

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Elvira JAGODIČ

**DNEVNE SPREMEMBE MITOTSKEGA INDEKSA V  
KORENINSKIH VRŠIČKIH KALEČIH SEMEN  
BOBA (*Vicia faba* L.)**

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Elvira JAGODIČ

**DNEVNE SPREMEMBE MITOTSKEGA INDEKSA V  
KORENINSKIH VRŠIČKIH KALEČIH SEMEN BOBA (*Vicia faba* L.)**

DIPLOMSKO DELO  
Visokošolski strokovni študij

**DAILY CHANGES OF THE MITOTIC INDEX IN THE ROOTS  
MERISTEMS FROM GERMINATED SEEDS OF BROAD BEAN  
(*Vicia faba* L.)**

GRADIATION THESIS  
Higher Professional Studies

Ljubljana, 2014

Visokošolski strokovni študij agronomije končujem s tem diplomskim delom. Raziskovalni del diplomskega dela je bil opravljen v botaničnem laboratoriju Oddelka za agronomijo, na Katedri za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Višjega predavatelja mag. Tomaža Sinkoviča je študijska komisija Oddelka za agronomijo imenovala za mentorja mojega diplomskega dela.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc BATIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: viš. pred. Tomaž SINKOVIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Jernej JAKŠE  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Spodaj podpisana Elvira Jagodič se strinjam z objavo diplomskega dela v polnem tekstu na spletni strani Biotehniške fakultete v Ljubljani. Izjavljam, da je diplomsko delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji, rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Elvira JAGODIČ

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Vs
DK	UDK 635.651:576.351 (043.2)
KG	bob/mitoza/mitotski indeks/citološki preparati/faze mitoze/kromosomi
KK	AGRIS F63
AV	JAGODIČ, Elvira
SA	SINKOVIČ, Tomaž (mentor)
KZ	SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI	2014
IN	DNEVNE SPREMEMBE MITOTSKEGA INDEKSA V KORENINSKIH VRŠIČKIH KALEČIH SEMEN BOBA ( <i>Vicia faba</i> L.)
TD	Diplomsko delo (Visokošolski strokovni študij)
OP	X, 32, [18] str., 16 sl., 4 pril., 26 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V letu 2010 je bil izdelan poskus z bobom ( <i>Vicia faba</i> L.) v botaničnem laboratoriju Katedre za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko. Glavni namen poizkusa je bil izdelati začasne mikroskopske preparate in z njimi ugotoviti dnevne spremembe mitotskega indeksa v koreninskih vršičkih kalečih semen boba. Pripravili smo 13 fiksativov in iz vsakega fiksativa posamezno 5 preparatov. Šteli smo število vseh celic in število celic v fazi delitve ter na podlagi tega izračunali mitotski indeks. Z raziskavo smo ugotovili, da na mitotski indeks verjetno vpliva ritem dan/noč, dnevna svetloba in tudi dolžina korenine. Rezultati mitotskega indeksa so precej nihali, dnevne spremembe mitotskega indeksa pri bobu pa so bile relativno majhne. Rezultati analize mitotskega indeksa so precej variabilni.

## KEY WORD DOCUMENTATION

- DN Vs
- DC UDK 635.651:576.351 (043.2)
- CX broad beans/mitosis/mitotic index/cytological slides/mitosis  
phases/chromosomes
- CC AGRIS F63
- AU JAGODIČ, Elvira
- AA SINKOVIČ, Tomaž (mentor)
- PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
- PY 2014
- TI DAILY CHANGES OF THE MITOTIC INDEX IN THE ROOTS  
MERISTEMS FROM GERMINATED SEEDS OF BROAD BEAN (*Vicia faba*  
L.)
- DT Graduation Thesis (Higher Professional Studies)
- NO X, 32, [18] p., 16 fig., 4 ann., 26 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB In the year 2010 an experiment with Broad bean (*Vicia faba* L.) was conducted in the Botanic laboratory, the Chair of applied botany, ecology, physiology and information science. The main purpose of the experiment was to perform temporary microscopic slides for recognition of daily changes of the mitotic index in the roots meristems from germinated seeds of broad bean. We prepared 13 fixatives and from each of it 5 samples. The total number of cells and the number of cells in the division phase were counted. Gathered data were used for calculation of the Mitotic Index. Research showed that rhythm of day/night, daily light and the length of the roots probably impacted the value of the mitotic index. The results of the mitotic index were quite variable; daily changes in the mitotic index were relatively small. The results of the analysis of the mitotic index are little variable.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija .....	III
Key Word Documentation .....	IV
Kazalo vsebine .....	V
Kazalo preglednic .....	VII
Kazalo slik .....	IX
Okrajšave in simboli .....	X
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN NAMEN .....	1
1.2 DELOVNA HIPOTEZA .....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 OPIS IN ZNAČILNOSTI BOBA .....	2
2.2 SISTEMATSKA PRIPADNOST BOBA .....	2
2.3 POMEMBNEJŠI CELIČNI ORGANELI IN MITOZA .....	4
<b>2.3.1 Kratek pregled rastlinske celice in celičnih organelov .....</b>	<b>4</b>
2.3.1.1 Citoplazma .....	4
2.3.1.2 Mitohodriji .....	5
2.3.1.3 Endoplazmatski retikulum (ER) .....	5
2.3.1.4 Ribosomi .....	6
2.3.1.5 Diktiosomi (Golgijeva telesca) .....	6
2.3.1.6 Lizosomi .....	7
2.3.1.7 Plastidi .....	7
<b>2.3.2 Jedro z jedrcem .....</b>	<b>7</b>
2.3.2.1 Kromosomi .....	8
2.3.2.1.1 Zgradba kromosomov .....	8
2.3.2.1.2 Kromatin .....	9
<b>2.3.3 Celični cikel .....</b>	<b>10</b>
2.3.3.1 Interfaza (obdobje med dvema delitvama): .....	10
2.3.3.2 Profaza .....	10
2.3.3.3 Metafaza .....	12

2.3.3.4	Anafaza.....	12
2.3.3.5	Telofaza.....	13
<b>2.3.4</b>	<b>Motnje v celičnem ciklu .....</b>	<b>14</b>
2.3.4.1	Citogenetska bioindikacija.....	14
2.3.4.2	Allium test.....	14
<b>2.3.5</b>	<b>Mitotski indeks.....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE DELA .....</b>	<b>16</b>
3.1	IZVEDBA POSKUSA.....	16
<b>3.1.1</b>	<b>Priprava semen in sajenje .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Priprava fiksativov .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Barvanje po Feulgenu in priprava mikroskopskih preparatov .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Mikroskopiranje in izračun mitotskega indeksa .....</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>20</b>
4.1	VPLIV SVETLOBE NA DELITEV CELIC.....	20
4.2	VPLIV DOLŽINE KORENINE.....	22
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>24</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO SLIK

Slika 1: Rastlina boba .....	3
Slika 2: Interfaza mitoze pri bobu .....	11
Slika 3: Profaza mitoze pri bobu .....	11
Slika 4: Metafaza mitoze pri bobu.....	12
Slika 5: Anafaza mitoze pri bobu .....	13
Slika 6: Telofaza mitoze pri bobu .....	13
Slika 7: Mikroskopiranje in prepoznavanje celic v fazi delitve .....	15
Slika 8: Raziskovalni mikroskop 'Olympus Provis' .....	16
Slika 9: Embalaža semen boba .....	17
Slika 10: Pripravljene predmete in raztopine za pripravo fiksativov.....	18
Slika 11: Pri delu v laboratoriju.....	18
Slika 12: Pripravljen prvi fiksativ.....	18
Slika 13: Povprečje mitotskega indeksa .....	20
Slika 14: Spremembe mitotskega indeksa v časovnem intervalu pri posameznih preparatih.....	21
Slika 15: Primerjava povprečja MI in dolžine korenin .....	22
Slika 16: Spreminjanje dolžine korenin v časovnem intervalu pri posameznih preparatih .....	23



## KAZALO PRILOG

Priloga A: Izmerjene dolžine korenin

Priloga B: Statistični podatki

Priloga C: Slike mikroskopiranja

Priloga D: Preglednica podatkov o številu vseh vidnih celic in številu celic v fazi delitve

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava	Pomen
1. ER	Endoplazmatski retikulum
2. RNK	Ribonukleinska kislina
3. rER	Zrnati endoplazmatski retikulum
4. sER	Gladki endoplazmatski retikulum
5. rRNK	Ribosomalna ribonukleinska kislina
6. mRNK	Informacijska(messenger) ribonukleinska kislina
7. tRNK	Prenašalna (transfer) ribonukleinska kislina
8. 40 S	Mala podenota ribosoma
9. 60 S	Velika podenota ribosoma
10. ATP	Adenozin 3-trifosfat
11. GA	Golgijev aparat
12. DNK	Dezoksiribonukleinska kislina
13. N – C	Proge na kromosomih
14. pg	Pikogrami
15. DAPI	Fluorescenčno barvilo
16. UV	Ultravijolična svetloba
17. FISH	Fluorescenčna <i>in situ</i> hibridizacija
18. H1	Histon
19. H2A	Histon
20. H2B	Histon
21. H3	Histon
22. H4	Histon
23. Hz	Herc
24. G <sub>1</sub>	Prva rastna faza
25. G <sub>2</sub>	Druga rastna faza
26. MI	Mitotski indeks
27. 1N	1 normalna raztopina

28.	V	Prostornina
29.	$K_2S_2O_5$	Kalijev bisulfid
30.	$GA_3$	Giberelinska kislina
31.	$K_2O$	Kalijev oksid
32.	%	Odstotek
33.	$\mu g$	Mikrogram
34.	nm	Nanometer
35.	mm	Milimeter
36.	cm	Centimeter
37.	$^{\circ}C$	Stopinje Celzija
38.	g	Gram
39.	ml	Mikroliter
40.	mV	Milivolt
41.	V/min	Voltov na minuto
42.	S/m	Siemens na meter

## 1 UVOD

Bob je ena najstarejših kulturnih rastlin v Sredozemlju. Pripada družini metuljnic (Fabaceae). Kot hrano so ga uporabljali že v kameni dobi. Od železne dobe naprej je znan tudi v srednji Evropi. V egiptovskih grobovih so našli bob kot grobni dodatek. Zaradi črno pegastih cvetov je veljal za simbol smrti, zaradi česar ga egiptovski duhovniki in pozneje pitagorejci niso smeli jesti. Danes uporabljajo bob pretežno kot krmo za živino, tako nezrela semena kot tudi cele mlade stroke pa včasih kot zelenjavo (Duden, 2008).

Vsaka rastlina začne razvoj s celico, ki se deli in raste. Ko se rastlina razvije, imajo samo nekatere celice sposobnost neprestanih delitev in rasti, predvsem v rastnih vršičkih in kambijih (meristemi). Ostale celice se večinoma specializirajo za določeno nalogo, kot je spravilo hranil, fotosinteza, oporo, prevajanje hranil, pokrivanje in zaščita rastlinskega telesa (Sitte in sod., 1991; Moore in sod., 1995, cit. po Sinkovič, 2008).

Delitev celice obsega dva procesa: delitev jedra ali kariokinezo in delitev citoplazme ali citokinezo, čeprav se izraz celična delitev pogosto uporablja kot sinonim za mitozo. Izraz mitoza izvira iz grške besede »mitos« – nit. Ime je dobil po nitasti zgradbi kromosomov, ki so jih opazovali prvi raziskovalci pri celičnih delitvah (Sinkovič, 2008).

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN NAMEN

Namen te diplomske naloge je ugotavljanje sprememb ritma celičnih delitev (mitotskega indeksa) v teku dneva (12 ur) s pomočjo preparativne tehnike izdelovanja mikroskopskih preparatov pri kalečih semenih boba. Deleče celice in kromosome smo opazovali s svetlobnim raziskovalnim mikroskopom.

### 1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Pričakujemo spremembe mitotskega indeksa v teku dneva. Celični cikel je odvisen od trenutnih razmer, torej od temperature, vlage, dolžine dneva, letnega časa ter notranjega ritma celic, ki je vezan na obdobje dneva. V teku dneva lahko poteče tudi več celičnih ciklov. Kot indikatorje cito- in genotoksičnosti največkrat kot indikatorsko rastlino uporabljamo čebulo (*Allium cepa* L.), šalotko (*Allium cepa* L. var. *ascalonicum*), bob (*Vicia faba* L.), navadni grah (*Pisum sativum* L.), navadni ječmen (*Hordeum vulgare* L.), koruzo (*Zea mays* L.) in lasasti dimek (*Crepis capillaris* (L.) Wallr.) Zaradi lažjega kariotipa in opazovanja kromosomskih sprememb uporabljamo torej indikatorske rastline z relativno velikimi kromosomi in manjšim kromosomskim številom. Indikatorske rastline morajo imeti tudi enovit genetski material, stalno kromosomsko število in dober odziv na polutante. Mitotski indeks uporabljamo skupaj z dolžinskim prirastom korenin za določanje citotoksičnosti različnih kemičnih agensov (Glasenčnik, 2004). Latinska in slovenska imena so povzeta po Martinčiču in sod. (2007).

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 OPIS IN ZNAČILNOSTI BOBA

Bob (slika 1) je enoletna zelnata rastlina, ki razvije do 120 cm dolge korenine, večina korenin pa prodre od 50 do 75 centimetrov globoko. Steblo je pri pritlikavih ali determinantnih sortah visoko do 45 centimetrov, pri visokih ali nedeterminantnih sortah pa do 1,5 metra. Na stebelu so en do trije pari listov, ob osnovi teh so 10 milimetrov veliki nazobčani prilisti s črno ali temneje obarvanimi pegami: tu nastaja nektar, ki privablja žuželke. Listi so ovalni ali eliptični, dolgi od 40 do 100 mm in široki od 20 do 40 mm, so gladki, sivo zeleni, celorobi. Cvetovi se pojavljajo na 6 do 12 nodiju po 2 do 9 so združeni v cvetne grozde. Cvetovi so sedeči ali na kratkih pecljih. Zelo slabo se oplodijo, zato se iz njih razvijejo največ 4 stroki. Čaša ima pet zobcev. Venec je sestavljen iz širokoeliptičnega jadra, ki ima kratek kljun, 2 krajši krili in ladjico. Na krilih je velika črna pega. Devet prašnikov je zrastleh v cev, eden je prost; plodnica je nadrasla z več semenskimi zasnovami. Cvetovi se do 90 % oprahujejo z lastnim cvetnim prahom; bolje se oprahujejo tisti, ki so na pecljih, sedeči pa le redkokdaj. Do 10 % cvetov oprahujejo žuželke, ki jih privablja nektar na prilistih. Bob začne pri zgodnji saditvi cveteti sredi maja, v vročini začno odpadati cvetovi. Strok je dolg 8 do 15 cm, širok 1 do 2 cm, valjast, štrleč, v začetku razvoja mesnat, temnozelen, ko dozoreva, pa počrni zaradi oksidacije tirozina. V debelozrnatih sortah je v stroku od 1 do 3 semen, v drobno zrnatih pa 4 do 6 semen. Seme je jajčasto, podolgovato in sploščeno; je rjavo rumeno sivo, rumeno, zeleno rumeno, rjavo vijoličasto in s starostjo potemni. Eno seme tehta od 0,9 do 2,5 g. Seme ostane kaljivo 5 let, kali pa lahko že 10 dni potem, ko je dozorelo. Seme dozori avgusta in septembra, zelene stroke pa obiramo od junija do julija (Černe, 1999).

Somatsko kromosomsko število boba je  $2n = 12, 14$  (Garcke, 1972).

### 2.2 SISTEMATSKA PRIPADNOST BOBA

Duden (2008) navaja, da so metuljnice (Fabaceae, Papilionaceae), kamor spada tudi bob, po vsem svetu razširjena družina z okoli 9000 vrstami in približno 400 rodovi. V tropih so večinoma lesnate, v izventropskih predelih pa pretežno zelnate rastline z neparno pernatimi sestavljenimi listi (včasih s pernatimi viticami) ali s povečanimi prilisti. Enostransko simetrični cvetovi (metuljasti cvetovi) so sestavljeni iz petih časnih in petih venčnih listov. Venčni listi so sestavljeni iz enega zgornjega, večinoma povečanega in pokončnega ali nazaj zavihanega lista (jadro, vexillum), iz dveh stranskih listov (krilci, alae), ki oklepata dva spodnja, večinoma delno na robovih kljunasto zrasla lista (ladjica, carina). Niti devetih prašnikov (9 + 1) so večinoma zrastle v cev; en prašnik ostane prost. Plod je strok, ki se odpira z dvema loputama, ali členast strok, ki razpade v enosemenske delne mešičke. Semena s trdo semensko lupino in močnima kličnima listoma vsebujeta škrob, beljakovine, maščobe, ter druge hranilne snovi.



Slika 1: Rastlina boba (Illustration\_ *Vicia\_faba*1.jpg, 2014)

Na koreninah večinoma najdemo koreninske gomoljčke z bakterijami, ki vežejo dušik iz zraka (rod *Rhizobium*). Proces se imenuje zeleno gnojenje in zanj je značilno, da tla obogati z dušikom.

Sistematska pripadnost boba: uvrstitev vrste je naslednja (Batič in sod., 2004):

Kraljestvo: Plantae (rastline)

Deblo: Spermatophyta (semenke)

Poddeblo: Magnoliophytina (Angiospermae) – Kritosemenke

Razred: Magnoliopsida (Dicotyledonae) – dvokaličnice

Podrazred: Rosidae

Nadred: Fabanae

Red: Fabales (stročnice)

Družina: Fabaceae (metuljnice)

Rod: *Vicia* (grašica)

Vrsta: *Vicia faba* L. (bob)

## 2.3 POMEMBNEJŠI CELIČNI ORGANELI IN MITOZA

### 2.3.1 Kratek pregled rastlinske celice in celičnih organelov

Rastlinska celica je iz živega dela, protoplasta in iz produktov protoplasta, ki so neživi in jih imenujemo tudi ergastične tvorbe ali neživi deli celice. Analiza strukture rastlinske celice nam pove, da je protoplast diferenciran v pomembnejše organele, kot so jedro, plastidi in mitohondrij ter drugi celični vključki in organeli (Petrič, 1978).

