

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tamara ERHATIČ

**VELIKOST JEDRNEGA GENOMA TUJERODNIH
VRST DRESNIKOV (*Fallopia* sect. *Reynoutria*) V
SLOVENIJI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tamara ERHATIČ

**VELIKOST JEDRNEGA GENOMA TUJERODNIH VRST
DRESNIKOV (*Fallopia* sect. *Reynoutria*) V SLOVENIJI**

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij

**THE SIZE OF THE NUCLEAR GENOME OF ALIEN KNOTWEED
SPECIES (*Fallopia* sect. *Reynoutria*) IN SLOVENIA**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Jasno Dolenc Koce, za somentorja pa doc. dr. Simono Strgulc Krajšek.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Aleš KLADNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

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

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

Član: prof. dr. Nejc JOGAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta

Datum zagovora: 1.3.2012

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tamara Erhatic

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	581.5:581.4(497:4)(043.2)=163.6
KG	tujerodne vrste / dresnik / velikost genoma / vrednost 2C / slikovna citometrija DNA
AV	ERHATIC, Tamara
SA	DOLENC KOCE, Jasna (mentor) / STRGULC KRAJŠEK, Simona (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2012
IN	VELIKOST JEDRNEGA GENOMA TUJERODNIH VRST DRESNIKOV (<i>FALLOPIA</i> SECT. <i>REYNOUTRIA</i>) V SLOVENIJI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 49 str., 6 pregl., 12 sl., 5 pril., 56 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	V diplomski nalogi smo izmerili velikost jedrnega genoma tujerodnih vrst dresnikov, nabranih v Sloveniji. Merili smo s slikovno citometrijo DNA, ki temelji na kvantitativnem obarvanju DNA s Feulgenovo reakcijo. Želeli smo ugotoviti ali lahko tujerodne vrste dresnikov v Sloveniji določimo po velikosti jedrnega genoma. Ugotavljali smo tudi velikosti jedrnih genomov kalic, ki so uspešno zrasle iz semen, pobranih na določeni materinski rastlini. S pomočjo teh podatkov lahko ugotovimo, katere vrste so donorji peloda za posamezno materinsko rastlino. Še posebej so nas zanimali donorji peloda za vrsto <i>Fallopia japonica</i> var. <i>japonica</i> (japonski dresnik), saj je v evropski flori prisotna kot citološko in genetsko enotni ženski klon. Tkiva tujerodnih vrst dresnikov (koreninske vršičke, stebelne vršičke in kalice) smo fiksirali, pobarvali po Feulgenu in iz njih pripravili preparate mečkance. Na preparatih smo izmerili velikosti jedrnega genoma. Z izmerjenimi vrednostmi 2C smo lahko predhodno morfološko določitev tujerodnih vrst dresnikov v 3 različne taksone potrdili. Na podlagi vrednosti 2C kalic smo sklepali na to, katera vrsta je donor peloda za posamezno kalico.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	581.5:581.4(497:4)(043.2)=163.6
CX	alien species / knotweed / genome size / 2C-value / DNA image cytometry
AU	ERHATIC, Tamara
AA	DOLENC KOCE, Jasna (mentor) / STRGULC KRAJŠEK, Simona (somentor)
PP	SI-1000 Ljubljana
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY	2012
TI	THE SIZE OF THE NUCLEAR GENOME OF ALIEN KNOTWEED SPECIES (<i>FALLOPIA</i> SECT. <i>REYNOUTRIA</i>) IN SLOVENIA
DT	Graduation thesis (University studies)
NO	XI, 49 p., 6 tab., 12 fig., 5 ann., 56 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	The size of the nuclear genome of alien knotweed species sampled in Slovenia was measured using DNA image cytometry, based on quantitative staining of DNA with the Feulgen reaction. The aim was to find out whether alien species of knotweed in Slovenia can be unambiguously recognized according to the size of the nuclear genome. We determined the size of the nuclear genome of all the seedlings grown from the seeds, collected on one individual mother plant. With these data we could ascertain, which species are the pollen donors for individual mother plant. We were especially interested in pollen donors for <i>Fallopia japonica</i> var. <i>japonica</i> (Japanese knotweed) because it is present in European flora as cytologically and genetically unified female clone. We fixed different tissues of Japanese knotweed (root tips, shoot tips and seedling's roots), which were stained by Feulgen method and prepared microscopic slides with squashed specimen. We measured the size of nuclear genome of these specimens. Using the measured 2C-values we were able to confirm three different species of knotweed, previously determined by the morphological characters. Based on the 2C-values of seedlings, we concluded which species is the pollen donor for individual mother plant.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
OKRAJŠAVE.....	X
SEZNAM PRILOG	XI
1 UVOD.....	1
2 PREGLED OBJAV.....	2
2.1 Problematika invazivnih tujerodnih vrst	2
2.1.1 Hipoteze za uspešnost invazivnih tujerodnih vrst	4
2.1.2 Načini širjenja organizmov	5
2.1.3 Širjenje tujerodnih rastlin	6
2.2 Tujerodne rastlinske vrste v Sloveniji.....	7
2.3 Rod <i>Fallopia</i> sect. <i>Reynoutria</i>	7
2.3.1 Geografska razširjenost rodu <i>Fallopia</i> v Sloveniji.....	9
2.3.2 Določanje taksonov rodu <i>Fallopia</i>	10
2.3.3 Razmnoževanje.....	13
2.3.3.1 Vegetativno razširjanje	14
2.3.3.2 Spolno razmnoževanje in križanje	15
2.4 Velikost genoma	19
2.4.1 Poliploidnost.....	20
2.5 Slikovna citometrija	21
2.6 Pretočna citometrija	21
2.7 Delovne hipoteze	22

3	MATERIALI IN METODE	23
3.1	Vzorčenje	23
3.2	Določanje vrst	24
3.3	Shranjevanje in fiksiranje rastlinskega materiala	24
3.4	Analiza velikosti genoma	25
3.4.1	Barvanje po Feulgenu	25
3.4.2	Izdelava preparatov mečkancev	26
3.4.3	Meritve velikosti jedrnega genoma s slikovno citometrijo DNA	27
3.4.4	Statistična obdelava podatkov	28
4	REZULTATI	29
4.1	Velikosti jedrnega genoma materinskih rastlin	29
4.2	Velikosti jedrnega genoma kalic	33
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	37
5.1	Razprava	37
5.1.1	Velikosti jedrnega genoma materinskih rastlin tujerodnih vrst dresnikov	37
5.1.2	Velikosti jedrnega genoma kalic tujerodnih vrst dresnikov in določitev donorjev peloda	39
5.2	Sklepi	41
6	POVZETEK	42
7	SUMMARY	43
8	VIRI	45

ZAHVALA

PRILOGE

Priloga A: Statistična obdelava posameznega vzorca

Priloga B: Statistična analiza velikosti jedrnega genoma materinskih rastlin

Priloga C: Velikosti jedrnega genoma kalic

Priloga Č: Poster za EMAPi

Priloga D: Seznam lokalitet

KAZALO SLIK

Slika 1. Sestoj japonskega dresnika.	11
Slika 2. Oblike listov različnih taksonov rodu <i>Fallopia</i>	13
Slika 3. Struktura šopa poganjkov s koreniki.	15
Slika 4. Poenostavljena shema hibridizacije rodu <i>Fallopia</i>	18
Slika 5. Kvadranti, kjer smo nabrali vzorce dresnikov.	24
Slika 6. Velikosti jedrnega genoma materinskih rastlin dresnikov.	32
Slika 7. Mikroskopske slike interfaznih jeder.	33
Slika 8. Velikosti jedrnega genoma kalic japonskega dresnika (<i>F. japonica</i> var. <i>japonica</i>).	34
Slika 9. Velikosti jedrnega genoma kalic češkega dresnika (<i>F. x bohemica</i>).	35
Slika 10. Velikosti jedrnega genoma kalic sahalinskega dresnika (<i>F. sachalinensis</i>).	36
Slika 11. Velikosti jedrnega genoma dresnikov.	36
Slika 12. Primerjava naših podatkov o velikosti genoma (vrednost 2C v pg DNA $\pm$ SN) japonskega, češkega in sahalinskega dresnika s podatki Suda in sodelavcev (2010). .	38

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1. Velikosti jedrnega genoma materinskih rastlin japonskega dresnika (<i>F japonica</i> var. <i>japonica</i>).....	30
Preglednica 2. Velikosti jedrnega genoma materinskih rastlin češkega dresnika (<i>F. x bohemica</i>).....	31
Preglednica 3. Velikost jedrnega genoma materinske rastline sahalinskega dresnika (<i>F. sachalinensis</i>).....	32
Preglednica 4. Velikosti jedrnega genoma kalic japonskega dresnika (<i>F. japonica</i> var. <i>japonica</i>).....	
Preglednica 5. Velikosti jedrnega genoma kalic češkega dresnika (<i>F. x bohemica</i>).....	
Preglednica 6. Velikosti jedrnega genoma kalic sahalinskega dresnika (<i>F. sachalinensis</i>).....	

OKRAJŠAVE

ANOVA	enosmerna analiza variance
DNA	deoksiribonukleinska kislina
IOG	integrirana optična gostota
KV	koeficient variacije
SN	standardna napaka
Vrednost 1C	količina nepodvojenega haploidnega genoma osebka
Vrednost 2C	količina podvojenega haploidnega in nepodvojenega diploidnega genoma osebka ob koncu mitoze v telofazi in v G1-fazi interfaze

SEZNAM PRILOG

Priloga A: Statistična obdelava posameznega vzorca

Priloga B: Statistična analiza velikosti jedrnega genoma materinskih rastlin

Priloga C: Velikosti jedrnega genoma kalic

Priloga Č: Poster za EMAPi

Priloga D: Seznam lokalitet

1 UVOD

Z besedo tujerodne rastline označujemo tiste rastline, za katere velja, da so se na neko območje, kamor se po naravni poti same niso mogle razširiti, naselile s posredovanjem človeka. Invazivne tujerodne rastlinske vrste so vrste, ki se hitro in uspešno širijo v novonaseljenem naravnem okolju ter s svojo množičnostjo povzročajo resne spremembe v delovanju in zgradbi gostiteljskega ekosistema. To običajno pomeni, da ustvarjajo obsežne enovrstne sestoje, v katerih samonikle rastlinske vrste sploh ne uspevajo ali je njihova številčnost močno zmanjšana, posledica tega pa sta tudi sprememba živalskih združb ter spremenjena struktura habitatnega tipa (Jogan, 2006).

Ene najbolj problematičnih invazivnih tujerodnih rastlinskih vrst v evropski flori so vrste sekcije *Reynoutria* iz rodu *Fallopia* (*Polygonaceae*), ki jih včasih obravnavajo kot ločen rod *Reynoutria* (Suda in sod., 2010). Gre za vrste japonski dresnik (*Fallopia japonica* var. *japonica*, *Fallopia japonica* var. *compacta*), sahalinski dresnik (*Fallopia sachalinensis*) ter češki dresnik (*Fallopia x bohemica*). To so odporne zelnate eno- ali dvodomne trajnice z majhnimi belimi cvetovi, stebli podobnimi bambusovim in obsežnimi koreniki (Grimsby in Kesseli, 2010).

V Sloveniji so iz sekcije *Reynoutria* rodu *Fallopia* prisotne naslednje vrste: japonski dresnik (*Fallopia japonica* var. *japonica*), sahalinski dresnik in češki dresnik. Japonski in sahalinski dresnik sta naturalizirani okrasni rastlini, češki dresnik je njun križanec (Vreš, 2007).

2 PREGLED OBJAV

2.1 Problematika invazivnih tujerodnih vrst

Za ustrezno razumevanje problematike invazivnih tujerodnih vrst, je nujno poznavanje naslednjih pojmov:

- **Domorodna (avtohtona) vrsta** je vrsta, ki živi na območju svoje običajne (pretekle ali sedanje) naravne razširjenosti, tudi če se tu pojavlja le občasno. To velja tudi za območja, ki jih je vrsta lahko dosegla sama, bodisi s hojo, letenjem, prenosom z vodo ali vetrom ali drugimi načini razširjanja (Convention on Biological Diversity, 2002).
- **Tujerodna (alohtona) vrsta** je vrsta, ki se nahaja zunaj območja (pretekle ali sedanje) naravne razširjenosti oz. območja, ki bi ga lahko dosegla z naravnim širjenjem (to je zunaj območja naravne razširjenosti, ki ga ni mogla doseči brez neposredne ali posredne naselitve ali posredovanja človeka). To vključuje katerikoli del organizma, ki lahko preživi in je sposoben razmnoževanja (npr. spolne celice, semena, jajca, korenika) (Convention on Biological Diversity, 2002).
- **Invazivna tujerodna vrsta** ali **invazivka** je tujerodna vrsta, katere ustalitev in širjenje ogroža ekosisteme, habitate ali vrste (Convention on Biological Diversity, 2002).

Nekatere tujerodne vrste je človek na novo območje naselil z namenom, da bi se vrste v okolju tudi ustalile, človek pa bi imel od njih določeno korist. Primeri namernih naselitev so: tujerodne vrste rib za športni ribolov, tujerodne lovne vrste (sesalci, ptice) za povečanje privlačnosti lova, tujerodne ribe in školjke za namene gojitve, tujerodni organizmi za biotično varstvo škodljivih organizmov ter tujerodne rastline za namene gozdarstva ali v okrasne namene. Veliko invazivnih tujerodnih vrst je bilo sprva naseljenih na omejene prostore, rastline na njive in vrtove, živali pa so gojili na farmah ali v živalskih vrtovih, od koder so pobegnile v naravo. Primeri pobegov vrst v naravno okolje so: širjenje okrasnih rastlin z vrtov in botaničnih vrtov bodisi s semeni ali deli rastlin v polnaravno ali naravno okolje, širjenje kmetijskih rastlin z njiv v polnaravno ali naravno okolje, pobeg živali iz živalskih vrtov, terarijev ali vrtnih mlak, pobeg živali s farm ali iz ribogojnic. S

povečevanjem transporta surovin in blaga narašča tudi število škodljivcev, ki jih vnesemo kot patogene ali zajedavce rastlinskih ali živalskih vrst (Kus Veenvliet in sod., 2009).

Skupna lastnost vdorov invazivnih tujerodnih vrst na novonaseljena območja je ta, da se tujerodni organizmi pojavljajo v veliko večji gostoti in so sposobnejši v novem okolju kot v njihovem naravnem okolju (Blossey in Nötzold, 1995).

Invazivne tujerodne rastlinske vrste, ki se uspešno širijo v nova okolja, predstavljajo resno grožnjo za biotsko raznovrstnost po vsem svetu (Suda in sod., 2010), negativno vplivajo na habitate, ki jih naselijo, na številne načine spreminjajo delovanje ekosistema, vrstno sestavo in preoblikujejo prehranjevalne spletke (Chytrý in sod., 2009).

Vplive tujerodnih vrst lahko razdelimo v 4 kategorije (Kus Veenvliet in sod., 2009):

- vplivi na domorodne vrste,
- vplivi na ekosisteme,
- vplivi na gospodarstvo,
- vplivi na zdravje ljudi.

Vplivi na domorodne vrste so lahko zelo raznoliki. Tujerodne vrste lahko v novem okolju postanejo tekmeci domorodnih vrst, bodisi za življenjski prostor, hrano ali druge življenjsko pomembne vire. Nekatere tujerodne vrste v novem okolju popolnoma spremenijo medvrstne odnose, kroženje mineralnih hranil, fizikalne in kemijske dejavnike. To pogosto vodi v popolno preobrazbo ekosistema, iz katerega so izrinjene številne domorodne vrste. Tujerodne vrste so lahko škodljivci gospodarsko pomembnih rastlin ali rastlinskih proizvodov in na različne načine zmanjšujejo prihodke. To so lahko različni virusi, bakterije in glive, ki so povzročitelji bolezni in oslabijo rastline ter tako zmanjšujejo pridelek. Nekateri najbolj trdovratni pleveli so tujerodne rastline, ki smo jih v naše okolje zanesli in jih moramo neprestano odstranjevati z vrtov, da omogočimo rast vrtnim rastlinam. Med invazivke, v ožjem pomenu besede, pleveli, ki se ne širijo v naravno okolje, ne sodijo. Gosti sestoji invazivnih tujerodnih rastlin, ki preraščajo brežine rek, otežujejo dostop do vodotokov in tako zmanjšujejo rekreacijsko funkcijo vodotokov. Tudi vplivi na zdravje ljudi so različni. Mnoge okrasne rastline so delno ali v celoti strupene, zato je sajenje takih rastlin v okolici hiš ali izobraževalnih ustanov tvegano. Nekatere

rastline niso nevarne le ob zaužitju, temveč lahko izločajo nevarne snovi. Druge so alergene in povzročajo seneni nahod. Z uvozom tujerodnih živali lahko vnašamo tudi nekatere bolezni, ki so lahko nevarne za zdrave ljudi (Kus Veenvliet in sod., 2009).

2.1.1 Hipoteze za uspešnost invazivnih tujerodnih vrst

Obstaja več hipotez, ki poskušajo pojasniti uspešnost invazivnih tujerodnih vrst (Hierro in sod., 2005).

1) Hipoteza naravnih sovražnikov.

Hipoteza naravnih sovražnikov je ena izmed najstarejših in najpogostejše citiranih hipotez. Uspeh temelji na dejstvu, da so mnoge tujerodne vrste po vnosu v novo okolje rešene svojih specifičnih herbivorov in patogenov (Darwin, 1859; Elton, 1958). Tujerodne vrste si pridobijo znatno prednost, ker njihovih populacij neposredno ne zavirajo njihovi specializirani sovražniki in ker si pridobijo konkurenčno prednost pred domačimi vrstami, ki lahko nesorazmerno trpijo zaradi napadov domačih sovražnikov (Hierro in sod., 2005).

2) Hipoteza evolucije invazivnosti.

Nekatere vrste lahko vzpostavijo dominanco v novem okolju, ker doživijo hitre genetske spremembe, povezane z novimi selekcijskimi pritiski v novem okolju (Maron in sod., 2004).

3) Hipoteza prazne ekološke niše.

Čeprav po definiciji niša lahko obstaja samo v prisotnosti organizma, se hipoteza prazne niše nanaša na možnost, da so lahko določene tujerodne vrste uspešne, ker imajo v novem okolju dostop do virov, ki jih lokalne vrste ne uporabljajo. Ker imajo vrstno bogatejše združbe celovitejšo izrabo virov, prav pomanjkanje praznih ekoloških niš pojasni, zakaj so te združbe odpornejše na invazije (Elton, 1958).

4) Hipoteza novega orožja.

Nedavna hipoteza poudarja pomen alelopatij v procesu invazije in predlaga, da nekatere tujerodne vrste lahko uspejo, ker prinesejo nove načine interakcij v naravne rastlinske združbe (Callaway in Aschehoug, 2000). Natančneje, hipoteza novega orožja trdi, da

tujerodne vrste izločajo alelopatske snovi, ki so relativno neučinkovite proti dobro prilagojenim sosedom v izvorni združbi, vendar zelo zavirajo neprilagojene rastline v novi združbi (Hierro in sod., 2005).

5) Hipoteza motenj.

