljivke: število in dolžina pognanih korenin čebulic sorte Sturon (*Allium cepa* L.)

Kontrolne spremenljivke: sončna svetloba in valovna dolžina sončnih žarkov

3.3 Določanje mitotskega indeksa čebulic (*Allium cepa* L.) namakanih v 3 g/L in 5 g/L koncentracije soli

Opazovane celice v vidnem polju smo prešteli, jim določili fazo celične delitve ter izračunali njihovo odstotkovno vrednost. Pri tem smo mitotski indeks določili za tri vidna polja pri obeh koncentracijah soli, torej 3g/L in 5g/L.

3.3.1 Material

- čebule(*Allium cepa* L.)
- epruvete
- stojalo za epruvete
- gorilnik
- pinceto
- aluminijasta folija (s katero smo ovili spodnji del epruvete)
- raztopine NaCl (0 g/L, 3 g/L, 5 g/L, 8 g/L, 10 g/L, 13 g/L in 15 g/L)
- milimetrski papir
- mikroskop Leica CM E

3.3.2 Metode

Najprej smo določili vrsto čebulice za poskus. Nato smo očistili ustrezno število čebule sorte Sturon (*Allium cepa* L.). Čebule smo obrezali na strani, kjer poganjajo ter s tem spodbudili dodatno rast koreninskega dela.

Za izmerjene koncentracije soli smo uporabili tehtnico z natančnostjo 0.01 g. Koncentracije smo nalili v epruvete, na vrh pa nastavili čebulico sorte Sturon (*Allium cepa* L.) tako, da je obrezan del bil potopljen v raztopino. Nato smo počakali 3 oz 5 dni, ter pričeli z zbiranjem rezultatov. Najprej smo prešteli pognane korenine ter jim nato s pomočjo milimetrskega papirja izmerili dolžino.

Korenine smo nato odrezali, ter jih obarvali z barvilom kisli karmin, da so bile celice vidne pod mikroskopom. Nato smo vršičke dali v epruvete, ter jih segrevali z gorilnikom. Ko je barvilo pričelo vreti, smo gorilnik odstranili. To smo ponovili dvakrat. Odrezane vršičke smo s pinceto izvzeli iz epruvet ter jih namestili na krovno stekelce, nato pa smo spodnji del korenine nežno pomečkali med objektno in krovno steklo, nato pa smo koreninske vršičke opazovali pod mikroskopom.

3.4 Obdelava podatkov

Podatke smo obdelali s pomočjo Excel-a (2013). S programom smo izračunali aritmetično sredino in standardni odklon. Za grafično obdelavo pa smo si pomagali z Word-om (2013).

4 REZULTATI

4.1 Vsebnost vitamina C

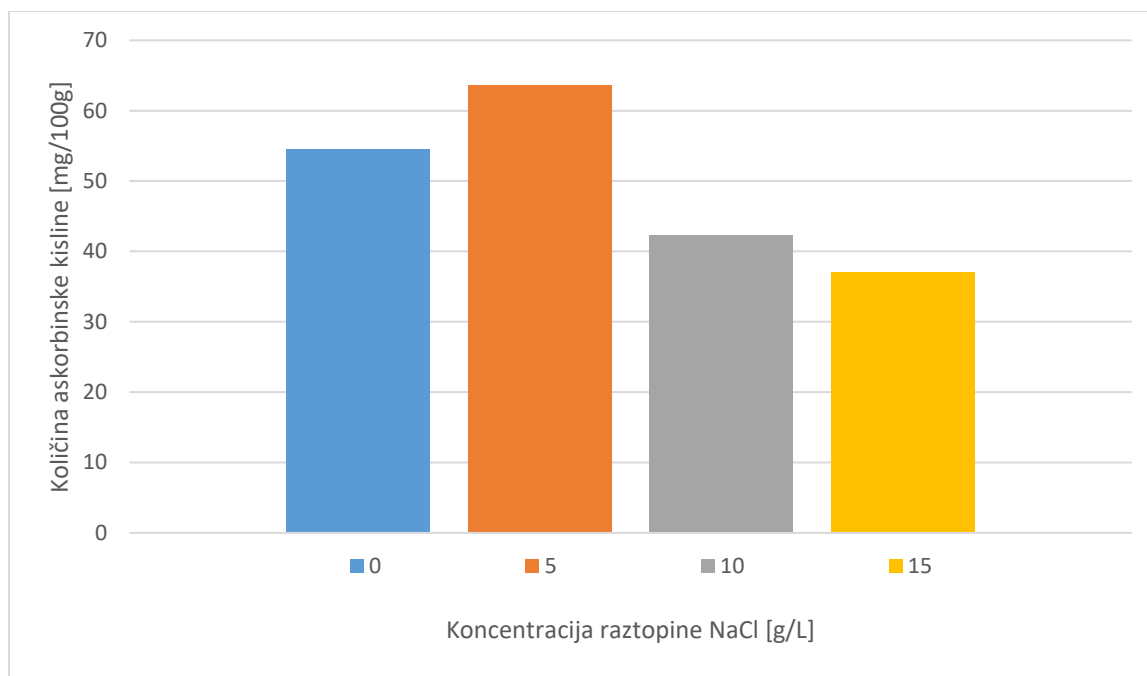
Tabela 1: Vsebnost askorbinske kisline (vitamina C) v mg na 100 g listov v drobnjakih (*Allium schoenoprasum*) po štiritedenskem zalivanju z destilirano vodo oziroma 5, 10 ali 15 g/L NaCl

Koncentracija raztopine NaCl [g/L]	Količina askorbinske kisline [mg/100g]
0	54,48
5	63,66
10	42,27
15	37,02

Podatki o masi drobnjaka, srednjem titru in volumnu porabljenega barvila 2,6-diklorindofenol pri titraciji vzorcev drobnjakov (*Allium schoenoprasum*) zalivanih z destilirano vodo oziroma 5 g/L, 10 g/L ali 15 g/L NaCl so navedeni v tabeli 17 v prilogi.

Vsebnost vitamina smo računali po enačbi navedeni v rubriki metode dela in materiali na strani 21. Primer izračuna količine vitamina C za drobnjak zalivanega z destilirano vodo:

$$x = \frac{10 \times 2,9\text{mL}}{15,00\text{g} \times 3,55 \frac{\text{mL}}{\text{mg}}} \times 100 = 54,48 \frac{\text{mg}}{100\text{g}}$$



Graf 1: Vsebnost askorbinske kisline (vitamina C) v mg na 100 g listov v drobnjaki (*Allium schoenoprasum*) po štiritedenskem zalivanju z destilirano vodo oziroma 5, 10 ali 15 g/L NaCl

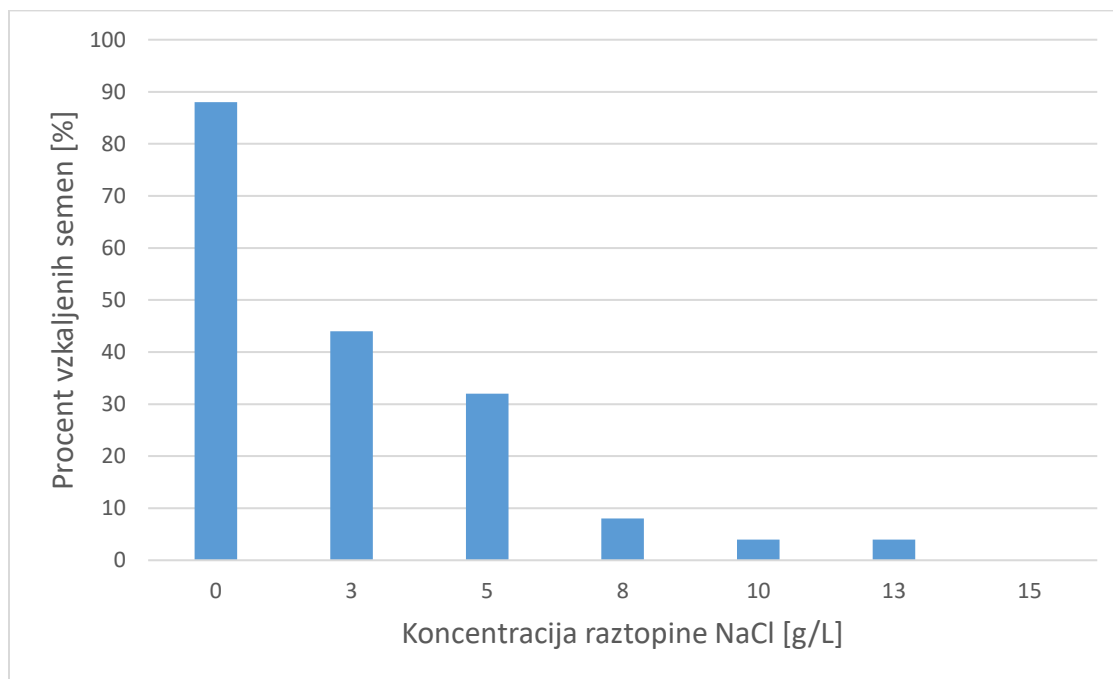
4.2 Število vzkaljenih semen drobnjaka (*Allium schoenoprasum*) in pšenice (*Triticum aestivum* L.) ter dolžina njihovih poganjkov

Tabela 2: Število vzkaljenih semen drobnjaka (*Allium schoenoprasum*) po sedmih dneh zalivanja s šestimi različnimi koncentracijami NaCl oziroma destilirano vodo

		Koncentracija raztopine NaCl [g/L]						
Število vzkaljenih semen	Dan	0	3	5	8	10	13	15
	1.	0	0	0	0	0	0	0
	2.	0	0	0	0	0	0	0
	3.	0	0	0	0	0	0	0
	4.	4	1	2	1	0	0	0
	5.	8	1	4	1	0	0	0
	6.	19	4	4	1	0	1	0
	7.	22	11	8	2	1	1	0

Tabela 3: Procent vzkaljenih semen drobnjaka (*Allium schoenoprasum*) po sedmih dneh zalivanja s šestimi različnimi koncentracijami NaCl oziroma destilirano vodo

		Koncentracija raztopine NaCl [g/L]						
	Dan	0	3	5	8	10	13	15
Procent vzkaljenih semen [%]	1.	0	0	0	0	0	0	0
	2.	0	0	0	0	0	0	0
	3.	0	0	0	0	0	0	0
	4.	16	4	8	4	0	0	0
	5.	32	4	16	4	0	0	0
	6.	76	16	16	4	0	4	0
	7.	88	44	32	8	4	4	0



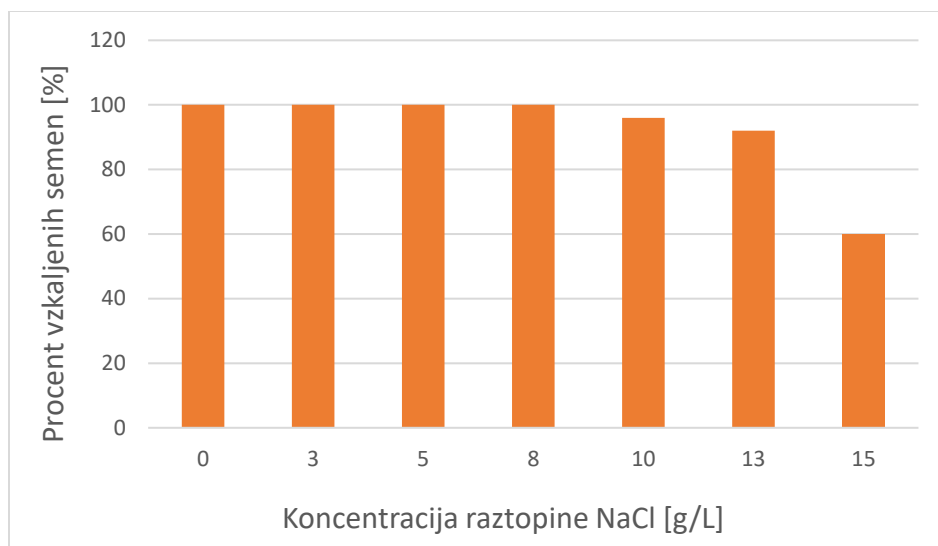
Graf 1: Procent vzkaljenih semen drobnjaka (*Allium schoenoprasum*) po sedmih dneh zalivanja s šestimi različnimi koncentracijami NaCl oziroma destilirano vodo

Tabela 4: Število vzkaljenih semen pšenice (*Triticum aestivum* L.) po sedmih dneh zalivanja s šestimi različnimi koncentracijami NaCl oziroma destilirano vodo

	Dan	Koncentracija raztopine NaCl [g/L]						
		0	3	5	8	10	13	15
Število vzkaljenih semen	1.	0	0	0	0	0	0	0
	2.	10	3	4	0	0	0	0
	3.	24	8	16	10	0	0	0
	4.	24	25	25	25	19	22	5
	5.	25	25	25	25	21	22	5
	6.	25	25	25	25	24	23	15
	7.	25	25	25	25	24	23	15

Tabela 5: Procent vzkaljenih semen pšenice (*Triticum aestivum* L.) po sedmih dneh zalivanja s šestimi različnimi koncentracijami NaCl oziroma destilirano vodo