Razvoj je termin, s katerim opišemo skupek sprememb, ki se z rastlino dogajajo med njenim življenjskim ciklom, od kalitve semena, rasti, prehoda iz juvenilne v odraslo fazo, cvetenja in staranja. Razvoj lahko spremljamo tudi na nivoju celic, tkiv in organov. Razvoj je posledica rasti in diferenciacije. V kvantitativnem smislu razumemo rast kot povečanje velikosti in mase. Če rast obravnavamo na nivoju organov ali cele rastline, je lahko vzrok rasti tudi povečanje števila celic, ki je posledica celičnih delitev. Na celičnem nivoju pa rast razumemo kot povečanje volumna celic. Čeprav so delitve celic in njihova rast po navadi dobro usklajeni in se celice delijo, ko doseže jedro določeno velikost, včasih ni tako. Poznamo primere, ko določeni deli rastline, rastlinski organi rastejo pretežno na račun delitev celic ali pa le na račun njihove rasti. Diferenciacija je izraz, s katerim označujemo kvalitativne spremembe v razvoju, ki so rezultat specializacije celic. Potomke ene materinske celice na podlagi izražanja različnih genov prevzamejo različne specializirane naloge. Oblikujejo se tkiva (Vodnik, 2012).

#### 2.3.1.1 Citoplazma

Osnovna masa citoplazme (hialoplazma) ne kaže pod svetlobnem mikroskopu, niti pri uporabi najboljše imerzijske optike, nobene strukture. Optično je torej popolnoma homogena. Njena struktura je submikroskopska, saj leži pod razločevalno sposobnostjo svetlobnega mikroskopa. V mladih rastlinskih celicah zavzema citoplazma ves prostor med jedrom in celično steno. V nekoliko starejših rastlinskih celicah, ki so se razvile iz embrionalnih po rasti, tj. po dolžinskem in širinskem raztezanju, se pojavijo v citoplazmi celic vakuole. Te so sprva majhne in jih je veliko, kasneje pa se združujejo, zato postajajo večje in jih je vedno manj. Pri večanju celic se količina citoplazme skoraj ne poveča, zato postajajo celice plazmatsko bolj in bolj revne. Končno je lahko doseženo stanje, ko je v celici znotraj citoplazmatske obloge en sam velik s celičnim sokom napolnjen prostor, celična vakuola. Citoplazma je na periferiji diferencirana v citoplazmatski membrani; to sta plazmalema, s katero meji citoplazma na celično steno, ter tonoplast, s katerim meji citoplazma na vakuolo. Citoplazmatski mrenici sta diferencialno ali selektivno propustni (semiparmeabilni). Citoplazma je v stalnem gibanju, o tem nas prepričajo drobni vključki v hialoplazmi, mikrotubuli in mikrofilamenti. To so telesca, ki so po velikosti na meji razločevalne sposobnosti svetlobnega mikroskopa, in ki kažejo BROWN-ovo molekularno gibanje. Pri zaprti zaslonki se vidijo ta telesca temno (Petrič, 1978).

Glavno maso suhe snovi citoplazme sestavljajo beljakovine ali proteini. Zgrajene so iz aminokislin. Molekulo aminokislina karakterizira amino ( $\text{NH}_2$ ) in karboksilna skupina ( $\text{COOH}$ ). Preko teh skupin se aminokislina medsebojno povezujejo. Pri tem nastajajo molekule z glavno verigo  $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$  (peptidna vez), na kateri sedijo radikali aminokislin kot stranske verige. Take spojine imenujemo peptide. Proteini so polipeptidi z velikimi molekularnimi težami. Znanih je 20 različnih aminokislin, ki so gradbeni elementi beljakovin. Nekatere aminokislina vsebujejo tudi žveplo kot sulfhidrilno skupino ( $-\text{SH}$ ) in fosfor. Ker se aminokislina medsebojno povezujejo v najrazličnejših kombinacijah, v različnem številu in različni zaporedjih (sekvencah), je število možnih beljakovin praktično neomejeno. Tako lahko pojasnjujemo ne samo vrstno in sortno, ampak tudi individualno specifičnost beljakovin (Petrič, 1978).

### 2.3.1.2 Mitohondriji

Mitohondriji so telesca, ki lomijo svetlobo manj od mikrosomov in so zato težje vidna. So večji od mikrosomov in po obliki raznovrstni; okroglasti, ovalni, paličasti, nitasti. Notranjo zgradbo mitohondrijev lahko analiziramo šele z elektronskim mikroskopom. Elektronski mikroskop pokaže, da je mitohondrij sestavljen iz dvojne membrane, katere zunanja površina je gladka, notranja površina membrane pa vstopa v notranjost, kjer napravlja gube in zavoje. Gube in zavoji znatno povečajo notranjo površino mitohondrija. Mitohondrij vsebuje razen ribonukleinske kisline tudi dihalne encime. V mitohondrijih se razgrajujejo organske spojine preko več zaporednih stopenj do ogljikovega dioksida in vode. Gre torej za aerobno respiracijo ali dihanje (Krebsov cikel). Respiracijo omogočajo specifični dihalni encimi. Energija, ki se pri tem sprošča, se v glavnem vgradi v adenzin trifosfat (ATP). Ta zapušča mitohondrije in potuje v vse dele celice, kjer je energija potrebna (Petrič, 1978).

### 2.3.1.3 Endoplazmatski retikulum (ER)

ER je membransko omrežje v protoplastu celice. Predstavlja najpogostejše sistem ploščatih vrečk ali cistern, ki so omejene z enojno membrano. Le-te so široke 5 do 6 nm. Ploščate vrečke so pogosto povezane v omrežja. ER se nahaja v vseh celicah razen pri cianobakterijah in bakterijah. Poleg beljakovin bomo v njih našli še RNK. Razlikujemo tri različne oblike elementov ER: cisterne, mehurčki (vezikli) in cevke (tubuli). Cisterne so podaljšane in sploščene vrečke, ki imajo v prečnem preseku videz kanalov s premerom 40 do 50 nm. Kanali so razvrščeni vzporedno. Vezikli imajo obliko več ali manj razširjenih vrečk, katerih širina je 25 do 500 nm. Tubuli so cevasti izrastki, ki so pogosto razvejani, njihov premer se giblje od 50 do 100 nm. Razvitost elementov ER v mladih zarodnih (meristemskih) celicah je slaba, medtem ko je v diferencialnih odraslih celicah ER zelo razvit. Poznamo dva tipa ER: zrnati (rER) in gladki (sER). Membrane zrnatega (granularnega) ER imajo pritrjene ribosome (pogosto poliribosome). Granularni ER je ponavadi sestavljen iz ozkih cistern (Sinkovič, 2006).



ER opravlja dve važnejši funkciji:

- a) Prevajalna funkcija je potrebna za povezavo in transport snovi med celičnim jedrom, citoplazmo, posameznimi deli citoplazme in tudi za povezavo med sosednjimi celicami. Za povezavo med sosednjimi celicami služijo plazmatske cevke plazmodezme, ki prehajajo iz ene celice v drugo skozi pore v celični steni v predelu pikenj in tudi izven predela pikenj. Plazmodezme so cevasti izrastki ER. Skozi njihovo središče gredo odcepki cistern ER.
- b) ER predstavlja aktivni del citoplazme, na katerem potekajo številne biokemijske reakcije. Na membranah ER so pogosto ribosomi. ER z ribosomi se imenuje hrapavi ali granularni rER, brez ribosomov pa gladki ali agranularni sER. Membrane ER imajo tudi določeno vlogo pri aktivaciji ribosomov, saj so le-ti vezani na membrane ER in 5–6-krat aktivnejši pri sintezi beljakovin od prostih ribosomov (Kranjčič, 1984).

#### 2.3.1.4 Ribosomi

So okrogle (globularne) oblike, spadajo k nemembranskim celičnim organelom in so zaradi vsebnosti rRNK dobile ime ribosomi. Pomembni so pri sintezi beljakovin. Sestavljeni so iz večje in manjše podenote, ki se po sintezi beljakovin zopet razideta. Povezovanje ribosomskih podenot omogočajo Mg-ioni. Pred začetkom sinteze beljakovin se na manjše podenote (40S) veže informacijska (mRNK), ki prenaša informacijo DNK preko tripletne kode. Prenasalne ali tRNK se z aminokislinami vežejo na 60 S del ribosoma. Aminokislina morajo biti aktivne, s posebnimi encimi aktivacije, za katere je potrebna energija ATP (adenozin tri fosfata). Z večjim delom se ribosomi pritrdijo na membrano. Ribosomi se gibljejo vzdolž mRNK in povezujejo aminokislino po zaporedju, ki je kodirana v DNK v polipeptidno verigo (translacija ali prevajanje genetske informacije) (Sinkovič, 2006).

#### 2.3.1.5 Diktiosomi (Golgijeva telesca)

Diktiosomi so strukturni elementi Golgijevega aparata. Osnovna funkcionalna enota GA je torej diktiosom. Golgijev aparat je v rastlinski celici sestavljen iz več diktiosomov. Glavna naloga diktiosomov je izločalna (sekretorna). V času aktivnosti se robovi cistern diktiosomov razširijo v Golgijeve mehurčke ali vezikle, ki so napolnjeni s sekretom. V sekretu so sekretorni produkti, ki nastajajo v celicah. Ko se Golgijevi mešički odluščijo, potujejo na mesto uporabe. Pri delitvi rastlinskih celic potujejo vezikli GA v ekvatorialno ravnino celice in se povežejo v celično ploščo. Sodelujejo pri tvorbi celične stene. Vsebina diktiosomov sestavlja celično ploščo ali osrednjo lamelo, iz ovojja pa nastane plazmatska membrana ali plazmalema. V diktiosomih se sintetizirajo protopektini in hemiceluloza za tvorbo celične ploskve. Tvorijo tudi nekatere druge polisaharide in so pomembni pri tvorbi eteričnih olj. Diktiosomi imajo tudi nalogo sprejema, sortiranja in prenosa beljakovin od ribosomov na endoplazemski retikulum in do drugih delov v celici (Sinkovič, 2006).

### 2.3.1.6 Lizosomi

So veliki od 0,2 do 0,8 mikrometra. Po obliki so različni. Obdaja jih enojna elementarna biomembrana. Kemično so sestavljeni iz beljakovin in fosfolipidov. V lizosomih so našli veliko encimov, ki razkrajajo različne organske molekule, nukleinske kisline, beljakovine, ogljikove hidrate in maščobe. Značilen encim za lizosome je kislja fosfataza. Encimi so v intaktnih celicah zaprti z lipoproteinsko ovojnico lizosoma in lahko delujejo samo na substrate, ki so v njih. Encimi ne morejo prehajati skozi membrane, membrana je zelo stabilna in odporna na hidrolitsko delovanje lastnih encimov. Glavna naloga lizosomov je razgrajevanje tujkov in delov lastnih odmrlih celic. Tujek obdajo in v svoji notranjosti prebavijo. Če je tujek trden govorimo o fagocitozi, če je tujek tekoč, pa govorimo o pinocitozi. Membrana lizosoma se odpre in skozi pore se izločijo hidrolitski encimi protoplazme v trahejah, traheidah in lesnih vlaknih. Pri nastanku trahej razgradijo vmesne stene in razkrajajo izumrle celice in tujke. Lizosomi, ki vsebujejo nerazkrojene ostanke, so rezidualna telesca. Lizosomi, ki vsebujejo dele celic pri prebavi, se imenujejo avtofagosomi (Sinkovič, 2006).

### 2.3.1.7 Plastidi

Krajncič (1984) navaja, da so plastidi celični organeli fotosintetskih rastlinskih evkariontov. Za vse plastide je značilno, da jih obdaja dvojna lipoproteinska ovojnica in da imajo sposobnost razmnoževanja z delitvijo na dvojje. Vsi plastidi vsebujejo lastno DNK. V plastidih so tudi ribosomi, ki so podobni prokariotskemu tipu. Plastidi imajo lastno plastidioplazmo (stroma) (Sinkovič, 2006).

## 2.3.2 Jedro z jedrcem

V citoplazmi leži tudi jedro (nucleus) z jedrci (nucleolusi), jedrno membrano in kromatinskim omrežjem, ki sestavljajo ogrodje jedra (Petrič, 1978). V jedru je tekočina – karioplazma.

Sinkovič (2006) opisuje, da je jedro celični organel, ki ima pomembne naloge pri ohranjanju in prenosu dednega materiala. Ima pomembno vlogo tudi pri sintezi beljakovin in procesih celičnega dihanja. V zarodnih tkivih rastline pride do delitev jeder, pri katerih se videz jedra bistveno spremeni. Jedro ima tudi pomembno vlogo pri kontroli rasti in razmnoževanju celic, pri kontroli presnove (metabolizma) in tvorbi RNK ter beljakovin. Na splošno ločimo tri različna stanja jedra, pri katerem so oblike in funkcije jedra različne: interfazno jedro, mitotsko jedro in delovno (metabolno) jedro. Interfazno jedro se nahaja v obdobju med dvema delitvama pri celicah, ki so zmožne delitve. Jedro je v tem obdobju zelo aktivno in se pripravlja na novo delitev. Mitozno jedro je jedro v procesu delitve, ko prihaja do identične vzdolžne delitve dednega materiala in razdelitve na dve novi jedri. Delovno ali metabolno jedro je jedro, ki je v odraslih diferenciranih celicah (trajna tkiva),

ki so zgubile zmožnost delitve. Delovno ali metabolno jedro sodeluje predvsem pri presnovi celice.

Sinkovič (2006) navaja tudi, da v jedru poteka podvojevanje DNK in transkripcija ali prepis genetske informacije, ki je pomembna za sintezo beljakovin (encimov). V jedru se sintetizirajo vse tri vrste RNK: informacijska RNK (mRNK) in prenašalna (tRNK) se sintetizirata ob kromosomski DNK, ribosomalna RNK (rRNK) pa se sintetizira ob nukleolarni DNK. V jedru se tvorijo histoni in beljakovine mikrotubulov delitvenega vretena. Prav tako se v jedru tvorijo podenote ribosomov. Torej jedro sodeluje pri rasti, morfogenezi, razmnoževanju celic, regeneraciji in nastanku celičnih sten.

### 2.3.2.1 Kromosomi

Kromosomi so sestavine jedra, ki so vidne pri celični delitvi. Na kromosomih so linearno nameščeni geni. Kromosomi se delijo in podvajajo. V času jedrne delitve se vzdolžno delijo in s tem omogočajo prenos dedne snovi iz ene celice v drugo ter iz ene generacije v drugo. Izraz kromosom je povezan z njihovim intenzivnim obarvanjem z bazičnimi barvili in izvira iz grških besed *chroma* (barva) in *soma* (telo) (Sinkovič, 2006).

Po kemični zgradbi so kromosomi sestavljeni iz beljakovin, DNK in RNK. Od beljakovin so v kromosomih bazične beljakovine ali histoni, kisle beljakovine in preostale beljakovine. Histoni se v kromosomih pojavljajo v več skupinah in so pomembni kot genski regulatorji, ki zavirajo – represorji. Nekatere izmed kislih beljakovin pa delujejo nasprotno kot aktivatorji genov ali induktorji (Sinkovič, 2006).

#### 2.3.2.1.1 Zgradba kromosomov

S svetlobnim mikroskopom lahko opazujemo, da so kromosomi v profazi in metafazi sestavljeni iz dveh kromatid, ki so med seboj povezane s centromero. Od konca profaze (ko jedrce ali nukleolus in jedrna ovojnica izginejo) do sredine telofaze je vsaka kromatida zgrajena iz spiralno zavite vrvice kromoneme, sestavljene iz beljakovin, DNK (nukleoproteidi) in ovoja ali matriksa. Kromoneme imajo premer 0,2 mikrometra in nastanejo s spiralizacijo kromatinskih niti. Močnejše spiralizirani deli kromoneme so kromomere. Le-te se pod optičnim mikroskopom kažejo kot temno obarvana zrnca. Profazni in metafazni kromosomi so sestavljeni iz dveh kromatid. Ovoj ali matriks kromosoma je sestavljen iz nitastih (fibrilarnih) in zrnastih (granularnih) povezav nukleinskih kislin in beljakovin (ribonukleoproteidov). Brez ovoja so kromosomi v predelu primarne zožitve (centromere) in sekundarne zožitve. Z despiralizacijo (odvijanjem) kromosomov v sredini telofaze ovoj ali matriks kromosomov razpade. V interfazi so kromatinske niti najmočnejše odvijte (despiralizirane) in s tem imajo največjo dolžino. V interfazi so vijačnice DNK aktivne. Med jedrno delitvijo (mitozo) pa se začno kromatinske niti spiralizirati in s tem krajšati ter tako predstavljajo transportno obliko ali kromosome. V profazi se vsak kromosom prične deliti v dve kromatidi, ki sta že nekoliko spiralizirani

(zaviti). V metafazi pa so kromosomi najbolj spiralizirani, najkrajši in najdebelejši ter razdeljeni na dve kromatidi. Kromosomske niti se v interfazi značilno obarvajo z bazičnimi barvili. Posamezni deli kromatinskih niti se različno obarvajo. Močnejše obarvane dele označujemo kot heterokromatinske dele, manj obarvane dele pa kot evkromatinske. Evkromatinski deli se nahajajo v bolj odvitem stanju in predstavljajo aktivni del kromatina. Heterokromatinski deli se v interfazi ne odvijajo. DNK v heterokromatinskih delih ne vsebujejo genov, ki sodelujejo pri sintezi encimov in polipeptidnih verig, ampak opravlja druge naloge (regulacija delovanja genov in zavijanje kromatina pri delitvah). Gensko dejavne so samo despiralizirane evkromatinske regije kromosomov, ki vsebujejo več kislih proteinov, fosfoproteidov in kislih lipidov kromatina, ki se vežejo na represorje – histone in jih aktivirajo. Evkromatin je dejaven v času interfaze, v času delitev jeder mitoze in mejoze, pa opravlja funkcije (sinteza beljakovin). Metafazni kromosom ima dve kromatidi in dve dvojnovijačni molekuli DNK, anafazni kromosom pa ima samo eno kromatido (Sinkovič, 2000).