Tujerodne vrste, ki napadejo motene združbe, so na splošno, ruderalne vrste. Pričakovano je, da ruderalne vrste prekašajo domače kompetitorje in na strese odporne vrste v zgodnjih sukcesijskih stopnjah (Grime, 1979). Nejasno pa je, zakaj ruderalne vrste, ki so domače v sistemu, niso sposobne kolonizirati motenih območij tako uspešno kot tujerodne ruderalne vrste (Hierro in sod., 2005). Hipoteza motenj trdi, da razlike obstajajo zato, ker avtohtone ruderalne vrste niso izkusile tipa in intenzivnosti motenj, na katere so tujerodne ruderalne vrste prilagojene (Mack in sod., 2000).

6) Hipoteza vrstnega bogastva.

Elton (1958) je prvi predlagal, da bi lahko bile bolj raznolike združbe bolj odporne na invazije kot vrstno revne združbe. Ta ideja je bila podprta s teoretičnimi argumenti, da ima manj raznolika združba šibkejšo medvrstne interakcije in več praznih ekoloških niš (Drake, 1990). Več prostih virov v vrstno revnih združbah lahko povzroči, da so te združbe bolj izpostavljene širjenju invazivnih tujerodnih vrst kot vrstno bogatejša združbe (Hierro in sod., 2005).

2.1.2 Načini širjenja organizmov

Širjenje propagul (katerikoli deli organizma, ki se lahko razvijejo v nov organizem) vrst iz enega območja na novo območje je ključnega pomena za razvoj biogeografskih vzorcev. Naravno širjenje vrst v nove habitate ali njihova kolonizacija novih območij lahko privedeta do lokalnega množičnega izumrtja, speciacije in nastanka novih ekosistemov. Tudi širjenje vrst s posredovanjem človeka preko njihovih naravnih meja širjenja (tujerodne vrste) je pomemben dejavnik za oblikovanje svetovne biotske raznovrstnosti, posebej v zadnjih nekaj stoletjih (Wilson in sod., 2008).

Poznamo 6 splošnih načinov širjenja organizmov: difuzno širjenje, koridorji, skokovito širjenje, širjenje na ekstremno dolge razdalje, množično širjenje in gojenje (Wilson in sod., 2008).

Prvi način širjenja je difuzija, kjer se vrsta širi z roba svojega območja v skladu z zmožnostjo širjenja svojih propagul (Hewitt, 2000). Tesna fizična povezava med novim in izvirnim območjem se ohranja. Primeri difuznega širjenja so ponovne kolonizacije po poledenitvah ter odzivi na spremembe habitata (Wilson in sod., 2008).

Poseben način širjenja se pojavi tam, kjer se vzpostavi koridor ustreznega habitata. Na regionalni ravni si organizmi v izvirnem in novem okolju lahko delijo nedavno evolucijsko zgodovino, sekundarni stik med obema populacijama je omogočen. V nasprotju s klasičnim difuznim širjenjem, ki je počasno in vključuje postopno odzivanje na spremenjene pogoje, koridorji odpirajo veliko območje potencialno primerne območja, ki ga je mogoče hitro kolonizirati. Primera: Panamski in Sueški prekop (Wilson in sod., 2008).

Pri skokovitem širjenju je še vedno možen genski pretok med novim in izvirnim območjem, vendar lahko pride do začasnega pobega pred sovražniki in kompetitorji med začetno kolonizacijo. Primer takega širjenja je širjenje preko gorskih preprek ali vodnih teles (Wilson in sod., 2008).

V nasprotju s skokovitim širjenjem vodi širjenje na ekstremno dolge razdalje (medcelinsko, čezoceansko širjenje) v ločitev med novim in izvirnim območjem (Levin, 2006). Verjetnost sočasnega ali kasnejšega širjenja več različnih vrst iste združbe je zelo majhna, populacije v novem okolju kažejo močne ustanovitelske učinke in hitro odstopajo od populacij v izvirnem okolju (Wilson in sod., 2008).

Redno širjenje propagul na dolge razdalje iz številnih virov na številne lokacije (masovno širjenje) povečuje možnost uvedbe visoke stopnje genetske raznolikosti. Čeprav je masovno širjenje pogosto rezultat človekove aktivnosti, je lahko tudi rezultat evolucijskih novosti, kot je bilo na primer letenje. Človek je tudi tesno povezan z usmerjenim širjenjem propagul v daljšem časovnem obdobju v območja, kjer je njhova vzpostavitev lažja (širjenje preko gojenja) (Wilson in sod., 2008).

2.1.3 Širjenje tujerodnih rastlin

Po načinu širjenja so tujerodne vrste zelo raznolike, pogosto pa imajo pred domorodnimi vrstami neke konkurenčne prednosti, zaradi katerih se lahko širijo uspešneje. Številne so

enoletnice, ki proizvedejo ogromne količine semen, ta pa se lahko razširjajo z vetrom, v sočnih plodovih, ki jih raznašajo ptice, ali pa se s kaveljčki oprijemljejo živali in človeka. Nedotike celo same uspevajo odmetavati semena več metrov daleč. Neredko pa je tudi pri naknadnem širjenju aktivno pomagal človek (ki je po definiciji povzročil že primarno širjenje tujerodne vrste). Zaradi medonosnosti nekaterih tujerodnih vrst so jih načrtno širili čebelarji (žlezava nedotika (*Impatiens glandulifera*), robinija (*Robinia pseudacacia*), amorfa (*Amorpha fruticosa*), japonski dresnik (*Fallopia japonica*...)), zaradi krmne vrednosti za divjad so druge vrste sadili lovci (topinambur (*Helianthus tuberosus*)), nekatere okrasne vrste sadijo po vrtovih (budleja (*Buddleia davidii*), japonsko kosteničje (*Lonicera japonica*), japonska medvejka (*Spiraea japonica*), deljenolistna rudbekija (*Rudbeckia laciniata*...)). Na ta način lahko invazivke hitro zasedejo nova območja, na katerih pa je njihova uspešnost odvisna tudi od podnebnih dejavnikov. Za preživetje in nadaljnje širjenje populacij na novo zasedenih območjih je navadno poleg širjenja s semeni zelo pomembno tudi vegetativno širjenje in razraščanje. Številne zelnate trajnice (npr. japonski dresnik, zlate rozge, ...) imajo razrasel podzemni sistem korenin in preživijo celo več let redne košnje (Kus Veenvliet in sod., 2009).

2.2 Tujerodne rastlinske vrste v Sloveniji

Tujerodnih rastlinskih vrst je v Sloveniji nepregledno veliko, sem lahko štejemo večino okrasnih in drugih gojenih rastlin, mnoge plevela... in seveda sodi sem še zelo neraziskana skupina tujerodnih nižjih rastlin (alg in mahov). Med bolje preučenimi višjimi rastlinami je od skupno nekaj čez 3000 vrst naše flore kar dobra petina tujerodnih, med njimi kakih 300 arheofitov, ki so prišli v našo floro pred več kot 500 leti. Preostale pa so neofiti, ki so v flori ustaljeni manj kot 500 let in efemerofiti, ki se v flori pojavljajo le prehodno. Ožji definiciji invazivke pa ustreza razmeroma malo rastlinskih vrst slovenske flore, našteji bi jih lahko 30 do 60, odvisno od tega, kako dosledni smo (Kus Veenvliet in sod., 2009).

2.3 Rod *Fallopia* sect. *Reynoutria*

Dresniki (*Fallopia* sect. *Reynoutria*, družina *Polygonaceae*) so ena najbolj problematičnih invazivnih tujerodnih rastlinskih vrst v evropski flori. V Evropi so prisotni 4 taksoni: 2 varieteti japonskega dresnika (*F. japonica* var. *japonica* in *F. japonica* var. *compacta*), sahalinski dresnik (*F. sachalinensis*) ter češki dresnik (*F. x bohemica*), ki je križanec med

F. japonica in *F. sachalinensis*. Te vrste so robustne zelnate trajnice z obsežnim sistemom korenin (Suda in sod., 2010).

Dresniki so doma v vzhodni Aziji in so bili prineseni v Evropo v sredi devetnajstega stoletja kot okrasne rastline (Bailey in Conolly, 2000), češki dresnik pa je morda nastal šele v Evropi, ko je prišlo do sobivanja starševskih vrst.

Do sedaj so dresniki v Evropi kolonizirali različne umetne in polnaravne habitate, zlasti ob bregovih rek (Mandák in sod., 2004), in bistveno zmanjšali raznolikost rastlinskih vrst (Bímová in sod., 2004).

Japonski dresnik je avtohtona vrsta na Japonskem, Tajvanu in severni Kitajski, kjer raste ob cestah, rečnih bregovih in obdelovalnih površinah in je eden od dominantnejših kolonizatorjev območij z lavo. V Evropi se pojavlja v različnih umetnih habitatnih tipih kot so zemljišča ob kanalih, cestah, železniških nasipih, pokopališčih in ob potočnih in rečnih bregovih (Hollingsworth in Bailey, 2000).

Sahalinski dresnik je avtohtona vrsta v vzhodni Aziji, kjer je poznana na jugu otoka Sahalin, južnih Kurilskih otokih, japonskih otokih Hokaido in Honšu ter v Koreji. Pojavlja se na motenih območjih od 0 do 1050 m nadmorske višine in jo lahko najdemo ob cestah, robovih gozdov, vrhovih pečin, rekah, in je tako kot japonski dresnik ena od pionirskih kolonizatorjev pustih območij, nastalih po vulkanskih izbruhih (Sukopp in Starfinger, 1995).

Druga predstavnika rodu *Fallopia*, prinesena v Evropo, sta še varieteta *compacta* vrste japonski dresnik in grmasti slakovec (*F. baldschuanica*) (Hollingsworth in Bailey, 2000).

V Sloveniji so prisotni vsi trije taksoni iz sekcije *Reynoutria*: japonski, sahalinski in češki dresnik. Japonski dresnik je naturalizirana okrasna rastlina, ki se v Sloveniji pojavlja predvsem ob železniških nasipih, ob vodah in na nasipališčih v nižini in spodnjem montanskem pasu. Sahalinski dresnik je prav tako naturalizirana okrasna rastlina in se pojavlja pri nas v naseljih, ob poteh in na vlažnih mestih. Pojavlja se raztreseno v nižinah do montanskega pasu. V Sloveniji je ponekod v naravi prisotna in mestoma podivjana okrasna tujerodna vrsta grmasti slakovec, ki ne sodi v sekcijo *Reynoutria*. Poleg tujerodne vrste slakovca sta pogosti tudi avtohtoni vrsti navadni slakovec (*F. convolvulus*) in hostni

slakovec (*F. dumetorum*) (Vreš, 2007). Tudi slakovci so pomembni, saj so sorodni taksoni dresnikov in zato so lahko tudi njihovi opraševalci (Bailey in sod., 2009).

Vrsta *Fallopia japonica* var. *compacta* pri nas ne uspeva, zato v nalogi ob omenjanju japonskega dresnika vedno govorimo o vrsti *Fallopia japonica* var. *japonica*.

2.3.1 Geografska razširjenost rodu *Fallopia* v Sloveniji

V Sloveniji je potrjeno uspevanje petih vrst iz rodu *Fallopia*: *F. convolvulus*, *F. dumetorum*, *F. baldschuanica*, *F. japonica* in *F. sachalinensis* ter dveh križancev: *F. x convolvuloides* (križanec med *F. convolvulus* in *F. dumetorum*) in *F. x bohémica*. Na Primorskem je pričakovana tudi najdba križanca *F. x conollyana*. Izmed teh vrst so *F. baldschuanica*, *F. japonica*, *F. sachalinensis* in *F. x bohémica* invazivne tujerodne vrste (Strgulc Krajšek in Jogan, 2011).

V Sloveniji so japonski dresnik prvič opazili v začetku 20. stoletja ob Savinji pri Celju (Hayek, 1908). Sahalinski dresnik so v okolico Celja prinesli iz Nemčije okrog leta 1935 in ga nasadili kot okrasno rastlino (Strgar, 1981). Strgar (1981, 1982) je naštel več kot 100 nahajališč japonskega dresnika, raztresenih ob rekah Dravi, Meži, Sotli, Savinji in Savi s pritoki, in 9 rastišč sahalinskega dresnika. Ugotovil je, da je sahalinski dresnik v Sloveniji redek, japonski pa razmeroma pogost. Kot najobsežnejša rastišča japonskega dresnika je navedel vzhodno predmestje Ljubljane ob Litijski cesti in njeni bližini, v okolici Naklega pri Kranju ter med Savinjo in Voglajno pri Celju. Sahalinskega dresnika je bilo največ v Kočevju, južno od Celja, rastišči v Trbovljah in Kranju sta bili zelo majhni. Strgar (1981) je pisal tudi o tedanjih popolnih ali delnih »dresniških prazninah« Primorske, Istre, Notranjske, Dolenjske, Kozjanskega, Zgornje Savinjske doline, Halož, Slovenskih goric in nekaterih drugih predelov Slovenije, kjer dresnikov sploh niso našli ali pa jih je bilo zelo malo.

Danes poznamo že 15 nahajališč sahalinskega dresnika in okrog 150 nahajališč japonskega dresnika (Jogan in sod., 2001).

V Pomurju, Slovenskih goricah, Haložah in v okolici Nove Gorice se je japonski dresnik razširil šele nedavno, v zadnjih 20 letih. Uspešno se širi po Ljubljanski kotlini ter vzdolž Save in Drave. Več desetletij stare navedbe o uspevanju japonskega dresnika ponekod v

južnem delu Slovenije, ki v zadnjem času niso bile potrjene, nam kažejo, da se vrsta tam ni ustalila, še verjetneje pa je, da novejših podatkov preprosto ni zaradi premajhne floristične dejavnosti v tem delu Slovenije (Jogan, 2006).

Strgar (1981, 1982) in Gradivo za Atlas flore Slovenije (Jogan in sod., 2001) križanca med japonskim in sahalinskim dresnikom ne omenjata. Vreš (2007) pa omenja, da se v Sloveniji pojavlja križanec, češki dresnik, vendar je njegova razširjenost malo poznana. Strgulc Krajšek in Jogan (2011) pa navajata, da sta v Sloveniji najpogostejša predstavnika obravnavanega rodu *F. japonica* in *F. x bohemica*. Menita, da na mnogih že objavljenih nahajališčih japonskega dresnika, pravzaprav raste križanec, češki dresnik, ki je v nižinah v Sloveniji zelo pogost.

2.3.2 Določanje taksonov rodu *Fallopia*

V družino *Polygonaceae* uvrščamo zelišča, redkeje olesenele polgrmičke ali ovijalke (Vreš in Jogan, 2007). Za vse predstavnike družine dresnovk (*Polygonaceae*) je značilno kolenčasto členjeno steblo. Steblo je votlo in zaradi kolenčaste členjenosti nekoliko podobno stebлом bambusa, pogosto rdečkasto lisasto (Frajman, 2008). Listi so razvrščeni spiralasto, so enostavni, prilista sta zrasla v škornjico, ki objema steblo. Cvetovi so drobni, v grozdastih ali latastih socvetjih ali posamični v zalistjih, 3-, 4- ali 5- števnih, cvetno odevalo enotno ali v dveh različnih krogih, zelenkasto, belkasto ali rdečkasto. Prašnikov je 6 do 10. Plodnica je enopredalasta, iz 2 ali 3 karpelov, z 2 ali 3 vratovi. Plod je orešek (Vreš in Jogan, 2007).

Dresniki pri nas vzcvetijo konec julija. Podobno kot številne druge invazivke (npr. žlezava nedotika, topinambur, deljenolistna rudbekija) so to pozno poleti cvetoče rastline. Drobni belkasti do zelenkasti cvetovi so združeni v pokončna latasta socvetja (Frajman, 2008) (slika 1).

Japonski dresnik je do 2 m visoka rastlina. Listi so navadno dolgi do 15 cm, v obrisu skoraj okrogli do širokojajčasti, z zaokroženim ali prisekanim dnom. Cvetno odevalo je belo. Sahalinski dresnik je navadno visok nad 2 m (do 4 m). Listi so dolgi do 30 cm, podolgastojajčasti do srčasti, z rahlo srčastim dnom. Cvetno odevalo je zelenkasto (Vreš, 2007).

Bailey in sodelavci (2009) opisujejo, da japonski dresnik zraste 2 do 3 m v višino, češki 2,5 do 4 m v višino, sahalinski dresnik pa opisujejo kot presenetljivo veliko rastlino, ki zraste do 4 m v višino.

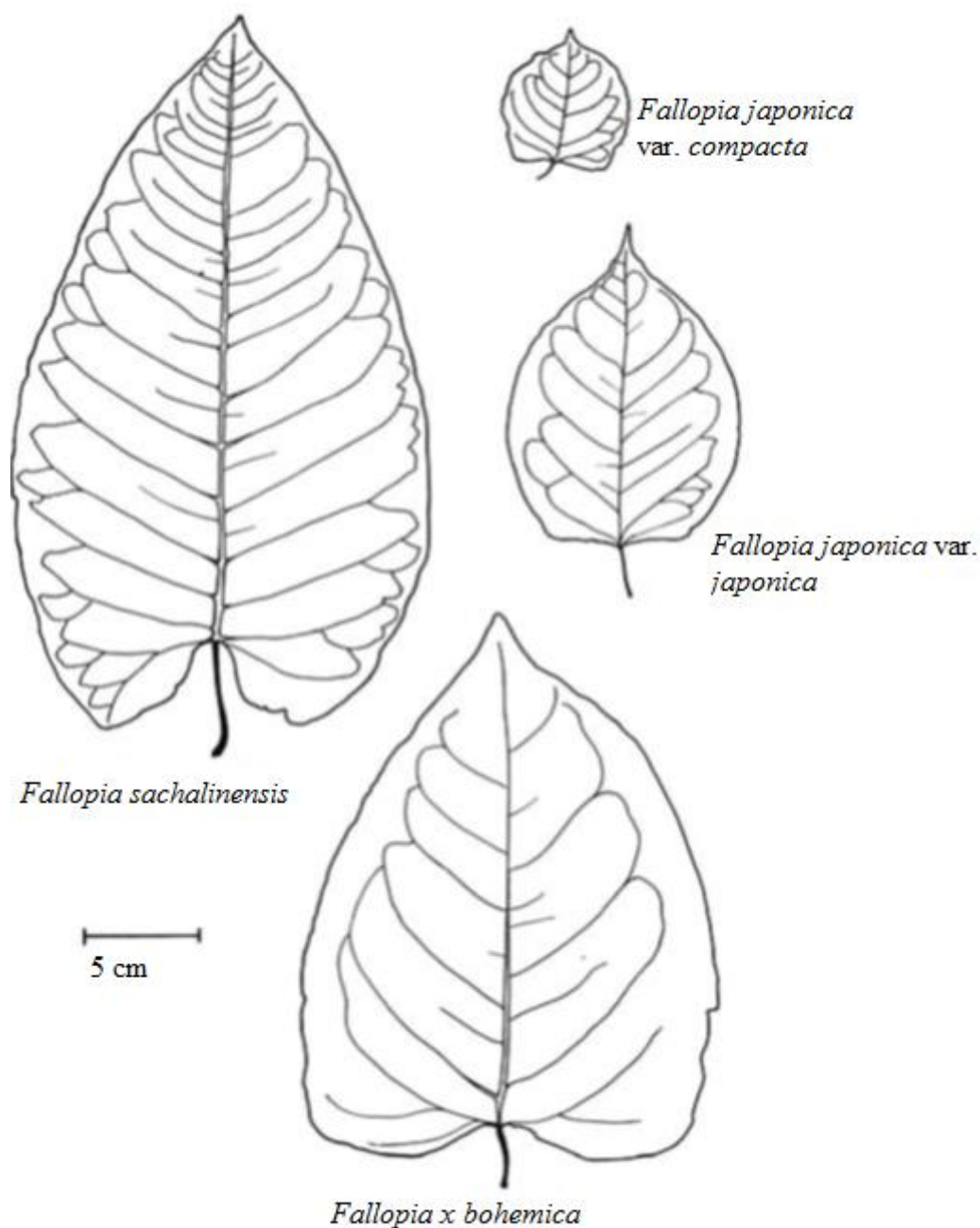


Slika 1. Sestoj japonskega dresnika (Frajman, 2008: 2).