	Dan	Koncentracija raztopine NaCl [g/L]						
		0	3	5	8	10	13	15
Procent vzkaljenih semen [%]	1.	0	0	0	0	0	0	0
	2.	40	12	16	0	0	0	0
	3.	96	32	64	40	0	0	0
	4.	96	100	100	100	76	88	20
	5.	100	100	100	100	84	88	20
	6.	100	100	100	100	96	92	60
	7.	100	100	100	100	96	92	60

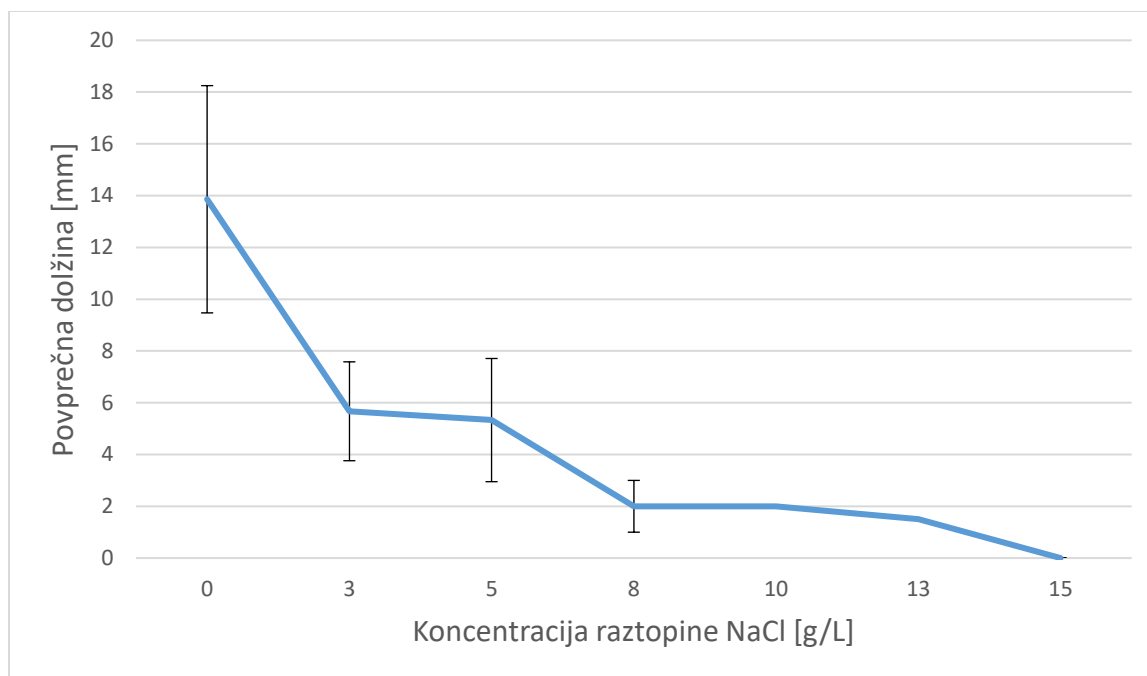


Graf2: Procent vzkaljenih semen pšenice (*Triticum aestivum* L.) po sedmih dneh zalivanja s šestimi različnimi koncentracijami NaCl oziroma destilirano vodo

Tabela 6: Povprečna dolžina vzkaljenih semen drobnjaka (*Allium schoenoprasum*) po sedmih dneh zalivanja s šestimi različnimi koncentracijami NaCl oziroma destilirano vodo(SD ± 1)

Koncentracija raztopine NaCl [g/L]	Povprečna dolžina poganjkov [mm]	Standardni odklon [mm]
0	13,86	4,39
3	5,67	1,91
5	5,33	2,38
8	2,00	1,00
10	2,00	0,00
13	1,50	0,00
15	0,00	0,00

Dolžine posameznih semen drobnjaka so v tabeli 20 v prilogi na strani 69.

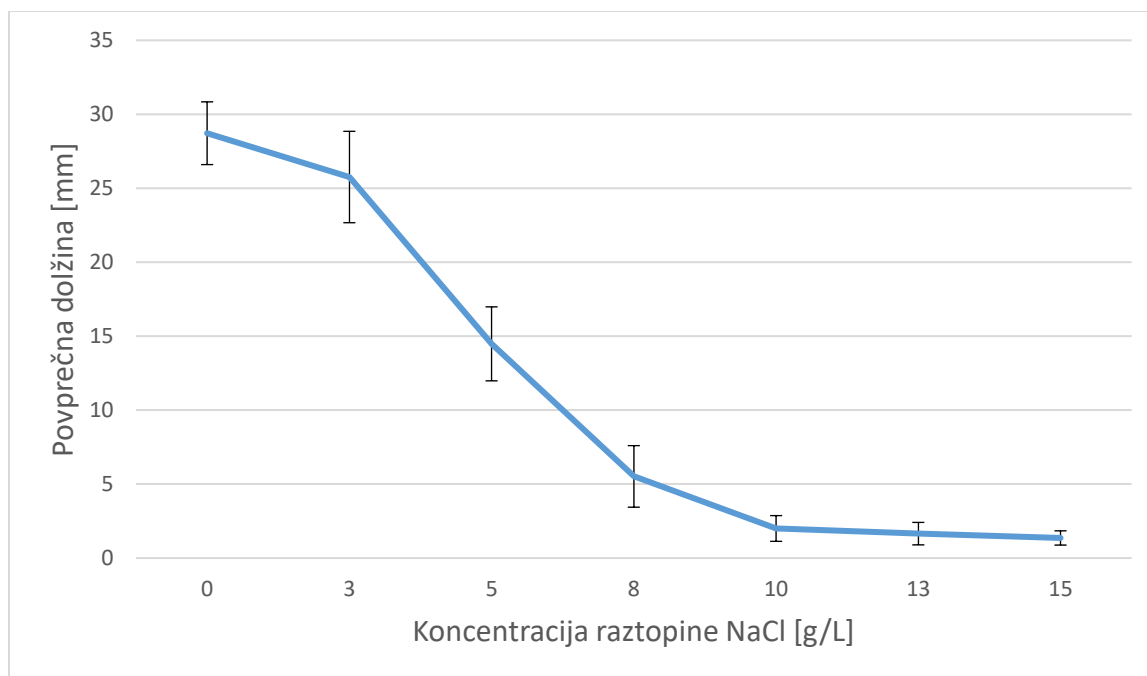


Graf3: Dolžina vzkaljenih semen drobnjaka (*Allium schoenoprasum*) po sedmih dneh zalivanja z destilirano vodo in šestimi različnimi koncentracijami NaCl (SD ± 1)

Tabela 7: Povprečna dolžina vzkaljenih semen pšenice (*Triticum aestivum* L.) po sedmih dneh zalivanja z destilirano vodo in šestimi različnimi koncentracijami NaCl (SD ± 1)

Koncentracija raztopine NaCl [g/L]	Povprečna dolžina poganjkov [mm]	Standardni odklon [mm]
0	28,72	2,12
3	25,76	3,09
5	14,48	2,50
8	5,52	2,08
10	2,00	0,87
13	1,65	0,76
15	1,36	0,48

Dolžine posameznih semen pšenice so v tabeli 21 v prilogi na strani 70.

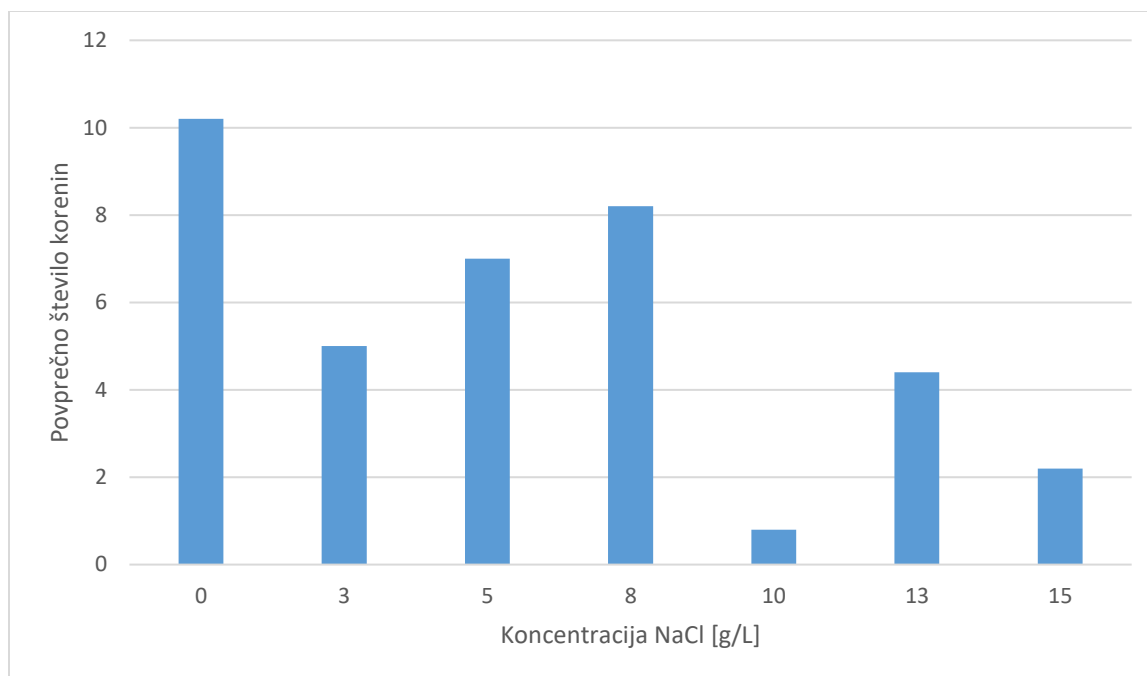


Graf 5: Dolžina vzkaljenih semen pšenice (*Triticum aestivum* L.) po sedmih dneh zalivanja z destilirano vodo in šestimi različnimi koncentracijami NaCl (SD ± 1)

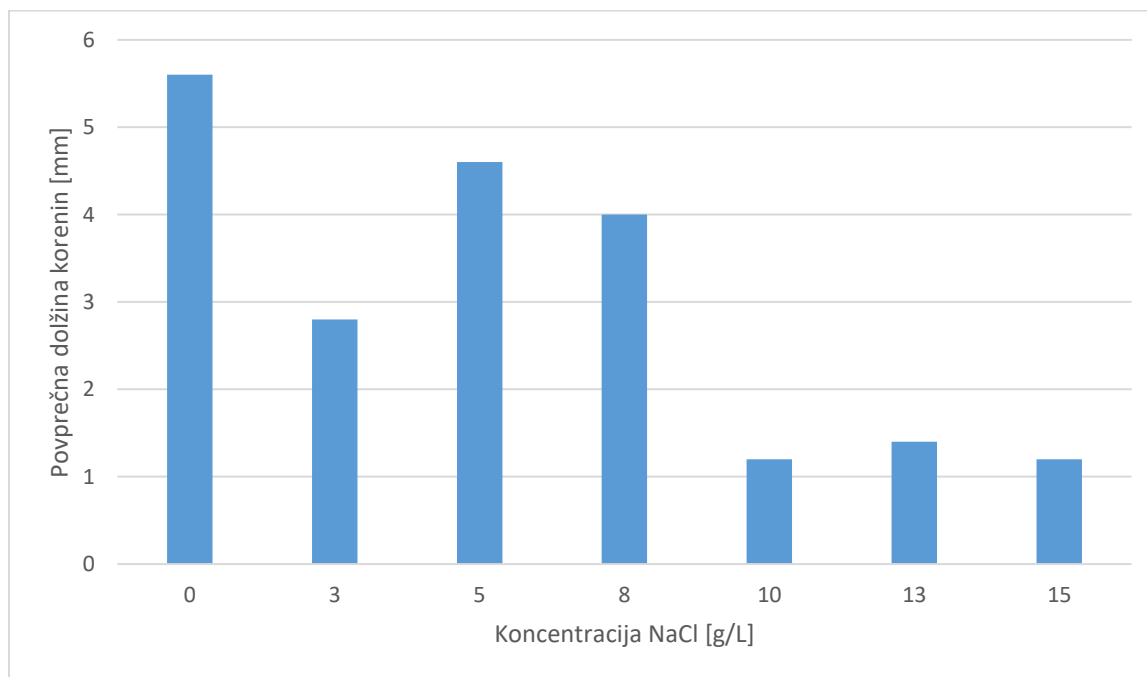
4.3 Gojenje čebulic sorte Sturon (*Allium cepa* L.) in merjenje dolžine korenin

Tabela 8: Število in dolžine korenin čebule (*Allium cepa* L.) po tridnevnem namakanju v šestih različnih koncentracijah NaCl in destilirani vodi

Koncentracija NaCl (g/L)	Število korenin pri preizkušancih					Povprečno število	Dolžina korenin pri preizkušancih [mm]					Povprečna dolžina [mm]
0	9	9	13	8	12	10,2	6,0	5,0	5,0	7,0	5,0	5,6
3	0	7	0	9	9	5,0	0,0	7,0	0,0	4,0	3,0	2,8
5	12	9	10	3	1	7,0	5,0	6,0	5,0	5,0	2,0	4,6
8	6	5	7	7	16	8,2	5,0	3,0	3,0	4,0	5,0	4,0
10	1	2	0	0	1	0,8	2,0	3,0	0,0	0,0	1,0	1,2
13	0	3	8	1	10	4,4	0,0	1,0	3,0	1,0	2,0	1,4
15	0	6	0	0	5	2,2	0,0	3,0	0,0	0,0	3,0	1,2