Za citološke analize so pomembni zlasti metafazni kromosomi, ker so najprimernejši za opazovanje s svetlobnim mikroskopom. Vsaka rastlinska vrsta ima v somatskih in spolnih celicah določeno število kromosomov in morfologijo kromosomov. Te lastnosti so značilne za rastlinsko vrsto in se imenujejo kariotip. Shematsko prikazane kariotipske značilnosti posamezne vrste pa imenujemo idiotip. Citološka merjenja dolžine kromosomov so pomembna pri sistematiki, evoluciji in filogeniji rastlinskih vrst. Merila za sestavo kariotipa oz. idiotipa so skupna dolžina vseh kromosomov, dolžina posameznih kromosomov in N – C proge. Citološka merjenja količine DNK so pomembna tudi za poznavanje evolucije in filogenije rastlinskih vrst. Vsebnost jedrne DNK je podana v pg. Uporabljamo fluorescenčna barvila, specifična za molekulo DNK (DAPI, propidium-jodid) in UV kot vzbudno svetlobo. Poleg proganja kromosomov (banding) se je v zadnjih desetletjih pri citoloških raziskavah razvila tudi tehnika fluorescenčne in situ hibridizacije (FISH), ki omogoča citološko določanje mesta genov na kromosomih in dokaz genov na kromosomih, ki jih opazujemo z epifluorescenčnim mikroskopom (Sinkovič, 2006).

#### 2.3.2.1.2 Kromatin

Kromatin je osnovna strukturna enota interfaznega jedra. Na fiksiranih in obarvanih preparatih je kromatin videti kot dolge in tanke niti (evkromatin) ter kot drobna zrnca, ki predstavljajo bolj spiralizirane dele kromatina (heterokromatin). Kemično so sestavljeni iz kompleksov DNK in beljakovin (dezoksiribonukleoproteidi) ter kompleksov RNK in beljakovin (ribonukleoproteidi). Beljakovine stabilizirajo molekulo DNK in sodelujejo pri uravnavanju njenega delovanja. Kromatin predstavlja osnovno maso, iz katere se kasneje tvorijo kromosomi, ki jih lahko opazujemo samo pri celičnih delitvah (Sinkovič, 2000).

Kromatin je sestavljen iz dvojne vijačnice DNK, histonov in nehistonskih beljakovin. Novejše raziskave so pokazale, da so histoni neenakomerno razdeljeni vzdolž DNK v obliki nukleosomov in da histoni povzročijo zavijanje DNK v predelu nukleosomov in s

tem skrajšajo kromatinske ali kromosomske fibrile za 5–20-krat. Nukleosomi so torej kompleksi negativno nabite DNK in pozitivno nabitih beljakovin – histonov. Nukleosom po navadi vključuje okoli 300 baznih parov dolgo verigo DNK. Glede na različno aminokislinsko sestavo (vsebnost lizina in arginina) in različno molsko maso razlikujemo 5 vrst histonov; H1, H2A, H2B, H3 in H4. Histoni so zelo ohranjeni skozi evolucijo in so zelo majhne razlike v sestavi histonov pri različnih organizmih. Celotna kromatinska vrstica se še dodatno, s pomočjo histona H1 spiralasto povezuje v pakete nukleosomov s premerom 30 nm. Med posameznimi paketi nukleosomov je gola DNK, ki je le na določenih delih podprta z nehistskimi beljakovinami (Sinkovič, 2006).

### 2.3.3 Celični cikel

Celični cikel obsega mitozo ali M fazo, med katero poteka delitev jedra (kariokineza) in citokinezo, med katero poteka delitev citoplazme in s tem celice. Celični cikel pa obsega tudi sledečo interfazo, v kateri preživi celica najdlje. Molekula DNK je v  $G_1$  fazi interfaze močno odvita (despiralizirana) in organizirana s pomočjo različnih histonov (bazičnih beljakovin) v enote imenovane nukleosomi. Po  $G_1$  fazi se celice lahko diferencirajo v trajna tkiva in zgubijo sposobnost delitev ( $G_0$ ) ali nadaljujejo celični cikel (embrionalna tkiva). V S obdobju interfaze se dvojna vijačnica DNK razklene in podvaja. V  $G_2$  obdobju pa celice tvorijo beljakovine in druge snovi, ki so nujno potrebne za mitozo (Sinkovič, 2006).

#### 2.3.3.1 Interfaza (obdobje med dvema delitvama)

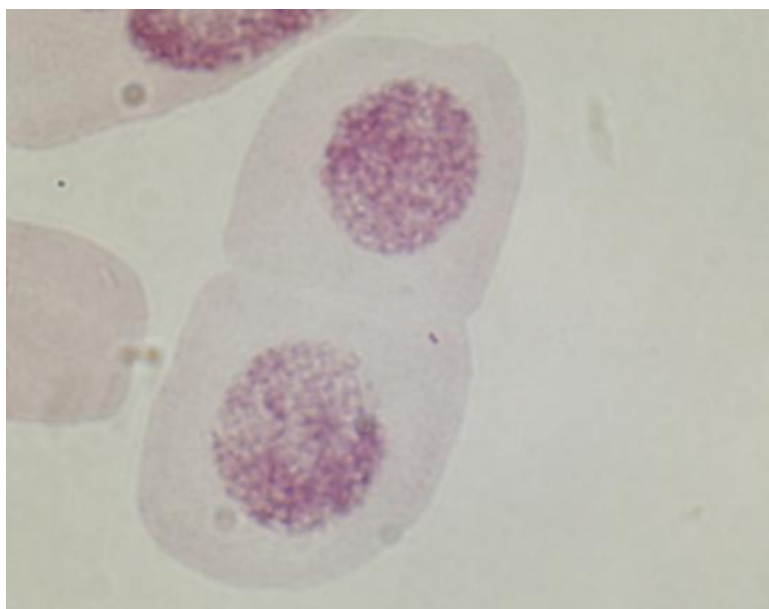
Je časovno najdaljša, traja povprečno devetkrat dlje kot sama delitev celice. Dejansko je v tej fazi molekula DNK odvita in v delujoči obliki. Interfazo (slika 2) delimo na tri obdobja:

- $G_1$  – prva rastna faza: sintetizirajo se RNA, lipidi in beljakovine ter priprava za sintezo DNK.
- S – obdobje sinteze DNK: je obdobje podvojevanja DNK ali S faza, v kateri se dvojna vijačnica razklene, in se po vzorcu matrične DNK sintetizira nova kopija. Podvojevanje in prepis dednih informacij sta možni samo v odviti obliki, zato da imajo do molekule DNK dostop encimi, kot so DNK helikaza in topoizomeraza. Pri podvojevanju sodeluje še več kot ducat drugih encimov. V S fazi poteka tudi sinteza jedrnih bazičnih beljakovin – histonov.
- $G_2$  – druga rastna faza: poteka sinteza beljakovin delitvenega vretena in tvorba ATP. Povprečno trajanje  $G_2$  periode je 3–5 ur in traja, dokler se ne prične mitoza. Ko se konča  $G_2$  perioda, se konča interfaza (Sinkovič, 2006).

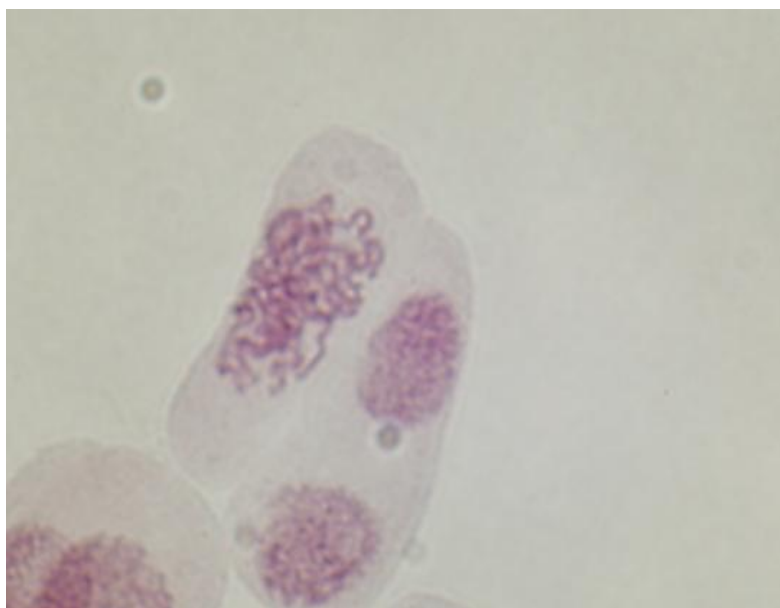
#### 2.3.3.2 Profaza

V začetku profaze (slika 3) je kromatin v obliki tankih, dolgih odvitih niti. Proti koncu profaze se kromatinske niti spiralizirajo, kar pomeni zavijanje in krajšanje, ter tvorbo kromosomov iz kromatinskih nitk. To fazo bi lahko opisali tudi kot prehod dednega

materiala iz delovanja v prenosno (transportno) obliko. Prične se vzdolžna delitev dolgih profaznih kromosomov na dve sestrski kromatidi, ki sta tesno druga ob drugi. Pod optičnim mikroskopom so vidne majhne razpoke med kromatidama, ki kažeta na delitev v dve kromatidi. Kromatidi ostaneta spojeni na mestu na kromosomu, imenovanem primarna zožitev ali centromera. Ob koncu profaze se prične tvoriti ovoj ali matriks kromosomov. Jedrce (nucleolus) izgine prav tako kot jedrna ovojnica (caryotheca). Tvorijo se začetne niti delitvenega vretena (mitotski aparat), ki ga sestavljajo niti ali mikrotubuli delitvenega vretena (Sinkovič, 2006).



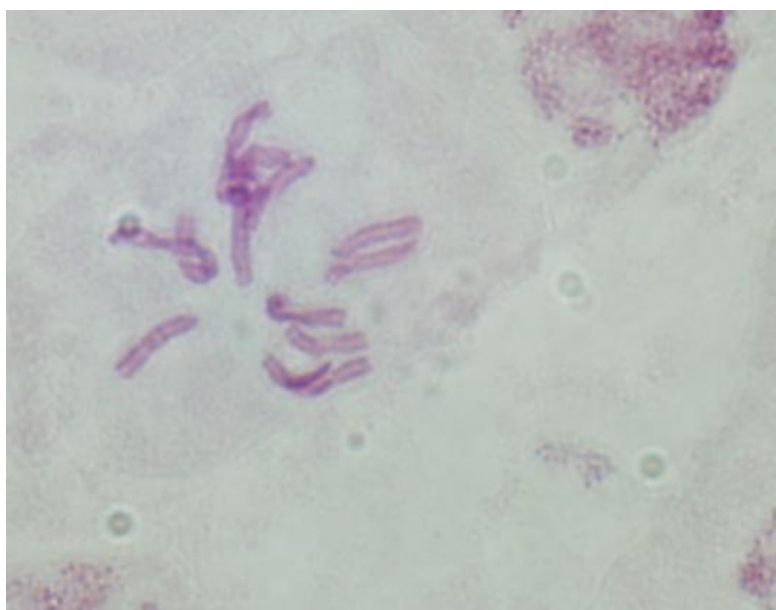
Slika 2: Interfaza mitoze pri bobu



Slika 3: Profaza mitoze pri bobu

### 2.3.3.3 Metafaza

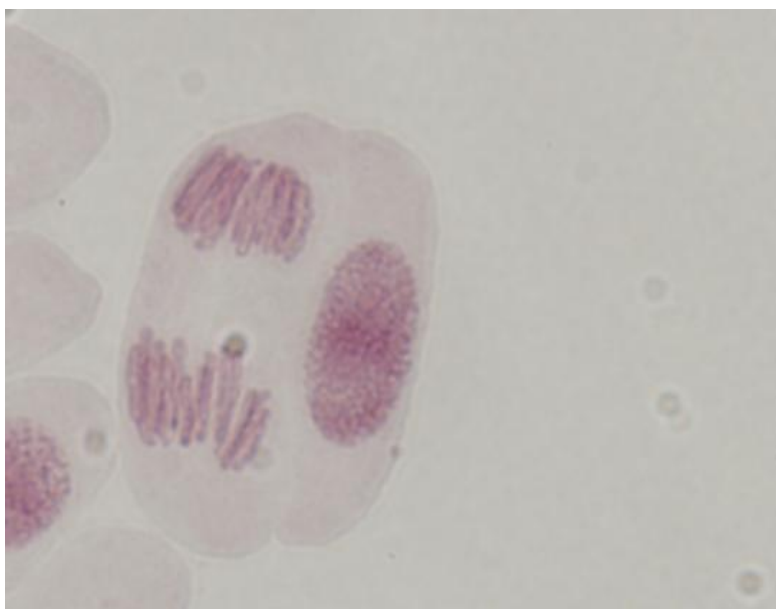
V metafazi (slika 4) se delitveno vreteno dokončno izoblikuje. V tej fazi se tvorijo polni in kinetohorni mikrotubuli. Kinetohorni mikrotubuli se pritrdijo na centromero ali primarno zožitev kromosomov preko kinetohorjev. Kromosomi so v metafazi najkrajši in najbolj ugodni za opazovanje, štetje in za analizo kariotipa rastlinske vrste, saj so najkrajši in najdebelejši. Kromosomi so v idealnem primeru razporejeni v ekvatorialni ravnini celice. Pri pripravi preparatov – mečkancev korenin so pogosto razporejeni po celotni celici, saj jedrne ovojnice ni več. V tej fazi se sestrski kromatidi dokončno ločita in sta povezani le še pri centromeri (Sinkovič, 2006).



Slika 4: Metafaza mitoze pri bobu

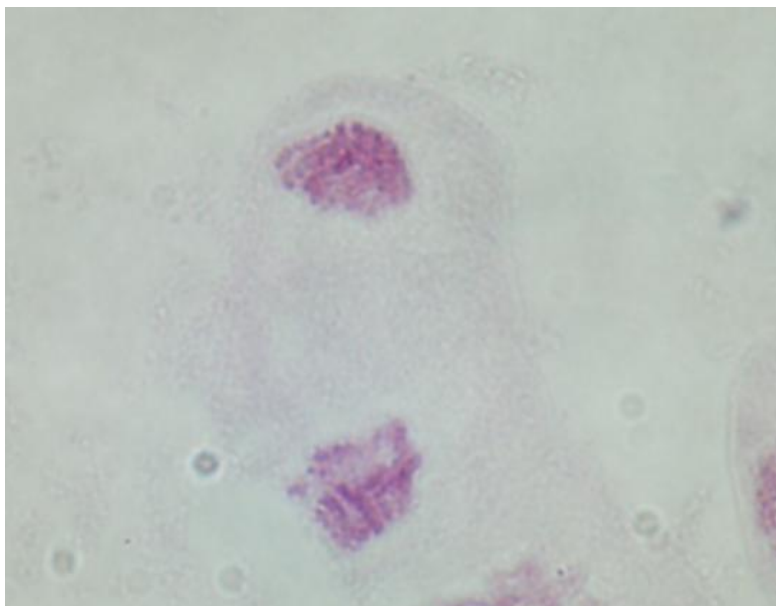
### 2.3.3.4 Anafaza

Sestrski kromatidi se v tej fazi (slika 5) dokončno ločita z nitmi delitvenega vretena, ki se pritrdijo na centromero. Kinetohorni mikrotubuli se krčijo in vlečejo sestrski kromatidi proti poloma celice ter enakomerno razdelijo dedno snov na hčerinski celici. S potovanjem na celična pola se konča anafaza. Ob koncu anafaze se začnejo zbirati v ekvatorialni ravnini celice Golgijevi vezikli, ki sestavljajo celično ploščo. Po trajanju je ta faza najkrajša (Sinkovič, 2006).



Slika 5: Anafaza mitoze pri bobu

#### 2.3.3.5 Telofaza



Slika 6: Telofaza mitoze pri bobu

V telofazi (slika 6) se kromosomi despiralizirajo, odvijajo, podaljšajo in izgubijo svoj ovoj ali matriks in se pretvorijo v kromatin. Heterokromatinski deli kromocentrov pa ostanejo spiralizirani in so zaradi tega temneje obarvani. Dedna snov zopet preide v delovno obliko. Zopet se pojavi jedrna ovojnica (caryotheca) in jedrce (nucleolus). Po naštetih dogajanjih v jedru je telofaza nasprotna profazi. V telofazi se iz celične plošče tvori primordialna



celična stena ali osrednja lamela, ki predeli novo nastali celici. Časovno traja najdlje profaza mitoze, sledi telofaza in metafaza. Anafaza je časovno najkrajša. Kromosomska števila se po somatski celični delitvi ne spremenijo. Iz diploidne somatske celice nastaneta dve diploidni celici, ki sta genetsko popolnoma enaki (kloni) (Sinkovič, 2006).

### 2.3.4 Motnje v celičnem ciklu

Delitev je osnovna značilnost celic in hkrati tudi živih organizmov. Višje rastline imajo razen spolnega načina razmnoževanja tudi nespolen način razmnoževanja, ki temelji na mitozah. Vse telesne celice rastejo, se obnavljajo z delitvijo na dve hčerinski celici. Celični cikel obsega dva bistvena dogodka, in sicer podvojevanje DNK, vzdolžno delitev kromosomov na dve sestrski kromatidi in razporejanje kromatid v dve hčerinski celici. Dedni material (molekula DNK) se zavija in prehaja iz delovne v prenosno obliko. Genom celice lahko v življenju doživi veliko napak in poškodb. Zaradi obsežnih popravljalnih mehanizmov se večina napak in poškodb popravi. Mutacije – napake, ki postanejo stalne in se prenašajo naprej ob celični delitvi so sorazmerno redke. Napake v regulaciji celičnega cikla vodijo v nenormalno delitev, lahko tudi v nastanek rakastih celic, zato je regulacija delovanja celičnega cikla predmet intenzivnih raziskav (Sinkovič, 2006).