Kot najočitnejša znaka za določanje taksonov Bailey in sodelavci (2009) navajajo obliko in velikost listov (slika 2). Listi sahalinskega dresnika so največji in imajo globoko srčasto dno. Merijo do 40 x 22 cm. Listi japonskega dresnika so veliko manjši in imajo vedno presekan bazo. Dolgi so 10 do 15 cm. Listi češkega dresnika so vmesni tako po obliki in velikosti, veliki so do 23 x 19 cm. Ko gledamo te znake, je pomembno, da gledamo vedno največje in v celoti razvite stebelne liste, saj so si mladi listi ob socvetjih med seboj zelo podobni po obliki in velikosti pri vseh taksonih. Kot pomemben dodatni znak navajajo površino listov. Abaksialni listni površini japonskega in sahalinskega dresnika se med seboj razlikujeta tako v površini povrhnjice in v trihomih, medtem ko je češki dresnik

jasno vmesen. Japonski dresnik ima zelo gladko površino povrhnjice s samo nekaj progami, sahalinski pa ima zelo nagubano povrhnjico. Spodnja povrhnjica listov češkega dresnika ima vmesen izgled. Dlakavost po spodnji strani listov ima še večji pomen pri razlikovanju češkega dresnika od njegovih staršev. Medtem ko ima japonski dresnik le nekaj enoceličnih papil vzdolž svojih žil, ima sahalinski dresnik pogosto tanke laske, dolge do 14 celic. Križanci imajo močnejše odebeljene laske, dolge 2 do 4 celice.

Določitev obravnavanih taksonov le na podlagi morfologije listov je pogosto nezanesljiva in praktično nemogoča, če za določevanje uporabimo mlade liste ali liste s stranskih poganjkov. Zanesljivo jih lahko prepoznamo po kombinaciji več znakov (velikost in oblika listne ploskve, debelina listnih ploskev, dno listne ploskve, trihomi na spodnji strani listne ploskve ter morfologija cvetov) (Strgulc Krajšek in Jogan, 2011).



Slika 2. Oblike listov različnih taksonov rodu *Fallopia* (Bailey in sod., 2009: 1193).

2.3.3 Razmnoževanje

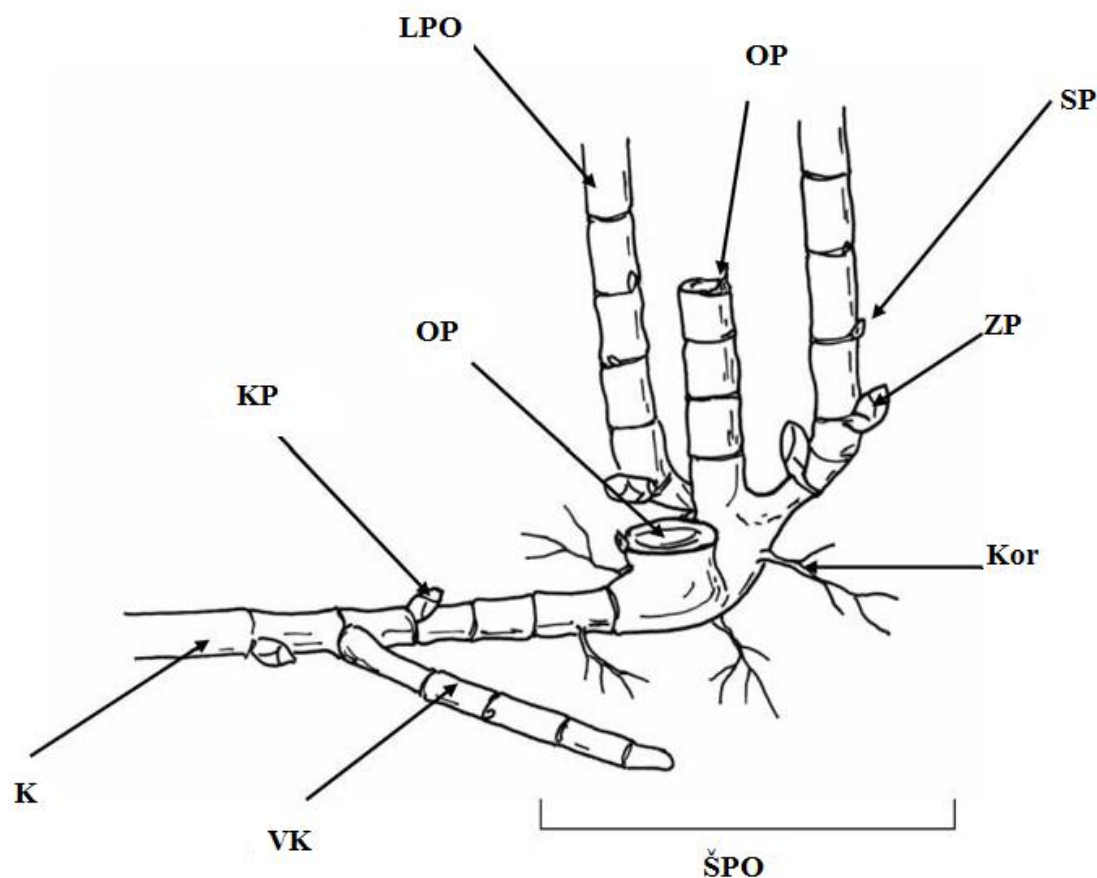
Kot večina trajnic so tudi invazivne vrste sposobne spolnega razmnoževanja preko tvorbe semen in/ali vegetativnega razmnoževanja. Prednosti vegetativnega razmnoževanja so hitro in skoraj neomejeno razmnoževanje ugodnih genov, možnost širjenja sterilnih genotipov, hitra naselitev ugodnih habitatov, potencialno neomejena življenjska doba. Spolno razmnoževanje pa ima prednost generiranja genotipske variabilnosti, povečevanja

zmožnosti vrst, da se prilagajajo spremenljivemu okolju (Tiébré in sod., 2007). Ravnotežje med spolno in vegetativno strategijo razmnoževanja je ključni dejavnik pri uspešnosti invazivnih vrst (Eckert in sod., 2003).

2.3.3.1 Vegetativno razširjanje

Bailey in sodelavci (2009) navajajo, da vsi taksoni rodu *Fallopia* sect. *Reynoutria* kažejo močno klonsko rast, ki jim omogoča izpodrivanje okoliških vrst in hitro kolonizacijo novih območij. Osnovna enota sistema korenika je šop poganjkov (slika 3), ki je različno velik pri različnih dresnikih. Vrh korenike se razvije v nadzemni poganjek. Letni nadzemni poganjki poženejo več podzemnih zimskih popkov na svoji bazi do konca obdobja rasti. Majhni poganjki in tisti, ki so propadli med rastnim obdobjem, ne tvorijo takšnih popkov. Eden ali več zimskih popkov na bazi nadzemnega poganjka zraste naslednjo pomlad v nove nadzemne poganjke blizu materinskega poganjka. Nadzemni poganjki zavzemajo skoraj enak položaj več let in sestavljajo majhen skupek poganjkov. Ko ta šop poganjkov ne tvori več novih nadzemnih poganjkov in odmre, se prekine dormanca nekaterih stranskih popkov, ki začnejo rasti horizontalno kot nove veje korenika. Japonski dresnik ima precej velik šop poganjkov povezan z dolgimi tankimi korenikami. Sahalinski dresnik razvije manjše šope tesneje povezanih poganjkov, ki rastejo v vrstah. Češki dresnik ima kombinacijo karakteristik obeh staršev.

Razkosanje in raznašanje korenika s poplavami ali človekovo aktivnostjo so glavni načini razširjanja. Že 1 cm dolgi in 0,7 g težki koščki korenike so se sposobni regenerirati. Dresniki se lahko regenerirajo tudi iz stebelnih poganjkov, vendar je stopnja regeneracije manjša (Bailey in sod., 2009). Bímová in sodelavci (2003) so našli celo razlike v sposobnosti in hitrosti regeneracije kot tudi razlike v kakovosti razvitih poganjkov. Regeneracija iz stebel je manj učinkovita kot iz korenika pri vseh taksonih, razen pri sahalinskem dresniku. Češki dresnik ima najvišjo stopnjo regeneracije izmed vseh taksonov in je najuspešnejši pri regeneraciji in razvijanju novih poganjkov. Japonski in sahalinski dresnik kažeta splošno nižje stopnje regeneracije (Bailey in sod., 2009).



Slika 3. Struktura šopa poganjkov s koreniki. ŠPO- šop poganjkov, LPO- letni nadzemni poganjek, OP- odmrli poganjek, K- korenika, VK- veja korenike, SP- stebelni popek, ZP- zimski popek, KP- popek na koreniki, Kor- korenina (prirejeno po Bailey in sod., 2009: 1199).

2.3.3.2 Spolno razmnoževanje in križanje

Japonski dresnik v Evropi je citološko in gensko enoten. Oktoploidni ($2n = 8x = 88$) ženski klon pripada enemu samemu genotipu, ki je prisoten po vsej Evropi (Hollingsworth in Bailey, 2000). Ker so prisotni le kloni ženskih rastlin, peloda te vrste ni. Kljub temu pa te rastline proizvedejo semena, saj jih oprašči pelod sorodnih taksonov (Bailey in sod., 2009).

V Evropi so znani tako dvospolni kot ženski tetraploidni kloni sahalinskega dresnika (Bailey in Stace, 1992). Na Češkem so nedavno našli še heksaploidne ($2n = 6x = 66$) in oktoploidne klone ($2n = 8x = 88$) (Mandák in sod., 2003).

Križanec, češki dresnik, je v glavnem heksaploid ($2n = 6x = 66$), vendar so bili najdeni tudi tetraploidni, oktoploidni in anevploidni kloni (Bailey in Stace, 1992). Pri tem taksonu je genetska variabilnost v celotnem rodu *Fallopia* največja, saj se pojavlja na treh ravneh ploidnosti (na vsaki ravni sta prisotna oba spola) (Mandák in sod., 2005). Kljub zmožnosti spolnega razmnoževanja predvidevajo, da se takson po Evropi širi večinoma vegetativno (Bailey in sod., 2009).

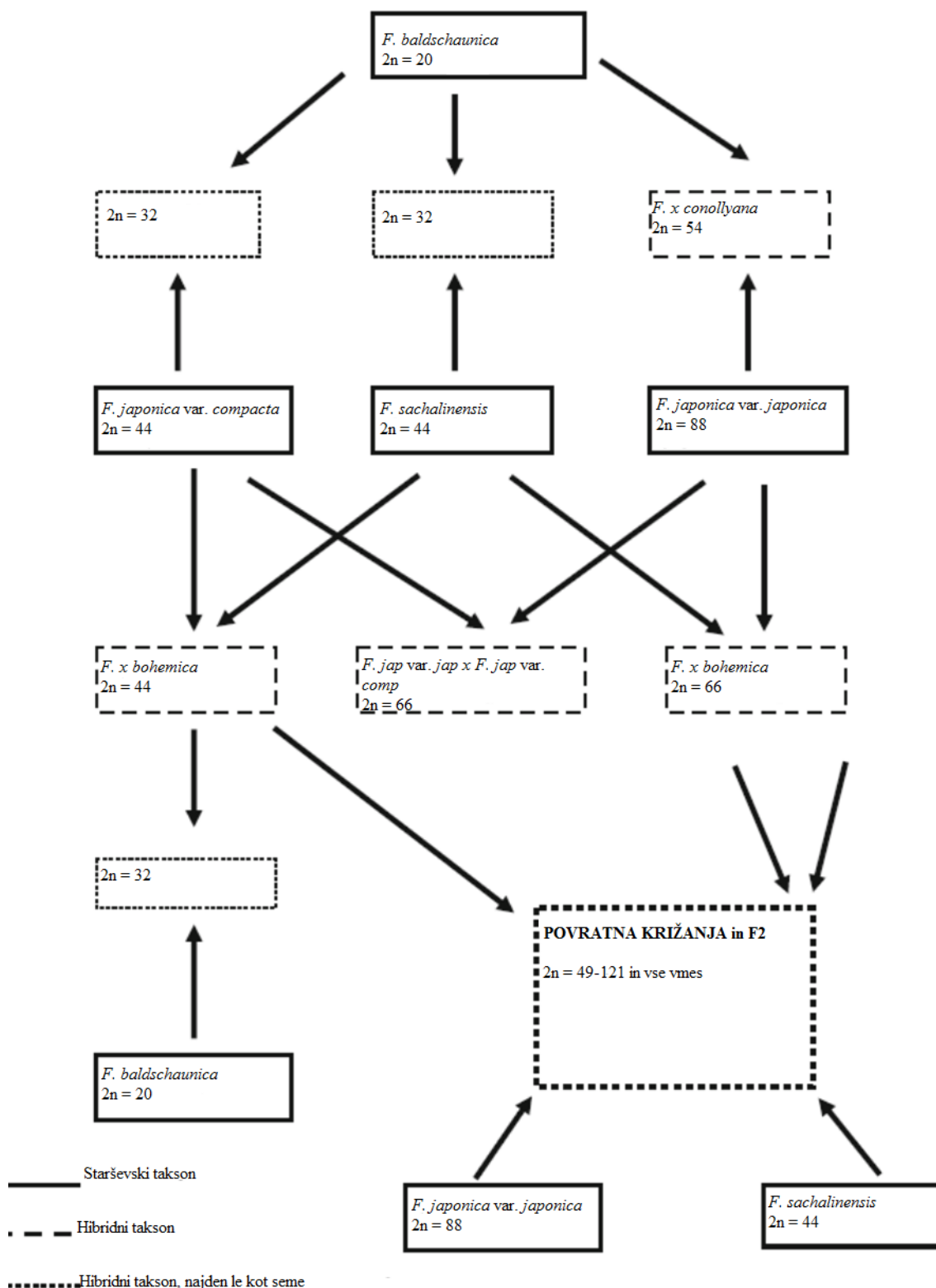
Japonski dresnik se sicer lahko razmnožuje s semeni, vendar potomci večinoma niso vrste japonski dresnik, saj semena nastanejo kot posledica križanja (slika 4). Druge vrste iz rodu *Fallopia* (sahalinski in češki dresnik ter grmasti slakovce) proizvajajo viabilen pelod in so potencialni vir za križanje z japonskim dresnikom. Tiébré in sodelavci (2007) so dokazali, da večina semen japonskega dresnika nastane s povratnim križanjem s češkim dresnikom in križanjem z grmastim slakovcem. Dodatno so ugotovili, da so vsaj nekatera semena, ki izvirajo iz križanja z grmastim slakovcem, viabilna, saj so vzkli. To kaže na potencialno pomembno vlogo grmastega slakovca pri vzpostavljanju spolnega razmnoževanja pri japonskem dresniku. Vendar pa križanca med tema vrstama, *F. x conollyana*, v njihovi raziskavi klonov rodu *Fallopia* v Belgiji niso našli (Tiébré in sod., 2007). So pa ti križanci velik problem v Veliki Britaniji in severno-zahodnih delih celinske Evrope, kjer predstavljajo najpogostejše najdena semena na japonskem dresniku (Bailey in sod., 2009). V Sloveniji ni potrjeno, da bi obstajali križanci japonskega dresnika z grmastim slakovcem (Strgulc Krajšek in Jogan, 2011).

Zanimivo je, da japonski dresnik ni vedno proizvajal semen kot to počne danes, vsaj v Veliki Britaniji ne. Conolly (1977) je zapisal »Plodovi so očitno le zelo redki in še to samo po vročih in suhih poletjih...«. To pomeni, da se je nekaj drastično spremenilo v zadnjih 30 letih, odkar je bil japonski dresnik še brez semen. V teh procesih so verjetno delovali 3 faktorji. Prvič, japonski dresnik je bil še posebej občutljiv na zgodnji mraz, saj cveti pozno poleti. Vendar se je to tveganje, odkar je Conolly pisal pa do danes, močno zmanjšalo. Drugič, opazne so bile spremembe v obnašanju opraševalcev. V poznih sedemdesetih in zgodnjih osemdesetih letih, čeprav so cvetovi zelo privlačni za žuželke, na cvetovih ni bilo videti, da bi privabljali čebele. Tretjič, prišlo je do povečanja zasaditev vrtov z grmastim slakovcem, ki je glavni vir cvetnega prahu za uspešen nastanek semen v Veliki Britaniji in delih celinske Evrope. Povečana aktivnost čebel, večja razpoložljivost ustreznega peloda in

na splošno vse bolj toplo podnebje so kombinacija dejavnikov, ki omogočajo tolikšno tvorbo semen, kot smo ji priča danes (Bailey in sod., 2009).

Sahalinski dresnik je sposoben tvoriti številna semena. Je donor peloda za japonski dresnik in starševska vrsta češkega dresnika. Široka razširjenost češkega dresnika skupaj z dokazano proizvodnjo velike količine delno viabilnega peloda, je v skladu z ugotovitvijo, da večina semen japonskega dresnika izvira iz povratnega križanja s češkim dresnikom (Tiébré in sod., 2007). Češki dresnik je postal glavna komponenta uspešnosti invazivnih vrst rodu *Fallopia*, spodbuja spolno razmnoževanje japonskega dresnika in lahko obnovi genotipsko raznolikost ter prilagoditveni potencial na novem območju (Hollingsworth in Bailey, 2000). Razvoj semen na rastlinah češkega dresnika je skoraj ničn, kar je skupna značilnost križancev (Tiébré in sod., 2007).

Medtem ko je japonski dresnik v Evropi citološko enoten, je situacija s sahalinskim in češkim dresnikom veliko bolj zapletena. Sahalinski dresnik je v glavnem tetraploid, vendar so našli tudi heksaploide in oktoploide. Mandák in sodelavci (2003) navajajo dva možna vzroka za ta stanja. Prvi je apomiktično razmnoževanje preko diploidnih gamet, drugi razlog pa so somatske mutacije (avtopoliploidizacija vodi v oktoploidno stanje). Češki dresnik je v glavnem heksaploid. Kloni z drugačnimi poliploidnimi stanji, tetraploidi in oktoploidi, imajo različen izvor. Tetraploidni češki dresnik je verjetno križanec med sahalinskim in japonskim dresnikom varietete *compacta*. Oktoploine rastline češkega dresnika so verjetno produkt zlitja diploidnih (heksaploidna rastlina češkega dresnika) in normalnih haploidnih (tetraploidna rastlina sahalinskega dresnika) gamet. Druga možnost je tudi avtopoliploidizacija tetraploidnega stanja (Mandák in sod., 2003).