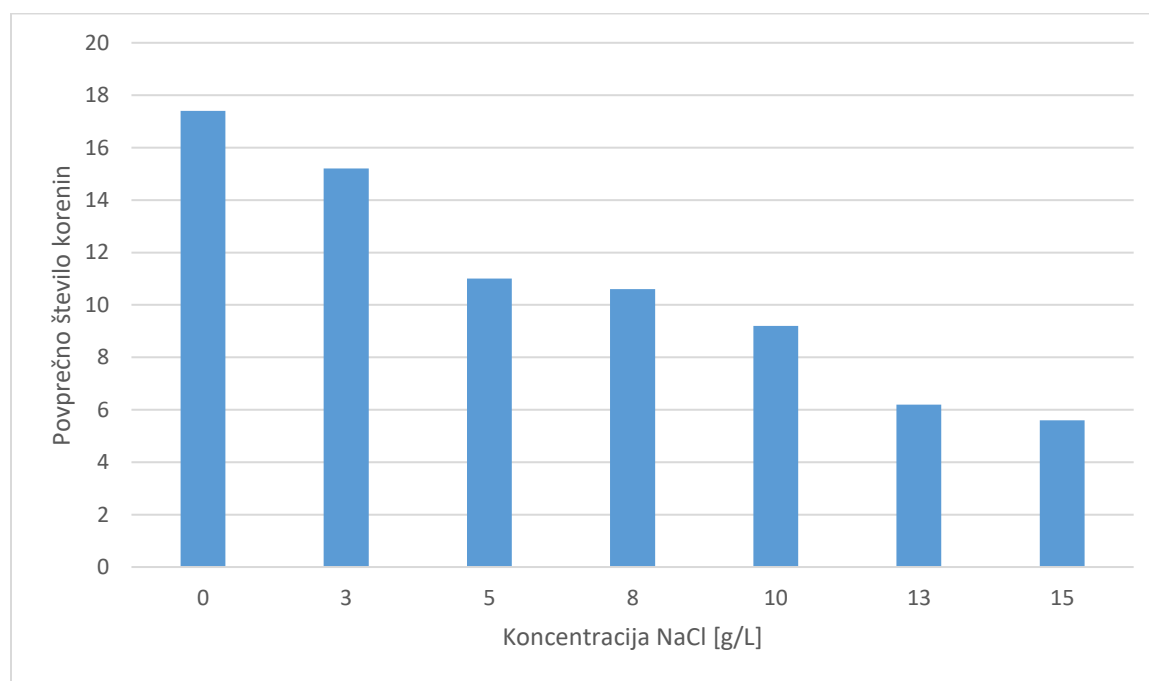
Graf 2: Povprečno število pognanih korenin čebule (*Allium cepa L.*) po tridnevnem namakanju v šestih različnih koncentracijah NaCl in destilirani vodi



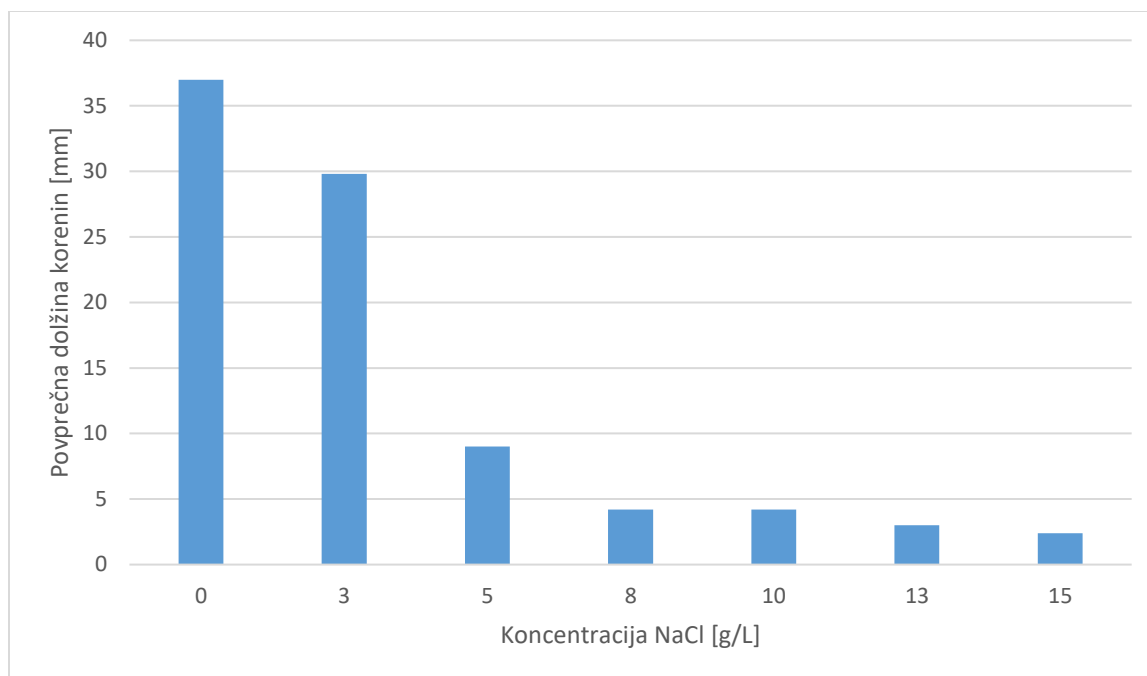
Graf 3: Povprečna dolžina pognanih korenin čebule (*Allium cepa L.*) po tridnevnem namakanju v šestih različnih koncentracijah NaCl in destilirani vodi

Tabela 9: Število in dolžine korenin čebule (*Allium cepa* L.) po petdnevnem namakanju v šestih različnih koncentracijah NaCl ter destilirani vodi

Koncentracija NaCl (g/L)	Število korenin pri preizkušancih					Povprečno število	Dolžina korenin pri preizkušancih [mm]					Povprečna dolžina [mm]
0	16	14	19	20	18	17,4	28,0	42,0	38,0	37,0	40,0	37,0
3	17	23	11	10	15	15,2	37,0	40,0	12,0	36,0	24,0	29,8
5	5	20	9	21	0	11,0	7,0	12,0	8,0	18,0	0,0	9,0
8	7	19	6	12	9	10,6	4,0	7,0	4,0	4,0	2,0	4,2
10	22	2	12	3	7	9,2	11,0	1,0	3,0	2,0	4,0	4,2
13	10	7	2	8	4	6,2	4,0	4,0	1,0	4,0	2,0	3,0
15	2	0	11	0	15	5,6	2,0	0,0	6,0	0,0	4,0	2,4



Graf 4: Povprečno število pognanih korenin čebule (*Allium cepa*) po petdnevnem namakanju v šestih različnih koncentracijah NaCl in destilirani vodi



Graf 5: Povprečna dolžina pognanih korenin čebule (*Allium cepa* L.) po petdnevnem namakanju v šestih različnih koncentracijah NaCl in destilirani vodi

4.4 Določanje mitotskega indeksa čebule (*Allium cepa* L.) namakanih v destilirano vodo, 3 g/L in 5 g/L koncentracije soli

Za vsako preučevano koncentracijo – 3g/L in 5g/L – smo zajeli tri vzorce opazovanega vidnega polja. Naključno smo prešteli skupek več kot 100 celic ter jim odstotkovno določili njihovo fazo mitotske delitve. Opazili smo, da se je (razen v interfazah) največ celic nahajalo v profazi.

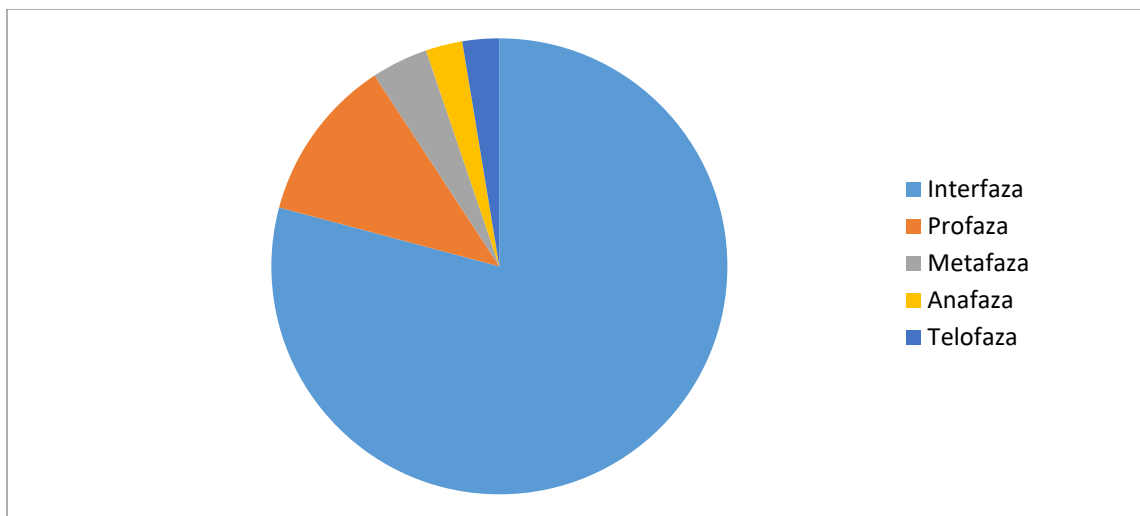
Posnetke smo zajeli preko računalniškega programa, s katerim smo se povezali na mikroskop pri 400-kratni povečavi. Slike posameznega vidnega polja so v prilogi na strani 71-73.

Tabela 10: Število celice čebule (*Allium cepa* L.) po petdnevem namakanju v destilirani vodi pregledanih pri 400-kratni povečavi

Zaporedno število preparata	Število celic				
	Interfaza	Profaza	Metafaza	Anafaza	Telofaza
1	95	14	5	3	0
2	103	12	2	1	3
3	93	17	8	5	8
Povprečje	97	14	5	3	4

Tabela 11: Odstotek faz celice čebule (*Allium cepa* L.) po petdnevem namakanju v destilirani vodi pregledanih pri 400-kratni povečavi

Zaporedno število preparata	Odstotek celic (v %)				
	Interfaza	Profaza	Metafaza	Anafaza	Telofaza
1	81	12	4	3	0
2	85	10	2	1	2
3	71	13	6	4	6
Povprečje	79	11,6	4	2,6	2,6



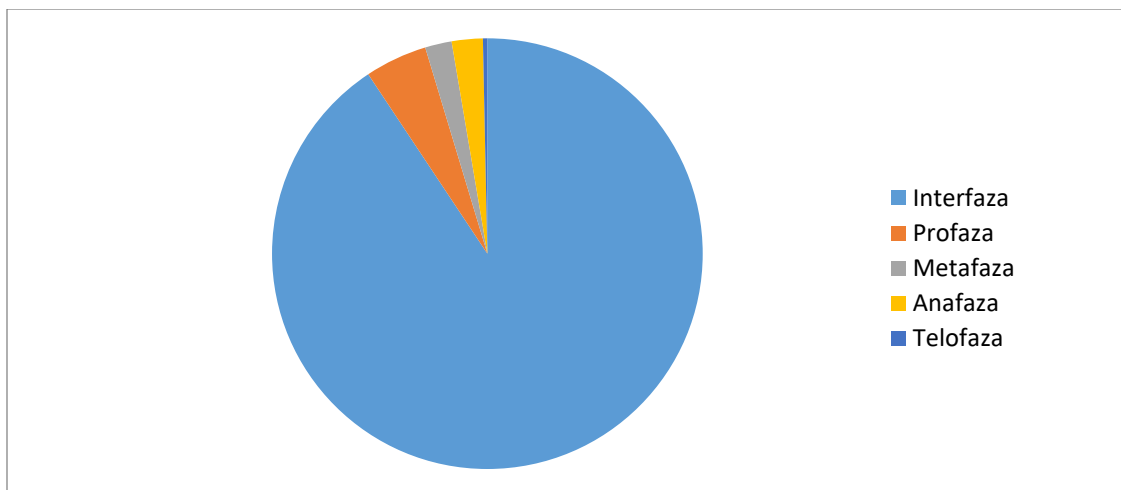
Graf 6: Povprečni delež celic čebule (*Allium cepa* L.) v vsaki fazi delitve po petdnevnem namakanju v destilirani vodi

Tabela 12: Število celic čebule (*Allium cepa* L.) po petdnevnem namakanju v 3 g/L NaCl pregledanih pri 400-kratni povečavi

Zaporedno število preparata	Število celic				
	Interfaza	Profaza	Metafaza	Anafaza	Telofaza
1	123	7	4	6	0
2	113	5	0	1	1
3	108	6	4	2	0
Povprečje	114,6	6	2,6	3	0,3

Tabela 13: Odstotek celice čebulic (*Allium cepa* L.) po petdnevnem namakanju v 3 g/L NaCl pregledanih pri 400-kratni povečavi