Sinkovič (2006) navaja, da lahko motnje v celičnem ciklu potekajo na več stopnjah. Podvojevanje DNK vijačnic brez delitve kromosomov vodi do politenije. Podvojevanje kromosomov v celicah brez jederne delitve privede do poliploidije. Umetno lahko povzročimo poliploidije s citostatiki, ki negativno vplivajo na tvorbo niti delitvenega vretena. Pri večjedrnih (polienergidnih) celicah številnih alg in gliv pride do podvajanja DNK, delitev kromosomov in jeder, vendar nato ne sledi delitev citoplazme.

#### 2.3.4.1 Citogenetska bioindikacija

Špes (2008) navaja, da je citogenetika veda, ki temelji na dveh samostojnih vedah, citologiji in genetiki, ter ju združuje. Citologija se ukvarja s preučevanjem celice, genetika pa s preučevanjem dednosti. Citogenetika torej obravnava število in zgradbo kromosomov (analize kariotipa), proučuje funkcijo in delitve kromosomov (celična delitev – mitoza, mejoza) in mnoge spremembe v strukturi in izvoru kromosomov glede na rekombinacije, transmisije in ekspresije genov (fenotip). Vključuje tudi tehnike barvanja kromosomov.

#### 2.3.4.2 *Allium* test

Kljub temu, da je *Allium* test eden izmed najstarejših rastlinskih testov biotoksičnosti, pa še danes obstajajo burne razprave o njegovi zanesljivosti in občutljivosti. Prvi ga je uporabil Levan leta 1938. Rank in Nielsen sta leta 1993 izvedla primerjavo *Allium* testa z drugimi testi mutagenosti in genotoksičnosti ter dokazala 82 % občutljivost v primerjavi z drugimi rastlinskimi testnimi sistemi in zelo veliko občutljivost testa *Allium* glede na dozo izpostavitve. Z *Allium* testom ugotavljamo genotoksičnost v dveh stopnjah. Neznano

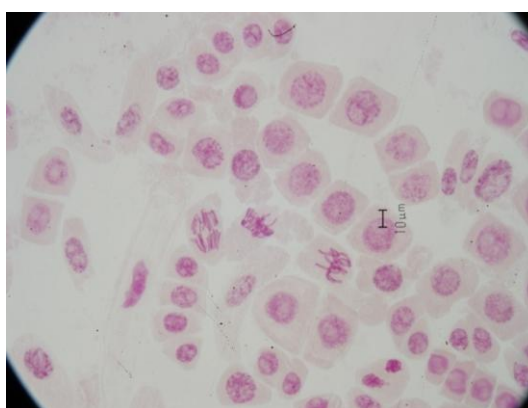
mutageno snov v okolju definiramo na osnovi kromosomskih okvar, z neznanimi genotoksičnimi snovmi različnih koncentracij pa določamo vrsto in stopnjo kromosomskih okvar glede na kontrolo. Z uporabo modificiranega testa *Allium* so bili testirani učinki herbicidov, pesticidov, insekticidov, pitne, industrijske in odpadne vode ter drugih kemikalij, ki največkrat povzročajo cito- in genotoksične učinke na določenih izpostavljenih rastlinah (Špes, 2008).

### 2.3.5 Mitotski indeks

Mitotski indeks se uporablja za merjenje hitrosti razmnoževanja celične populacije. Definiran je kot razmerje med številom celic v mitozu in skupnim številom celic. Mitotski indeks lahko razberemo s preparata, tudi s svetlobno mikroskopijo (slika 7). 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 ravnem 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 ( $G_1$ ). 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 (Mitotic index, 2014)

Mitotski indeks (1) se izračuna po naslednji formuli (Prabhakar in Sakya, 2008):

$$\text{Mitotski indeks (MI)} = \text{število celic v delitvi} \times 100 / \text{število vseh celic}. \quad \dots (1)$$



Slika 7: Mikroskopiranje in prepoznavanje celic v fazi delitve

### 3 MATERIALI IN METODE DELA

#### 3.1 IZVEDBA POSKUSA

Delo je potekalo v botaničnem laboratoriju, na Biotehniški fakulteti v Ljubljani na Oddelku za agronomijo. Semena boba (*Vicia faba* L.) smo kalili v zemlji. Ko so korenine dosegle dolžino vsaj 10 mm in več, smo koreninske vršičke odrezali vsako uro v roku 12 ur, torej tekom dneva. Koreninske vršičke smo nato fiksirali v etanol-očetni kislini v razmerju 3 : 1 in jih tako pustili še nekaj dni v hladilniku pri temperaturi +4 °C. Nato je sledila citološka tehnika barvanja kromosomov v Feulgenovem barvilu in acetokarminu ter izdelovanje začasnih preparatov. Korenine, dolge od 1,2 do 5,8 cm, so bile vložene v Farmerjev fiksativ v razmerju 3 : 1 etanol (96 %) in očetno kislino (V/V). Po nekaj dnevih v fiksativu smo koreninske rastne vršičke boba sprali v destilirani vodi, obarvali s Feulgenom po hidrolizi v 1N HCl pri 60 °C za 6–8 minut, da smo določili mitotski indeks v meristemu. Vršičke korenin smo mečkali v kapljici acetokarmina pod krovnim stekelcem.

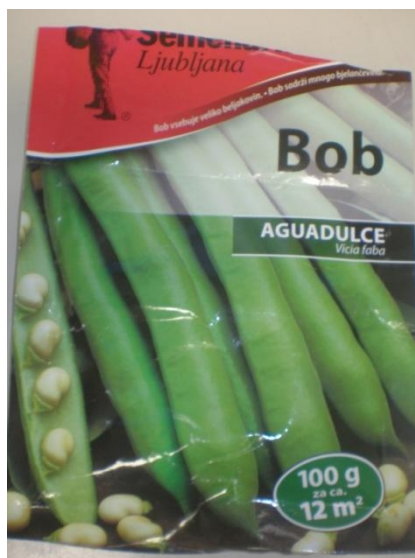
Rezultate smo opazovali z raziskovalnim mikroskopom »Olympus Provis« (slika 8) in kromosome boba tudi fotografirali ter določili število delečih se celic (mitotski indeks). Pri rastlinah potekajo delitve ritmično in kažejo dnevno spreminjanje. Na celični cikel vplivajo številni zunanji in notranji dejavniki, kot so temperatura, ritem dan-noč, dolžina dneva, ura dneva, letni čas itd. Spremembe v številu celic (mitotskega indeksa) pa smo pričakovali v teku dneva (12 ur). Metodo bi lahko uporabili tudi za ugotavljanje vitalnosti semen pri različno skladiščenih ali starih semenih.



Slika 8: Raziskovalni mikroskop 'Olympus Provis'

### 3.1.1 Priprava semen in sajenje

1. DAN: Četrtek, 4. 11. 2010: Potrebovala sem 131 semen boba (slika 9), dva pladnja z zemljo za gojenje lončnic ter dva litra vode. Sobna temperatura je bila 25 °C.



Slika 9: Embalaža semen boba

2. DAN: Petek, 5. 11. 2010:

Zalila sem zemljo, in sicer dvakrat tekom dneva z 0,5 litra vode.

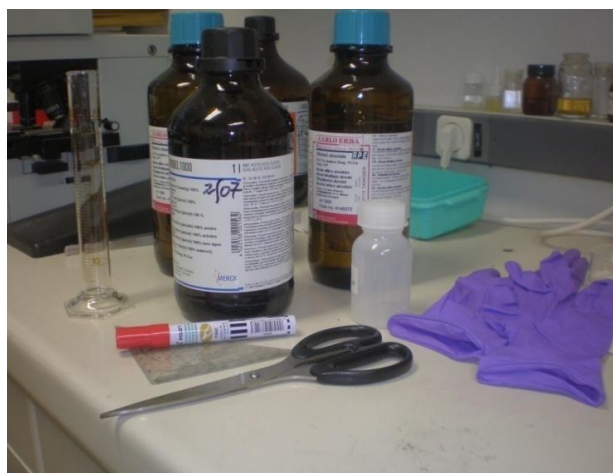
3. DAN: Ponedeljek, 8. 11. 2010:

Ponovno sem zalila zemljo, prav tako dvakrat v dnevu z 0,5 litra vode.

### 3.1.2 Priprava fiksativov

4. DAN: Torek, 9. 11. 2010:

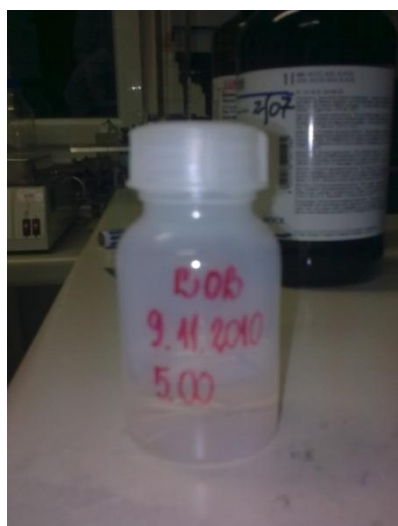
Pripravila sem sveže fiksative (slika 10). Za to sem potrebovala etanol (96 %) in očetno kislino, v razmerju 3 : 1 (30 ml – 10 ml). Nato sem petim skaljenim semenom ob 5.00 uri odrezala korenine. Izmerila sem dolžino posamezne korenine (priloga A) ter vstavila vseh 5 korenin v sveže pripravljen fiksativ. Na pripravljen fiksativ sem napisala datum in uro ter vstavila pripravljen fiksativ v hladilnik pri temperaturi +4 °C (slika 11, 12). Postopek sem ponovila vsako polno uro vse do 17.00 ure. Pripravila sem torej 13 fiksativov.



Slika 10: Pripravljene predmeti in raztopine za pripravo fiksativov



Slika 11: Pri delu v laboratoriju



Slika 12: Pripravljen prvi fiksativ

### 3.1.3 Barvanje po Feulgenu in priprava mikroskopskih preparatov

Shiffov reagent pripravimo tako, da v 100 ml vrele destilirane vode raztopimo 0,5 g fuksina. Dobro premešamo in ohladimo na 50 °C. Dvakrat filtriramo in dodamo 15 ml HCl. Dodamo 1,5 g K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in pustimo stati v dobro zaprti steklenici v temi čez noč oz. dokler se ne pojavi blede rumena do rahlo roza barva. Če barvilo ni v celoti razbarvano, dodamo 500 mg oglja in pretresamo 2 minuti ter nato filtriramo. Ponovimo z ogljem, če je potrebno. Shranimo v oranžni steklenički oz. v steklenički, oviti z alufolijo v hladilniku (Clark, 1981).

Barvilo karmin očetno kislino pripravimo na sledeč način: 1g karmina mešamo v mešanici 45 ml koncentrirane očetne kisline in 55 ml destilirane vode. Suspenzijo kuhamo 2 do 3 ure. Po ohladitvi filtriramo v temno stekleničko (Göltenboth, 1978).

Za pripravo preparata oz. mečkancev smo iz 37 % HCl vzeli 3,7 ml ter razredčili na 100 ml. Nato smo HCl segreli v vodni kopeli na 60 °C. 3–5 konic koreninic smo dali v HCl in nato v vodno kopel za 6 minut. Za tem smo sprali koreninice v destilirani vodi ter jih dali v barvilo Feulgen za eno uro. Nato smo vzeli 1–2 mm dolg koreninski vršiček, ga dali na predmetno stekelce in nanj kanili kapljico acetokarmina. Pokrili smo ga s krovnim stekelcem, čez položili papir ter rahlo poteptali s svinčnikom, da so se celice primerno razporedile po preparatu oz. predmetnem stekelcu. Nato smo mečkance koreninskih vršičkov opazovali pod mikroskopom.

### 3.1.4 Mikroskopiranje in izračun mitotskega indeksa

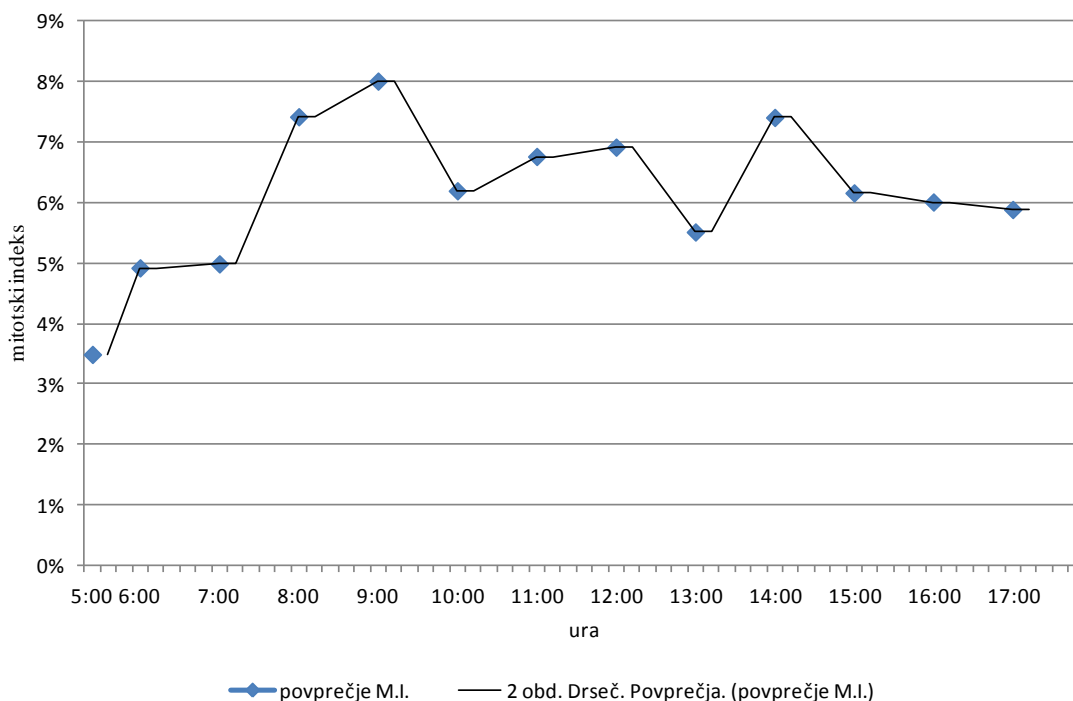
Za vsako uro smo imeli pet sveže pripravljenih preparatov koreninskih rastnih vršičkov. V vsakem preparatu smo naključno izbrali pet polj, v katerih smo na polovici ali v celem vidnem polju prešteli vsa celična jedra, ter nato še vse delitve jeder (profaza, metafaza, anafaza, telofaza). Na primer, imeli smo eno vidno polje, kjer je bilo 50 celic, torej tudi 50 jeder, to je 100 %. Nato smo prešteli jedra, ki so v fazi delitve, in ta sta bila recimo 2. Izračunali smo koliko % je jeder, ki so bila v fazi delitve. V tem primeru je bilo to 4 %. Torej je bil mitotski indeks v tem vidnem polju 4%. Za vsak fiksativ pa smo imeli na voljo pet preparatov, v katerih smo v vsakem posameznem prešteli jedra petih vidnih polj. Povprečje smo izračunali tako, da smo sešteli vse procente delečih se jeder, in to delili s pet. Rezultat je bil povprečje delitev jeder oz. mitotski indeks v eni konici koreninice. Pod mikroskopom smo jedra opazovali in šteli na 200 do 400-kratni povečavi. Rezultati so v prilogi B.

## 4 REZULTATI

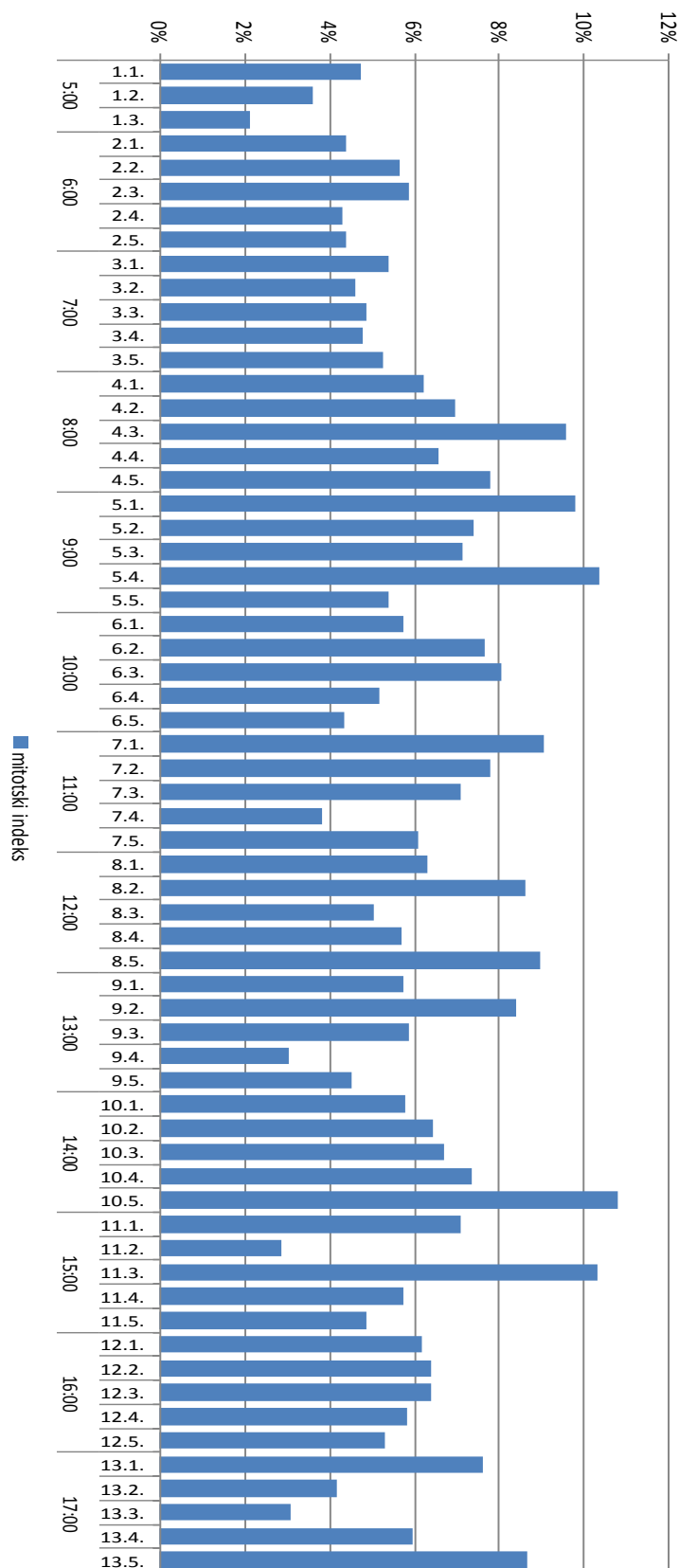
### 4.1 VPLIV SVETLOBE NA DELITEV CELIC

Delitve celic so potekale tekom celega dneva. Vrednost mitotskega indeksa se je spreminjala skozi cel dan (slika 13).