Slika 4. Poenostavljena shema hibridizacije rodu *Fallopia* (Bailey in sod., 2009: 1196).

2.4 Velikost genoma

Vsak genom ima svojo velikost, ki jo lahko izrazimo z njegovo maso v pikogramih DNA ali s številom baznih parov. Holoploidna velikost jedrnega genoma (iz grščine, v kateri holos pomeni celoten) je količina DNA v vseh kromosomih jedra ne glede na stopnjo ploidnosti. Označujemo jo kot vrednost C. Vrednost 1C pomeni količino DNA v nepodvojenem reduciranem kromosomskem kompletu (npr. po mejozi), kar izhaja iz aritmetičnega pravila, da je 1C polovica zigotne vrednosti 2C. Količina DNA je znotraj vrste stalna, a ima širok razpon vrednosti med različnimi vrstami, od 10^7 do 10^{11} baznih parov. Predpostavka, da je velikost genoma v grobem povezana z evlucijsko zapletenostjo organizmov (npr. človek ima večji genom kot večina žuželk in žuželke imajo večji genom kot glive) ni univerzalno pravilo. Nekatere dvoživke imajo 50-krat večje genome kot človek. Genomi rastlin obsegajo celoten razpon velikosti genomov evkariontskih organizmov. Med kritosemenkami ima enega najmanjših genomov navadni repnjakovec (*Arabidopsis thaliana*), med največjimi pa je genom logarice (*Fritillaria assyriaca*) (Dermastia, 2007).

Vrednost 1C je količina DNA v haploidnem genomu osebka. Pri diploidnih osebkih ob koncu mitoze v telofazi in v fazi G1 interfaze količina jedrne DNA ustreza vrednosti 2C. V fazi G2 interfaze in na začetku mitoze (profaza) pa količina DNA ustreza vrednosti 4C. V fazi S interfaze količina DNA ustreza vrednostim med 2C in 4C (Tajnik, 2007).

Zanimanje za velikost genoma kot markerja za določanje invazivnih tujerodnih taksonov rodu *Fallopia* sekcije *Reynoutria*, je povezano z dejstvom, da je ta marker povezan z več celičnimi, tkivnimi in organizemskimi značilnostmi (Bennett, 1972). Kot primer lahko navedemo pozitivno povezavo med velikostjo genoma in jedrnim in celičnim volumnom, trajanjem mitoznega cikla in trajanjem mejoze (Leitch in Bennett, 2007). Velikost genoma je bistveno povezana z minimalnim generacijskim časom zelnatih rastlin. V povprečju imajo kratkotrajnice najmanjše, obvezne trajnice pa največje genome (Bennett in sod., 1998). Količina jedrne DNA je značilnost, ki jo lahko uspešno uporabimo za napoved invazivnosti pri rastlinah (Rejmánek, 1996). V rastlinski taksonomiji količina jedrne DNA pogosto olajša razvrstitve taksonov v različne kategorije in je zato lahko vodilo taksonomskih odločitev (Kron in sod., 2007). Še več, velikost genoma nam lahko pokaže

genomsko konstitucijo alopoliploidnih taksonov in/ali nam razkrije domnevne starše medvrstnih križancev (Suda in sod., 2007).

Da lahko o velikosti genoma govorimo kot o taksonomskem markerju, morata biti izpolnjena dva predpogoja: nizka intraspecifična variabilnost in zadostna razlika med različnimi vrstami. Sekcija *Reynoutria* rodu *Fallopia* izpolnjuje oba pogoja (Suda in sod., 2010).

Velikosti genoma različnih taksonov in križancev rodu *Fallopia* sta merila Bailey in Stace (1992). Tiébré in sodelavci (2007) so raziskali stopnje ploidnosti in relativne vrednosti jedrne DNA kalic. Velikosti genoma invazivnih tujerodnih vrst rodu *Fallopia* so merili tudi Suda in sodelavci (2010).

2.4.1 Poliploidnost

Poliploidne so celice, ki imajo več kot 2 kompleta kromosomov (Dermastia, 2007).

Poliploidi imajo določene selekcijske prednosti pred diploidnimi predniki. Imajo lahko večje celice, debelejša liste, bolje zadržujejo vodo, počasneje rastejo, imajo večje cvetove, cvetijo dalj časa in so lahko bolj odporni proti raznim skrajnim razmeram v okolju. Poliploidne vrste se bolje prilagajajo okoljskim spremembam. S povečanjem snovi za gensko rekombinacijo bi se lahko povečala stopnja genske evolucije, genske reorganizacije in končno nastanka novih vrst. S poliploidijo lahko rastlina vpliva na regulacijo genske aktivnosti. Zaradi tega so naravni poliploidi pogostejši v ostrejših razmerah okolja. Poliploidi se razvijejo v dveh procesih. Pri avtopoliploidnosti se število kromosomov podvoji med posamezniki iste vrste. Avtopoliploidi navadno nastanejo zaradi napake pri ločevanju kromosomov med mejozo. Na ta način lahko nastanejo diploidne gamete. Alopoliploidnost je proces s katerim nastanejo fertilni potomci po križanju dveh različnih vrst. Normalno so križanci sterilni, ker pri njih ni možno parjenje kromosomov med mejozo. V primeru, da pride do podvojitve kromosomskega števila po oploditvi, zaradi nepravilnega ločevanja pri podvojevanju, se bodo kromosomi normalno parili med mejozo in v rastlini bo ponovno vzpostavljeno fertilno stanje (Dermastia, 2007).

2.5 Slikovna citometrija

Najpogosteje uporabljene citometrične metode za merjenje vsebnosti jedrne DNA temeljijo na kvantitativnem obarvanju molekul DNA in situ. Načine takih meritev lahko klasificiramo v dve skupini, fluorometrične meritve in denzitometrične meritve. Denzitometrija obsega metode, ki sklepajo o količini DNA v jedru iz optične gostote obarvanih celičnih struktur. V tem primeru je najpogostejša in najprimernejša metoda za obarvanje DNA Feulgenova reakcija. Klasične denzitometrične meritve vključujejo merjenje optične gostote z instrumenti, ki povezujejo mikroskop in fotometer in so lahko poimenovani kot mikrodenzitometri, citofotometri in mikrospektrofotometri. Fotometer sedaj nadomešča sistem za analizo slike, ki zajame sliko iz mikroskopa preko video ali digitalne kamere in izračuna optično gostoto iz sivih vrednosti pik v jedru. Klasična metoda se imenuje fotometrična citometrija, računalniško podprta metoda pa slikovna citometrija (Vilhar in sod., 2001).

Prednost slikovne citometrije je uporaba fiksiranega materiala, kar je pomembno predvsem pri rastlinah, pri katerih svež material ni vedno na voljo. Slikovna citometrija omogoča tudi določanje števila kromosomov, stopnje ploidnosti in količine DNA na istem preparatu, ob uporabi enakih postopkov barvanja (Bennett in sod., 2000). Jedra, ki nas zanimajo za meritve lahko izberemo. Preparati so trajni in tako na voljo za več meritev (Sumner, 1997).

Velikosti genoma različnih taksonov in križancev rodu *Fallopia* sta z metodo Feulgenove mikrodenzitometrije merila Bailey in Stace (1992). V Belgiji so Tiébré in sodelavci (2007) raziskovali predvsem hibridizacijo in spolno razmnoževanje invazivnih tujerodnih vrst rodu *Fallopia*, kjer so s pretočno citometrijo ugotavljali stopnje ploidnosti in relativne vrednosti jedrne DNA kalic. Prav tako so s pretočno citometrijo izmerili velikosti genoma invazivnih tujerodnih vrst rodu *Fallopia* Suda in sodelavci (2010).

2.6 Pretočna citometrija

Pretočna citometrija temelji na fluorometriji, analizi relativne intenzitete fluorescence jeder, pobarvanih s fluorokromi (DAPI, propidijev jodid, etidijev bromid, kromomicin). Začetni material je suspenzija posameznih jeder, ki v toku tečejo preko žarišča vzbujajoče svetlobe. Ob osvetlitvi jedra fluorokromi, vezani na DNA, sevajo svetlobo, ki jo zaznamo z optičnim detektorskim sistemom. Intenziteta sevane svetlobe je sorazmerna s količino

DNA. S to metodo lahko izmerimo količino DNA v več tisoč jedrih v zelo kratkem času. Z uporabo notranjega standarda relativno fluorescenco pretvorimo v absolutne enote. Poleg velikosti genoma lahko s pretočno citometrijo analiziramo in sortiramo kromosome ter določamo poliploidnost (Doležel, 1997).

Prednost slikovne citometrije pred pretočno je že v sami pripravi vzorcev. Pri pretočni citometriji je priporočljivo, da je tkivo sveže, postopki za pripravo vzorcev pa so lahko zelo zapleteni (Doležel, 1997). Pri slikovni citometriji je priprava vzorcev relativno enostavna, uporabimo lahko predhodno fiksiran in shranjen material (Greilhuber in Ebert, 1994). Preparati, ki jih pripravimo za slikovno citometrijo, so trajni in uporabni za več meritev (Sumner in sod., 1997). Pomembna prednost slikovne citometrije je vidnost jeder med samo meritvijo. Pretočna citometrija pa ne omogoča vpogleda v preiskovana jedra.

2.7 Delovne hipoteze

Namen našega dela je bil izmeriti velikost jedrnega genoma materinskih rastlin različnih tujerodnih vrst dresnikov, nabranih v Sloveniji, ter velikost jedrnega genoma kalic semen, pobranih na materinskih rastlinah.

Hipoteze

- Materinske rastline dresnikov, nabrane v Sloveniji, imajo različne velikosti jedrnega genoma, saj se taksoni dresnikov razlikujejo po količini jedrnega genoma.
- Velikosti jedrnega genoma osebkov, ki so potomci iste materinske rastline, se lahko razlikujejo od velikosti jedrnega genoma materinske rastline in med seboj, saj lahko donorji peloda pripadajo različnim taksonom dresnikov.

3 MATERIALI IN METODE

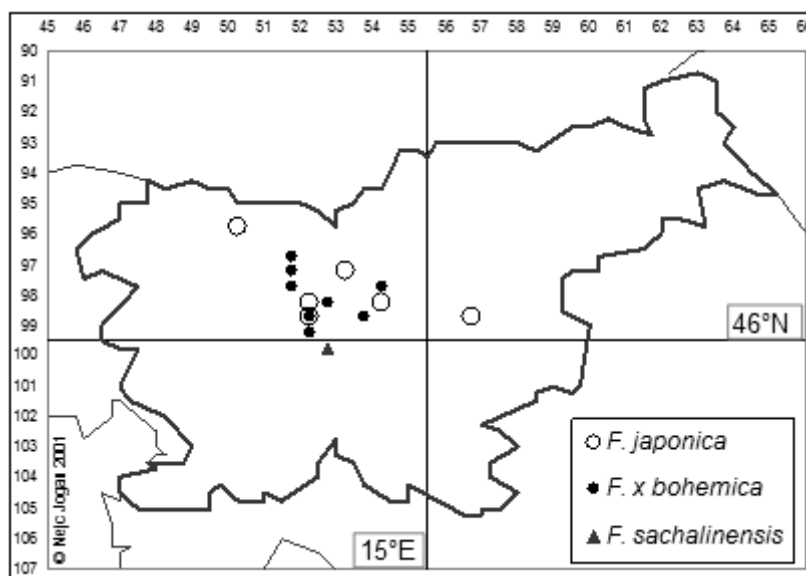
Delo v laboratoriju je potekalo na Katedri za botaniko in fiziologijo rastlin, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani v študijskem letu 2010/2011.

3.1 Vzorčenje

Vzorčenje vrst *F. japonica*, *F. sachalinensis* in *F. x bohemica* je potekalo v različnih krajih po Sloveniji (slika 5). Na terenu smo:

- določili geografsko lokacijo (nahajališče) vzorca,
- ocenili velikost populacije vrste dresnika,
- fotografirali nahajališče,
- nabrali material za analize, in sicer:
 - semena (vzorčenje: november in december 2009),
 - poganjke za morfološke analize, določanje in za dokazni rastlinski material (vzorčenja: november in december 2009, april in maj 2010, avgust in september 2010),
 - cvetoče poganjke za morfološko analizo cvetov (vzorčenje: avgust in september 2010),
 - mlade vršičke poganjkov za analizo velikosti genoma materinskih rastlin (vzorčenje: april, maj in junij 2010),
 - poganjke za vzgojo nadomestnih korenin in analizo velikosti genoma materinskih rastlin (vzorčenje: avgust in september 2010).

Vzorci smo označili s črko F, ki pomeni dresnik (*Fallopia*), ter s številko, ki pomeni zaporedno oznako nahajališča (priloga D).



Slika 5. Kvadranti, kjer smo nabrali vzorce dresnikov. V nekaterih kvadrantih je več vzorčnih mest za posamezen takson. Seznam vzorčnih mest je v prilogi D.

3.2 Določanje vrst

Določanje nabranega materiala je potekalo kot vzporedna raziskava. Določitve smo upoštevali v naši nalogi.

3.3 Shranjevanje in fiksiranje rastlinskega materiala

Semena (oz. plodove skupaj z posušenim ovojem iz perigona) smo posušili v suhem prostoru na sobni temperaturi in jih nato shranili v papirnatih vrečkah v hladilniku na temperaturi približno 4 °C.

Poganjke za morfološke analize smo herbarizirali v sušilnici za sušenje herbarijskega materiala s sistemom za prepihanje toplega zraka. Dokazni herbarijski material je shranjen v javni herbarijski zbirki Herbarij LJU.

Koščke zdravih listov za analize DNA smo shranili v plastičnih stekleničkah skupaj s sredstvom za sušenje silikagel.

Koščke socvetij za analizo zgradbe cvetov smo shranili v stekleničkah s 70 % etanolom.

Tkiva tujerodnih vrst dresnikov, koreninske vršičke, stebelne vršičke ter kalice, ki so bila namenjena za analizo velikosti genoma, smo fiksirali s formaldehidom (Dolenc Koce,

2001). Skupaj s tkivi dresnikov smo fiksirali tudi koreninske vršičke standardne vrste *Pisum sativum* cv. Kleine Rheinlaenderin. Tkiva smo fiksirali v majhnih stekleničkah v 4 % nevtralnem formaldehidu, pripravljenem v Sørensenovem pufru (pH 6,8), 60 minut pri sobni temperaturi. Nato smo vzorce sprali v destilirani vodi. Dodatno smo jih fiksirali v mešanici 3:1 (v/v) absolutni metanol : led očetna kislina (MAA) trikrat po 10 minut. V četrti mešanici fiksativa MAA smo vzorce tkiva fiksirali čez noč pri 4 °C. Za dolgotrajnejše shranjevanje smo jih prenesli v 96 % etanol in jih hranili pri -20 °C. Formaldehidni fiksativ in fiksativ MAA smo vedno pripravili svež tik pred uporabo.

Priprava Sørensenovega pufru (pH 6,8)

- V merilno bučo dodaj 4,54 g KH_2PO_4 in 12,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$.
- Dodaj destilirano vodo do 1000 ml.
- Pufer hrani pri 4 °C nekaj tednov (v pufru ne sme biti precipitata ali okužbe).

3.4 Analiza velikosti genoma

3.4.1 Barvanje po Feulgenu

Fiksirano rastlinsko tkivo smo pobarvali po postopku, prirejenem po Greilhuber in Ebert (1994). Bistvo tega postopka je rožnato obarvanje jeder po vezavi Schiffovega reagenta na najmanj dve aldehydni skupini, nastali po odstranitvi purinskih baz adenina in gvanina z blago kislno hidrolizo.

Fiksirano rastlinsko tkivo smo najprej spirali v destilirani vodi najmanj 5 minut, da smo odstranili fiksativ. Sledila je hidroliza v 5M HCl v termostabilni vodni kopeli pri 20 °C. Po 90 minutah smo hidrolizo ustavili tako, da smo s pipeto odstranili vso kislino in tkivo prelili s hladno destilirano vodo. Po 5 do 10 minutah smo odstranili destilirano vodo in dodali Schiffov reagent. Rastlinsko tkivo se je v Schiffovem reagentu barvalo 120 minut pri 20 °C ali pa čez noč v hladilniku. Po barvanju smo prebitek barvila sprali s SO_2 -vodo. Spirali smo 3-krat po 2 min, 2-krat po 10 min in 1-krat po 20 min. SO_2 -vodo smo pripravili vedno svežo tik pred uporabo. Če smo je pripravili več, smo jo hranili v hladilniku do 3 dni oz. dokler je še imela oster vonj. Po zadnjem spiranju smo odstranili

vso SO₂-vodo in dodali destilirano vodo, v kateri smo shranili rastlinsko tkivo vse do priprave preparatov mečkancev.

Priprava Schiffovega reagenta

- 4 g pararosanilin klorida (Pararosaniline chloride, BDH, VB) raztopi v 800 ml vrele destilirane vode, premešaj in pusti ohladiti na 50 °C.
- Raztopino vakuumsko prefiltriraj preko filtra iz steklenih vlaken (Microfibre filters, Whatman GF/C9).
- Raztopini dodaj 120 ml 1 M HCl in 12 g kalijevega metabisulfit K₂S₂O₅ (Fisons, VB).
- Raztopino čez noč pusti v temi na sobni temperaturi.
- Raztopini dodaj 2 do 4 g aktivnega oglja za razbarvanje (decolourising charcoal, BDH, VB) in premešaj.
- Raztopino vakuumsko prefiltriraj preko filtra iz steklenih vlaken v suho steklenico (barvilo mora biti prozorno).
- Raztopino hrani v hladilniku pri 4 °C do 1 leto (v barvilu ne sme biti precipitata).

Priprava SO₂-vode

- V 475 ml destilirane vode dodaj 25 ml 1M HCl.
- Raztopini dodaj 2,5 g kalijevega metabisulfit K₂S₂O₅ (Fisons, VB).

3.4.2 Izdelava preparatov mečkancev

Mečkanci so preparati, ki jih pripravimo s pritiskom na rastlinsko tkivo, tako da dobimo eno plast celic.

Po Feulgenu pobarvane vzorce rastlinskega tkiva smo za 5 do 15 minut prenesli v 45 % očetno kislino, da se je rastlinsko tkivo zmehčalo. Na predhodno očiščena in označena objektna stekelca smo dali kapljico 45 % očetne kisline in vanjo položili pobarvane vzorce.