Zaporedno število preparata	Odstotek celic [%]				
	Interfaza	Profaza	Metafaza	Anafaza	Telofaza
1	88,0	5,0	3,0	4,0	0,0
2	94,0	4,0	0,0	1,0	1,0
3	90,0	5,0	3,0	2,0	0,0
Povprečje	90,7	4,7	2,0	2,3	0,3



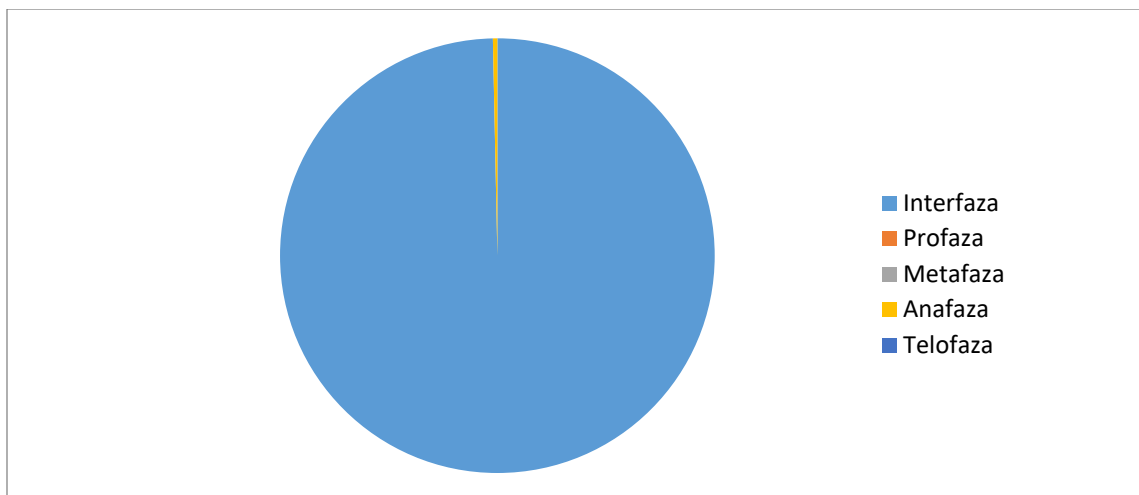
Graf 8: Povprečni delež celic čebule (*Allium cepa* L.) v vsaki fazi delitve po petdnevnem namakanju v 3 g/L NaCl

Tabela 14: Število celic čebule (*Allium cepa* L.) po petdnevnem namakanju v 5 g/L NaCl pregledanih pri 400-kratni povečavi

Zaporedno število preparata	Število celic				
	Interfaza	Profaza	Metafaza	Anafaza	Telofaza
1	157	0	0	0	0
2	134	0	0	0	0
3	201	0	0	2	0
Povprečje	164	0	0	0,6	0

Tabela 15: Odstotek celice čebulic (*Allium cepa* L.) po petdnevnem namakanju v 5 g/L NaCl pregledanih pri 400-kratni povečavi

Zaporedno število preparata	Odstotek celic [%]				
	Interfaza	Profaza	Metafaza	Anafaza	Telofaza
1	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	99,0	0,0	0,0	1,0	0,0
Povprečje	99,7	0,0	0,0	0,3	0,0



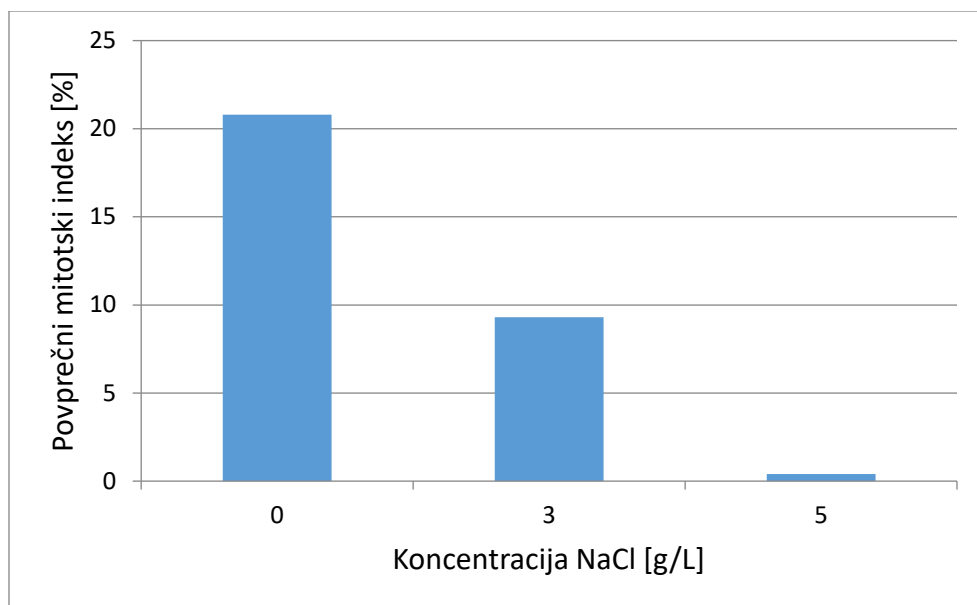
Graf 9: Povprečna odstotkovna vrednost celic čebule (*Allium cepa L.*) v fazah mitoze po petdnevnem namakanju v 5 g/L NaCl

Povprečni mitotski indeks podan v procentih smo izračunali po sledeči formuli:

$$\text{mitotski indeks (MI)} = \frac{100\% \times \text{število celic v določeni fazi}}{\text{število vseh celic}}$$

Tabela 16: Povprečni mitotski indeks celic čebule (*Allium cepa L.*) po petdnevnem namakanju v destilirani vodi, 3 g/L oziroma 5 g/L NaCl

Koncentracija NaCl [g/L]	Povprečni mitotski indeks [%]
0	20,8
3	9,3
5	12,0



Graf 7: Povprečni mitotski indeks celic čebule (*Allium cepa L.*) po petdnevnem namakanju v destilirani vodi, 3 g/L oziroma 5 g/L NaCl

5 RAZPRAVA

Hipoteza 1

Drobnjak (*Allium Schoenoprasum L.*) vsebuje približno 56,48 mg vitamina C na 100 g rastlinskega materiala (listov). (Iosin, 2017). V kontrolni skupini drobnjakov, ki smo jih zalivali z destilirano vodo, smo s pomočjo titracijske metode določili 54,48 mg/100 g vitamina C, kar je natanko 2,00 mg manj od vrednosti, ki so jo določili Iosine Alice in njeni sodelavci (2017). Če količino vitamina C primerjamo z drugimi rezultati v tabeli 1, opazimo da je po štiritedenskem zalivanju s 5 g/L NaCl vsebnost askorbinske kisline narastla za 9,18 mg/100 g, med tem ko je upadla za 12,21 mg/100 g in 17,46 mg/100 g po zalivanju s 10 in 15 g/L NaCl.

V našem poskusu smo se omejili le na dokazovanje, da z zalivanjem višjih koncentracij soli lahko povečamo količino askorbinske kisline v zelenih listih drobnjaka. Rezultati so potrdili našo prvo hipotezo, saj je vsebnost askorbinske kisline narastla za 16,85% po zalivanju s 5 g/L NaCl. Vpliv slanosti na tvorbo vitamina C potrjujejo tudi mnoge druge raziskave. (Akram et al 2017, Hameed et al 2015).

Abnormalne količine soli v rastlinah in drugi stresni dejavniki povzročajo oksidativni stres, ki je posledica povečane produkcije reaktivnih kisikovih spojin². Učinkovit antioksidativni sistem, pri katerem ima eno izmed vodilnih vlog askorbinska kislina, je ključen za razvoj tolerance na razne stresorje. (Hameed, 2015)

Že v poglavju teoretičnih osnov v rubriki o pomenu askorbinske kisline v rastlinah na strani 17, smo omenili, da je aktivna oblika askorbinske kisline anion askorbat. Velike zaloge tega aniona se nahajajo v celični citoplazmi. Od tu se ga okoli 5% transportira v apoplast. S tem se nadzoruje količina askorbata v apoplastu, kar skupaj s celokupnim redoks potencialom³apoplasta določa nadaljnjo signaliziranje in odzivanje rastline na oksidativni stres. Kljub temu da je v apoplastu še veliko drugih antioksidantov, ima askorbinska kislina ključno vlogo še posebej zaradi odsotnosti

² Med reaktivne kisikove spojine sodijo prosti radikali, razni peroksidi, lipidni peroksidi in težke kovine

³ Redoks potencial je odvisen od vseh raztopljenih molekul v neki raztopini in njihovih standardnih redoks potencialov (Stopar, 2007)

glutathiona⁴ in NAD(P)H-ja. Pignocchi je poročal, da redoks stanje apoplasta in količina askorbatov vplivata na hormonalno ravnovesje in rast rastline, signalno delovanje MAP kinaze⁵ in aktivacijo antioksidativnih encimov. Askorbinska kislina torej, glede na svoj položaj v apoplastu, ohranja ključno vlogo pri zaznavanju stresorjev, vodenju fizioloških in biokemijskih odzivov na abiotike stresorje ter vzdrževanju redoks homeostaze in s tem povezano regulacijo oksidativnih stresorjev. (Akram, 2017)

Askorbinska kislina pa ni le signalna molekula, temveč tudi pripomore k izboljšanju vzdržljivosti rastlin, ko so izpostavljene stresnim dejavnikom. Najbolj učinkovito jih ščitijo pred slanostjo in oksidativni stresorji, ki povzročajo sušenje, ob eksogenem nanosu askorbinske kisline, saj spodbuja rast, delovanje fotosinteze in fotosintetskih pigmentov ter transpiracijo. (Akram, 2017)

Že prej smo poudarili, da stres v rastlinah povzroči intenzivno produkcijo reaktivnih kisikovih spojin, kar imenujemo tudi oksidativni stres. Ta problem rešujejo s sintezo encimskih in neencimskih antioksidantov. Med slednje spada tudi vitamin C (askorbinska kislina), ki je univerzalni neencimski antioksidant in pomembno vpliva na razstrupljanje rastline z zaviranjem pretirane sinteze reaktivnih kisikovih spojin in pospeševanjem njihove razgradnje. (Akram, 2017)

Natančneje kako je proizvodnja reaktivnih kisikovih spojin povezana z osmotskim stresom pojasnjujejo Hanin in sodelavci, ki so raziskovali odzivne mehanizme rastlin na solni stres. Mednje spada signalizacija s pomočjo kalcijevih ionov. Rastline imajo senzorično omrežje občutljivo na pretok ionov, kar omogoča hitro prenašanje informacij po celotnem organizmu. Senzorji za zaznavanje hiperosmotičnega stresa so povezani s kalcijevimi ioni, ki so signalne molekule in lahko sprožijo verigo reakcij kadar se njihova količina v citosolu poveča. Velike koncentracije soli zaznavajo koreninske celice v katerih se poruši ravnovesje kalcijevih ionov, kar sproži signal ki se širi s hitrostjo do 400 $\mu\text{m/s}$ do oddaljenih tkiv rastline. (Hanin, 2016) Povečana koncentracija kalcijevih ionov v citosolu povzroči produkcijo radikalov in aktivacijo encimov, ki proizvajajo reaktivne kisikove spojine. (Görlach, 2015)

⁴ Glutathion je antioksidant, ki ščiti celice pred reaktivnimi kisikovimi spojinami

⁵ MAP kinaza je encim, ki pripenja fosfatnoscupino na aminokisline serin, treonin in tirozin. Sodelujejo pri obrambnih mehanizmih, ki ščitijo celice pred osmotskim stresom, previsokimi temperaturami itd. (Morrison, 2012)

Chan in soavtorji knjige *ROS⁶ regulation during plant abiotic stress responses* pa so povečano sintezo reaktivnih kisikovih spojin utemeljevali tudi z delovanjem elektronske prenašalne verige. Reaktivne kisikove spojine nastajajo v raznih metabolnih procesih. So neizogiben stranski produkt v elektronski prenašalni verigi, ki se nahaja v kloroplastih in mitohondrijih. Elektroni iz elektronske prenašalne verige se spojijo z O₂ molekulami in pri tem nastanejo različne reaktivne kisikove spojine. Abiotski in biotski stresni dejavniki povečujejo produkcijo in akumulacijo ROS. Za primer vzamemo kloroplast – reaktivne kisikove spojine lahko nastanejo na fotosistemu 1 in fotosistemu 2. Pod vplivom stresnih dejavnikov ima rastlina presežek absorbirane svetlobne energije, ki presega energijsko kapaciteto fotosinteze, kar pomeni da ne more porabiti vse absorbirane energije v elektronski transportni verigi. Posledično se tvori več reaktivnih kisikovih spojin, ki negativno delujejo na razvoj rastlin. (Chan, 2017)

Slanost torej poveča osmotski stres in zmanjšuje količino proste vode, kar vodi v manjšanje celičnega turgorja in kopičenje reaktivnih kisikovih spojin. (Nxele, 2017)