Mitotski indeks je bil najmanjši ob 5.00 uri zjutraj, ko je povprečje MI znašalo od 3,48 %. V nadaljevanju preučevanega obdobja je MI vseskozi naraščal do 9.00 ure, kjer je dosegel vrh s povprečno vrednostjo 8,01 %. MI je nato ponovno rasel do 12.00 ure in dosegel vrednost 6,91 %. Ob 13.00 uri je vrednost MI vidno padla na povprečno vrednost 5,51 %. Ob 14. 00 uri je MI dosegel svoj drugi vrh pri vrednosti 7,40 %, ki je enaka vrednosti, doseženi ob 8.00 uri zjutraj. MI do 17.00 ure vidno pada in doseže vrednost 5,88 % (slika 14).



Slika 13: Povprečje mitotskega indeksa

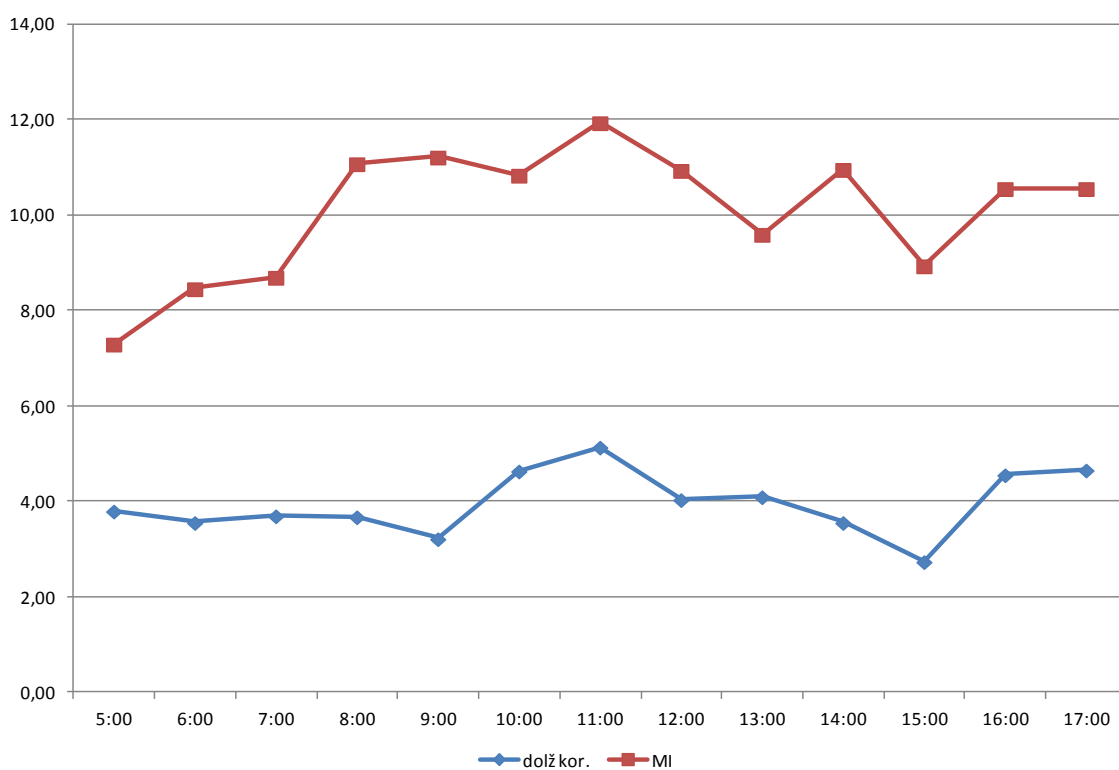


Slika 14: Spremembe mitotskega indeksa v časovnem intervalu pri posameznih preparatih

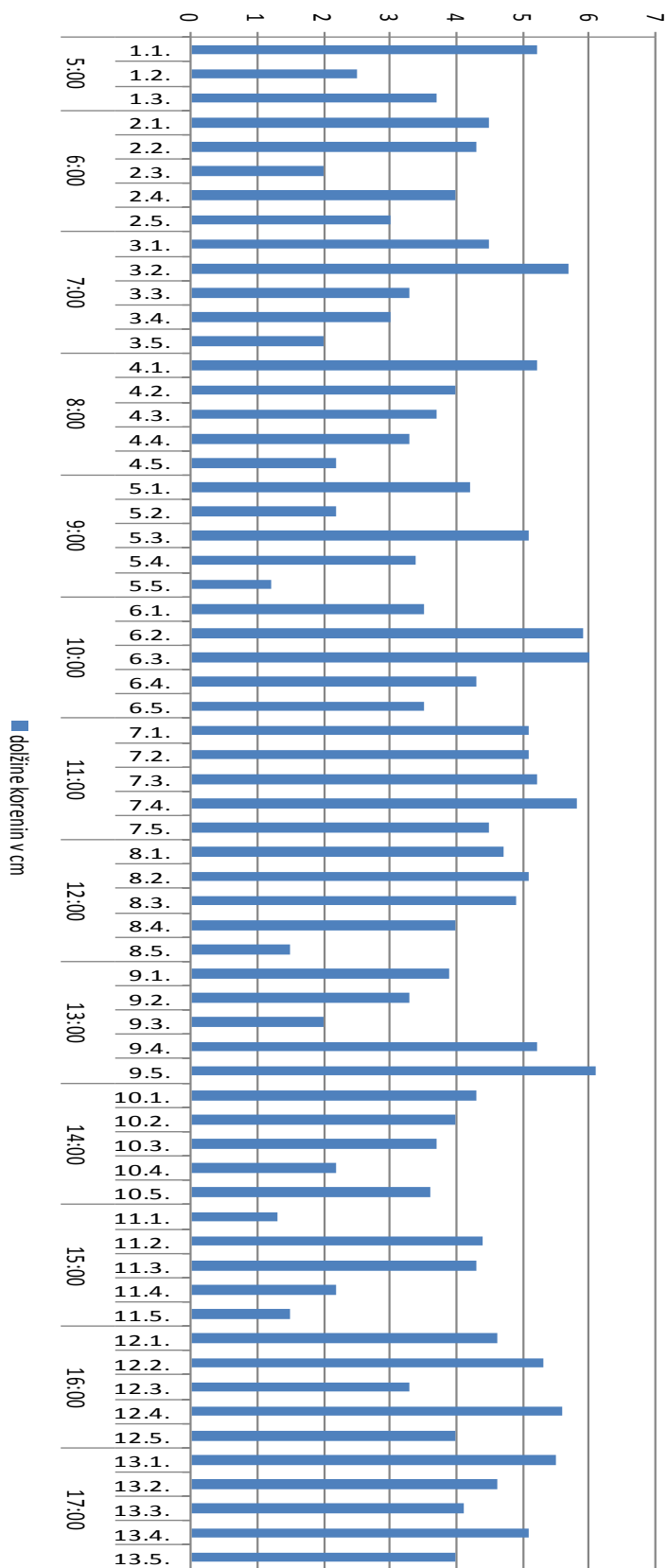


## 4.2 VPLIV DOLŽINE KORENINE

Pri ugotavljanju odvisnosti MI in dolžine korenin (slika 15) smo prišli do zaključka, da je največji MI dosežen pri krajših koreninah (slika 16). Sorazmerno z daljšanjem korenine pada tudi intenzivnost celičnih delitev. Najvišje vrednosti MI smo izmerili v sredini dneva, zjutraj in popoldne so bile vrednosti MI manjše



Slika 15: Primerjava povprečja MI in dolžine korenin



Slika 16: Spreminjanje dolžine korenin v časovnem intervalu pri posameznih preparatih

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo analizirali vrednosti mitotskega indeksa v koreninskih vršičkih kalečega semena boba. Zanimalo nas je, kaj vpliva na mitotski indeks te rastline v teku dneva oziroma v teku 12 ur. Ugotovili smo, da na mitotski indeks v našem poskusu vplivata dnevna svetloba ter dolžina korenin boba (*Vicia faba* L.).

Zgornje ugotovitve se skladajo tudi z raziskavo MI (Osuji, 2010), opravljeno na Afriškem kruhovcu (*Treculina africana*), kjer so ugotovili, da je bil odstotek celic v fazi delitve večji v dnevnem kot v zgodnjem jutranjem in poznem popoldanskem času. Osuji (2010) v raziskavi navaja, da celice v temi počivajo.

Naš poskus smo primerjali še z nekaterimi drugimi raziskavami, ki proučujejo mitotski indeks različnih vzorčnih rastlin, na katere vplivajo mnogi dejavniki.

V raziskavi in vitro testa antimutagenega delovanja izvlečka majarona na meristemske celice korenine boba so ocenjevali antimutageno delovanje majarona (*Origanum majorana*) na meristemske celice na korenini boba (*Vicia faba* L.). Na celice koreninskega vršička boba so 6 ur nanašali 250 in 350 µg/ml natrijevega azida. Pred nanosom natrijevega azida so 20 ur dodajali 50, 100 in 200 µg/ml izvlečka majarona (*Origanum majorana*). Po nanosu kolhicina so naredili mečkance in analizirali kromosomske aberacije in mitotski indeks. Ekstrakt majarona v zanemarljivih količinah povzroča kromosomske spremembe ali aberacije celic (aneuploidija, poliplodija, mikronukleus, anafazni mostički itd.) na koreninskem vršičku boba v primerjavi s kontrolo. Sam natrijev azid povzroča občutno več kromosomskih aberacij skladno s povečevanjem koncentracije. Skupno število aberacij se je opazno zmanjšalo pri celicah korenine, na katere so prej nanесли ekstrakt majarona. Raziskava je razkrila, da ima majaron antimutageni potencial, ki deluje na zmanjšanje kromosomskih aberacij meristemskih celic korenine (*Vicia faba* L.), na katere so prej nanесли natrijev azid. Poleg tega je pokazal blago citotoksičnost, saj je zmanjšal odstotek mitotičnega indeksa pri vseh skupinah celic, na katere so nanесли ekstrakt majarona. Antimutageno delovanje izvlečka majarona prične na meristemske celice korenine boba učinkovati pri količini 50 µg/ml (Qari, 2008).

Zanimiva je tudi primerjava rasti in mitotskega indeksa korenine (*Vicia faba* L.) ob izpostavljenosti 60 Hz električnemu polju. V opravljeni raziskavi so določili rast, mitotski indeks in obnavljanje stopnje rasti pri koreninah boba, ki so jih izpostavili 60 Hz električnemu polju pri 200, 290 in 360 V/m v vodnem anorganskem hranilnem mediju (prevodnost 0,07–0,09 S/m). Rast korenine se je zmanjšala skladno s povečevanjem moči, mejna jakost električnega polja, ki je že imela vpliv na rast, je bila 230 V/m. Sproženi transmembranski potencial pri mejni izpostavljenosti je bil okoli 4–7 mV. Izpostavljenost električnemu polju ni imela dovolj velikega vpliva na mitotski indeks, da bi lahko

zmanjšala stopnjo rasti za več kot približno 35 % v primerjavi s kontrolo. Obnovitev stopnje rasti za 31–96 % v primerjavi s kontrolo se je pojavila v 4 dneh po prekinitvi izpostavljenosti električni napetosti 360 V/m. Rezultati podpirajo domnevo, da uporabljeno električno polje deluje na celično membrano (Inoue M. in sod., 1985).

Prav tako je zanimiva raziskava, ki proučuje vpliv genotoksičnosti kmetijske zemlje na mitotski indeks in kromosomske aberacije. Vzorci zemlje so bili odvzeti tako na dveh različnih globinah zemlje (eden na globini od 0 do 20 cm, drugi na globini 20–40 cm) kot tudi na dveh različnih poljih (eno obdelovano po konvencionalni metodi kmetijstva, drugo pa po enem letu obdelovanja po metodi trajnostnega kmetijstva). Kot testno rastlino so uporabili čebulo (*Allium cepa* L), korenine so imele dolžino približno 2,5 cm. Rezultati so pokazali, da je v koreninah te rastline, zrasle v zemlji, obdelovani po trajnostni metodi, večji mitotski indeks in manjša frekvenca kromosomskih aberacij kot v koreninah rastline, ki je rasla v zemlji, obdelovani po konvencionalni metodi. V obeh vzorcih z globine 20 do 40 cm pa je mitotski indeks manjši kot v vzorcih z globine od 0 do 20 cm. To dokazuje, da je v globljih plasteh tal citotoksičnost intenzivnejša in zaradi tega mitotski indeks manjši (Dragoeva in sod., 2009).

Na mitotski indeks in odstotek kromosomskih aberacij ima vpliv uporaba različnih regulatorjev rasti in kemikalij, ki se uporabljajo v kmetijstvu. Na Fakulteti znanosti Suez Canal University v Egiptu (Laila M., 2008) so semena boba tretirali z giberelinsko kislino ( $GA_3$ ), gnojilom, kalijevim oksidom ( $K_2O$ ) in z inhibitorjem avksina N-meta-tolil-phthalamic kislino (Tomaset). Citološke študije so pokazale, da uporaba regulatorja rasti  $GA_3$  stimulira aktivnost mitotskega indeksa. Prav tako tretiranje z  $GA_3$  v primerjavi s kontrolnimi koreninami ni povzročilo znatnejših mitotskih aberacij. Na drugi strani je uporaba  $K_2O$  pokazala večji odstotek kromosomskih aberacij. Ob uporabi  $K_2O$  se je MI kratkoročno (12 ur) sicer povečal, vendar je dolgoročno (36 ur) padel. Najbolj intenzivno zmanjšanje MI in hkrati največ kromosomskih aberacij je bilo povzročenih z uporabo kemikalije Tomaset. Citotoksični in genotoksični potencial kemikalije Tomaset je bil torej očitno večji kot pri  $K_2O$  in  $GA_3$ .

Kromosomske aberacije, povzročene z navedenimi kemikalijami v raziskavi, so podobne aberacijam, ki jih lahko povzročijo mnoge druge kemikalije: pesticidi, insekticidi, umetna gnojila, kemični mutageni in sevanja. Te kromosomske aberacije lahko smatramo kot indikatorje klastrogenih učinkov (Laila M., 2008).

Mitotski indeks je bistveno manjši tudi pri rastlinah, katerih celice so inficirane z virusnimi obolenji (Yadav in Yadav, 2010) v primerjavi z zdravimi rastlinami.

Na podlagi izvedenega poizkusa in rezultatov navedenih raziskav lahko zaključimo, da na mitotski indeks vplivajo različni dejavniki, tako umetno pridobljeni kot tudi naravni. V naši raziskavi mitotskega indeksa v koreninskih vršičkih kalečega semena boba (*Vicia faba* L.) smo ugotovili, da imata vpliv na mitotski indeks dnevna svetloba in dolžina korenin.

## 5.2 SKLEPI

V našem diplomskem delu smo izvedli poskus, v katerem smo ugotavljali dnevne spremembe mitotskega indeksa v koreninskih vršičkih kalečih semen boba. Semena boba smo kalili v zemlji, in ko so korenine dosegle dolžino vsaj 10 mm in več, smo potrebne koreninske vršičke odrezali vsako uro v roku 12 ur. Fiksirali smo jih v etanol-očetni kislini v razmerju 3 : 1. Sledila je citološka tehnika barvanja kromosomov v Feulgnovem barvilu in acetokarminu ter izdelovanje začasnih preparatov.

Poskus je dokazal, da na mitotski indeks vpliva dnevna svetloba in tudi dolžina korenine. Vrednosti MI so precej variirale. Dnevne spremembe mitotskega indeksa pri bobu so relativno majhne, rezultati analize MI pa nekoliko variabilni.

Kljub temu pa so bile največje vrednosti MI ob 8.00, 9.00 in ob 14.00 uri, kar pomeni, da delitve celic verjetno potekajo v času intenzivnejše svetlobe. Poskus je potekal v jesenskem času (9. 11. 2010), kar pomeni, da je ob 5.00 uri zjutraj in ob 17.00 uri popoldne tema. Sklepamo lahko, da je zaradi tega ob tem času tudi mitotska aktivnost manjša. Sorazmerno z daljšanjem korenine pada tudi intenzivnost celičnih delitev. Iz tega pa lahko sklepamo, da so celice v krajših koreninah bolj aktivne pri delitvi (optimum je 1–2.5 cm dolžine).

Na podlagi izvedenega poskusa in preučevanja različnih raziskav mitotskega indeksa lahko zaključimo, da na celični cikel vplivajo razni dejavniki, tako naravni kot tudi umetno povzročeni. Žal imajo umetno povzročeni dejavniki velikokrat negativni učinek na celotni potek cikla. Kljub nazornim rezultatom je uporaba kemičnih substanc v našem kmetijstvu vsakdanja, rezultati raziskav pa pogosto ignorirani. Majhen MI je tudi osnovna težava pri kromosomskih raziskavah, saj pomeni majhno število kromosomov za analize pri raznih raziskavah.