Na levo polovico objektnega stekelca smo dali vzorec preiskovanega rastlinskega tkiva, na desno polovico pa vzorec koreninskega vršička graha (*P. sativum*). Pobarvanim koreninam smo s skalpelom ali britvico odstranili koreninsko čepico. Od velikih koreninskih vršičkov, predvsem pri grahu, smo uporabili le približno 1 mm velik meristem. Na podoben način smo pripravili preparate iz stebelnih vršičkov. Tkivo smo s skalpelom razrezali na manjše koščke. Čez tkivo smo položili krovno stekelce, nanj pritiskali s preparirno iglo in s tem razprostrli rastlinsko tkivo. Čez krovno stekelce smo položili kos filtrirnega papirja in s palcem navpično pritisnili na mestu krovnega stekelca ter s tem zmečkali tkivo v eno plast celic. Kvaliteto mečkanca smo sproti preverjali pod mikroskopom. Tako pripravljene preparate smo zamrznili na suhem ledu (CO₂ v trdnem stanju) in odstranili krovna stekelca. Preparate z mečkanci smo dehidrirali po 3 minute v 96 % etanolu. Dehidrirane preparate smo posušili na zraku in v temi.

Iz vsakega vzorca materinskih rastlin (F02, F03, F04, F05, F07, F08, F09a, F09b, F10, F12, F13, F14, F16, F17, F21, F22, F24a, F24b, F25, F27, F28, F29 in F36) smo pripravili po 7 preparatov. Iz vzorca F19 smo pripravili le 1 preparat, saj je bilo fiksiranega malo rastlinskega materiala. Pri vzorcih F10, F12, F16, F19, F21, F22 in F36 smo za izdelavo preparatov za analizo velikosti genoma materinskih rastlin uporabili koreninske vršičke. Nabrane stebelne poganjke smo dali v vodo in iz njih vzgojili nadomestne koreninice, njihove koreninske vršičke smo fiksirali. Pri vzorcih F02, F03, F04, F05, F07, F08, F09a, F09b, F13, F14, F17, F24a, F24b, F25, F27, F28 in F29 smo pripravili preparate iz mladih vršičkov poganjkov. Iz kalic, z enakimi oznakami kot materinske rastline, smo pripravili različno število preparatov, od 1 do 23, odvisno od tega, koliko semen posamezne materinske rastline je vzkalilo. Semena materinskih rastlin z oznakami F24a, F24b, F27, F28, F29 in F36 niso kalila, zato iz teh vzorcev nismo pripravili preparatov kalic.

3.4.3 Meritve velikosti jedrnega genoma s slikovno citometrijo DNA

Na pripravljenih preparatih smo denzitometrično merili količino jedrnega genoma s sistemom za analizo slike.

Sistem za analizo slike sestavljajo svetlobni mikroskop (Axioskop MOT, Carl Zeiss), CCD kamera (Sony DXC-950P), osebni računalnik, zajemalnik slike (Matrox Meteor) ter programski paket za analizo slike KS 400 verzija 3.0 (Carl Zeiss Vision). V svetlobno pot

smo vstavili zeleni filter (540 nm). Za nastavitev mikroskopa smo uporabili Köhlerjevo osvetlitev in povečavo objektiva 63x (Plan-Neofluar, Carl Zeiss, 63x/1,25 Oil).

Preden smo začeli z meritvijo, smo prižgali CCD kamero in luč na mikroskopu, ter ju pustili prižgani 90 minut, da se je merilni sistem ogrel in stabiliziral (Vilhar in Dermastia, 2002). Nato smo najprej nastavili primerno osvetlitev in izvedli optično kalibracijo oz. umerjanje s pomočjo različnih filtrov nevtralne optične gostote (ND 79, 70, 63, 50, 20, 5 %) (Vilhar in Dermastia, 2002). Sledila je dejanska meritev velikosti jedrnega genoma.

Merili smo intenziteto obarvanja DNA posredno prek integrirane optične gostote (IOG), ki je povezana s transmisijo. Računalniški program intenziteto svetlobnega signala pretvori v sive vrednosti od 0 (črna barva) do 255 (bela barva). Sive vrednosti so sorazmerne transmisiji. Da smo se izognili presvetljeni sliki smo jakost osvetlitve nastavili tako, da je bila povprečna siva vrednost ozadja 220. Na osnovi sivih vrednosti na zajeti sliki je program za analizo slike izvedel segmentacijo slike in izračunal IOG za posamezno jedro. Pri meritvah nismo upoštevali jeder na robu slike in poškodovanih jeder.

Na vsakem preparatu smo izmerili IOG 60 do 200 interfaznih jeder. Iz grafičnih prikazov frekvenčnih porazdelitev IOG, smo lahko razbrali dva vrhova. Prvi vrh je predstavljal vrednost 2C, drugi pa 4C. IOG smo merili v arbitrarnih enotah. Kot umeritveni standard za preračunavanje relativnih količin DNA v absolutne smo uporabili vrsto *Pisum sativum* z vrednostjo $2C = 8,84 \text{ pg DNA}$ (Greilhuber in Ebert, 1994).

3.4.4 Statistična obdelava podatkov

Za statistično obdelavo smo uporabljali računalniška programa Excel (Microsoft Inc.) in Graph Pad Prism 3.0 (Graph Pad Software Inc.).

4 REZULTATI

4.1 Velikosti jedrnega genoma materinskih rastlin

Velikost jedrnega genoma smo izmerili v 24-ih materinskih rastlinah. Vrednosti 2C so znašale od 4,30 do 9,86 pg DNA. Po izmerjenih vrednostih 2C smo lahko vzorce materinskih rastlin razvrstili v 3 različne skupine (slika 6), ki predstavljajo 3 različne vrste, japonski dresnik, češki dresnik in sahalinski dresnik. Delitev materinskih rastlin na osnovi velikosti jedrnega genoma se je skladala s predhodno opravljeno morfološko analizo (Strgulc Krajšek, ustno). Dvanajst vzorcev materinskih rastlin (vzorci F03, F04, F08, F10, F13, F14, F17, F21, F22, F27, F28 in F36) sodi v vrsto japonski dresnik. Imeli so najvišje vrednosti 2C, in sicer od 8,62 pg do 9,86 pg DNA, povprečna vrednost 2C je bila $9,37 \pm 0,10$ pg DNA. Koeficient variacije znaša 3,62 % (preglednica 1). Enajst vzorcev materinskih rastlin (vzorci F02, F05, F07, F09a, F09b, F12, F19, F24a, F24b, F25 in F29) sodi v hibridni takson češki dresnik. Vrednosti 2C so znašale med 6,22 pg in 7,11 pg DNA, povprečna vrednost 2C je bila $6,79 \pm 0,07$ pg DNA, koeficient variacije znaša 3,60 % (preglednica 2). Najnižjo vrednost 2C je imela vrsta sahalinski dresnik, in sicer 4,30 pg DNA (preglednica 3).

Preglednica 1. Velikosti jedrnega genoma materinskih rastlin japonskega dresnika (*F. japonica* var. *japonica*). Prikazani so rezultati vzorcev 12 materinskih rastlin. N - število izmerjenih preparatov iz posamezne rastline, 2C – povprečna vrednost 2C preparatov (število izmerjenih jeder na preparat je bilo med 60 in 200), SN – standardna napaka, KV - koeficient variacije.

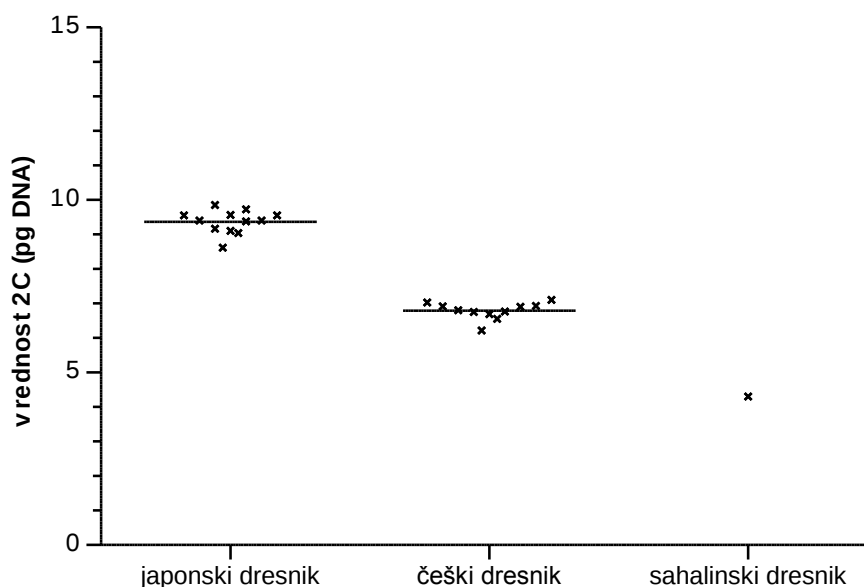
vzorec	N	vrednost 2C (pg DNA)	SN	KV (%)
F03	7	9,86	0,09	2,41
F04	7	9,41	0,16	4,56
F08	7	9,73	0,10	2,65
F10	5	8,62	0,16	4,05
F13	7	9,55	0,06	1,75
F14	7	9,57	0,06	1,67
F17	7	9,56	0,16	4,31
F21	7	9,10	0,12	3,38
F22	7	9,17	0,08	2,23
F27	7	9,38	0,12	3,40
F28	7	9,41	0,12	3,38
F36	7	9,04	0,14	4,07
povprečje		9,37		
SN		0,10		
KV(%)		3,62		

Preglednica 2. Velikosti jedrnega genoma materinskih rastlin češkega dresnika (*F. x bohemica*). Prikazani so rezultati vzorcev 11 materinskih rastlin. N - število izmerjenih preparatov iz posamezne rastline, 2C – povprečna vrednost 2C preparatov (število izmerjenih jeder na preparat je bilo med 60 in 200), SN – standardna napaka, KV - koeficient variacije.

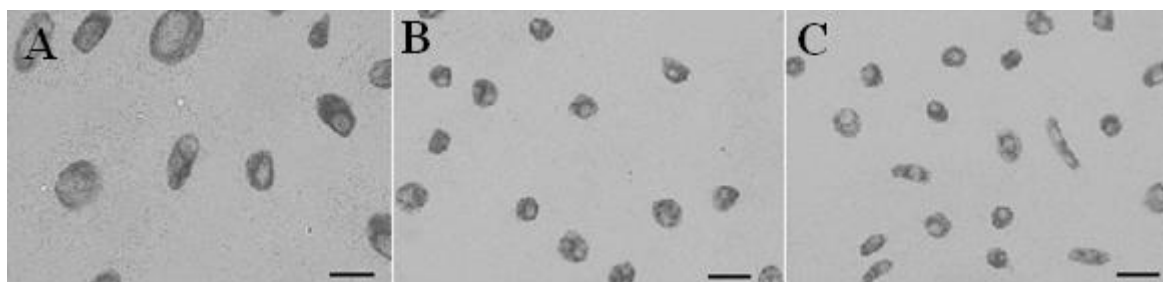
vzorec	N	vrednost 2C (pg DNA)	SN	KV (%)
F02	7	6,91	0,13	5,00
F05	7	6,77	0,12	4,78
F07	7	7,11	0,12	4,36
F09a	7	6,76	0,14	5,63
F09b	6	6,80	0,06	2,23
F12	4	6,22	0,06	2,05
F19	1	6,56		
F24a	7	6,92	0,05	1,96
F24b	7	6,70	0,10	3,87
F25	7	7,03	0,08	3,17
F29	7	6,93	0,10	3,90
povprečje		6,79		
SN		0,07		
KV(%)		3,60		

Preglednica 3. Velikost jedrnega genoma materinske rastline sahalinskega dresnika (*F. sachalinensis*). Prikazani so rezultati 1 vzorca materinske rastline. N - število izmerjenih preparatov iz posamezne rastline, 2C – povprečna vrednost 2C preparatov (število izmerjenih jeder na preparat je bilo med 60 in 200), SN – standardna napaka, KV - koeficient variacije.

vzorec	N	vrednost 2C (pg DNA)	SN	KV (%)
F16	6	4,30	0,09	5,34



Slika 6. Velikosti jedrnega genoma materinskih rastlin dresnikov. Križci označujejo vrednosti 2C v pg DNA posamezne materinske rastline, črta pa označuje povprečje teh vrednosti.



Slika 7. Mikroskopske slike interfaznih jeder. A - japonski dresnik, B – češki dresnik, C – sahalinski dresnik. Merilce predstavlja 10 µm.

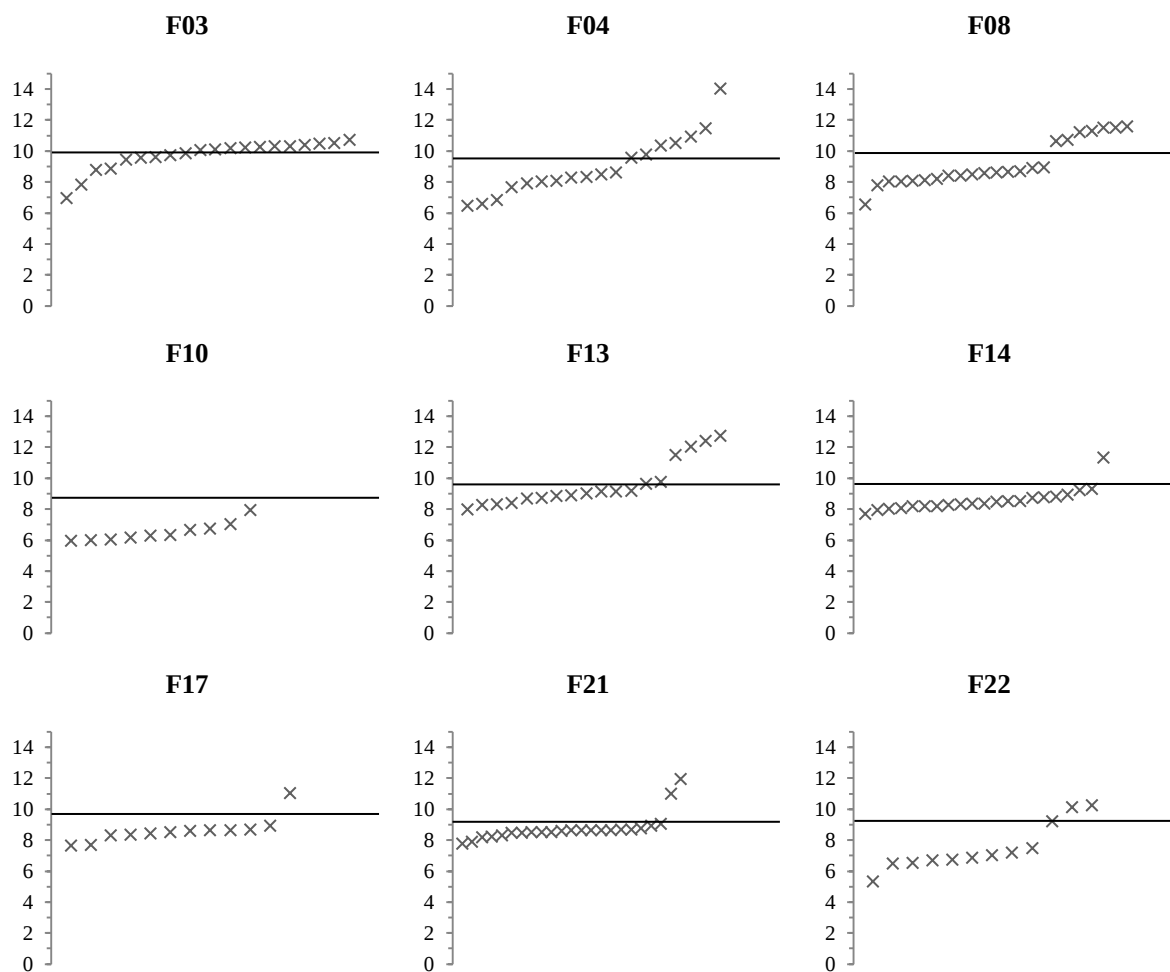
4.2 Velikosti jedrnega genoma kalic

Kot smo pričakovali, so imele kalice posamezne materinske rastline različne vrednosti 2C. Nekatere vrednosti 2C so bile v kalicah podobne kot v materinskih rastlinah, nekatere pa so med seboj odstopale. 2C-vrednosti kalic japonskega dresnika so se med seboj najbolj razlikovale in so tudi najbolj odstopale od 2C-vrednosti materinskih rastlin. Povprečna vrednost 2C materinske vrste je znašala $9,37 \pm 0,10$ pg DNA, minimalna vrednost 2C kalic je bila 5,33 pg, maksimalna pa 13,99 pg DNA (slika 8). Koeficienti variacije pri kalicah japonskega dresnika so med 8,80 % in 21,51 %. Najnižji koeficient variacije imajo kalice vzorca F14, najvišjega pa kalice vzorca F04 (preglednica 4). Pri kalicah vzorcev F04, F08, F13 in F22 smo opazili veliko raztresenost 2C-vrednosti (slika 8), kar se kaže v visokih vrednostih koeficienta variacije (preglednica 4). Kalice vzorcev F03, F10, F14, F17 in F21 so imele nekoliko nižje koeficiente variacije (do 10,38%), raztresenost 2C-vrednosti teh kalic pa je bila manjša (slika 8).

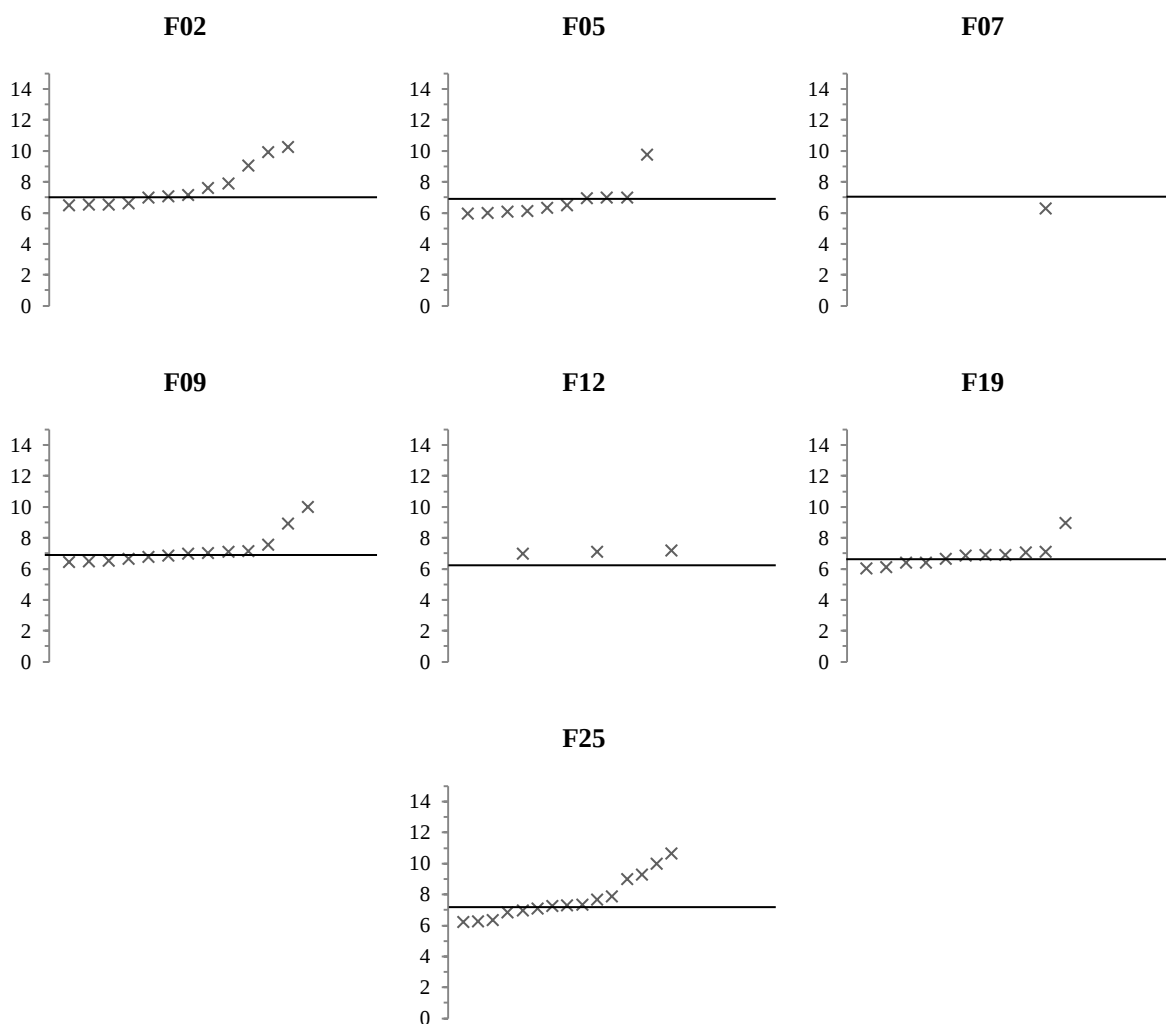
2C-vrednosti kalic češkega dresnika so bile med 5,92 pg in 10,62 pg DNA (slika 9). Koeficienti variacije so znašali med 1,42 % in 17,78 %. Najnižji koeficient variacije so imele kalice vzorca F12, najvišjega pa kalice vzorca F25. Visoke koeficiente variacije so imeli še vzorci F02, F05, F09 in F19 (preglednica 5).