Zato je potreben ustrezen antioksidativni sistem, ki nadzira količino teh toksičnih spojin. Mnoge raziskave so že potrdile, da askorbat učinkovito regulira antioksidativni metabolizem v rastlinah. Delovanje askorbinske kisline povezujejo z aktivacijo različnih antioksidativnih encimov. Najbolj znane so askorbatne peroksidaze, ki so neaktivne kadar v okolici ni dovolj askorbinske kisline. Vsebujejo hem in razgrajajo vodikov peroksid na vodo ter molekule kisika, pri čemer uporabljajo askorbinsko kislino kot donor elektrona. Na izražanje genov za sintezo askorbatne peroksidaze encimov torej posredno, s pospeševanjem sinteze askorbinske kisline, vplivajo abiotski stresorji, kot so slanost, suša, škodljivo ionizirajoče sevanje. (Akram, 2017)

Vodikov peroksid je strupena spojina in nastaja kot stranski produkt v nekaterih aerobnih metabolnih poteh. Kadar so rastline izpostavljene abiotskim ali biotskim stresorjem nastaja v velikih količinah. Vodikov peroksid pa ne deluje le kot toksična snov, temveč ima tudi vlogo signalne molekule, saj bi naj regulirala izražanje genov med obrambo rastline pred različnimi stresorji iz okolja. (Locato, 2013)

⁶ ROS je kratica za reactive oxygen species, kar v prevodu pomeni reaktivne kisikove spojine

Zanimiv podatek je, da so rastline, ki proizvajajo velike količine askorbinske kisline v skoraj vseh rastlinskih organih, največ v zelenih delih rastlin, razvile način sinteze askorbinske kisline, ki v jo v zadnji fazi katalizira L-galakton-1,4-lakton dehidrogenaza, pri čemer ne nastane vodikov peroksid. (Locato, 2013)

Predvsem pomembno vlogo ima askorbinska kislina pri reakcijah redukcij v fotosintezi, saj ji s tem omogoča varno delovanje. Kadar je rastlina izpostavljena mnogim stresnim dejavnikom, kot so nizke temperature in prevelika slanost, se pospešeno izražajo geni za sintezo encimov, ki obnavljajo in sintetizirajo askorbinsko kislino. S tem rastline dosežejo stabilnejše notranje okolje in preprečujejo motnje v delovanju bioloških procesov. (Locato, 2013)

Kloroplasti so zelo občutljivi na vodikov peroksid, saj oksidira tiole v beljakovinah kloroplastov. Vodikov peroksid tako deluje kot posrednik pri zaviranju ključnih encimov, ki delujejo v kalvinovem ciklu, prav tako zavira fiksacijo ogljikovega dioksida. Prosti radikali zato morajo biti zadušeni, saj uničujejo kloroplast. (Akram, 2017)

Askorbati so lahko fakultativni-alternativni donorji elektronov, zato lahko kadar so rastline pod vplivom raznih abiotičnih stresnih dejavnikov sodelujejo v elektronski prenašalni verigi v kloroplastih. (Akram, 2017)

Hipoteza 2

Kot predvideno je količina askorbinske kisline pri višjih koncentracijah soli (10 in 15 g/L) začela upadati. Po štiritedenskem zalivanju s 10 g/L je vsebnost vitamina C upadla za 22,41%, med tem ko je pri 15 g/L upadla za 32,05%. V argumentaciji hipoteze 1 smo razpravljali o reaktivnih kisikovih spojinah in antioksidativnem obrambnem mehanizmu. Ob preveliki obremenitvi rastline s soljo, askorbinska kislina in drugi antioksidanti ne morejo več preprečiti pretirane produkcije reaktivnih kisikovih spojin in vdiranje raznih ionov v celico.

Ko kopičenje reaktivnih kisikovih spojin in drugih radikalov ter ionov kot so Na^+ , Cl^- , K^+ in SO_4^{2-} presežejo prag tolerance se pojavijo razni toksični učinki. V normalnih pogojih je v citoplazmi celic višjih rastlin od 100 do 200 mM kalijevih ionov (K^+) in od 1 do 10 mM natrijevih ionov (Na^+). V takšnem okolju tudi encimi lahko delujejo najbolj optimalno. Nenormalni nivo Na^+ in K^+ ionov onemogoči delovanje encimov in zavre sintezo tudi drugih beljakovin. Kadar je v celici preveč Na^+ ionov, lahko začnejo ti izrivati kalcijeve ione, kar spremeni prepustnost membrane, posledično pa začnejo izhajati tudi K^+ ioni. (Schulze, 2002) Kalijeve ioni pa so makro-elementi, ki regulirajo rast in razvoj rastlin in drugih organizmov. Hkrati pa povzročajo kopičenje osmotsko aktivnih snovi in antioksidantov (askorbinske kisline in drugih) v celicah, kadar so te izpostavljene višjim koncentracijam soli. (Ahanger, 2017)

Drugo hipotezo lahko potrdimo, saj smo dokazali da po zalivanju drobnjaka s previsokimi koncentracijami NaCl je vsebnost vitamina C upadla, vendar točen prag ni bil določen.

Po štiritedenskem zalivanju s 10 in 15 g/L NaCl pa je drobnjak začel tudi vidno navzven propadati. Listi so se povесili in pričeli bledeti ter izgubljati na masi. Za titracijo (metoda s katero smo določali količino askorbinske kisline) je priporočena uporaba vsaj 15-ih gramov rastlinskega materiala. Iz tabele 17 je razvidno, da smo pri obranih drobnjakih, ki smo jih zalivali z 10 in 15 g/L NaCl natehtali 1 g oziroma 2,30 g manj zelenih listov od priporočenega standarda, saj nam je zmanjkalo rastlinskega materiala, kljub temu da smo vzgajali enako število drobnjaka.

Prav tako smo pri sekljanju drobnjaka na drobne koščke zaznali da so listi drobnjakov, ki smo jih zalivali z višjimi koncentracijami soli, postajali vse bolj pekoči. Tega nismo dokazovali z raznimi

metodami, je le kvalitativna opazka, na katero smo naleteli ob pripravljanju drobnjaka za titracijo. Obstajajo pa raziskave (Arrowsmith et al 2011, Al Hattab et al 2015) ki eksperimentalno dokazujejo da s povišano slanostjo okolja postajajo rastline bolj pekoče. Glavna substanca, ki se kopiči in daje pekoč občutek je alicin. (Arrowsmith, 2011)

Na tem področju se bi še dalo narediti precej raziskav, ki bi lahko natančneje opredelile prag tolerance na sol in vzroke ter posledice za povečanje pekočnosti.

Hipoteza 3

Rezultati iz tabel 7, 8, 9 in 10 potrjujejo našo tretjo hipotezo, saj je v petrijevkah z višjimi koncentracijami soli vzkalilo manj semen. Tudi dolžina poganjkov je padala z višanjem koncentracije soli. Končni rezultati veljajo tako za drobnjak (*Allium schoenoprasum*) kot za pšenico (*Triticum aestivum* L.).

Če primerjamo procent vzkaljenih semen pri drobnjaku iz tabele 6 in pšenice iz tabele 8 opazimo, da je bila kalitev veliko uspešnejša pri pšenici, saj so vzkalila vsa semena zalivana z destilirano vodo oziroma s 3, 5 ali 8 g/L NaCl že šesti dan. Medtem ko semena drobnjaka niso niti po sedmih dneh v nobeni izmed petrijevk zalivanih z različnimi koncentracijami soli dosegla 100% kaljivost. Po tem lahko sklepamo, da je pšenica veliko tolerantnejša na visoke koncentracije soli kot drobnjak. Tudi Akbari in sodelavci so zapisali, da razne vrste pšenice spadajo med relativno halotolerantne rastline, (torej so veliko tolerantnejše od povprečnih glikofitov). (2007) Določimo lahko celo njen prag tolerance na sol, ki znaša približno 8 g/L NaCl. Pri 10, 13 in 15 g/L NaCl je procent vzkaljenih semen pšenice padal z naraščanjem koncentracije soli. Drobnjak je občutljivejša rastlina zato je vzkalilo le 88% semen zalivanih z destilirano vodo. Z višanjem koncentracije soli pa je ta procent upadal. Pri 15 g/L NaCl je bila kaljivost 0%.

Iz grafa 4 in 5 lahko vidimo, da dolžina semen upada z višanjem koncentracije soli. Kljub temu da so vsa semena pšenice zalivana z destilirano vodo oziroma s 3, 5 ali 8 g/L NaCl vzkalila, njihove dolžine niso enake, temveč prav tako upadajo z višanjem količine soli.

Mirujoče stanje semen prekine imbibicija oziroma absorpcija vode, kar omogoči aktivacijo metabolizma. Povišana slanost upočasni vsrkavanje vode v semena, posledično s tem tudi zavirajo njihovo kalitev in rast. NaCl zlahka prehaja skozi celično membrano v citoplazmo celic, razen če akumulacijo preprečuje aktivirana membranska črpalka. (Katembe, 1998) Akumulacija Na^+ in Cl^- ionov v celici zavira absorpcijo ključnih hranil kot je K^+ (Mittal, 2018) in vpliva na aktivnost beljakovin, saj ioni preoblikujejo strukturo hidratacijskega ovoja, ki oblega proteine. NaCl lahko deluje kot inhibitor za nekatere encime ki imajo ključno vlogo pri kaljenju. (Katembe, 1998)

Hipoteza 4

Iz grafov 2 in 4 je razvidna povprečno število pognanih korenin čebule (*Allium cepa*) za vsako koncentracijo NaCl v vodni raztopini. Po petdnevnem namakanju so največ korenin pognale čebule gojene pri nižjih koncentracijah soli, najmanj pa čebule gojene pri višjih koncentracijah. Število korenin in njihova dolžina je uapdala obratnosorazmerno s koncentracijo soli. Po tridnevnem namakanju pa število pognanih korenin neenakomerno narašča in pada. Največ korenin so pognale čebule gojene v destilirani vodi, nato njihovo število močno upade pri čebulah namakanih v 3 g/L soli in začne naraščati vse do 8 g/L soli, nato ponovno začne upadati.

Deloma je na rezultate števila korenin in njihovo dolžino vplivalo tudi dejstvo, da pri nekaterih višjih koncentracijah rastline niso pognale korenin, zato je bila tudi njihova skupna dolžina nična. Ponekod so se pri nižjih koncentracijah pojavili primerki, ko je kakšna korenina izstopala v svoji dolžini, zato smo izmerili vse korenine in jim tudi izračunali njihovo povprečno dolžino. Večjo dolžino koreninskih vršičkov si lahko razlagamo kot uporabo za rastline primernejšega hranila, medtem ko lahko za neustrezno hranilo označimo tiste koncentracije, kjer koreninski laski niso pgnali.

Četrto hipotezo, torej da bo pri obeh poskusih gojenja rast korenin čebulic sorte Sturon(*Allium cepa* L.) uspešnejša pri manjših koncentracijah NaCl lahko v celoti potrdimo pri petdnevnem namakanju v raztopini, medtem ko lahko pri tridnevnem namakanju to le delno potrdimo, saj so imele koncentracije 3g/L, 5g/L in 8g/L relativno podobno uspešnost pri rasti korenin, kljub temu pa je bilo vidno odstopanje od višjih koncentracij (10g/L, 13g/L in 15g/L). Drugi del četrte hipoteze, torej da bodo korenine daljše (pri nižjih koncentracijah NaCl) lahko v celoti potrdimo pri petdnevnem namakanju, saj so si povprečne dolžine korenin v vrstnem redu sledile obratno kot koncentracija NaCl, pri višji koncentraciji smo dobili krajše korenine, pri najnižji koncentraciji pa najdaljše.

Hipoteza 5

Opazimo, da je najnižji mitotski indeks prav pri najvišji koncentraciji NaCl, torej 15g/L ter da je najvišji mitotski indeks pri najnižji koncentraciji NaCl (če izvajamo kontrolni poskus).

Mitotski indeks je z višanjem koncentracije NaCl padal tako pri tridnevnem kot tudi pri petdnevnam namakanju čebul. To si lahko razložimo z dejstvom, da prevelika količina soli zavira rast korenin, saj Na ovira dostop korenin do hranilnih snovi, v našem primeru do vodne raztopine.

Učinki slanosti na rastline so presežki Na^+ in Cl^- v protoplazmi, ki podrejo ionsko ravnotežje (K^+ , Ca^{2+} , Na^+), specifični učinki ionov na delovanje posameznih encimov in membrano, nižja fotofosforilacija, manjša asimilacija nitrata, motnje v sintezi proteinov ter kopičenje diaminov in poliaminov. (Vodnik, 2018)

Če je stres močan, pride do trajnih funkcijskih nepravilnosti in do poškodb, manjše rasti in problema pri kalitvi. (Vodnik, 2018)

Iz tabele 16 in grafa 7 lahko razberemo, da se je mitotski indeks spreminjal sorazmerno s koncentracijo raztopine NaCl. Tako smo za 3g/L dobili višji mitotski indeks kot za koncentracijo 5g/L, obe koncentraciji pa sta imeli manjši mitotski indeks kot kontrolni poskus.

Mitotski indeks za posamezno fazo se v vrstnem redu ni kaj bistveno razlikoval med koncentracijami.

Hipotezo 5 lahko potrdimo in na osnovi rezultatov sklepamo, da se mitotski indeks manjša s povečanjem NaCl v raztopini. Sklepamo lahko, da bi z nadaljevanjem poskusa in z merjenjem mitotskega indeksa kmalu prišli do koncentracije, kjer bi se delitev celic (mitoza) popolnoma ustavila prav zaradi prevelike koncentracije NaCl.