## 6 POVZETEK

Vsaka rastlina začne razvoj s celico, ki se deli in raste. Vendar imajo samo nekatere celice sposobnost delitve in rasti, predvsem v rastnih vršičkih in kambijih (mersitemi), ostale celice pa se večinoma specializirajo za določeno drugo nalogo. Mnoge celice s staranjem izgubijo zmožnost delitve ali se le redko delijo, druge celice pa so sposobne hitro deliti.

Mitoza je vrsta celične delitve. Obsega dva procesa, delitev jedra ali kariokinezo in delitev citoplazme ali citokinezo.

Za merjenje hitrosti razmnoževanja celične populacije se uporablja mitotski indeks, ki je definiran kot razmerje med številom celic v mitozih in skupnim številom celic.

Bob je kritosemenka in dvokaličnica, ki spada v družino metuljnic (Fabaceae). Te so po vsem svetu razširjena družina iz reda stročnic z okoli 17000 vrstami z približno 700 rodovi (Batič in sod. 2009). Bob so kot hrano uporabljali že v kameni dobi. Semena se danes v večini uporablja kot krmo za živino, nezrela semena in tudi cele mlade stroke pa včasih kot zelenjavo.

Namen diplomske naloge je bil analiza dnevnih vrednosti mitotskega indeksa v koreninskih vršičkih kalečega semena boba. V ta namen smo pripravili ustrezne mikroskopske preparate rastline boba ter opazovali spremembe deležih se celic tekom dneva, natančneje v obdobju 12 ur. Poskus smo izvedli v laboratoriju s pomočjo svetlobnega laboratorijskega in raziskovalnega mikroskopa.

Z raziskavo smo ugotovili, da na mitotski indeks v koreninskih vršičkih kalečega semena boba vpliva tako dnevna svetloba kot tudi dolžina korenine. Aktivnejše delitve celic potekajo v času intenzivne svetlobe. Intenzivnost celičnih delitev pada sorazmerno z daljšanjem korenine. Koreninski rastni vršički so najprimernejši za kromosomske analize, ko dosežejo dolžino okoli 1 cm. Rezultati mitotskega indeksa so precej nihali, dnevne spremembe MI pa so bile relativno majhne.

## 7 VIRI

- Batič F., Šircelj H., Turk B. 2004. Pregled rastlinskega sistema, delovna verzija; za interno uporabo. Za študente agronomije, zootehnike in veterine. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Agronomijo: 119 str.  
[http://web.bf.uni-lj.si/ag/botanika/gradiva/AGR\\_ZOO\\_VET\\_Pregled%20sistema\\_Skripta.pdf](http://web.bf.uni-lj.si/ag/botanika/gradiva/AGR_ZOO_VET_Pregled%20sistema_Skripta.pdf) (12.4.2014)
- Batič F., Wraber T., Turk B. 2009. Pregled rastlinskega sistema, druga dopolnjena izdaja. Za študente gozdarstva in krajinske arhitekture. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Agronomijo: 649 str.
- Bhatta P., Sakya S.R. 2008. Study of mitotic activity and chromosomal behaviour in root meristem of *Allium cepa* L. treated with magnesium sulphate. Ecological Society, 15: 83–88
- Clark G. 1981. Staining procedures, fourth edition. Biological Stain Commission Published for the Biological Stain Commission by Williams & Wilkins: 512 str.
- Černe M. 1999. Vrtni bob. Naša žena, 3.  
<http://fides.fe.uni-lj.si/zdravje/clanki/3-99.html> (26.3.2014)
- Dragoeva A., Kalcheva V., Slanev S. 2009. Genotoxicity of Agricultural Soils after one year of Conversion Period and under Conventional Agricultur. Journal of Applied Sciences and Environmental Management, 13, 1: 81-83
- Garcke A. 1972. Illustrierte Flora. 23, Auflage. Verlag Paul Parey Berlin und Hamburg: 1607 str.
- Glšenčnik E. 2004. Vpliv onesnaženega zraka na celične delitve v koreninskih vršičkih šalotke (*Allium cepa* L. var *ascalonicum*) na emisijsko ogroženih področjih Slovenije. Doktorska dizertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, oddelek za Biologijo: 200 str.
- Göltenboth F. 1978. Chromosomen praktikum. Georg Thieme Verlag Stuttgart: 212 str.
- Illustration\_Vicia\_faba1.jpg, 2014  
[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Illustration\\_Vicia\\_faba1.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Illustration_Vicia_faba1.jpg), 5.3.2014
- Inoue M, Miller MW, Cox C, Carstesen EL. 1985. Growth rate and mitotic index analysis of *Vicia faba* L. roots exposed to 60-Hz electric fields. Bioelectromagnetics, 6, 3:293-303  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3836672> (12.7.2012)

- Krajnčič B. 1984. Botanika (anatomija z morfologijo). Maribor, Univerza v Mariboru, Višja agronomska šola: 383 str.
- Laila M. 2008. The Effect of Three Agricultural Chemicals on Mitotic Division and Total Seed Protein Banding Profiles of Alfalfa (*Vicia faba*). International Journal of Agriculture & Biology, 10, 5: 499-504
- Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Ravnik V., Podobnik A., Turk B., Vreš B. 2007. Mala flora Slovenije. Ključ za določanje praprotnic in semenk. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 967 str.
- Mitotic Index  
[http://en.wikipedia.org/wiki/mitotic\\_index](http://en.wikipedia.org/wiki/mitotic_index) (26.8.2010)
- Moore R., Clark W. D., Stern K. R., Wodopich D. 1995. Botany. Dubuque, William C. Brown Communications: 824 str.
- Osuji J.O., Owei, S. D. Jnr. 2010. Mitotic Index studies on *Treculia africana* decne. In Nigeria. Australian Journal of Agricultural Engineering, 1, 1: 25–28
- Petrič M. 1978. Botanika. Citologija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 78 str.
- Praprotnik N., Zgonec S. 2008. Tematski leksikoni - Rastline. Tržič, Učila International: 361 str.
- Qari S.H. 2008. In vitro evalutaion of the anti-mutagenic effect of *Origanum majorana* extract on the meristemetic root cells of *Vicia Faba*. Journal of Taibah University for Science, 1: 6-11
- Sinkovič T. 2000. Uvod v botaniko. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo: 176 str.
- Sinkovič T. 2006. Botanika. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo: 217 str.
- Sinkovič T. 2008. Mitoza in celični cikel pri višjih rastlinah. Acta agriculturae Slovenica, 91, 2: 465–477
- Špes A. 2008. Ugotavljanje genotoksičnosti metil tetra-butyl etra (MTBE) z *Allium testom*. Raziskovalna naloga. Velenje, Splošna in strokovna gimnazija: 60 str.



Vodnik D. 2012. Osnove fiziologije rastlin. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 141 str.

Yadav H. and Yadav P.K. 2010. A Study of mitotic cell division in *Capsicum annuum* L. induced by chilli mottle virus disease. Asian Journal of Experimental Biological Science, 1, 2: 445-447

## ZAHVALA

Ob zaključenem diplomskem delu se najprej iskreno zahvaljujem svojemu mentorju, višjemu predavatelju mag. Tomažu Sinkoviču, za vso strokovno pomoč tako pri teoretičnem kot tudi pri praktičnem delu diplomske naloge ter predvsem iskrena hvala za potrpežljivost in razumevanje.

Prav tako se iskreno zahvaljujem prof. dr. Jerneju Jakšetu in prof. dr. Francu Batiču za strokovni pregled diplomske naloge.

Iskrena hvala tudi Moniki Žvikart za pomoč pri obdelavi statističnih podatkov oziroma grafičnih prikazih ter pri urejanju diplomskega dela.

Posebno zahvalo dolgujem tudi svojim staršem, sestri Dijani ter Matevžu za vso podporo in pomoč tekom študija in pri nastajanju tega dela.

Zahvaljujem pa se tudi Cirili, Nini ter vsem ostalim, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku te diplomske naloge. Hvala!

## PRILOGA A

### Izmerjene dolžine korenin

URA: 5.00  
1. 5,2 cm  
2. 2,5 cm  
3. 3,7 cm  
4. 2,2 cm  
5. 3,9 cm

URA: 6.00  
1. 4,5 cm  
2. 4,3 cm  
3. 2 cm  
4. 4 cm  
5. 3 cm

URA: 7.00  
1. 4,5 cm  
2. 5,7 cm  
3. 3,3 cm  
4. 3 cm  
5. 2 cm

---

URA: 8.00  
1. 5,2 cm  
2. 4 cm  
3. 3,7 cm  
4. 3,3 cm  
5. 2,2 cm

URA: 9.00  
1. 4,2 cm  
2. 2,2 cm  
3. 5,1 cm  
4. 3,4 cm  
5. 1,2 cm

URA: 10.00  
1. 3,5 cm  
2. 5,9 cm  
3. 6 cm  
4. 4,3 cm  
5. 3,5 cm

---

URA: 11.00  
1. 5,1 cm  
2. 5,1 cm  
3. 5,2 cm  
4. 5,8 cm  
5. 4,5 cm

URA: 12.00  
1. 4,7 cm  
2. 5,1 cm  
3. 4,9 cm  
4. 4 cm  
5. 1,5 cm

URA: 13.00  
1. 3,9 cm  
2. 3,3 cm  
3. 2 cm  
4. 5,2 cm  
5. 6,1 cm

---

URA: 14.0  
1. 4,3 cm  
2. 4 cm  
3. 3,7 cm  
4. 2,2 cm  
5. 3,6 cm

URA: 15.00  
1. 1,3 cm  
2. 4,4 cm  
3. 4,3 cm  
4. 2,2 cm  
5. 1,5 cm

URA: 16.00  
1. 4,6 cm  
2. 5,3 cm  
3. 3,3 cm  
4. 5,6 cm  
5. 4 cm

---

URA: 17.00  
1. 5,5 cm  
2. 4,6 cm  
3. 4,1 cm  
4. 5,1 cm  
5. 4 cm

## PRILOGA B

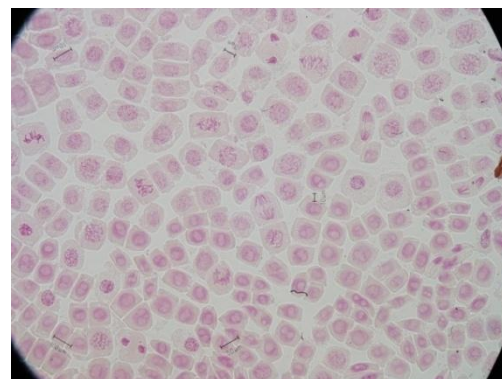
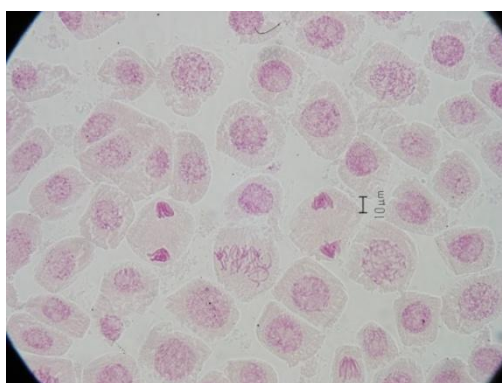
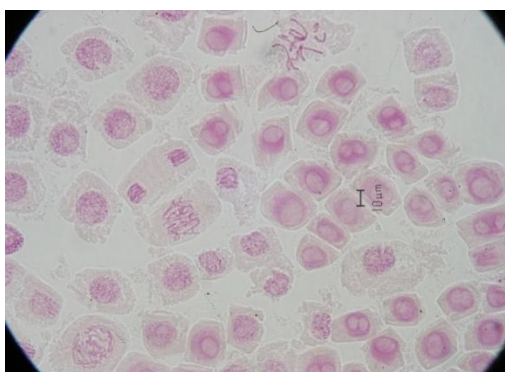
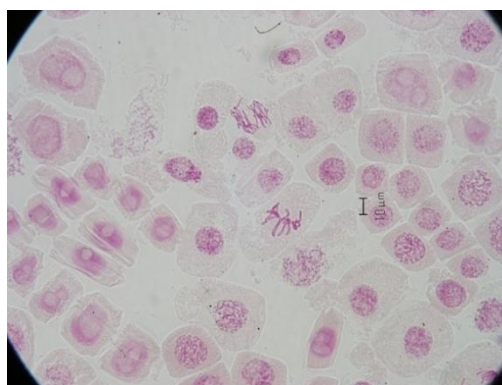
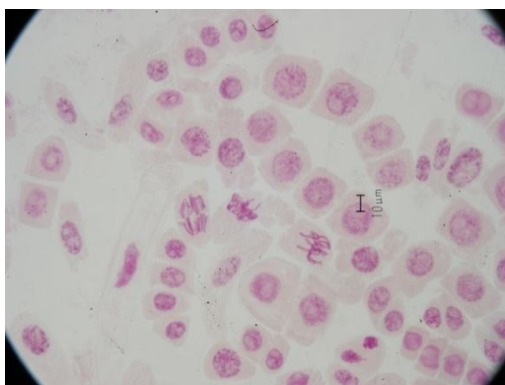
### Statistični podatki

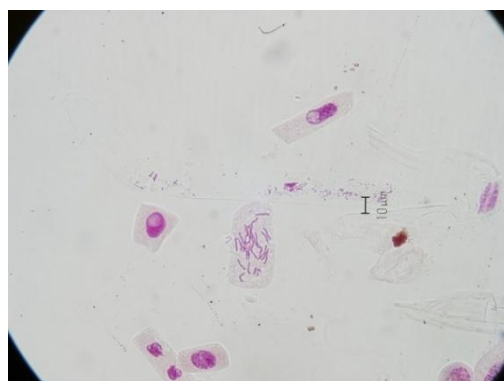
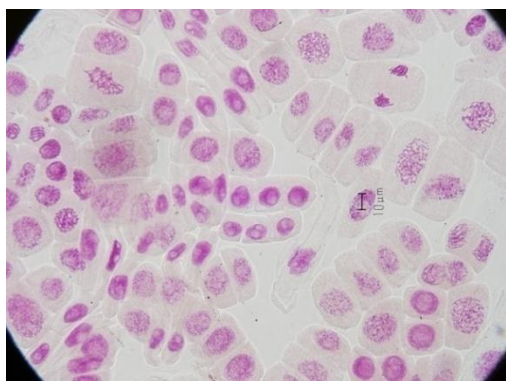
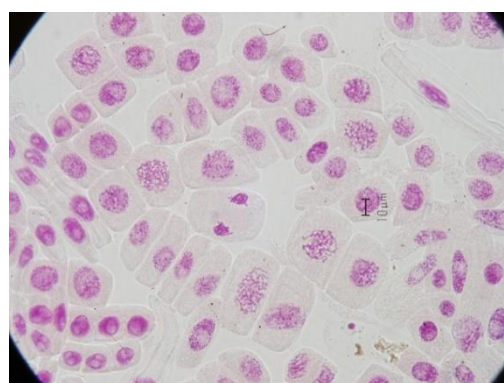
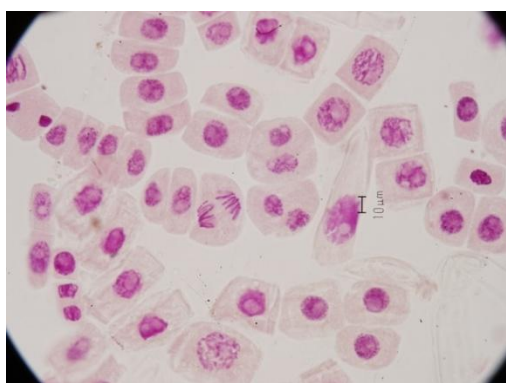
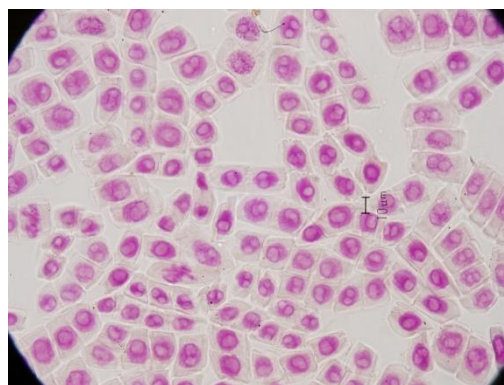
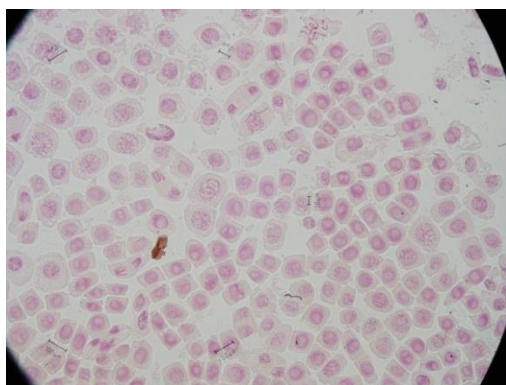
Ura	Fiksativ	Preparat	1. vidno		2. vidno		3. vidno		4. vidno		5. vidno		število vseh celic	število vseh jader v fazi delitve	mitotski indeks	povprečne mitotskega indeksa	mitotski indeks v odstotkih	dolžine korenin v cm
			polje, število celic	polje, število jader v fazi delitve	polje, število celic	polje, število jader v fazi delitve	polje, število celic	polje, število jader v fazi delitve	polje, število celic	polje, število jader v fazi delitve								
5:00	1	1.1.	198	14	233	14	149	8	245	6	229	8	1054	50	0,047	0,035	3,486	5,2
	1	1.2.	312	15	222	6	202	4	161	5	165	8	1062	38	0,036			2,5
	1	1.3.	162	3	216	3	224	4	328	10	194	4	1124	24	0,021			3,7
6:00	2	2.1.	153	5	206	8	165	8	146	4	128	10	798	35	0,044	0,049	4,919	4,5
	2	2.2.	127	8	109	8	122	9	186	5	111	7	655	37	0,056			4,3
	2	2.3.	194	10	172	9	128	11	138	7	135	8	767	45	0,059			2
7:00	2	2.4.	222	9	98	5	229	9	117	8	196	6	862	37	0,043			4
	2	2.5.	184	6	98	5	123	4	129	5	125	9	659	29	0,044			3
	3	3.1.	157	9	112	4	98	4	119	9	125	7	611	33	0,054	0,050	4,985	4,5
8:00	3	3.2.	174	7	169	9	123	5	119	5	109	6	694	32	0,046			5,7
	3	3.3.	102	5	157	7	124	7	209	4	108	11	700	34	0,049			3,3
	3	3.4.	96	3	104	5	82	4	117	7	124	6	523	25	0,048			3
9:00	3	3.5.	86	3	72	4	118	4	83	8	96	5	455	24	0,053			2
	4	4.1.	172	9	170	7	199	15	109	10	152	9	802	50	0,062	0,074	7,421	5,2
	4	4.2.	58	4	59	5	106	8	379	20	103	12	705	49	0,070			4
10:00	4	4.3.	142	25	163	11	112	13	153	9	78	4	648	62	0,096			3,7
	4	4.4.	140	15	122	11	86	8	198	6	126	4	672	44	0,065			3,3
	4	4.5.	125	11	157	13	111	11	102	6	133	8	628	49	0,078			2,2
11:00	5	5.1.	89	8	112	12	129	11	154	13	57	9	541	53	0,098	0,080	8,011	4,2
	5	5.2.	103	6	144	12	168	14	107	9	128	7	650	48	0,074			2,2
	5	5.3.	127	4	75	5	142	6	163	23	112	6	619	44	0,071			5,1
12:00	5	5.4.	165	17	202	23	42	6	109	10	157	14	675	70	0,104			3,4
	5	5.5.	87	3	74	3	253	14	116	4	119	11	649	35	0,054			1,2
	6	6.1.	165	4	108	6	123	7	69	9	126	8	591	34	0,058	0,062	6,195	3,5
13:00	6	6.2.	173	13	113	12	132	10	146	9	257	19	821	63	0,077			5,9
	6	6.3.	104	11	122	12	184	9	154	7	56	11	620	50	0,081			6
	6	6.4.	154	7	137	6	66	4	121	6	84	6	562	29	0,052			4,3
6	6.5.	154	5	75	3	132	8	68	3	126	5	555	24	0,043			3,5	