Najmanjša raznolikost v 2C-vrednostih kalic se je pokazala pri sahalinskem dresniku, kjer so vrednosti 2C znašale med 4,30 pg DNA in 6,54 pg DNA, koeficient variacije pa 8,71 % (preglednica 6). Raztresenost vrednosti 2C teh kalic je bila majhna (slika 10).

Nekatere kalice materinskih vrst japonskega in češkega dresnika so imele zelo visoke vrednosti 2C, in sicer do 13,99 pg DNA (slika 11).

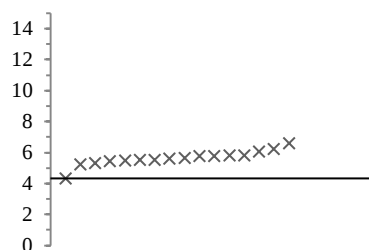


Slika 8. Velikosti jedrnega genoma kalic japonskega dresnika (*F. japonica* var. *japonica*). Na sliki so prikazane povprečne vrednosti 2C materinskih rastlin v pg DNA (črta) in vrednosti 2C v pg DNA njihovih kalic (križci) za vzorce F03, F04, F08, F10, F13, F14, F17, F21 in F22.

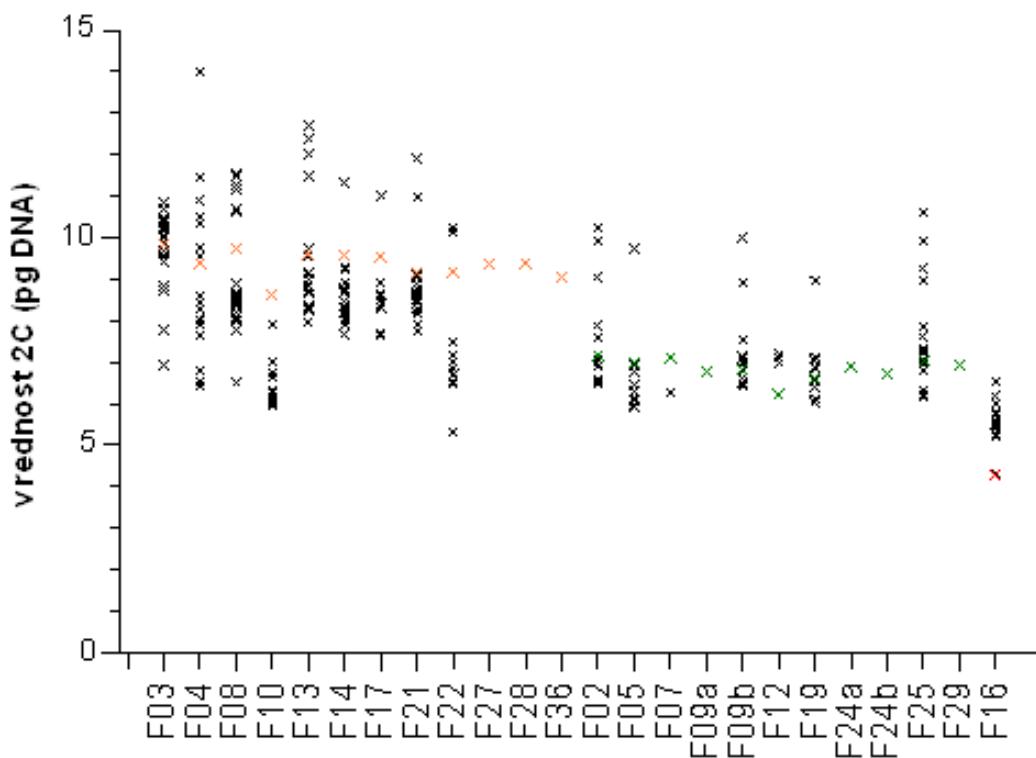


Slika 9. Velikosti jedrnega genoma kalic češkega dresnika (*F. x bohémica*). Na sliki so prikazane povprečne vrednosti 2C materinskih rastlin v pg DNA (črta) in vrednosti 2C v pg DNA njihovih kalic (križci) za vzorce F02, F05, F07, F09, F12, F19 in F25.

F16



Slika 10. Velikosti jedrnega genoma kalic sahalinskega dresnika (*F. sachalinensis*). Na sliki je prikazana povprečna vrednost 2C materinske rastline v pg DNA (črta) in vrednosti 2C v pg DNA njenih kalic (križci) za vzorec F16.



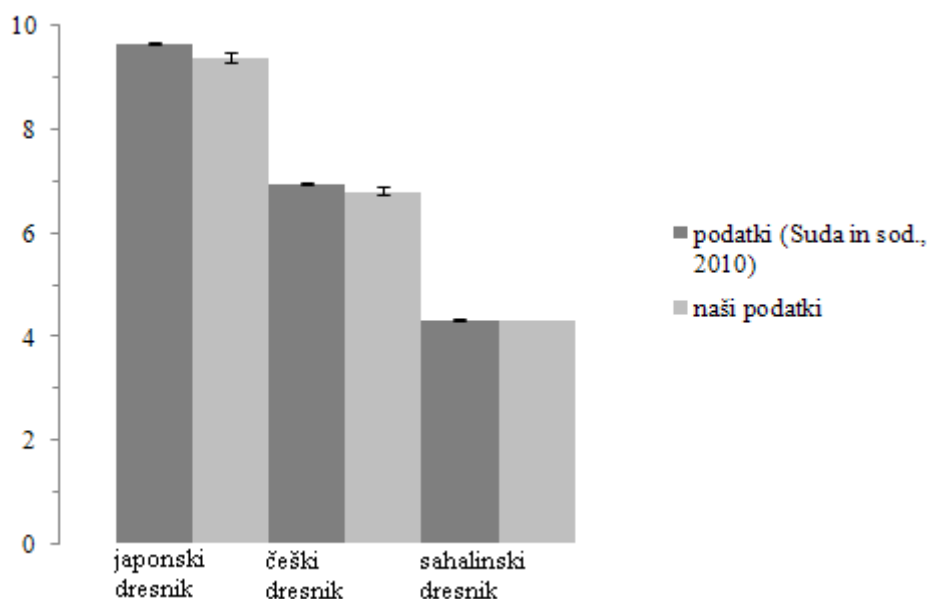
Slika 11. Velikosti jedrnega genoma dresnikov. Prikazane so vrednosti 2C za tri vrste materinskih rastlin kot obarvani križci (oranžni – *F. japonica* var. *japonica*, zeleni – *F. x bohemica*, rdeč – *F. sachalinensis*). 2C-vrednosti kalic posamezne materinske rastline so prikazane kot črni križci.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 Razprava

5.1.1 Velikosti jedrnega genoma materinskih rastlin tujerodnih vrst dresnikov

Povprečne velikosti jedrnega genoma materinskih rastlin so potrdile predhodne določitve vrst po morfoloških znakih. Določili smo 3 različne taksone dresnikov, in sicer japonski (*Fallopia japonica* var. *japonica*), sahalinski (*Fallopia sachalinensis*) in češki (*Fallopia x bohemica*). Velikost genoma torej lahko uporabimo kot marker za identifikacijo invazivnih tujerodnih vrst dresnikov, kot so to ugotovili že Suda in sodelavci (2010). Naši rezultati so popolnoma primerljivi z njihovimi. Čeprav kromosomi v naših preparatih večinoma niso bili vidni in jih zato nismo mogli prešteti, lahko v primerjavi z njihovimi rezultati razberemo poliploidnost posamezne vrste. Povprečna 2C-vrednost materinske vrste japonski dresnik je zelo blizu povprečni 2C-vrednosti oktoploidnega japonskega dresnika (slika 12) v njihovi raziskavi. Češki dresnik v naši raziskavi ima podobno povprečno vrednost 2C kot heksaploidni češki dresnik v njihovi raziskavi (slika 12). Tudi vrednost 2C sahalinskega dresnika lahko primerjamo s povprečno 2C-vrednostjo tetraploidnega sahalinskega dresnika v njihovi raziskavi (slika 12).



Slika 12. Primerjava naših podatkov o velikosti genoma (vrednost 2C v pg DNA $\pm$ SN) japonskega, češkega in sahalinskega dresnika s podatki Suda in sodelavcev (2010).

Suda in sodelavci (2010) so za meritve količine DNA uporabili pretočno citometrijo. Kot barvilo za DNA so uporabili propidijev jodid, standardna umeritvena vrsta je bila koruza (*Zea mays*). Kljub različnim metodam pa so rezultati podobni. Iz primerjave lahko sklepamo, da so naše rastline japonskega dresnika oktoploidi, rastline češkega dresnika heksaploidi, sahalinski dresnik pa je tetraploid.

Velikosti genoma vrst in križancev rodu *Fallopia* sta merila tudi Bailey in Stace (1992) in sicer z uporabo barvanja po Feulgenu in mikrodensitometrije. Vrednosti 2C, zabeležene v njuni raziskavi, so veliko manjše kot vrednosti 2C, izmerjene v naši raziskavi in v raziskavi Suda in sodelavcev (2010). Suda in sodelavci (2010) so mnenja, da so rezultati, pridobljeni s pretočno citometrijo, natančnejši, saj menijo, da je Feulgenova densitometrija veliko bolj občutljiva na eksperimentalne pogoje. Tudi Bailey in Stace (1992) obravnavata pridobljene vrednosti s previdnostjo in večinoma ocenjujeta samo relativne razlike med vrstami. Mi pa smo mnenja, da je slikovna citometrija, ki jo uporabljamo v našem laboratoriju, zanesljiva metoda za določanje količine DNA pri rastlinah s katero dobimo rezultate, ki so primerljivi z že objavljenimi.

5.1.2 Velikosti jedrnega genoma kalic tujerodnih vrst dresnikov in določitev donorjev peloda

Velikosti jedrnih genomov kalic, katerih materinske rastline so japonski, češki in sahalinski dresnik, so zelo različne. Vrednosti 2C se gibljejo od 4,30 pg (kalica materinske rastline sahalinskega dresnika) pa vse do 13,99 pg DNA (kalica materinske rastline japonskega dresnika). Predvsem kalice iz materinskih rastlin japonskega in češkega dresnika so zelo variabilne. Najmanj variabilne so kalice materinske rastline sahalinskega dresnika. Razlog za najmanjšo raznolikost je verjetno tudi ta, da smo merili kalice samo ene rastline iz te vrste.

Zelo visoke vrednosti 2C in vrednosti, ki navzgor odstopajo od večine vrednosti 2C pri posameznih vzorcih, so posledica oploditve s pelodom, ki je nastal brez mejoze ali z napakami pri mejozi. Če bi bili kromosomi na preparatih teh kalic vidni, bi lahko povezali količino DNA in število kromosomov. Raznolikost v številu kromosomov je namreč lahko posledica oploditve s pelodom nastalim brez mejoze oz. nastalim z napakami pri mejozi. Heksaploidni češki dresnik ima zelo nepravilne mejoze, kjer se lahko formirajo univalenti, bivalenti, trivalenti ali redko kvadrivalenti v pelodnih zrnih (Bailey in Stace, 1992). Kalice, ki zrastejo po oploditvi tako spremenjenih spolnih celic, so navadno aneuploidne (Tiébré in sod., 2007).

Po številu kromosomov so Tiébré in sodelavci (2007) določili, katera vrsta je donor peloda. Ugotovili so, da sta za japonski dresnik donorja peloda lahko grmasti slakovec in češki dresnik. Kot donorja peloda za sahalinski dresnik so prav tako določili grmasti slakovec. V naši raziskavi, kjer kromosomi večinoma niso bili vidni, smo o donorjih sklepali na podlagi velikosti genomov kalic. S statističnim testom ANOVA smo testirali razlike med velikostjo genoma kalic iz dveh vrst. V eno skupino smo uvrstili vse kalice japonskega dresnika (vzorci F03, F04, F08, F10, F13, F14, F17, F21 in F22). Kalice teh vzorcev smo med seboj primerjali in ugotovili, da se med seboj statistično značilno razlikujejo (ANOVA, $p < 0,05$). Odstopajo kalice vzorcev F10 in F22, ki imajo vrednosti 2C značilno nižje od ostalih kalic. Sklepamo, da je donor peloda za kalice vzorcev F03, F04, F08, F13, F14, F17, F21 češki dresnik. Za kalice vzorcev F10 in F22 pa bi lahko bil donor peloda druga vrsta, predvidevamo da sahalinski dresnik, ki ima manjši jedrni genom. 2C-vrednosti kalic vzorcev F10 in F22 namreč ustrezajo 2C-vrednostim češkega dresnika,

ki je križanec japonskega in sahalinskega dresnika. Ker pa sahalinski dresnik ne raste v bližini lokalitet vzorcev F10 in F22 (Strgulc Krajšek, ustno), je malo verjeten donor peloda. Možna bi bila tudi oprašitev s slakovci, tudi s tujerodnim grmastim slakovcem, ki imajo nižje velikosti genoma kot opazovane vrste. To možnost omenjajo Bailey in sod. (2009). Vendar pa ni potrjeno, da bi v Sloveniji obstajali takšni križanci in tudi mi ne moremo potrditi takšnega križanja. Predvsem grmasti slakovec lahko uspeva kje v bližini lokalitet, kjer smo vzorčili, saj je precej pogosto sajen kot okrasna rastlina.

V drugo skupino smo uvrstili vse kalice češkega dresnika (vzorci F02, F05, F07, F09, F12, F19 in F25). Kalice teh vzorcev se med seboj niso statistično značilno razlikovale (ANOVA, $p > 0,05$). Iz tega sklepamo, da je za vse kalice donor peloda enak. Donor peloda je verjetno češki dresnik.

Kalic sahalinskega dresnika nismo mogli testirati na enak način, saj smo imeli en vzorec materinske rastline. Donor peloda je verjetno češki dresnik. Zelo zanimiva je velikost genoma ene kalice sahalinskega dresnika, ki je imela popolnoma enako velikost genoma kot materinska rastlina. V tem primeru je verjetno v bližini (lahko celo v istem sestoju) obstajal vsaj en cvet, ki je imel fertilne prašnike in je proizvajal uporaben pelod. Ta pelod je lahko oprašil sahalinski dresnik.

Ugotovili smo, da je za kalice materinskih rastlin japonskega dresnika običajno najverjetnejši donor peloda češki dresnik. Donor peloda za češki dresnik je verjetno kar češki dresnik, saj imajo kalice teh materinskih rastlin večinoma zelo podobne 2C-vrednosti kot materinske rastline. Ta vrsta pa je na vseh 3 ravneh poliploidnosti sposobna povratnega križanja s starševskimi taksoni in tudi križanja med sabo (Bailey in sod., 2009). Donor peloda za večino kalic na sahalinskem dresniku je najverjetneje češki dresnik. Bailey (1989) je ugotovil, da so dvospolne rastline sahalinskega dresnika avtoinkompatibilne in niso sposobne tvoriti semen brez ustreznega vira peloda. Tudi podatek Baileya (1994), da je sahalinski dresnik redko sposoben samooploditve, potrjuje našo določitev.

5.2 Sklepi

- Materinske rastline, ki smo jih analizirali, pripadajo trem taksonom: japonski (*Fallopia japonica*), češki (*F. x bohemica*) in sahalinski dresnik (*F. sachalinensis*). Povprečne vrednosti 2C materinskih rastlin za vsak takson dresnikov znašajo: $9,37 \pm 0,10$ pg DNA za japonski dresnik, $6,79 \pm 0,07$ pg DNA za češki dresnik in $4,30$ pg DNA za sahalinski dresnik.
- Kalice, zrasle iz semen razvitih na isti materinski rastlini, so imele različne velikosti jedrnega genoma od materinske rastline. 2C-vrednosti kalic, katerih materinska rastlina je japonski dresnik, so bile med $5,33$ pg in $13,99$ pg DNA. Kalice materinske rastline češkega dresnika so imele vrednosti 2C med $5,92$ pg in $10,62$ pg DNA. Najnižje 2C-vrednosti imajo kalice iz materinske rastline sahalinskega dresnika, in sicer med $4,3$ pg in $6,54$ pg DNA.
- Donor peloda za japonski dresnik je večinoma češki dresnik, lahko pa tudi katera od vrst slakovcev. Donor peloda za češki in za sahalinski dresnik je najverjetneje češki dresnik.
- Zelo visoke 2C-vrednosti kalic ali vrednosti, ki navzgor odstopajo od večine 2C vrednosti kalic posameznega vzorca, so verjetno posledica oploditve s pelodom, ki je nastal brez mejoze ali z napakami pri mejozi. Odstopanje navzdol je lahko posledica oploditve s pelodom slakovcev (navadi, hostni ali grmasti), ki imajo nižje velikosti genoma, vendar tega ne moremo potrditi.

Rezultati naše raziskave so v skladu s postavljenima hipotezama:

- Materinske rastline dresnikov, nabrane v Sloveniji, imajo različne velikosti jedrnega genoma, saj se taksoni dresnikov razlikujejo po količini jedrnega genoma.
- Velikosti jedrnega genoma osebkov, ki so potomci iste materinske rastline, se lahko razlikujejo od velikosti jedrnega genoma materinske rastline in med seboj, saj lahko donorji peloda pripadajo različnim taksonom dresnikov.