Dani rezultati v grobem nakazujejo, da je bila v danem trenutku pri kontrolnem poskusu kar ena petina (20%) celic v fazi delitve, pri koncentraciji 3g/L pa le še ena desetina (10%). Pri koncentraciji 5g/L je bila v fazi delitve v povprečju le ena celica na 300 opazovanih celic (0,3%), kar nakazuje bližanje popolni ustavitvi celičnih delitev pri višjih koncentracijah.

Hipotezo 5 potrjuje hipoteza 4, saj daljše korenine hkrati pomenijo tudi višji mitotski indeks, saj daljša kot je korenina čebulic, več celičnih delitev je opravila.

6 OCENA METODE DELA

6.1 Titracija

Titracija je kvantitativna metoda določanja neznane koncentracije znane snovi. Titriramo do ekvivalentne toče oziroma barvnega preskoka v vzorcu. Odčitamo volumen porabljene raztopine in s pomočjo enačb izračunamo iskano koncentracijo snovi v vzorcu. (Titration, 2018)

Pripravljen zelen vzorec drobnjaka smo titrirali s temno modrim barvilom do barvnega preskoka v roza. Pomanjkljivost te metode je subjektivno določanje kdaj se je titrirana raztopina obarvala v pravi odtenek roza. Napako smo sicer skušali zmanjšati s primerjalno raztopino roza barve, ki smo jo postavili ob novem vzorcu pripravljenem za titriranje.

Zaradi majhne porabe modre raztopine 2,6-diklorindofenola (od 2,0 mL do 3,6 mL) je možnost za relativno napako bila toliko večja. Pri titraciji smo morali biti izredno natančni, saj je vsak mililiter ključni pokazatelj razlike v volumnih porabe. Ker je barvilo 2,6-diklorindofenola temno modre barve je bilo odčitavanje volumna na bireti, ki ima prav tako skalo označeno s temno modro barvo, oteženo.

Dandanes poznamo veliko natančnejše in tehnološko naprednejše metode določanje vitamina C, kot je HPLC metoda - tekočinska kromatografija visoke ločljivosti. Je najbolj natančna metoda, s katero lahko kvalitativno in kvantitativno opredeljujemo posamezne komponente vzorca. Snovi v vzorcu se razlikujejo glede na fizikalne in kemijske interakcije z mobilno in stacionarno fazo. (Pokorny, 2013)

Kot že omenjeno smo v kontrolni skupini drobnjakov, ki smo jih zalivali z destilirano vodo s pomočjo titracijske metode določili 54,48 mg/100 g vitamina C, kar je natanko 2,00 mg manj od vrednosti, ki so jo določili losine Alice in njeni sodelavci (2017). Na vsebnost vitamina C v rastlinah vplivajo tudi drugi dejavniki kot so gojenje, čas pobiranja, skladiščenje in transport, zaradi česar lahko pride do odstopanja v vrednostih. V svoji raziskavi so losine in sodelavci kupili drobnjak v trgovini, med tem ko smo ga mi vzgojili sami. S tem smo delno izključili druge moteče dejavnike, ki bi lahko vplivali na količino vitamina C.

6.2 Ocena metode gojenja čebulic

Tukaj se pojavi vprašanje, katere rastline (s poudarkom na poljščinah) so primerne za hranila z višjo koncentracijo NaCl oz. kakšna je splošna meja koncentracije NaCl za povprečno rastlino, da le-ta še uspeva. Prav tako se pojavi vprašanje, če je katera koncentracija NaCl za določeno rastlino bolj primerna kot nižja koncentracija ali je uspešnost rasti obratno sorazmerna z koncentracijo NaCl v vodi.

Do natančnejših rezultatov bi prišli predvsem, če bi se osredotočili zgolj na eno samo koncentracijo NaCl ter z njo opravili več gojenj čebulic, saj bi morda pri večji količini (kvantiteti) prišli do (malo) drugačnih meritev. Rezultati bi lahko bili natančnejši, če bi bila čebulica v času gojenja v komori z regulirano (sobno) temperaturo, prav tako bi (verjetno) dobili (malo) drugačne rezultate, če bi bile čebulice ves čas pod enakomerno svetlobno jakostjo in valovno dolžino.

Poskus bi ponovili z večjo količino čebulic, ki bi bile (na videz) identične, izmerili bi jim enako količino hranila, postavili bi jih v temperaturno komoro s sobno temperaturo 20°C in jim določili ustrezni barvni spekter svetlobe in svetlobno jakost.

6.3 Ocena metode določanja mitotskega indeksa

Dane vrednosti ob določeni fazi mitoze čebulic bi ocenili kot korektno pridobljene, saj smo bili pri delu skrbni, organizirani in dovršni. Če bi poskus z mitotskim indeksom ponovili, bi prišli do podobnih rezultatov, morda bi prišlo do rahlega odstopanja, če bi meritve opravljali na zelo obširnem številu celic (več tisoč celic).

Območja opazovanih celic so bila popolnoma naključna, saj smo želeli dobiti splošne rezultate. Dejstvo je, da se mitotski indeks razlikuje glede na območje, nekje je kakšna celica v anafazi več, spet v drugem območju je kakšna celica v stanju telofaze več.

Uporabili smo splošno metodo štetja, nismo se ozirali na okvirno število celic, temveč zgolj na opazovano območje ter število celic preračunali na odstotke. Zanesljivost rezultatov smo izboljšali z večkratnim štetjem pri več vidnih poljih.

7 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Dandanes se pojavlja problematika gnojenja in izčrpavanje zemlje, ki povzroča skrb ne le okoljevarstvenikom temveč tudi kmetovalcem, ki izgubljajo rodovitne površine. Z namakanjem in izsuševanjem zemelj povzročamo akumulacijo raznih topljencev in soli, ki v prevelikih količinah lahko škodujejo rastlinam. Ocenjujejo da ima kar ena tretjina namakalnih površin preveliko količino soli. (Schulze, 2002)

8 ZAKLJUČEK

V prvem delu raziskovalne naloge smo dokazovali, da solni stres vpliva na raven vitamina C v drobnjaku (*Allium schoenoprasum*). Pri 5 g/L soli je bilo v zelenih listih drobnjaka 9,18 mg/100 g več vitamina C kakor v listih drobnjakov zalivanega z destilirano vodo. Pri 10 g/L in 15g/L je ta raven močno upadla, rastline so prav tako začele navzven vidno propadati. Prvo in drugo hipotezo smo s tem potrdili. Predlagamo nadaljne raziskave, ki bi določile natančno zgornjo mejo tolerance drobnjaka (*Allium schoenoprasum*) na solni stres.

Tudi tretjo hipotezo lahko potrdimo, saj smo dokazali da solni stres zavira kalitev semen drobnjaka (*Allium schoenoprasum*) in pšenice(*Triticum aestivum* L.). Vendar moramo upoštevati, da je pšenica tolerantnejša vrsta, zato so semena pšenice po sedemdnevnem kaljenju dosegla 100% kaljivost pri koncentracijah od 0 do 8 g/L soli, med tem ko semena drobnjaka nikoli niso vsa vzkalila. Potrebno pa je tudi omeniti, da je dolžina poganjkov tako pri pšenici kot drobnjaku upadala z višanjem koncentracije soli.

Na podlagi danih rezultatov, ki smo jih pridobili s preštevanjem korenin čebulic, merjenjem njihove dolžine in določanjem mitotskega indeksa pri različnih koncentracijah smo prišli do sklepa, da (večje količine) soli negativno vplivajo na rast in razvoj rastlin.

Pri prevelikih koncentracijah NaCl smo zasledili že popoln zastoj razvoja rastline, kjer se je rast ustavila že v zelo zgodnji fazi ali pa se sploh ni začela. Pri nižjih koncentracijah NaCl, predvsem pri 3g/L in 5g/L smo zasledili še relativno spodbudne rezultate tako za število korenin, kot tudi za njihovo dolžino. Rezultati so bili pozitivni tako pri tridnevnem kot petdnevem namakanju.

Na podlagi mitotskega indeksa, pridobljenega z mikroskopiranjem smo dobili rezultate, ki še dodatno potrjujejo dejstva, pridobljena z gojenjem čebulic.

Pri koncentraciji 5g/L smo prišli skoraj do popolne prevlade celic med interfazo celične delitve, kar nam dodatno prikaže, zakaj se je rast zmanjšala. Pri koncentraciji 3g/L smo imeli (v povprečju) več korenin, ki so bile (prav tako v povprečju) tudi daljše (pri obeh časovnih obdobjih merjenja), kar potrjujemo tudi z mikroskopiranjem, saj smo zasledili največ celic v ostalih fazah delitve (profazi, metafazi, anafazi in telofazi), čemur pripisujemo tudi najučinkovitejšo rast.

Temu, da je prevladovala interfaza mitoze pripisujemo predvsem dejstvu, da je celica v času delitve prav v tej fazi in da ostale potečejo relativno zelo hitro.

9 VIRI

Ahanger, Tomar, Tittal, Argal in Agarwall. 2017. Plant growth under water/salt stress: ROS production; antioxidants and significance of added potassium under such conditions. [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29158624> [Citirano 26. 12. 2018, 15:15]

Akbari, G., Sanavy, S. A. M. M. in Yousefzadeh, S. 2007. Effect of Auxin and Salt Stress (NaCl) on Seed Germination of Wheat Cultivars (*Triticum Aestivum* L.). [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu: <https://scialert.net/fulltextmobile/?doi=pjbs.2007.2557.2561> [Citirano 18. 12. 2018, 18:25]

Akram, N. A., Shafiq, F., Ashraf, M. 2017. Ascorbic Acid-A Potential Oxidant Scavenger and Its Role in Plant Development and Abiotic Stress Tolerance. [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5405147/> [Citirano 24. 12. 2018, 20:24]

Al Hattab, Z., Al-Ajeel, S. A. in El-Kaaby, E. J. 2015. Effect of Salinity Stress on *Capsicum annuum* Callus Growth, Regeneration and Callus Content of Capsaicin, Phenylalanine, Proline and Ascorbic Acid. [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu: https://www.researchgate.net/publication/287107693_Effect_of_Salinity_Stress_on_Capsicum_annuum_Callus_Growth_Regeneration_and_Callus_Content_of_Capsaicin_Phenylalanine_Proline_and_Ascorbic_Acid [Citirano 28. 12. 2018, 00:30]

Arrowsmith, S., Egan, T. P., Meekins, F., Powers, D. in Metcalfe, M. 2011. Research Article: Effects of salt stress on capsaicin content, growth, and fluorescence in a Jalapeño cultivar of *Capsicum annuum* (Solanaceae). [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu: <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1893/0005-3155-83.1.1?journalCode=bios> [Citirano 22. 12. 2018, 00:01]

Arslan, H., Kiremit, M., S. in Güngör, A., 2018. Impacts of different water salinity levels on salt tolerance, water use, yield, and growth of chives (*Allium schoenoprasum*). [spletni vir].

Dostopno na URL naslovu:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00103624.2018.1526949?journalCode=lcss20h>

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00103624.2018.1526949>
%3FjournalCode%3Dlcss20& [Citirano 29. 12. 2018, 21:15]

Barth, C., De Tullio, M. in Conklin, P., L., 2006. The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence. [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu: <https://academic.oup.com/jxb/article/57/8/1657/525733> [Citirano 27. 12. 2018, 22:10]

Bejo, K. in Zinauer, L., 2015. Drevesa in zimsko soljenje: Vpliv soli na rast rastlin. [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu: http://www.svz-si.eu/sl/Rastline_in_zima/Drevesa_in_zimsko_soljenje/ [Citirano 17. 1. 2019, 18:52]

Chan, Z., Song, C., Kim, W., Y. in Yokawa K., 2017. ROS Regulation during Plant Abiotic Stress Responses. Frontiers in plant science. ISBN 978-2-88945-054-1.