Ura	Fiksativ	Preparat	1. vidno		2. vidno		3. vidno		4. vidno		5. vidno		število vseh celic	število vseh jeder v fazi delitve	mitotski indeks	povprečje mitotskega indeksa	mitotski indeks v odstotkih	dolžine korenin v cm
			polje, število celic	polje, število jeder v fazi delitve	polje, število celic	polje, število jeder v fazi delitve	polje, število celic	polje, število jeder v fazi delitve	polje, število celic	polje, število jeder v fazi delitve	polje, število celic	polje, število jeder v fazi delitve						
11:00	7	7.1.	107	17	284	19	114	8	224	28	132	6	861	78	0,091	0,068	6,763	5,1
	7	7.2.	92	13	119	6	84	9	116	6	129	8	540	42	0,078			5,1
	7	7.3.	155	13	163	5	120	11	123	7	117	12	678	48	0,071			5,2
12:00	7	7.4.	347	13	178	8	92	3	187	6	143	6	947	36	0,038			5,8
	7	7.5.	159	7	154	12	102	9	88	5	153	7	656	40	0,061			4,5
	8	8.1.	162	10	51	6	210	9	53	6	97	5	573	36	0,063	0,069	6,917	4,7
13:00	8	8.2.	102	7	107	10	93	13	197	11	221	21	720	62	0,086			5,1
	8	8.3.	209	9	78	9	149	8	159	5	121	5	716	36	0,050			4,9
	8	8.4.	119	9	132	14	67	4	212	8	208	7	738	42	0,057			4
14:00	8	8.5.	82	14	91	7	167	8	92	11	192	16	624	56	0,090			1,5
	9	9.1.	182	10	193	8	78	4	148	11	81	6	682	39	0,057	0,055	5,513	3,9
	9	9.2.	11	5	171	9	305	24	181	15	152	16	820	69	0,084			3,3
15:00	9	9.3.	329	18	133	10	101	9	112	5	107	4	782	46	0,059			2
	9	9.4.	191	4	254	13	122	5	229	3	97	2	893	27	0,030			5,2
	9	9.5.	179	7	112	8	132	2	152	11	110	3	685	31	0,045			6,1
16:00	10	10.1.	132	9	121	11	126	4	145	6	151	9	675	39	0,058	0,074	7,409	4,3
	10	10.2.	167	8	121	7	119	13	100	5	98	6	605	39	0,064			4
	10	10.3.	191	12	137	9	112	8	142	9	105	8	687	46	0,067			3,7
17:00	10	10.4.	145	12	103	9	124	11	141	4	99	9	612	45	0,074			2,2
	10	10.5.	131	15	189	22	126	8	76	7	137	19	659	71	0,108			3,6
	11	11.1.	134	8	178	6	101	8	234	19	109	9	706	50	0,071	0,062	6,160	1,3
18:00	11	11.2.	173	6	128	4	253	6	108	3	98	4	810	23	0,028			4,4
	11	11.3.	186	27	154	8	114	19	148	8	107	11	709	73	0,103			4,3
	11	11.4.	79	7	112	8	159	5	73	4	83	5	506	29	0,057			2,2
19:00	11	11.5.	152	5	122	7	135	6	203	9	89	7	701	34	0,049			1,5
	12	12.1.	205	6	169	11	147	10	139	13	136	9	796	49	0,062	0,060	6,009	4,6
	12	12.2.	158	12	172	13	137	10	169	13	209	16	845	54	0,064			5,3
20:00	12	12.3.	159	8	147	11	153	5	197	19	129	7	785	50	0,064			3,3
	12	12.4.	148	12	207	10	188	12	217	14	115	3	875	51	0,058			5,6
	12	12.5.	121	5	231	11	151	14	216	5	92	8	811	43	0,053			4
21:00	13	13.1.	122	13	109	7	298	24	116	4	145	12	790	60	0,076	0,059	5,885	5,5
	13	13.2.	138	4	176	7	140	6	131	6	159	8	744	31	0,042			4,6
	13	13.3.	107	2	141	5	128	4	139	4	171	6	686	21	0,031			4,1
22:00	13	13.4.	115	11	178	9	156	6	84	4	121	9	654	39	0,060			5,1
	13	13.5.	149	15	158	14	123	4	114	12	162	16	706	61	0,086			4

## PRILOGA C

Slike mikroskopiranja: vidne različne faze mitoze





## PRILOGA D

### Preglednica podatkov o številu vseh vidnih celic in številu celic v fazi delitve

#### 1. Fiksativ pripravljen ob 5.00 uri

##### Preparati Fiksativa 1

###### 1.1. preparat

1. celo vidno polje	198 jeder	14 jeder v fazi delitve (7,07%)
2. celo vidno polje	233 jeder	14 jeder v fazi delitve (6%)
3. celo vidno polje	149 jeder	8 jeder v fazi delitve (5,36%)
4. celo vidno polje	245 jeder	6 jeder v fazi delitve (2,44%)
5. celo vidno polje	229 jeder	8 jeder v fazi delitve (3,49%)

###### 1.2. preparat

1. celo vidno polje	312 jeder	15 jeder v fazi delitve (4,80%)
2. celo vidno polje	222 jeder	6 jeder v fazi delitve (2,70%)
3. celo vidno polje	202 jeder	4 jedra v fazi delitve (1,98%)
4. celo vidno polje	161 jeder	5 jeder v fazi delitve (3,10%)
5. celo vidno polje	165 jeder	8 jeder v fazi delitve (4,84%)

###### 1.3. preparat

1. celo vidno polje	162 jeder	3 jedra v fazi delitve (1,85%)
2. celo vidno polje	216 jeder	3 jedra v fazi delitve (1,38%)
3. celo vidno polje	224 jeder	4 jedra v fazi delitve (1,78%)
4. celo vidno polje	328 jeder	10 jeder v fazi delitve (3,04%)
5. celo vidno polje	194 jeder	4 jedra v fazi delitve (2,06%)

#### 2. Fiksativ pripravljen ob 6.00 uri

##### Preparati fiksativa 2

###### 2.1. preparat

1. celo vidno polje	153 jeder	5 jeder v fazi delitve (3,26%)
2. celo vidno polje	206 jeder	8 jeder v fazi delitve (3,88%)
3. celo vidno polje	165 jeder	8 jeder v fazi delitve (4,84%)
4. celo vidno polj	146 jeder	4 jedra v fazi delitve (2,73%)
5. celo vidno polje	128 jeder	10 jeder v fazi delitve (7,81%)



## 2.2. preparat

1. celo vidno polje	127 jeder	8 jeder v fazi delitve (6,29%)
2. celo vidno polje	109 jeder	8 jeder v fazi delitve (7,33%)
3. celo vidno polje	122 jeder	9 jeder v fazi delitve (7,37%)
4. celo vidno polje	186 jeder	5 jeder v fazi delitve (2,68%)
5. celo vidno polje	111 jeder	7 jeder v fazi delitve (6,30%)

## 2.3. preparat

1. celo vidno polje	194 jeder	10 jeder v fazi delitve (5,15%)
2. celo vidno polje	172 jeder	9 jeder v fazi delitve (5,23%)
3. celo vidno polje	128 jeder	11 jeder v fazi delitve (8,59%)
4. celo vidno polje	138 jeder	7 jeder v fazi delitve (5,07%)
5. celo vidno polje	135 jeder	8 jeder v fazi delitve (5,92%)

## 2.4. preparat

1. celo vidno polje	222 jeder	9 jeder v fazi delitve (4,05%)
2. celo vidno polje	98 jeder	5 jeder v fazi delitve (5,10%)
3. celo vidno polje	229 jeder	9 jeder v fazi delitve (3,93%)
4. celo vidno polje	117 jeder	8 jeder v fazi delitve (6,83%)
5. celo vidno polje	196 jeder	6 jeder v fazi delitve (3,06%)

## 2.5. preparat

1. celo vidno polje	184 jeder	6 jeder v fazi delitve (3,26%)
2. celo vidno polje	98 jeder	5 jeder v fazi delitve (5,10%)
3. celo vidno polje	123 jeder	4 jedra v fazi delitve (3,25%)
4. celo vidno polje	129 jeder	5 jeder v fazi delitve (3,87%)
5. celo vidno polje	125 jeder	9 jeder v fazi delitve (7,2%)

## 3. Fiksativ pripravljen ob 7.00 uri

### Preparati fiksativa 3

#### 3.1. preparat

1. celo vidno polje	157 jeder	9 jeder v fazi delitve (5,73%)
2. celo vidno polje	112 jeder	4 jedra v fazi delitve (3,57%)
3. celo vidno polje	98 jeder	4 jedra v fazi delitve (4,08%)
4. celo vidno polje	119 jeder	9 jeder v fazi delitve (7,56%)
5. celo vidno polje	125 jeder	7 jeder v fazi delitve (5,6%)

#### 3.2. preparat

1. celo vidno polje	174 jeder	7 jeder v fazi delitve (4,02%)
2. celo vidno polje	169 jeder	9 jeder v fazi delitve (5,32%)

3. celo vidno polje	123 jeder	5 jeder v fazi delitve (4,06%)
4. celo vidno polje	119 jeder	5 jeder v fazi delitve (4,20%)
5. celo vidno polje	109 jeder	6 jeder v fazi delitve (5,50%)
3.3. preparat		
1. celo vidno polje	102 jeder	5 jeder v fazi delitve (4,90%)
2. celo vidno polje	157 jeder	7 jeder v fazi delitve (4,45%)
3. celo vidno polje	124 jeder	7 jeder v fazi delitve (5,64%)
4. celo vidno polje	209 jeder	4 jedra v fazi delitve (1,91%)
5. celo vidno polje	108 jeder	11 jeder v fazi delitve (10,18%)
3.4. preparat		
1. celo vidno polje	96 jeder	3 jedra v fazi delitve (3,12%)
2. celo vidno polje	104 jeder	5 jeder v fazi delitve (4,80%)
3. celo vidno polje	82 jedra	4 jedra v fazi delitve (4,87%)
4. celo vidno polje	117 jeder	7 jeder v fazi delitve (5,98%)
5. celo vidno polje	124 jeder	6 jeder v fazi delitve (4,83%)
3.5. preparat		
1. celo vidno polje	86 jeder	3 jedra v fazi delitve (3,48%)
2. celo vidno polje	72 jeder	4 jedra v fazi delitve (5,55%)
3. celo vidno polje	118 jeder	4 jedra v fazi delitve (3,38%)
4. celo vidno polje	83 jeder	8 jeder v fazi delitve (9,63%)
5. celo vidno polje	96 jeder	5 jeder v fazi delitve (5,20%)

#### 4. Fiksativ pripravljen ob 8.00 uri

##### Preparati fiksativa 4

###### 4.1. preparat

1. celo vidno polje	172 jeder	9 jeder v fazi delitve (5,23%)
2. celo vidno polje	170 jeder	7 jeder v fazi delitve (4,11%)
3. celo vidno polje	199 jeder	15 jeder v fazi delitve (7,53%)
4. celo vidno polje	109 jeder	10 jeder v fazi delitve (9,17%)
5. celo vidno polje	152 jeder	9 jeder v fazi delitve (5,92%)

###### 4.2. preparat

1. celo vidno polje	58 jeder	4 jedra v fazi delitve (6,89 %)
2. celo vidno polje	59 jeder	5 jeder v fazi delitve (8,47%)
3. celo vidno polje	106 jeder	8 jeder v fazi delitve (7,54%)
4. celo vidno polje	379 jeder	20 jeder v fazi delitve (5,27%)
5. celo vidno polje	103 jeder	12 jeder v fazi delitve (11,65%)

#### 4.3. preparat

1. celo vidno polje	242 jeder	25 jeder v fazi delitve (10,33%)
2. celo vidno polje	163 jeder	11 jeder v fazi delitve (6,74%)
3. celo vidno polje	112 jeder	13 jeder v fazi delitve (11,60%)
4. celo vidno polje	153 jeder	9 jeder v fazi delitve (5,88%)
5. celo vidno polje	78 jeder	4 jedra v fazi delitve (5,12%)

#### 4.4. preparat

1. celo vidno polje	140 jeder	15 jeder v fazi delitve (10,71%)
2. celo vidno polje	122 jeder	11 jeder v fazi delitve (9,01%)
3. celo vidno polje	86 jeder	8 jeder v fazi delitve (9,30%)
4. celo vidno polje	198 jeder	6 jeder v fazi delitve (3,03%)
5. celo vidno polje	126 jeder	4 jedra v fazi delitve (3,17%)

#### 4.5. preparat

1. celo vidno polje	125 jeder	11 jeder v fazi delitve (8,8%)
2. celo vidno polje	157 jeder	13 jeder v fazi delitve (8,28%)
3. celo vidno polje	111 jeder	11 jeder v fazi delitve (9,90%)
4. celo vidno polje	102 jeder	6 jeder v fazi delitve (5,88%)
5. celo vidno polje	133 jeder	8 jeder v fazi delitve (6,01%)

### 5. Fiksativ ob 9.00 uri

#### Preparati fiksativa 5

##### 5.1. preparat

1. celo vidno polje	89 jeder	8 jeder v fazi delitve (8,98%)
2. celo vidno polje	112 jeder	12 jeder v fazi delitve (10,71%)
3. celo vidno polje	129 jeder	11 jeder v fazi delitve (8,52%)
4. celo vidno polje	154 jeder	13 jeder v fazi delitve (8,44%)
5. celo vidno polje	57 jeder	9 jeder v fazi delitve (15,78%)

##### 5.2. preparat

1. celo vidno polje	103 jeder	6 jeder v fazi delitve (5,82%)
2. celo vidno polje	144 jeder	12 jeder v fazi delitve (8,33%)
3. celo vidno polje	168 jeder	14 jeder v fazi delitve (8,33%)
4. celo vidno polje	107 jeder	9 jeder v fazi delitve (8,41%)
5. celo vidno polje	128 jeder	7 jeder v fazi delitve (5,46%)

##### 5.3. preparat

1. celo vidno polje	127 jeder	4 jedra v fazi delitve (3,14%)
2. celo vidno polje	75 jeder	5 jeder v fazi delitve (6,66%)

3. celo vidno polje	142 jeder	6 jeder v fazi delitve (4,22%)
4. celo vidno polje	163 jeder	23 jeder v fazi delitve (14,11%)
5. celo vidno polje	112 jeder	6 jeder v fazi delitve (5,35%)
5.4. preparat		
1. celo vidno polje	165 jeder	17 jeder v fazi delitve (10,30%)
2. celo vidno polje	202 jeder	23 jeder v fazi delitve (11,38%)
3. celo vidno polje	42 jeder	6 jeder v fazi delitve (14,28%)
4. celo vidno polje	109 jeder	10 jeder v fazi delitve (9,17%)
5. celo vidno polje	157 jeder	14 jeder v fazi delitve (8,91%)
5.5. preparat		
1. celo vidno polje	87 jeder	3 jedra v fazi delitve (3,44%)
2. celo vidno polje	74 jeder	3 jedra v fazi delitve (4,05%)
3. celo vidno polje	253 jeder	14 jeder v fazi delitve (5,53%)
4. celo vidno polje	116 jeder	4 jedra v fazi delitve (3,44%)
5. celo vidno polje	119 jeder	11 jeder v fazi delitve (9,24%)

## 6. Fiksativ ob 10.00 uri

### Preparati fiksativa 6

#### 6.1. preparat

1. celo vidno polje	165 jeder	4 jedra v fazi delitve (2,42%)
2. celo vidno polje	108 jeder	6 jeder v fazi delitve (5,55%)
3. celo vidno polje	123 jeder	7 jeder v fazi delitve (5,69%)
4. celo vidno polje	69 jeder	9 jeder v fazi delitve (13,04%)
5. celo vidno polje	126 jeder	8 jeder v fazi delitve (6,34%)