6 POVZETEK

Vrste iz rodu *Fallopia* sect. *Reynoutria* (*Polygonaceae*) sodijo med najbolj problematične invazivne tujerodne vrste v evropski flori (Suda in sod., 2010). V slovenski flori so take vrste japonski dresnik (*F. japonica* var. *japonica*), sahalinski dresnik (*F. sachalinensis*) in njun križanec češki dresnik (*F. x bohemica*).

Tujerodne vrste dresnikov se vegetativno razširjajo z obsežnim sistemom korenin (Bailey in sod., 2009). Zelo zanimivo pa je spolno razmnoževanje teh vrst. V Evropi so prisotni le kloni ženskih rastlin japonskega dresnika, zato njegovega peloda ni. Kljub temu pa te rastline proizvedejo semena, saj jih oprašijo pelod sorodnih taksonov (Bailey in sod., 2009).

V naši raziskavi smo izmerili velikosti jedrnih genomov tujerodnih vrst dresnikov, nabranih na različnih rastiščih v Sloveniji, in velikosti jedrnih genomov kalic, ki so se razvile iz semen, zraslih na materinskih rastlinah. Tkiva dresnikov, tj. koreninske vršičke, stebelne vršičke in kalice, smo fiksirali v 4 % nevtralnem formaldehidu in metanol-ocetni kislini. Skupaj s tkivi dresnikov smo fiksirali tudi koreninske vršičke standardne vrste *Pisum sativum*. Fiksirana rastlinska tkiva smo pobarvali po Feulgenu in pripravili preparate mečkance. Na pripravljenih preparatih smo izmerili količino DNA v interfaznih jedrih s sistemom za analizo slike. Iz grafičnih prikazov frekvenčnih porazdelitev integrirane optične gostote smo razbrali dva vrha, od katerih je prvi predstavljal vrednost 2C. Za preračunavanje relativnih količin DNA v absolutne smo uporabili vrsto *Pisum sativum* ($2C = 8,84 \text{ pg}$).

Iz izmerjenih vrednosti 2C tujerodnih vrst dresnikov smo lahko potrdili, da gre za 3 različne taksone. Japonski dresnik ima povprečno 2C-vrednost $9,37 \pm 0,10 \text{ pg DNA}$, češki dresnik $6,79 \pm 0,07 \text{ pg DNA}$, sahalinski dresnik pa $4,30 \text{ pg DNA}$. Na podlagi 2C-vrednosti kalic smo sklepali o donorjih peloda za posamezno kalico. Najverjetnejši donor peloda za kalice japonskega dresnika je češki dresnik, lahko pa tudi katera od vrst slakovcev, za kalice češkega in sahalinskega dresnika je najverjetnejši donor peloda češki dresnik.

Naloga je bila predstavljena na 11. Mednarodni konferenci o ekologiji in upravljanju s tujerodnimi invazivnimi rastlinami (11th International Conference on EMAPi), ki je potekala od 30.8 do 3.9.2011 na Madžarskem. Poster je v prilogi Č.

7 SUMMARY

Species of genus *Fallopia* sect. *Reynoutria* (*Polygonaceae*) are among the most problematic invasive alien species in European flora (Suda et al., 2010). All these are represented, also in Slovene flora, namely Japanese knotweed (*F. japonica* var. *japonica*), Sakhalin knotweed (*F. sachalinensis*) and their hybrid (*F. x bohemica*).

The alien species of knotweed spread vegetatively with extensive rhizome system (Bailey et al., 2009). Their sexual reproduction is very interesting. Only female clones of Japanese knotweed are present in Europe, for this reason, their pollen is nonexistent. Nevertheless, these plants produce seeds because they are pollinated by any other closely related species in the area (Bailey et al., 2009).

In our research we measured the size of the nuclear genome of alien species of knotweed, collected in different sites in Slovenia. We also measured the size of nuclear genome of seedlings, developed from seeds and grown on mother plants. Different tissues of knotweed (root tips, shoot tips and seedling roots) were fixed in 4% neutral formaldehyde and methanol-acetic acid. Alongside knotweed tissues we also fixed root tips of standard species *Pisum sativum* used for calibration.

We stained the fixed plant tissues according to Feulgen and prepared microscopic slides with squashed specimen. In that specimen we measured the quantity of DNA in interphase nuclei with image analysis system. From the frequency distribution of integrated optical density of nuclei we determined two points, the first one representing 2C-value. For calculating relative quantities of DNA into absolute quantities *Pisum sativum* was used (2C = 8,84 pg).

After measuring 2C-values of knotweeds we were able to confirm three different species, recognized already by their morphology. The average 2C-value of the Japanese knotweed is $9,37 \pm 0,10$ pg DNA, *F. x bohemica* has $6,79 \pm 0,07$ pg DNA and Sakhalin knotweed has 4,30 pg DNA. Based on 2C-values of seedlings we could recognize the pollen donor for individual mother species. The pollen donor for Japanese knotweed is *F. x bohemica*, only rarely *F. convolvulus*, *F. dumetorum* or *F. baldschuanica*, the pollen donor for *F. x bohemica* and Sakhalin knotweed is *F. x bohemica*.

This research was presented on the 11th International Conference on EMAPi held in Hungary from 30 August to 3 September 2011. The poster is in supplement Č.

8 VIRI

Convention on Biological Diversity, 2002. Decision VI/23: Alien species that threaten ecosystems, habitats or species (<http://www.cbd.int/decision/cop/?id=7197>)

Bailey J.P. in Conolly A.P., 2000. Prize-winners to pariahs: a history of Japanese knotweed s.l. (*Polygonaceae*) in the British Isles. *Watsonia*, 23: 93-110

Bailey J.P. in Stace C.A., 1992. Chromosome number, morphology, pairing, and DNA values of species and hybrids in the genus *Fallopia* (*Polygonaceae*). *Plant Syst Evol*, 180: 29-52

Bailey J.P., 1989. Cytology and breeding behaviour of giant alien *Polygonum* species in Britain. PhD Thesis, University of Leicester, UK

Bailey J.P., 1994. Reproductive biology and fertility of *Fallopia japonica* (Japanese knotweed) and its hybrids in the British Isles. V: De Waal L.C., Child L.E., Wade P.M., Brock J.H., uredniki. Ecology and management of invasive riverside plants. Chichester: John Wiley and Sons, 141-158

Bailey J.P., Bímová K., Mandák B., 2009. Asexual spread versus sexual reproduction and evolution in Japanese Knotweed s.l. sets the stage for the »Battle of the Clones«. *Biol Invasions*, 11: 1189-1203

Bennett M.D., 1972. Nuclear DNA content and minimum generation time in herbaceous plants. *Proc. R. Soc. London B*, 181: 109-135

Bennett M.D., Leitch I.J., Hanson L., 1998. DNA amounts in two samples of angiosperm weeds. *Ann. Bot.*, 82/Suppl. A.: 121-134

Bennett M.D., Bhandol P., Leitch I.J., 2000. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses – 807 new estimates. *Annals of Botany*, 86: 859-909

Bímová K., Mandák B. in Kašparová I., 2004. How does *Reynoutria* invasion fit the various theories of invasibility? *J. Veget. Sci.*, 15: 495-504

Bímová K., Mandák B. in Pyšek P., 2003. Experimental study of vegetative regeneration in four invasive *Reynoutria* taxa (*Polygonaceae*). *Plant Ecol*, 166: 1-11

Blossey, B. in Nötzold, R., 1995. Evolution of increased competitive ability in invasive non-indigenous plants: a hypothesis. *Journal of Ecology*, 83: 887-889

Callaway R.M. in Aschehoug E.T., 2000. Invasive plants versus their new and old neighbors: a mechanism for exotic invasion. *Science*, 290: 521-523

Chytrý M., Wild J., Pyšek P., Tichý L., Danihelka J. in Knollová I., 2009. Maps of the level of invasion of the Czech Republic by alien plants. *Preslia*, 81: 187-207

Conolly A.P., 1977. The distribution and history in the British Isles of some alien species of *Polygonum* and *Reynoutria*. *Watsonia*, 11: 291-311

Darwin C., 1859. *On the origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. John Murray, London

Dermastia M., 2007. *Pogled v rastline*. Ljubljana: Nacionalni inštitut za biologijo. 237 str.

Dolenc Koce J., 2001. Ugotavljanje variabilnosti količine jedrne DNA pri standardnih rastlinskih vrstah in morskih kritosemenkah s slikovno citometrijo. Doktorska disertacija

Doležel J., 1997. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics*, 38 (3): 285-302

Drake J.A., 1990. The mechanics of community assembly and succession. *Journal of Theoretical Biology*, 147: 213-233

Eckert C.G., Lui K., Bronson K., Corradini P., Bruneau A., 2003. Population genetic consequences of extreme variation in sexual and clonal reproduction in an aquatic plant. *Molecular Ecology*, 12: 331-334

Frajman B., 2008. Japonski dresnik *Fallopia japonica*, Informativni list 1, Spletna stran tujerodne-vrste.info/informativni-listi/INF1-japonski-dresnik.pdf, Projekt Thuja. Datum dostopa: 27.08.2011

Greilhuber J., Ebert I., 1994. Genome size variation in *Pisum sativum*. *Genome*, 37: 646-655

Grime J.P., 1979. *Plant Strategies and Vegetation Processes*. Wiley, New York

Grimsby J.L. in Kesseli R., 2010. Genetic composition of invasive Japanese knotweed s.l. in the United States. *Biol Invasions*, 12: 1943-1946

Hayek A., 1908. *Flora von Steiermark*, Bd. 1

Hewitt G., 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405: 907-913

Hollingsworth M.L. in Bailey J.P., 2000. Hybridisation and clonal diversity in some introduced *Fallopia* species (*Polygonaceae*). *Watsonia*, 23: 111-121

Jogan N., 2006. Japonski dresnik (*Fallopia japonica*) – rastlina leta 2006. *Proteus*, 68/9-10: 437-440

Jogan, N., Bačič T., Frajman B., Leskovar I., Naglič D., Podobnik A., Rozman B., Strgulc Krajšek S., Trčak B., 2001. Gradivo za Atlas flore Slovenije, Center za kartografijo favne in flore. Miklavž na Dravskem polju

José L. Hierro, John L. Maron, Ragan M. Callaway, 2005. A biogeographical approach to plant invasions: the importance of studying exotics in their introduced and native range. *Journal of Ecology*, 93: 5-15

Kron P., Suda J. in Husband B.C., 2007. Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 38: 847-876

Kus Veenvliet J., Veenvliet P., Bačič T., Frajman B., Jogan N., Lešnik M., Kebe L., 2009. TUJERODNE vrste: priročnik za naravovarstvenike. Grahovo: Zavod Symbiosis. 45 str.

Leitch I.J. in Bennett M.D., 2007. Genome size and its uses: the impact of flow cytometry. V: Doležel J., Greilhuber J. in Suda J., uredniki. *Flow cytometry with plant cells*, p. 153-176, Wiley-VCH, Weinheim

Levin D.A., 2006. Ancient dispersals, propagule pressure, and species selection in flowering plants. *Syst. Bot.*, 31: 443-448

Mack R.N., Simberloff D., Lonsdale W.M., Evans H., Clout M. in Bazzaz F.A., 2000. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control. *Ecological Applications*, 10: 689-710

Mandák B., Bímová K., Pyšek P., Štěpánek J., Plačková I., 2005. Isoenzyme diversity in *Reynoutria* taxa: escape from sterility by hybridization. *Plant Syst Evol*, 253: 219-230

Mandák B., Pyšek P. in Bímová K., 2004. History of the invasion and distribution of *Reynoutria* taxa in the Czech Republic: a hybrid spreading faster than its parents. *Preslia*, 76: 15-64

Mandák B., Pyšek P., Lysák M., Suda J., Krahulcová K. in Bímová K., 2003. Variation in DNA-ploidy levels of *Reynoutria* taxa in the Czech Republic. *Ann Bot*, 92: 265-272

Maron J.L., Vilà M., Bommarco R., Elmendorf S. in Beardsley P., 2004. Rapid evolution of an invasive plant. *Ecological Monographs*, 74: 261-280

Rejmánek M., 1996. A theory of seed plant invasiveness: the first sketch. *Biol. Conserv.*, 78: 171-181

Strgar V., 1981. Genus *Reynoutria* v adventivni flori Slovenije. *Biološki vestnik*, 29(2): 121-136

Strgar V., 1982. Genus *Reynoutria* v adventivni flori Slovenije. *Biološki vestnik*, 30(2): 151-154

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

Suda J., Krahulcová A., Trávníček P., Rosenbaumová R., Peckert T. in Krahulec F., 2007. Genome size variation and species relationships in *Hieracium* subgen. *Pilosella* (Asteraceae) as inferred by flow cytometry. *Ann. Bot.*, 100: 1323-1335

Suda J., Trávníček P., Mandák B. in Berchová-Bímová K., 2010. Genome size as a marker for identifying the invasive alien taxa in *Fallopia* section *Reynoutria*. *Preslia*, 82: 97-106

Sukopp H. in Starfinger U., 1995. *Reynoutria sachalinensis* in Europe and in the far east: A comparison of the species ecology in its native and adventive distribution range. V: Pyšek P., Prach K., Rejmánek M. & Wade M., uredniki. *Plant invasions - general aspects and special problems*. Pp.151-159. S.P.B. Academic Publishing, Amsterdam

Sumner A.T., 1997. Microdensitometry – measurement of staining in cells. European Microscopy and Analysis (November): 9-10

Tajnik T., 2007. Razvoj metode za meritev velikosti genoma v rastlinskem materialu, nabranem na terenu. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana

Taylor C.M. in Hastings A., 2005. Allee effects in biological invasions. Ecol. Lett., 8: 895-908

Tiébré M.S., Vanderhoeven S., Saad L., Mahy G., 2007. Hybridization and Sexual Reproduction in the Invasive Alien *Fallopia* (*Polygonaceae*) Complex in Belgium. Annals of Botany, 99: 193-203

Vilhar B., Dermastia M., 2002. Standardisation of instrumentation in plant DNA image cytometry. Acta Bot. Croat., 61: 11-26

Vilhar B., Greilhuber J., Dolenc Koce J., Temsch E.A. in Dermastia M., 2001. Plant Genome Size Measurement with DNA Image Cytometry. Annals of Botany, 87: 719-728

Vreš B., 2007. *Fallopia* – dresnik, slakovec. V: Mala flora Slovenije: ključ za določanje praprotnic in semenk. Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Podobnik A., Turk B. in Vreš B. 4., dopolnjena in spremenjena izd. Ljubljana: Tehniška založba Slovenije. Str.: 211.

Vreš B., Jogan N., 2007. *Polygonaceae* – dresnovke. V: Mala flora Slovenije: ključ za določanje praprotnic in semenk. Martinčič A., Wraber T., Jogan N., Podobnik A., Turk B. in Vreš B. 4., dopolnjena in spremenjena izd. Ljubljana: Tehniška založba Slovenije. Str.: 205

Wilson J.R.U., Dormontt E.E., Prentis P.J., Lowe A.J. in Richardson D.M., 2008. Something in the way you move: dispersal pathways affect invasion success. Trends in Ecology and Evolution, Vol.24, No.3: 136-144

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem staršem, ki so mi omogočili študij v Ljubljani.

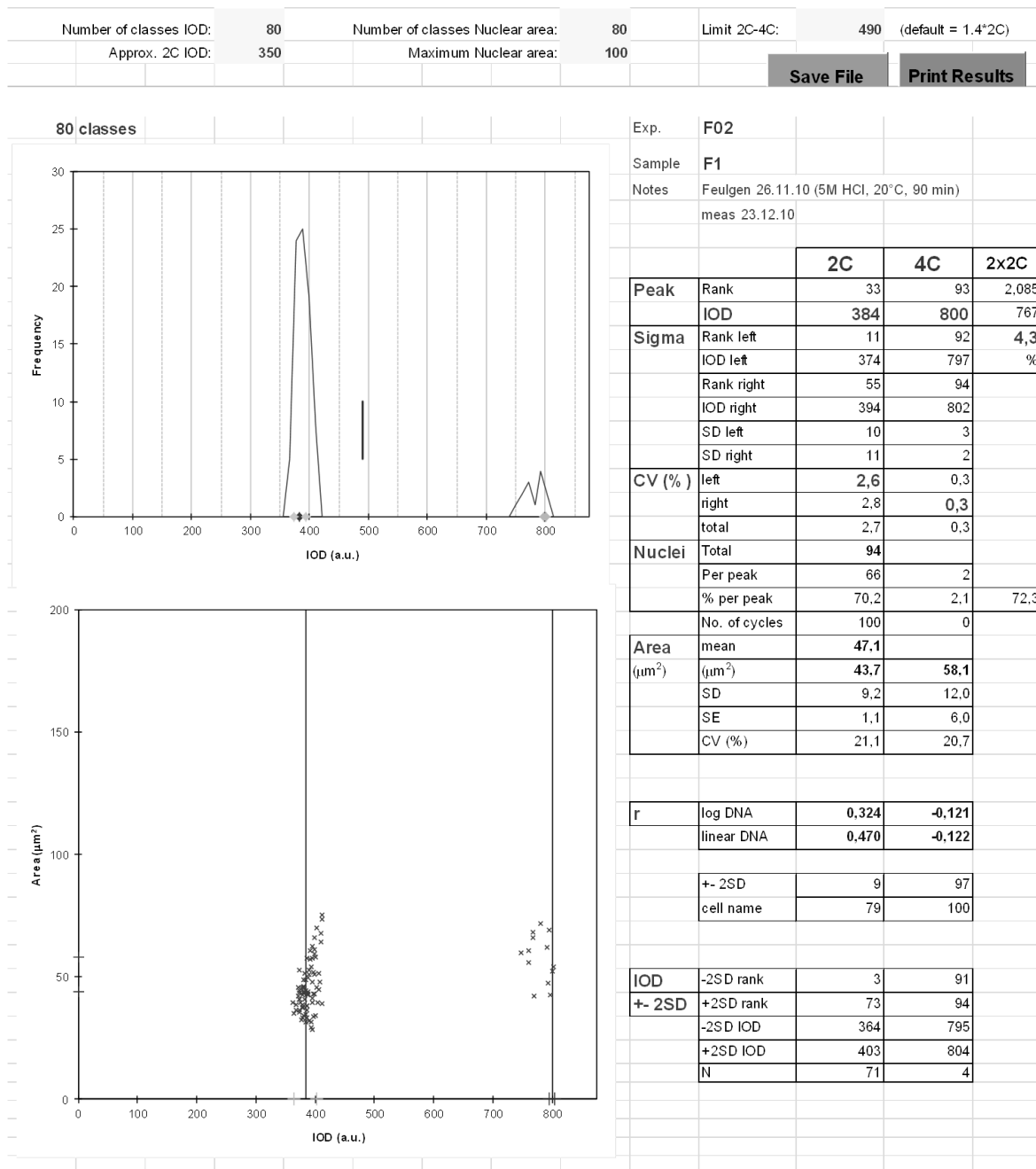
Ogromna zahvala gre mentorici doc. dr. Jasni Dolenc Koce in somentorici doc. dr. Simoni Strgulc Krajšek za vso njuno pomoč pri izdelavi diplomske naloge in vso posredovano znanje. Posebej bi se zahvalila, da sta mi omogočili udeležbo na 11. Mednarodni konferenci o ekologiji in upravljanju s tujerodnimi invazivnimi rastlinami na Madžarskem.