Gallie, D., R., 2012. Review Article: L-Ascorbic Acid: A Multifunctional Molecule Supporting Plant Growth and Development. [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/795964> [Citirano 28. 12. 2018, 23:22]

Görlach, A., Bertram, K., Hudecovam, S., Krizanova, O., 2015. Calcium and ROS: A mutual interplay. [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4556774/> [Citirano 30. 11. 2018, 20:20]

Göock Roland, Gewürze und Kräuter von A - Z" (V svetu začimb in dišav), Založba Mladinska knjiga in HP Droga Portorož, Ljubljana, 1979

Hameed, A., Gulzar, S., Aziz, I., Hussain, T., Gul, B. in Khan, M. A., 2015. Effects of salinity and ascorbic acid on growth, water status and antioxidant system in a perennial halophyte. [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu: https://www.researchgate.net/publication/271329990_Effects_of_salinity_and_ascorbic_acid_on_growth_water_status_and_antioxidant_system_in_a_perennial_halophyte [Citirano 18. 12. 2018, 16:35]

Hanin, M., Ebel, C., Ngom, M., Laplaze, L. in Masmoudi, K., 2016. New Insights on Plant Salt Tolerance Mechanisms and Their Potential Use for Breeding. [spletni vir]. Dostopno na URL

naslovu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5126725/> [Citirano 23. 12. 2018, 18:25]

Hofmann, H., 2014. Zelišča in jagodičje. – 1.izd. – Ljubljana: Mladinska knjiga. ISBN 978-961-01-3095-6

Iosin, A., Raba, D., Moldovan, C., Popa, V., Dumbravă, D. G., 2017. The influence of freezing on the content of vitamin c, chlorophylls and carotenoids in chives (*Allium Schoenoprasum* L.). Scien. Tech. Bull-Chem. Food Sci. Eng., Vol. 14(XV), p. 49-52

Jagodič E., 2014. Dnevne spremembe mitotskega indeksa v koreninskih vršičkih kalečih semen boba (*Vicia faba* L.). Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo. [Citirano 17. 1. 2019, 19:43]

Katembe, W., J., Ungar, I., A. in Mitchell J., P. 1998. Effect of Salinity on Germination and Seedling Growth of two *Atriplex* species (Chenopodiaceae). Annals of Botany 82: p. 167–175

Koželj, R. 2018. Pšenica. [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu: <https://www.farmedica.si/rastlina/63/Psenica> [Citirano 22. 12. 2018, 17:29]

Locato, V., Cimini, S., De Gara, L., 2013. Strategies to increase vitamin C in plants: from plant defense perspective to food biofortification. [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3660703/> [Citirano 24. 12. 2018, 17:12]

Martel, B. in Cassidy, K. (2004). Chemical Risk Analysis: A Practical Handbook. Butterworth–Heinemann. str. 369

Medić-Šarić, M., Buhač, I. in Bradamante, V., 2002. Vitamini in minerali: resnice in predsodki. Ptuj: In obs medicus. ISBN 961-90645-6-9.

Mittal, N., Thakur, S., Verma, H. in Kaur, A. 2018. Interactive effect of salinity and ascorbic acid on *Brassica Rapa* L. plants. [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu: https://www.researchgate.net/publication/326689690_INTERACTIVE_EFFECT_OF_SALINITY_AND_ASCORBIC_ACID_ON_BRASSICA_RAPA_L_PLANTS [Citirano 20. 1. 2019, 18:04]

Morrison, D., K., 2012. MAP Kinase Pathways. [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3536342/> [Citirano 21. 12. 2018, 12:54]

Nxele, X., Klein, A., Ndimba, B. K., 2017. Drought and salinity stress alters ROS accumulation, water retention, and osmolyte content in sorghum plants [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S025462991630477X> [Citirano 22. 12. 2018, 12:44]

Office of the Gene Technology Regulator. 2008. The Biology of *Triticum aestivum* L. Em Thell (Bread Wheat). [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu: [www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/wheat-3/\\$FILE/biologywheat08.pdf](http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/wheat-3/$FILE/biologywheat08.pdf) [Citirano 30. 12. 2018, 10:15]

Pokorny, I., 2013. Določanje askorbinske kisline in dehidroaskorbinske kisline v trdnih farmacevtskih oblikah z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.

ROKO. 2015. Čebulček semenski Sturon 14-21 500g. [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu: https://roko.si/prodajni_program/semena/cebula_cesen/6705/cebulecek_semenski_sturon_14_21_500g/ [Citirano 21. 1. 2019, 13:10]

Schulze, E., Beck, E. in Muller-Hohenstein, K., 2002. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg. ISBN 3-540-20833

Smirnoff, N., 1996. The Function and Metabolism of Ascorbic Acid in Plants. [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu: https://www.google.si/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjZ--mppf3fAhULmBQKHWAICbQQFjAAegQICRAB&url=https%3A%2F%2Facademic.oup.com%2Faob%2Farticle-pdf%2F78%2F6%2F661%2F7982642%2F780661.pdf&usg=AOvVaw2U8yUdA_r5ZT9sSRxD4PA4 [Citirano 20. 12. 2018, 12:55]

Smirnoff, N. in Wheeler, G., L., 2000. Ascorbic Acid in Plants: Biosynthesis and Function. DOI: 10.1080/07352680091139231

Snape, J. W., Pánková, K. 2013. *Triticum Aestivum* L (Wheat). [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu: <http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0003691.html> [Citirano 27. 12. 2018, 13:20]

Spohn, M. in Spohn, R., 2008. Katera cvetlica je to? Olševček: Narava. ISBN 978-961-6582-24-7.

Stopar, D., 2007. Vpliv redoks potenciala na delovanje mikroorganizmov. [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu: <http://web.bf.uni-lj.si/zt/mikro/homepage/kisikNS.pdf> [Citirano 17. 12. 2018, 23:40]

Štajner, D., Čanadanović-Brunet, J., in Pavlović, A., 2004. *Allium schoenoprasum* L., As a Natural Antioxidant. DOI: 10.1002/ptr.1472

The Editors of Encyclopaedia Britannica. 2018. Titration. [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu: <https://www.britannica.com/science/titration> [Citirano 17. 12. 2018, 16:35]

Vodnik D., 2018. Fiziologija stresa. [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu: http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2711/Gradiva_Vodnik_Predavanja_Bolonja/Vodnik_P_B_AG-UNI-Ekofiziologija-Stres1-P6_-11-12.pdf [Citirano 15. 12. 2018, 14:21]

Wood, F. O., Hills, J. M. in Ralston, R. H. 1999. Salt: Sodium chloride. [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu: <https://www.britannica.com/science/salt> [Citirano 14. 12. 2018, 17:34]

10 VIRI SLIK

Vitamin C. 2018. [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu:

<http://chemistry.oregonstate.edu/courses/ch130/old/VITCTEXT.htm> [Citirano 17. 12. 2018, 16:29]

Stopar, D. 2018. Abiotski faktorji. [spletni vir]. Dostopno na URL naslovu: <http://web.bf.uni-lj.si/zt/mikro/homepage/abiotskiFAKTORJI.pdf> [Citirano 14. 1. 2019, 15:15]

11 PRILOGE

Tabela 17: Masa uporabljenega drobnjaka (*Allium schoenoprasum*), obranega po štiritedenskem zalivanju z destilirano vodo oziroma s 5, 10 ali 15 g/L NaCl, za titracijo in določanje vsebnosti vitamina C

Koncentracija NaCl [g/L]	Masa [g]
0	15,00
5	15,05
10	14,00
15	13,70

Tabela 18: Volumen porabljenega barvila 2,6-diklorindofenol pri titraciji 2% metafosforne kisline s 2,705 mg/10 mL askorbinske kisline

Zaporedna meritev	V1 barvila[mL]	V2 barvila[mL]	ΔV barvila [mL]	Povprečni V barvila [mL]
1	0,0	9,7	9,7	9,6
2	9,7	19,2	9,5	
3	19,2	28,7	9,5	
4	28,7	38,3	9,6	
5	38,3	47,8	9,5	
6	0,0	9,4	9,4	
7	9,4	19,1	9,7	
8	19,2	28,7	9,2	
9	28,7	38,5	9,8	
10	38,7	48,4	9,7	

Izračun srednjega titra:

$$x = \frac{9,6\text{mL}}{2,705\text{g}} = 3,55 \frac{\text{mL}}{\text{mg}}$$

Tabela 19: Volumen porabljenega barvila 2,6-diklorindofenol pri titraciji vzorcev drobnjakov (*Allium schoenoprasum*) zalivanih z destilirano vodo oziroma 5, 10 ali 15 g/L NaCl

Koncentracija raztopine NaCl [g/L]	Zaporedna meritev	V1 [mL]	V2 [mL]	ΔV [mL]	Povprečni V [mL]
0	1	0,2	2,7	2,5	2,9
	2	2,7	5,3	2,6	
	3	5,6	8,1	2,5	
	4	8,1	10,6	2,5	
	5	10,6	13,5	2,9	
	6	13,5	16,8	3,3	
	7	16,8	19,6	2,8	
	8	19,6	22,7	3,1	
	9	22,7	26,0	3,3	
	10	26,0	29,0	3,0	
5	1	0,1	3,7	3,6	3,4
	2	3,7	7,0	3,3	
	3	7,0	10,2	3,2	
	4	10,2	13,4	3,2	
	5	13,4	16,4	3,0	
	6	16,4	19,3	2,9	
	7	19,3	22,4	3,1	
	8	22,4	25,3	2,9	
	9	25,3	28,5	3,2	
	10	28,5	31,5	3,0	
10	1	0,0	2,1	2,1	2,1
	2	2,1	4,2	2,1	
	3	4,2	6,0	1,8	
	4	6,0	8,1	2,1	
	5	8,1	10,2	2,1	
	6	10,2	12,3	2,1	
	7	12,3	14,3	2,0	
	8	14,3	16,3	2,0	
	9	16,3	18,4	2,1	
	10	18,4	20,5	2,1	
	1	0,0	1,5	1,5	

15	2	1,5	3,2	1,7	1,8
	3	3,2	4,7	1,5	
	4	4,7	6,1	1,4	
	5	6,1	7,5	1,4	
	6	7,5	9,2	1,7	
	7	9,5	11,4	1,9	
	8	11,4	13,5	2,1	
	9	13,5	15,9	2,4	
	10	15,9	17,8	1,9	

Tabela 20: Dolžina vzkaljenih semen drobnjaka (*Allium schoenoprasum*) po sedmih dneh zalivanja s šestimi različnimi koncentracijami NaCl oziroma destilirano vodo

		Koncentracija raztopine NaCl [g/L]						
	Poganjek	0	3	5	8	10	13	15
Dolžina [mm]	1.	15	4	10	3	2	1	/
	2.	16	8	4	1	/	2	/
	3.	15	4	5	/	/	/	/
	4.	20	6	5	/	/	/	/
	5.	14	4	6	/	/	/	/
	6.	22	6	2	/	/	/	/
	7.	11	8	2	/	/	/	/
	8.	13	3	4	/	/	/	/
	9.	15	8	/	/	/	/	/
	10.	5	3	/	/	/	/	/
	11.	15	4	/	/	/	/	/
	12.	18	/	/	/	/	/	/
	13.	5	/	/	/	/	/	/
	14.	15	/	/	/	/	/	/
	15.	16	/	/	/	/	/	/
	16.	15	/	/	/	/	/	/
	17.	11	/	/	/	/	/	/
	18.	14	/	/	/	/	/	/
	19.	16	/	/	/	/	/	/
	20.	4	/	/	/	/	/	/
	21.	13	/	/	/	/	/	/
	22.	17	/	/	/	/	/	/
	23.	/	/	/	/	/	/	/
	24.	/	/	/	/	/	/	/
	25.	/	/	/	/	/	/	/
	Povprečje [mm]	13,86	5,67	5,33	2,00	2,00	1,50	0,00
	Standardni odklon [mm]	4,39	1,91	2,38	1,00	0,00	0,50	0,00

Legenda:

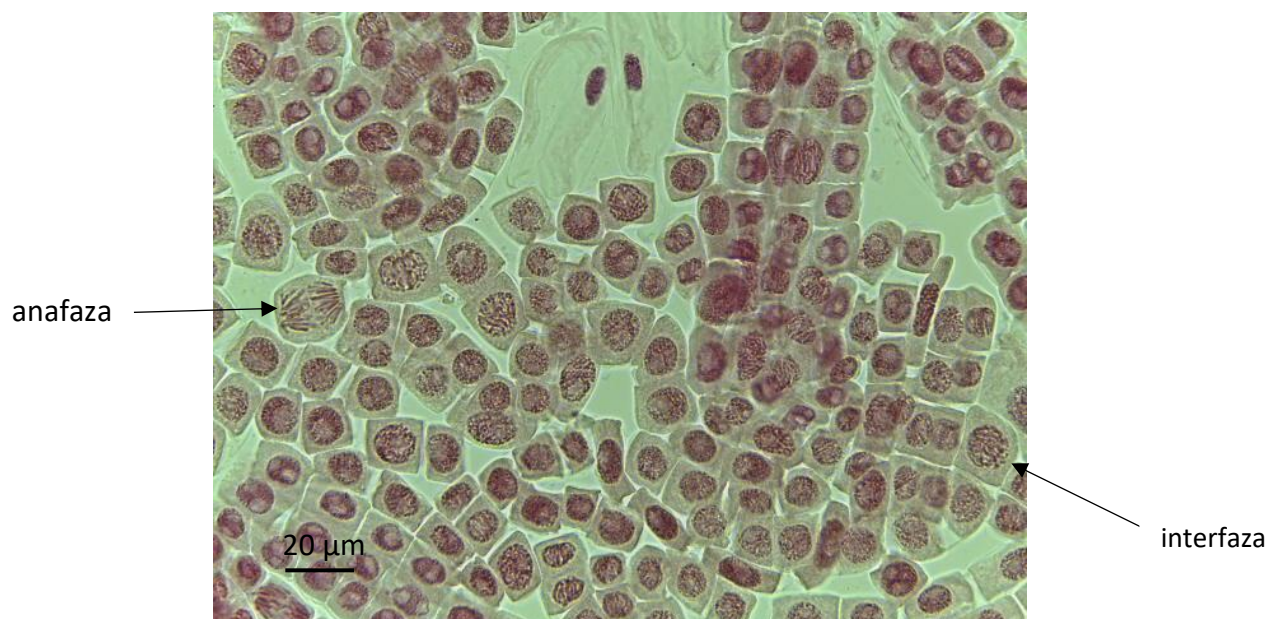
/ - seme ni vzkalilo

Tabela 21: Dolžina vzkaljenih semen pšenice (*Triticum aestivum* L.) po sedmih dneh zalivanja z destilirano vodo in šestimi različnimi koncentracijami NaCl