#### 6.2. preparat

1. celo vidno polje	173 jeder	13 jeder v fazi delitve (7,51%)
2. celo vidno polje	113 jeder	12 jeder v fazi delitve (10,61%)
3. celo vidno polje	132 jeder	10 jeder v fazi delitve (7,57%)
4. celo vidno polje	146 jeder	9 jeder v fazi delitve (6,16%)
5. celo vidno polje	257 jeder	19 jeder v fazi delitve (7,39%)

#### 6.3. preparat

1. celo vidno polje	104 jeder	11 jeder v fazi delitve (10,57%)
2. celo vidno polje	122 jeder	12 jeder v fazi delitve (9,83%)
3. celo vidno polje	184 jeder	9 jeder v fazi delitve (4,89%)
4. celo vidno polje	154 jeder	7 jeder v fazi delitve (4,54%)
5. celo vidno polje	56 jeder	11 jeder v fazi delitve (19,64%)

#### 6.4. preparat

1. celo vidno polje	154 jeder	7 jeder v fazi delitve (4,54%)
2. celo vidno polje	137 jeder	6 jeder v fazi delitve (4,37%)
3. celo vidno polje	66 jeder	4 jedra v fazi delitve (6,06%)
4. celo vidno polje	121 jeder	6 jeder v fazi delitve (4,95%)
5. celo vidno polje	84 jeder	6 jeder v fazi delitve (7,14%)

#### 6.5. preparat

1. celo vidno polje	154 jeder	5 jeder v fazi delitve (3,24%)
2. celo vidno polje	75 jeder	3 jedra v fazi delitve (4%)
3. celo vidno polje	132 jeder	8 jeder v fazi delitve (6,06%)
4. celo vidno polje	68 jeder	3 jedra v fazi delitve (4,41%)
5. celo vidno polje	126 jeder	5 jeder v fazi delitve (3,96%)

### 7. Fiksativ ob 11.00 uri

#### Preparati fiksativa 7

##### 7.1. preparat

1. celo vidno polje	107 jeder	17 jeder v fazi delitve (15,88%)
2. celo vidno polje	284 jeder	19 jeder v fazi delitve (6,69%)
3. celo vidno polje	114 jeder	8 jeder v fazi delitve (7,01%)
4. celo vidno polje	224 jeder	28 jeder v fazi delitve (12,5%)
5. celo vidno polje	132 jeder	6 jeder v fazi delitve (4,54%)

##### 7.2. preparat

1. celo vidno polje	92 jeder	13 jeder v fazi delitve (14,13%)
2. celo vidno polje	119 jeder	6 jeder v fazi delitve (5,04%)
3. celo vidno polje	84 jeder	9 jeder v fazi delitve (10,71%)
4. celo vidno polje	116 jeder	6 jeder v fazi delitve (5,17%)
5. celo vidno polje	129 jeder	8 jeder v fazi delitve (6,20%)

##### 7.3. preparat

1. celo vidno polje	155 jeder	13 jeder v fazi delitve (8,38%)
2. celo vidno polje	163 jeder	5 jeder v fazi delitve (3,06%)
3. celo vidno polje	120 jeder	11 jeder v fazi delitve (9,16%)
4. celo vidno polje	123 jeder	7 jeder v fazi delitve (5,69%)
5. celo vidno polje	117 jeder	12 jeder v fazi delitve (10,25%)

##### 7.4. preparat

1. celo vidno polje	347 jeder	13 jeder v fazi delitve (3,74%)
2. celo vidno polje	178 jeder	8 jeder v fazi delitve (4,49%)
3. celo vidno polje	92 jeder	3 jedra v fazi delitve (3,26%)

4. celo vidno polje	187 jeder	6 jeder v fazi delitve (3,20%)
5. celo vidno polje	143 jeder	6 jeder v fazi delitve (4,19%)

7.5. preparat

1. celo vidno polje	159 jeder	7 jeder v fazi delitve (4,40%)
2. celo vidno polje	154 jeder	12 jeder v fazi delitve (7,79%)
3. celo vidno polje	102 jedra	9 jeder v fazi delitve (8,82%)
4. celo vidno polje	88 jeder	5 jeder v fazi delitve (5,68%)
5. celo vidno polje	153 jeder	7 jeder v fazi delitve (4,57%)

8. Fiksativ ob 12.00 uri

Preparati fiksativa 8

8.1. preparat

1. celo vidno polje	162 jeder	10 jeder v fazi delitve (6,17%)
2. celo vidno polje	51 jeder	6 jeder v fazi delitve (11,76%)
3. celo vidno polje	210 jeder	9 jeder v fazi delitve (4,28%)
4. celo vidno polje	53 jeder	6 jeder v fazi delitve (11,32%)
5. celo vidno polje	97 jeder	5 jeder v fazi delitve (5,15%)

8.2. preparat

1. celo vidno polje	102 jedra	7 jeder v fazi delitve (6,86%)
2. celo vidno polje	107 jeder	10 jeder v fazi delitve (9,34%)
3. celo vidno polje	93 jeder	13 jeder v fazi delitve (13,97%)
4. celo vidno polje	197 jeder	11 jeder v fazi delitve (5,58%)
5. celo vidno polje	221 jeder	21 jeder v fazi delitve (9,50%)

8.3. preparat

1. celo vidno polje	209 jeder	9 jeder v fazi delitve (4,30%)
2. celo vidno polje	78 jeder	9 jeder v fazi delitve (11,53%)
3. celo vidno polje	149 jeder	8 jeder v fazi delitve (5,36%)
4. celo vidno polje	159 jeder	5 jeder v fazi delitve (3,14%)
5. celo vidno polje	121 jeder	5 jeder v fazi delitve (4,13%)

8.4. preparat

1. celo vidno polje	119 jeder	9 jeder v fazi delitve (7,56%)
2. celo vidno polje	132 jeder	14 jeder v fazi delitve (10,60%)
3. celo vidno polje	67 jeder	4 jedra v fazi delitve (5,97%)
4. celo vidno polje	212 jeder	8 jeder v fazi delitve (3,77%)
5. celo vidno polje	208 jeder	7 jeder v fazi delitve (3,36%)

8.5. preparat

1. celo vidno polje	82 jeder	14 jeder v fazi delitve (17,07%)
2. celo vidno polje	91 jeder	7 jeder v fazi delitve (7,69%)
3. celo vidno polje	167 jeder	8 jeder v fazi delitve (4,79%)
4. celo vidno polje	92 jeder	11 jeder v fazi delitve (11,95%)
5. celo vidno polje	192 jeder	16 jeder v fazi delitve (8,33%)

9. Fiksativ ob 13.00 uri

Preparati fiksativa 9

9.1. preparat

1. celo vidno polje	182 jeder	10 jeder v fazi delitve (5,49%)
2. celo vidno polje	193 jeder	8 jeder v fazi delitve (4,14%)
3. celo vidno polje	78 jeder	4 jedra v fazi delitve (5,12%)
4. celo vidno polje	148 jeder	11 jeder v fazi delitve (7,43%)
5. celo vidno polje	81 jeder	6 jeder v fazi delitve (7,40%)

9.2. preparat

1. celo vidno polje	111 jeder	5 jeder v fazi delitve (4,50%)
2. celo vidno polje	171 jeder	9 jeder v fazi delitve (5,26%)
3. celo vidno polje	305 jeder	24 jeder v fazi delitve (7,86%)
4. celo vidno polje	181 jeder	15 jeder v fazi delitve (8,28%)
5. celo vidno polje	152 jeder	16 jeder v fazi delitve (10,52%)

9.3. preparat

1. celo vidno polje	329 jeder	18 jeder v fazi delitve (5,47%)
2. celo vidno polje	133 jeder	10 jeder v fazi delitve (7,51%)
3. celo vidno polje	101 jedra	9 jeder v fazi delitve (8,91%)
4. celo vidno polje	112 jeder	5 jeder v fazi delitve (4,46%)
5. celo vidno polje	107 jeder	4 jedra v fazi delitve (3,73%)

9.4. preparat

1. celo vidno polje	191 jeder	4 jedra v fazi delitve (2,09%)
2. celo vidno polje	254 jeder	13 jeder v fazi delitve (5,11%)
3. celo vidno polje	122 jeder	5 jeder v fazi delitve (4,09%)
4. celo vidno polje	229 jeder	3 jedra v fazi delitve (1,31%)
5. celo vidno polje	97 jeder	2 jedri v fazi delitve (2,06%)

9.5. preparat

1. celo vidno polje	179 jeder	7 jeder v fazi delitve (3,91%)
2. celo vidno polje	112 jeder	8 jeder v fazi delitve (7,14%)
3. celo vidno polje	132 jeder	2 jedri v fazi delitve (1,51%)

4. celo vidno polje	152 jeder	11 jeder v fazi delitve (7,23%)
5. celo vidno polje	110 jeder	3 jedra v fazi delitve (2,72%)

#### 10. Fiksativ ob 14.00 uri

##### Preparati fiksativa 10

###### 10.1. preparat

1. celo vidno polje	132 jeder	9 jeder v fazi delitve (6,81%)
2. celo vidno polje	121 jeder	11 jeder v fazi delitve (9,09%)
3. celo vidno polje	126 jeder	4 jedra v fazi delitve (3,17%)
4. celo vidno polje	145 jeder	6 jeder v fazi delitve (4,13%)
5. celo vidno polje	151 jeder	9 jeder v fazi delitve (5,96%)

###### 10.2. preparat

1. celo vidno polje	167 jeder	8 jeder v fazi delitve (4,79%)
2. celo vidno polje	121 jeder	7 jeder v fazi delitve (5,78%)
3. celo vidno polje	119 jeder	13 jeder v fazi delitve (10,92%)
4. celo vidno polje	100 jeder	5 jeder v fazi delitve (5%)
5. celo vidno polje	98 jeder	6 jeder v fazi delitve (6,12%)

###### 10.3. preparat

1. celo vidno polje	191 jeder	12 jeder v fazi delitve (6,28%)
2. celo vidno polje	137 jeder	9 jeder v fazi delitve (6,56%)
3. celo vidno polje	112 jeder	8 jeder v fazi delitve (7,14%)
4. celo vidno polje	142 jeder	9 jeder v fazi delitve (6,33%)
5. celo vidno polje	105 jeder	8 jeder v fazi delitve (7,61%)

###### 10.4. preparat

1. celo vidno polje	145 jeder	12 jeder v fazi delitve (8,27%)
2. celo vidno polje	103 jedra	9 jeder v fazi delitve (8,73%)
3. celo vidno polje	124 jeder	11 jeder v fazi delitve (8,87%)
4. celo vidno polje	141 jeder	4 jedra v fazi delitve (2,83%)
5. celo vidno polje	99 jeder	9 jeder v fazi delitve (9,09%)

###### 10.5. preparat

1. celo vidno polje	131 jeder	15 jeder v fazi delitve (11,45%)
2. celo vidno polje	189 jeder	22 jeder v fazi delitve (11,64%)
3. celo vidno polje	126 jeder	8 jeder v fazi delitve (6,34%)
4. celo vidno polje	76 jeder	7 jeder v fazi delitve (9,21%)
5. celo vidno polje	137 jeder	19 jeder v fazi delitve (13,86%)



## 11. Fiksativ ob 15.00 uri

### Preparati fiksativa 11

#### 11.1. preparat

1. celo vidno polje	134 jeder	8 jeder v fazi delitve (5,97%)
2. celo vidno polje	128 jeder	6 jeder v fazi delitve (4,68%)
3. celo vidno polje	101 jeder	8 jeder v fazi delitve (7,92%)
4. celo vidno polje	234 jeder	19 jeder v fazi delitve (8,11%)
5. celo vidno polje	109 jeder	9 jeder v fazi delitve (8,25%)

#### 11.2. preparat

1. celo vidno polje	173 jeder	6 jeder v fazi delitve (3,46%)
2. celo vidno polje	178 jeder	4 jedra v fazi delitve (2,24%)
3. celo vidno polje	253 jeder	6 jeder v fazi delitve (2,37%)
4. celo vidno polje	108 jeder	3 jedra v fazi delitve (2,77%)
5. celo vidno polje	98 jeder	4 jedra v fazi delitve (4,08%)

#### 11.3. preparat

1. celo vidno polje	186 jeder	27 jeder v fazi delitve (14,51%)
2. celo vidno polje	154 jeder	8 jeder v fazi delitve (5,19%)
3. celo vidno polje	114 jeder	19 jeder v fazi delitve (16,66%)
4. celo vidno polje	149 jeder	8 jeder v fazi delitve (5,36%)
5. celo vidno polje	107 jeder	11 jeder v fazi delitve (10,28%)

#### 11.4. preparat

1. celo vidno polje	79 jeder	7 jeder v fazi delitve (8,86%)
2. celo vidno polje	112 jeder	8 jeder v fazi delitve (7,14%)
3. celo vidno polje	159 jeder	5 jeder v fazi delitve (3,14%)
4. celo vidno polje	73 jeder	4 jedra v fazi delitve (5,47%)
5. celo vidno polje	83 jeder	5 jeder v fazi delitve (6,02%)

#### 11.5. preparat

1. celo vidno polje	152 jeder	5 jeder v fazi delitve (3,28%)
2. celo vidno polje	122 jeder	7 jeder v fazi delitve (5,73%)
3. celo vidno polje	135 jeder	6 jeder v fazi delitve (4,44%)
4. celo vidno polje	203 jeder	9 jeder v fazi delitve (4,43%)
5. celo vidno polje	89 jeder	7 jeder v fazi delitve (7,86%)

## 12. Fiksativ ob 16.00 uri

### Preparati fiksativa 12

#### 12.1. preparat

1. celo vidno polje	205 jeder	6 jeder v fazi delitve (2,92%)
2. celo vidno polje	169 jeder	11 jeder v fazi delitve (6,50%)
3. celo vidno polje	147 jeder	10 jeder v fazi delitve (6,80%)
4. celo vidno polje	139 jeder	13 jeder v fazi delitve (9,35%)
5. celo vidno polje	136 jeder	9 jeder v fazi delitve (6,61%)

#### 12.2. preparat

1. celo vidno polje	158 jeder	12 jeder v fazi delitve (7,59%)
2. celo vidno polje	172 jeder	13 jeder v fazi delitve (7,55%)
3. celo vidno polje	137 jeder	10 jeder v fazi delitve (7,29%)
4. celo vidno polje	169 jeder	3 jedra v fazi delitve (1,77%)
5. celo vidno polje	209 jeder	16 jeder v fazi delitve (7,65%)

#### 12.3. preparat

1. celo vidno polje	159 jeder	8 jeder v fazi delitve (5,03%)
2. celo vidno polje	147 jeder	11 jeder v fazi delitve (7,48%)
3. celo vidno polje	153 jeder	5 jeder v fazi delitve (3,26%)
4. celo vidno polje	197 jeder	19 jeder v fazi delitve (9,64%)
5. celo vidno polje	129 jeder	7 jeder v fazi delitve (5,42%)

#### 12.4. preparat

1. celo vidno polje	148 jeder	12 jeder v fazi delitve (8,10%)
2. celo vidno polje	207 jeder	10 jeder v fazi delitve (4,83%)
3. celo vidno polje	188 jeder	12 jeder v fazi delitve (6,38%)
4. celo vidno polje	217 jeder	14 jeder v fazi delitve (6,45%)
5. celo vidno polje	115 jeder	3 jedra v fazi delitve (2,60%)

#### 12.5. preparat

1. celo vidno polje	121 jeder	5 jeder v fazi delitve (4,13%)
2. celo vidno polje	231 jeder	11 jeder v fazi delitve (4,76%)
3. celo vidno polje	151 jeder	14 jeder v fazi delitve (9,27%)
4. celo vidno polje	216 jeder	5 jeder v fazi delitve (2,31%)
5. celo vidno polje	92 jeder	8 jeder v fazi delitve (8,69%)

### 13. Fiksativ ob 17.00 uri

#### Preparati fiksativa 13

##### 13.1. preparat

1. celo vidno polje	122 jeder	13 jeder v fazi delitve (10,65%)
2. celo vidno polje	109 jeder	7 jeder v fazi delitve (6,42%)
3. celo vidno polje	298 jeder	24 jeder v fazi delitve (8,05%)
4. celo vidno polje	116 jeder	4 jedra v fazi delitve (3,44%)
5. celo vidno polje	145 jeder	12 jeder v fazi delitve (8,27%)

##### 13.2. preparat

1. celo vidno polje	138 jeder	4 jedra v fazi delitve (2,89%)
2. celo vidno polje	176 jeder	7 jeder v fazi delitve (3,97%)
3. celo vidno polje	140 jeder	6 jeder v fazi delitve (4,28%)
4. celo vidno polje	131 jeder	6 jeder v fazi delitve (4,58%)
5. celo vidno polje	159 jeder	8 jeder v fazi delitve (5,03%)

##### 13.3. preparat

1. celo vidno polje	107 jeder	2 jedri v fazi delitve (1,86%)
2. celo vidno polje	141 jeder	5 jeder v fazi delitve (3,54%)
3. celo vidno polje	128 jeder	4 jedra v fazi delitve (3,12%)
4. celo vidno polje	139 jeder	4 jedra v fazi delitve (2,87%)
5. celo vidno polje	171 jeder	6 jeder v fazi delitve (3,50%)

##### 13.4. preparat

1. celo vidno polje	115 jeder	11 jeder v fazi delitve (9,56%)
2. celo vidno polje	178 jeder	9 jeder v fazi delitve (5,05%)
3. celo vidno polje	156 jeder	6 jeder v fazi delitve (3,84%)
4. celo vidno polje	84 jeder	4 jedra v fazi delitve (4,76%)
5. celo vidno polje	121 jeder	9 jeder v fazi delitve (7,43%)

##### 13.5. preparat

1. celo vidno polje	149 jeder	15 jeder v fazi delitve (10,06%)
2. celo vidno polje	158 jeder	14 jeder v fazi delitve (8,86%)
3. celo vidno polje	123 jeder	4 jedra v fazi delitve (3,25%)
4. celo vidno polje	114 jeder	12 jeder v fazi delitve (10,52%)
5. celo vidno polje	162 jeder	16 jeder v fazi delitve (9,87%)