Zahvaljujem se vsem, ki so me v času nastajanja te naloge spodbujali in mi stali ob strani.

PRILOGE

Priloga A: Statistična obdelava posameznega vzorca

Prikazana je statistična obdelava izmerjenih vrednosti 1 preparata vzorca F02.



Priloga B: Statistična analiza velikosti jedrnega genoma materinskih rastlin

Prikazane so statistično obdelane vrednosti vseh 7 preparatov materinske rastline F02 in izračun iz arbitrarnih enot 2C-vrednosti (a.e.) v pg DNA ter končno povprečje velikosti jedrnega genoma vzorca F02 v pg DNA. Prikazani sta tudi vrednosti koeficienta variacije (CV) in standardne napake (SE).

Sample	ZC (a.u.)
1	7,35
2	6,37
3	7,12
4	6,82
5	6,89
6	6,60
7	7,21
Mean	6,91
SD	0,35
SE	0,13
CV (%)	5,00

Priloga C: Velikosti jedrnega genoma kalic

Preglednica 4. Velikosti jedrnega genoma kalic japonskega dresnika (*F. japonica* var. *japonica*). Prikazane so vrednosti 2C (pg DNA) za materinske rastline in za njihove kalice.

SN – standardna napaka, KV - koeficient variacije.

vzorec	F03	F04	F08	F10	F13	F14	F17	F21	F22	F27	F28	F36
materinska rastlina	9,86	9,41	9,73	8,62	9,55	9,57	9,56	9,10	9,17	9,38	9,41	9,04
kalica 1	8,73	10,33	8,19	7,93	8,66	8,34	11,01	7,90	7,17	ni kalic	ni kalic	ni kalic
kalica 2	10,38	9,74	8,66	6,15	9,74	8,24	7,65	11,92	6,52			
kalica 3	10,50	7,89	11,48	5,95	12,38	8,19	8,92	8,76	6,46			
kalica 4	7,78	8,04	8,90	6,63	8,30	8,47	8,64	8,50	6,84			
kalica 5	10,01	9,53	8,61	6,73	7,96	8,02	8,41	10,98	9,19			
kalica 6	9,82	8,45	11,25	6,25	9,60	8,15	7,69	8,18	6,67			
kalica 7	10,23	8,26	8,57	7,02	8,37	8,92	8,30	8,62	6,73			
kalica 8	6,94	6,54	7,77	6,31	8,82	8,31	8,66	8,90	7,01			
kalica 9	9,68	13,99	10,69	6,04	8,25	9,27	8,49	8,21	10,11			
kalica 10	9,43	11,43	8,47	5,99	9,01	7,68	8,63	8,67	10,25			
kalica 11	8,84	8,01	8,01		9,13	9,22	8,32	8,63	5,33			
kalica 12	10,29	8,60	11,56		12,70	8,78	8,60	8,51	7,47			
kalica 13	10,68	10,90	8,09		9,14	8,06		8,29				
kalica 14	9,54	6,80	8,88		8,71	8,69		8,51				
kalica 15	10,07	8,30	7,99		8,86	8,48		8,63				
kalica 16	10,20	10,50	11,17		12,03	8,17		8,65				
kalica 17	10,28	6,43	11,46		11,48	8,48		7,76				
kalica 18	10,43	7,63	8,53		9,16	7,91		8,44				
kalica 19	10,83		8,36			11,33		8,44				
kalica 20	9,59		8,39			8,35		8,59				
kalica 21	10,17		10,61			8,74		8,61				
kalica 22			6,52					9,03				
kalica 23			8,03					8,61				
povprečna vrednost	9,73	8,97	9,14	6,50	9,57	8,56	8,61	8,75	7,48			
SN	0,21	0,45	0,31	0,19	0,35	0,16	0,24	0,19	0,44			
KV(%)	9,91	21,51	16,06	9,44	15,69	8,80	9,81	10,38	20,57			

Preglednica 5. Velikosti jedrnega genoma kalic češkega dresnika (*F. x bohemica*).
Prikazane so vrednosti 2C (pg DNA) za materinske rastline in za njihove kalice. SN – standardna napaka, KV - koeficient variacije.

vzorec	F02	F05	F07	F09a	F09b	F12	F19	F24a	F24b	F25	F29
materinska rastlina	6,91	6,77	7,11	6,76	6,80	6,22	6,56	6,92	6,70	7,03	6,93
kalica 1	6,48	6,08	6,25		7,54	7,11	8,96	ni kalic	ni kalic	8,96	ni kalic
kalica 2	6,99	6,97			7,01	6,99	6,63			6,80	
kalica 3	6,53	6,98			9,99	7,19	6,04			9,26	
kalica 4	9,04	6,46			7,15		7,11			7,84	
kalica 5	7,60	5,92			7,08		6,10			7,22	
kalica 6	6,60	5,96			6,96		6,39			7,26	
kalica 7	10,22	6,32			8,91		6,87			7,06	
kalica 8	7,06	6,12			6,47		6,4			9,93	
kalica 9	6,53	9,74			6,78		6,85			7,62	
kalica 10	7,88	6,93			6,62		6,88			6,32	
kalica 11	7,15				6,84		7,05			6,24	
kalica 12	9,92				6,44					6,18	
kalica 13					6,50					7,31	
kalica 14										6,94	
kalica 15										10,62	
povprečna vrednost	7,67	6,75	6,25		7,25	7,10	6,84			7,70	
SN	0,39	0,36			0,29	0,06	0,24			0,35	
KV(%)	17,48	16,75			14,44	1,42	11,52			17,78	

Preglednica 6. Velikosti jedrnega genoma kalic sahalinskega dresnika (*F. sachalinensis*). Prikazane so vrednosti 2C (pg DNA) za materinsko rastlino in za njene kalice. SN – standardna napaka, KV - koeficient variacije.

vzorec	F16
materinska rastlina	4,30
kalica 1	6,02
kalica 2	5,45
kalica 3	5,77
kalica 4	5,56
kalica 5	5,4
kalica 6	6,54
kalica 7	4,30
kalica 8	5,73
kalica 9	5,21
kalica 10	5,26
kalica 11	6,19
kalica 12	5,49
kalica 13	5,75
kalica 14	5,61
kalica 15	5,79
kalica 16	5,49
povprečna vrednost	5,60
SN	0,12
KV(%)	8,71

Priloga Č: Poster za EMAPi

Poster, predstavljen na 11. Mednarodni konferenci o ekologiji in upravljanju s tujerodnimi invazivnimi rastlinami na Madžarskem (EMAPi).

Sexual Reproduction of Japanese Knotweed (*Fallopia japonica*) in Slovenia



Simona Strgulc Krajšek^{1*}, Tamara Erhatic², Sabina Vesnic³, Nejc Jogan¹, Jasna Dolenc Koce¹

¹ University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana, Slovenia; ² Dornavska cesta 18, SI-2250 Ptuj, Slovenia; ³ Beblerjev trg 12, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

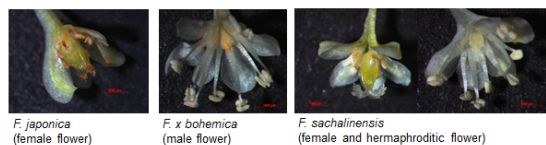
* Corresponding author: simona.strgulc@bf.uni-lj.si

Fallopia japonica (Polygonaceae) is known as one of the most noxious invasive plant species worldwide. Its vegetative reproduction is very well studied and is recognised as the main way of reproduction in invaded regions. It has been reported that all specimens of *F. japonica* in Europe belong to one extremely large clone of female plants (Hollingsworth 2000). In Slovenia *Fallopia japonica* is very common along rivers, railways, roads and in some other ruderal habitats. Less frequent is *Fallopia sachalinensis* with only few known scattered localities. For *F. x bohemica*, the hybrid between *F. japonica* and *F. sachalinensis*, only few data from central Slovenia were known, but it was expected to be much more frequent.

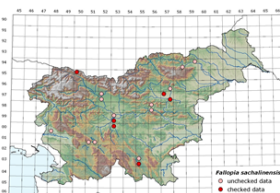
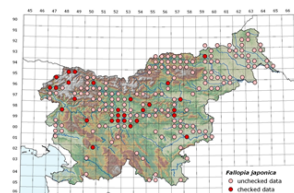
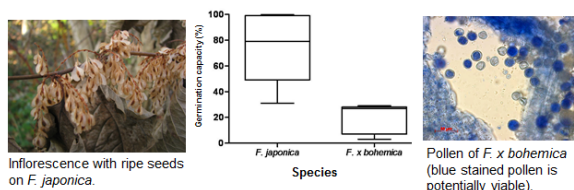


Young shoots of *F. japonica* in April growing from large rhizome hidden in the soil.

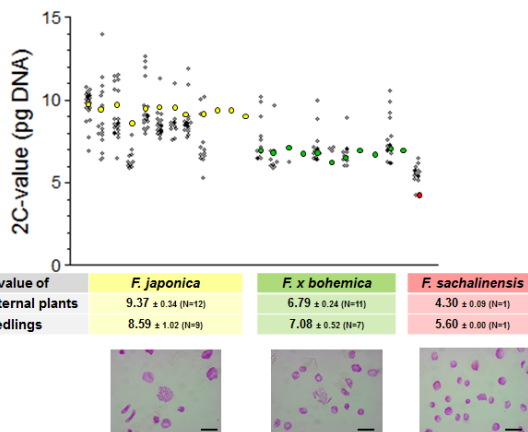
Flowering *F. x bohemica* in August.



Field observations have shown different amounts of seeds produced on *Fallopia* plants. *F. japonica* evidently produced more seeds in comparison to *F. sachalinensis* and *F. x bohemica*. We tested the **germination capacity** of seeds and analysed genome size of young seedlings to determine the source of pollen. The source of pollen for pollination of *F. japonica* flowers could be the hybrid (*F. x bohemica*), which has around 50 % of viable pollen grains, hermaphroditic plants of *F. sachalinensis* with almost 100 % of viable pollen grains or representatives of other *Fallopia* species that are present in Slovene flora (*F. baldschuanica*, *F. convolvulus*, *F. dumetorum*). The results of germination showed relatively high germination capacity of seeds from *F. japonica* and less successful germination of seeds from *F. x bohemica* and *F. sachalinensis*. Young seedlings have successfully overwintered in open air containers filled with soil.



Nuclear genome size was measured in maternal plants in shoot tips and in seedling roots with DNA image cytometry, using *Pisum sativum* as standard species. The results are in agreement with previously published data. Genome size mostly coincide with different ploidy levels known for hybrid *F. x bohemica* (hexaploid) and *F. x japonica* (octoploid). Additionally, an undefined group of seeds with higher values of genome size was observed which could be the result of copulation of different combinations of unreduced gametes and/or polyploidisation. The same situation was observed in seeds collected on *F. x bohemica* plants.



Genome size data are presented in the figure, showing 2C-values of 3 maternal species as coloured circles (*F. japonica* – yellow, *F. x bohemica* – green, *F. sachalinensis* – pink). 2C-values, measured in the seedlings of the same maternal plant, are shown as open diamonds.

In the table below the figure, average 2C-values ± SD are present (number of specimen is given as N in parenthesis).

Below the table, microscopic pictures of chromosomes and interphase nuclei are documented (bar represents 20 µm).

Distribution: Genome size measurements and morphological examinations of floral parts of *Fallopia* samples have shown that the presence of *F. x bohemica* was much underestimated. It looks that the hybrid is the most widespread *Fallopia* species in central Slovenia. *F. x bohemica* has mostly male flowers and only few flowers per plant with female fertile floral parts that could produce seeds. We have also confirmed presence of both types of *Fallopia* sachalinensis for flora of Slovenia – female and hermaphroditic plants, so *Fallopia sachalinensis* can be direct donor of pollen for pollinisation of *F. japonica*.

- References**
Bailey J.P., Bimova K., Mandak B. (2009): Asexual spread versus sexual reproduction and evolution in Japanese Knotweed s.l. sets the stage for the 'Battle of the Clones'. *Biol. Invasions* 11: 1189-1203.
Hollingsworth L.M., Bailey P.J. (2000): Evidence for massive clonal growth in the invasive weed *Fallopia japonica* (Japanese Knotweed). *Botanical Journal of the Linnean Society* 133: 463-472.
Jogan N., T. Bačić, B. Frajman, I. Leskovan-Samar, D. Nagič, A. Podobnik, B. Rozman, S. Strgulc-Krajšek, B. Tršák (2001): Gradivo za atlas flore Slovenije. Center za kartografijo flore in flore, Miklavž na Dravskem polju, 443 Pp.
Suda J., Travníček P., Mandak B., Berchova-Bimova K. (2010): Genome size as a marker for identifying the invasive alien taxa in *Fallopia* section *Reynoutria*. *Preslia* 82: 97-106.
Taher M.-S., Vanderhoeven S., Saad L., Mahy G. (2007): Hybridisation and sexual reproduction in the invasive alien *Fallopia* (Polygonaceae) complex in Belgium. *Annals of Botany* 99: 193-203.
Vrščina B., Jogan N. (2007): 35. družina: Polygonaceae – dresnikovci. In: A. Martičič (ur.): Mala flora Slovenije, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana, pp. 412-414.

Priloga D: Seznam lokalitet

Japonski dresnik

- vzorec: F03-BLED

Slovenija, Gorenjska, Bled, Zagorica, ob Koritenski cesti, za drvarnico stanovanjske hiše, grmovje na bregu, 9650/2, leg: 20.4.2010, S. Strgulc Krajšek

- vzorec: F04-LESCE

Slovenija, Gorenjska, Lesce, ob cesti Lesce – Bled nad hipodromom, ruderalno mesto ob cesti, 9650/2, leg: 20.4.2010, S. Strgulc Krajšek

- vzorec: F08-STANEŽIČE

Slovenija, Ljubljana, Stanežiče, ob glavni cesti Medvode – Ljubljana na križišču s cesto za Stanežiče, ruderalno mesto ob cesti, 9852/4, leg: 20.4.2010, S. Strgulc Krajšek

- vzorec: F10-KAMNIK

Slovenija, Gorenjska, Kamnik, Zgornje Perovo, za bencinsko črpalko ob odcepu za Zg. Perovo z glavne ceste, ruderalno mesto ob cesti, 9753/4, leg: 24.6.2010, S. Strgulc Krajšek

- vzorec: F13-ZIDANI MOST

Slovenija, Posavje, Zidani Most, ob cesti Zidani Most – Radeče med podvozoma pod železniško progo, ruderalno mesto ob cesti, 9957/1, leg: 11.4.2010, M. Škornik

- vzorec: F14-ŠIRJE

Slovenija, Posavje, Zidani Most, ob cesti Zidani Most – Širje, med cesto in Savinjo, pod blokom s hišno številko Zidani Most 35, ruderalno mesto ob cesti, 9957/1, leg: 11.4.2010, M. Škornik

- vzorec: F17-DOBROVA

Slovenija, Ljubljanska kotlina, Dobrova pri Ljubljani, ob reki Gradaščici vzhodno od mosta čez Gradaščico med Dobrovo in Šujico, rob travnika ob reki, 9952/2, leg: 6.4.2010, S. Strgulc Krajšek

- vzorec: F21-RIBČE

Slovenija, Zasavje, Ribče (naselje ob cesti Ljubljana-Litija), ob reki Savi, travniki ob Savi, 9854/4, leg: 27.9.2010, N. Jogan

- vzorec: F22-KRESNICE

Slovenija, Zasavje, Kresnice (naselje ob cesti Ljubljana-Litija), ob reki Savi, travniki ob Savi, 9854/4, leg: 27.9.2010, N. Jogan

- vzorec: F27-BF-MOSTIČEK

Slovenija, Ljubljana, ob Večni poti, ob potoku Glinščica ob mostičku čez Glinščico vzhodno od Biotehniške fakultete, 9952/2, leg: 15.4.2010, S. Strgulc Krajšek, S. Anžlovar

- vzorec: F28-BF-KOLESARSKA

Slovenija, Ljubljana, ob Večni poti, ob potoku Glinščica zahodno od mostička čez Glinščico vzhodno od Biotehniške fakultete, 9952/2, leg: 15.4.2010, S. Strgulc Krajšek, S. Anžlovar

- vzorec: F36-SP.LOKE

Slovenija, Posavsko hribovje, Krašnja, Spodnje Loke, mejica, 9854/2, leg: 24.6.2010, S. Strgulc Krajšek

Češki dresnik

- vzorec: F02-KOKRICA

Slovenija, Gorenjska, Kranj, Naklo, na odcepu s ceste Kranj - Naklo za gorenjsko avtocesto (Kranj Zahod), ruderalno mesto ob cesti, 9752/1, 20.4.2010, S. Strgulc Krajšek

- vzorec: F05-KRANJ

Slovenija, Gorenjska, Kranj, Savski otok, levi breg reke Save, rečni breg, 9752/3, 20.4.2010, S. Strgulc Krajšek

- vzorec: F09-ŠENTVID

Slovenija, Ljubljana, Šentvid, Poljane, ruderalno mesto ob cesti v naselju, 9952/2, leg: 20.4.2010, S. Strgulc Krajšek

- vzorec: F07-MEDVODE

Slovenija, Gorenjska, Medvode, Jeprca, Ob peščenem parkirišču ob glavni cesti Jeprca – Medvode ob gramoznici, ruderalno mesto ob parkirišču, 9852/1, leg: 20.4.2010, S. Strgulc Krajšek

- vzorec: F12-TRZIN

Slovenija, Ljubljanska kotlina, Trzin, pri križišču cest za Mengeš in Domžale, ob prehodu čez železniško progo, ruderalno mesto med cesto in železniško progo, 9853/3, leg: 24.6.2010, S. Strgulc Krajšek

- vzorec: F19-SENOŽETI

Slovenija, Zasavje, Senožeti (naselje ob cesti Ljubljana -Litija), ob reki Savi, travniki ob Savi, 9954/1, leg: 27.9.2010, N. Jogan

- vzorec: F24-BF

Slovenija, Ljubljana, ob Večni poti, ob potoku Glinščica ob ograji Biotehniške fakultete, rob reguliranega potoka Glinščica, 9952/2, leg: 15.4.2010, S. Strgulc Krajšek, S. Anžlovar

- vzorec: F25-BF-GOZDARSTVO

Slovenija, Ljubljana, ob cesti Rožna Dolina cesta XV, 100 m od križišča z Večno potjo, V od Oddelka za gozdarstvo BF, ruderalno mesto ob cesti v naselju, 9952/2, leg: 15.4.2010, S. Strgulc Krajšek, S. Anžlovar

- vzorec: F29-ROŽNA DOLINA

Slovenija, Ljubljana, Rožna dolina, opuščeno ruderalno zemljišče med cestama Rožna dolina VI in Rožna dolina cesta XVII, 9952/4, leg: 15.4.2010, S. Strgulc Krajšek, S. Anžlovar

Sahalinski dresnik

- vzorec: F16-IG

Slovenija, rob Ljubljanskega barja, Ig, Pungrt, rob travnika (jase) JV od gradu z ženskim zaporom, rob travnika, 0053/1, leg: 27.9.2010, S. Strgulc Krajšek, B. Dolinar