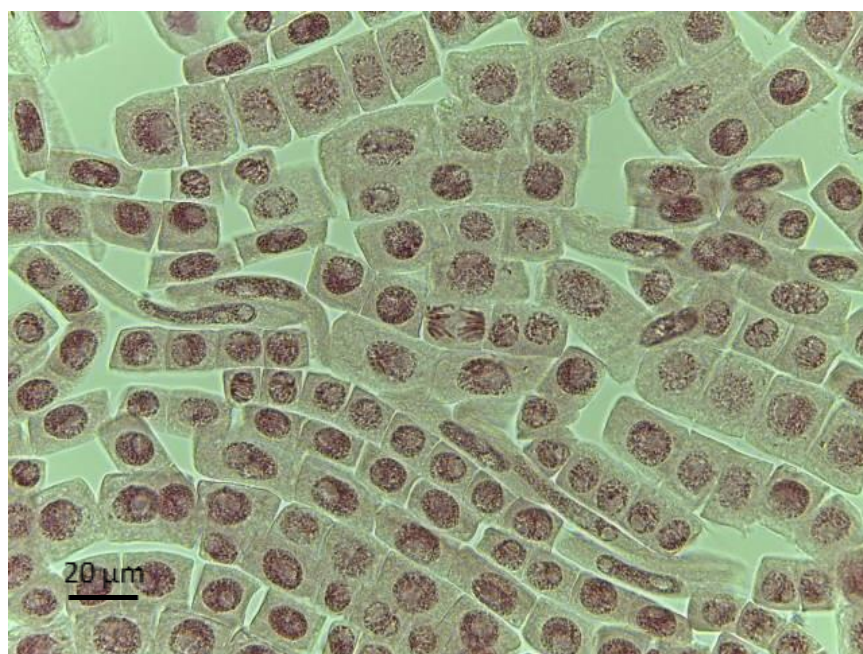
		Koncentracija raztopine NaCl [g/L]						
	Poganjek	0	3	5	8	10	13	15
Dolžina [mm]	1.	31	20	17	14	1	1	1
	2.	29	16	23	6	2	1	1
	3.	25	25	14	5	1	1	2
	4.	30	29	14	8	1	1	1
	5.	29	28	18	6	2	1	1
	6.	30	28	15	5	2	1	2
	7.	27	27	10	4	2	1	2
	8.	28	25	13	5	3	2	1
	9.	29	24	12	6	2	3	1
	10.	33	28	16	6	1	2	1
	11.	30	23	14	7	3	2	2
	12.	29	26	14	4	3	2	2
	13.	27	28	15	5	3	3	1
	14.	26	29	13	6	4	3	1
	15.	30	23	14	4	1	2	/
	16.	32	26	16	4	1	1	/
	17.	27	24	14	4	1	1	/
	18.	30	28	12	4	3	2	/
	19.	26	30	17	5	1	2	/
	20.	24	29	15	7	2	3	/
	21.	30	27	14	6	3	1	/
	22.	29	26	11	3	2	1	/
	23.	28	27	13	4	2	1	/
	24.	28	23	14	5	2	/	/
	25.	31	25	14	5	/	/	/
	Povprečje [mm]	28,72	25,76	14,48	5,52	2,0	1,65	1,36
	Standardni odklon [mm]	2,12	3,09	2,50	2,08	0,87	0,76	0,48

Legenda:

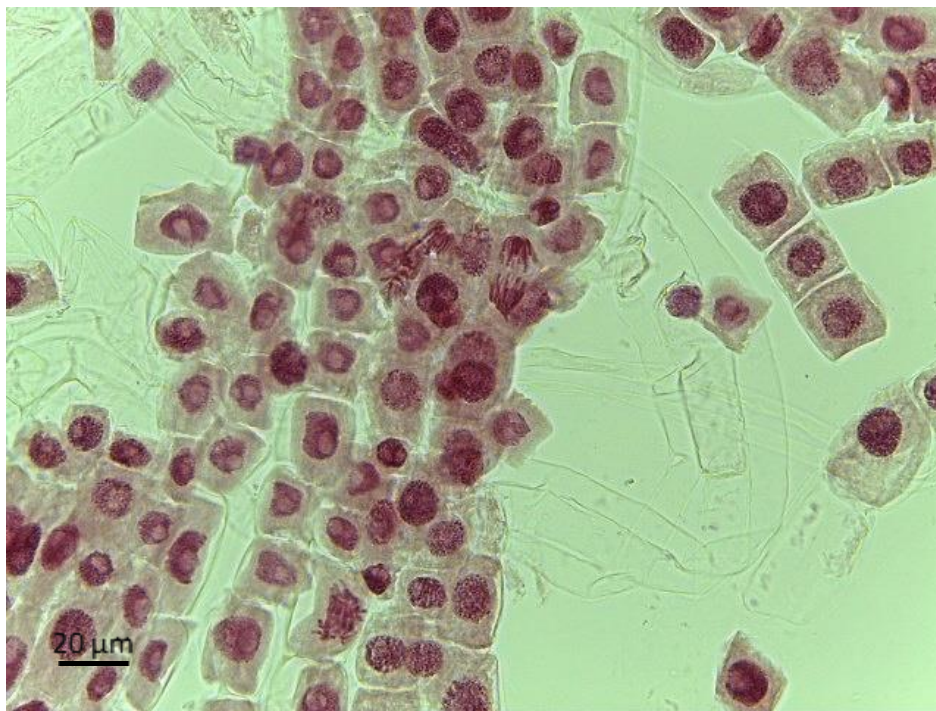
/ - seme ni vzkalilo



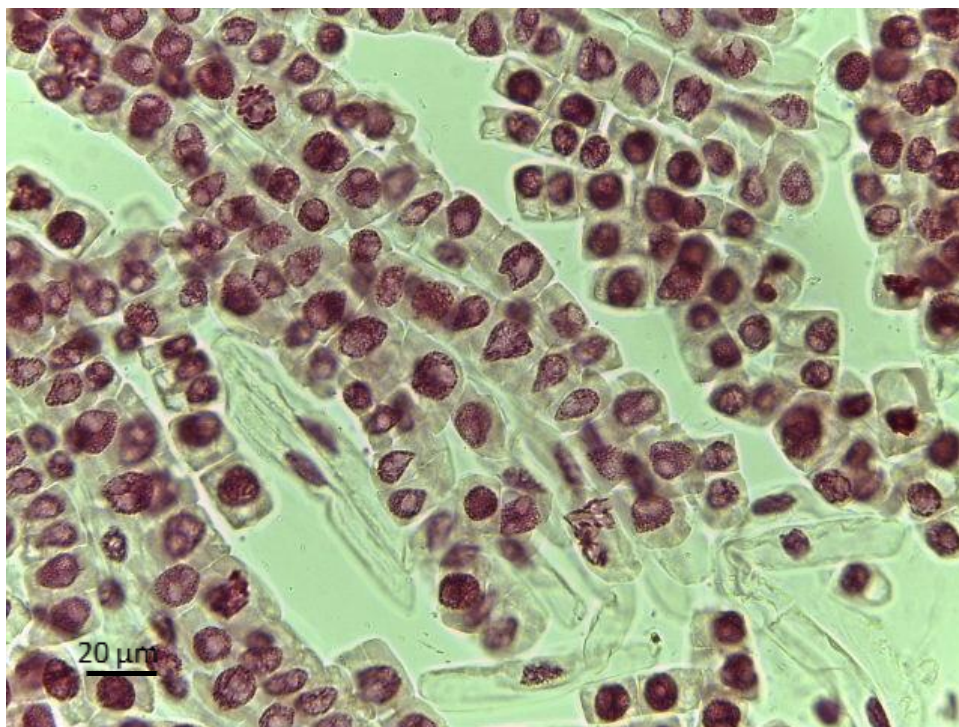
Slika 8: Vidno polje 1 pri 400- kratni povečavi – celice koreninskega vršička čebule (*Allium cepa* L.) po petdnevnem namakanju v 3 g/L (lastni vir)



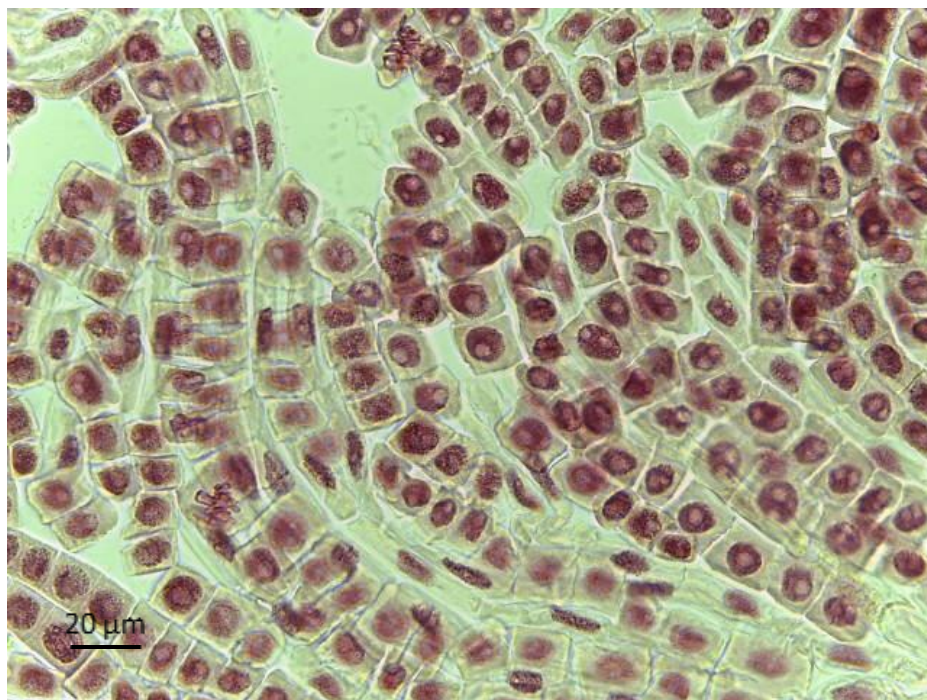
Slika 9: Vidno polje 2 pri 400- kratni povečavi – celice koreninskega vršička čebule (*Allium cepa* L.) po petdnevnem namakanju v 3 g/L (lastni vir)



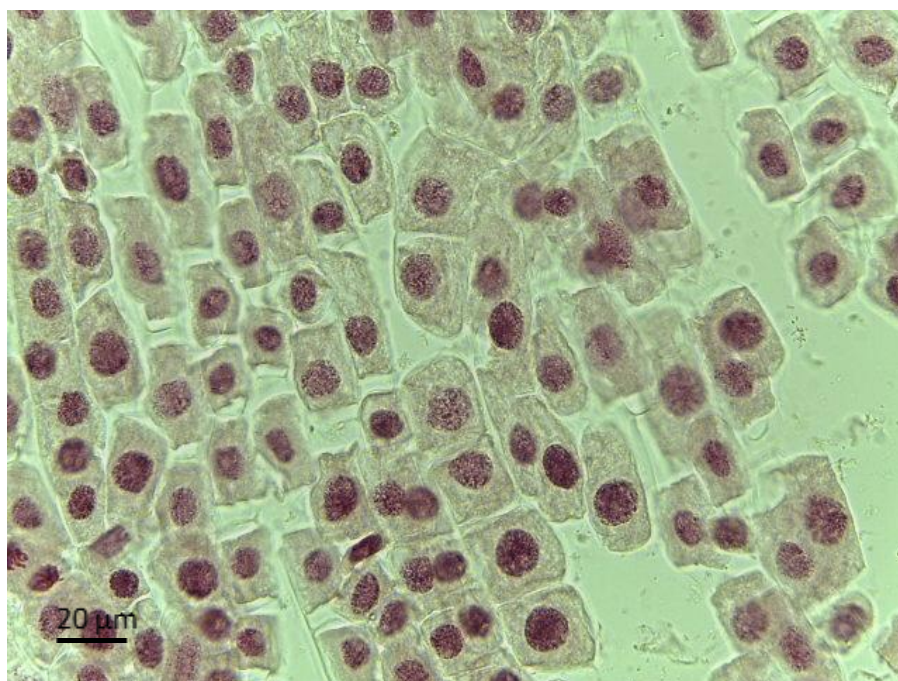
Slika 10: Vidno polje 3 pri 400- kratni povečavi – celice koreninskega vršička čebule (*Allium cepa* L.) po petdnevnem namakanju v 3 g/L (lastni vir)



Slika 11: Vidno polje 1 pri 400- kratni povečavi – celice koreninskega vršička čebule (*Allium cepa* L.) po petdnevnem namakanju v 5 g/L (lastni vir)



Slika 12: Vidno polje 2 pri 400- kratni povečavi – celice koreninskega vršička čebule (*Allium cepa* L.) po petdnevnem namakanju v 5 g/L (lastni vir)



Slika 13: Vidno polje 3 pri 400- kratni povečavi – celice koreninskega vršička čebule (*Allium cepa* L.) po petdnevnem namakanju v 5 g/L (lastni vir)