

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Julija JAKOPIN

**VZPOSTAVITEV TKIVNE KULTURE VEČIH
GENOTIPOV MINIATURNIH VRTNIC TER
INDUKCIJA CVETENJA *IN VITRO***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Julija JAKOPIN

**VZPOSTAVITEV TKIVNE KULTURE VEČIH GENOTIPOV
MINIATURNIH VRTNIC TER INDUKCIJA CVETENJA IN *VITRO***

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**ESTABLISHMENT OF DIFFERENT GENOTYPES OF MINIATURE
ROSE TISSUE CULTURE AND INDUCTION OF FLOWERING IN
*VITRO***

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2017

" Kdor želi videti, mora gledati s srcem.
Bistvo je očem nevidno. "

Mali princ, Anthoine Saint-Exupery

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje Biotehnologija. Delo je bilo opravljeno na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin.

Študijska komisija je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. prof. dr. Boruta Bohanca.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Borut BOHANEČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek agronomijo

Članica: prof. dr. Marjana REGVAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je magistrsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Julija Jakopin

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 582.639.11: 57.086.83: 631.547.47 (043.2)
KG	<i>in vitro</i> metode/ tkivne kulture/ vrtnica/ mikropropagacija/ rastlinski rastni regulatorji
AV	JAKOPIN, Julija
SA	BOHANEK, Borut (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Magistrski študijski program druge stopnje Biotehnologija
LI	2017
IN	VZPOSTAVITEV TKIVNE KULTURE VEČIH GENOTIPOV MINIATURNIH VRTNIC TER INDUKCIJA CVETENJA <i>IN VITRO</i>
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP	X, 55, [5] str., 6 pregl., 25 sl., 4 pril., 56 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Proučevali smo postopek mikropropagacije štirih genotipov miniaturnih vrtnic z namenom indukcije cvetenja znotraj posodic za <i>in vitro</i> gojenje. Za vsako fazo rasti smo pripravili MS gojišča z koncentracijami 0-0,4 mg/l NAA in 0-3 mg/l BAP, 0-0,2 mg/l GA₃ ter 30-50 g/l saharoze. S pomočjo meritev dolžin poganjkov in opazovanj smo poskusili ugotoviti optimalno kombinacijo rastnih regulatorjev. Najvišjo stopnjo indukcije poganjkov smo dosegli pri koncentraciji 0,1 mg/l NAA in ugotovili, da povečanje koncentracije negativno vpliva na indukcijo poganjkov. Povečana koncentracija BAP je povzročila zmanjšanje dolžine poganjkov, vendar pa so skupki tvorili številne aksilarne poganjke. Hiperhidracija se je pojavila gojiščih z 2 mg/l in 3 mg/l BAP ter 0.1 mg/l NAA. Ugotovili smo, da GA₃ pozitivno vpliva na rast poganjkov vrtnic. Povišana koncentracija saharoze od 30-50 g/l je ugodno vplivala na rast poganjkov. Uspešno nam je zacvetelo več izsečkov vrtnic, vendar s pomočjo rezultatov težko ugotovimo korelacijo s sestavo gojišča. Predstavili smo tudi več oblik vsebnikov, ki bi zaradi svoje estetske funkcije lahko bili primerni za trženje. Menimo, da imajo tovrstni primerki ugoden tržni potencial, saj predstavljajo konkurenčno priložnost zaradi enostavne uporabe, vendar bi bilo za tržno uporabo potrebno opraviti še dodatne raziskave.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
 DC UDC 582.639.11: 57.086.83: 631.547.47 (043.2)
 CX *in vitro* methods/ tissue culture/ roses/ micropropagation/ plant growth regulators
 AU JAKOPIN, Julija
 AA BOHANEČ, Borut (supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programme in Biotechnology
 PY 2017
 TI ESTABLISHMENT OF DIFFERENT GENOTYPES OF MINIATURE ROSE
 TISSUE CULTURE AND INDUCTION OF FLOWERING *IN VITRO*
 DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
 NO X, 55, [5] p., 6 tab., 25 fig., 4 ann., 56 ref.
 LA sl
 AL sl/en
 AB The process of micropropagation of multiple genotypes of miniature roses for induction of *in vitro* flowering was studied. For each phase growth phase MS medium with the concentrations of 0-0.4 mg / l NAA and 0-3 mg / l BAP, 0-0.2 mg / l GA₃, and 30-50 g/l of sucrose was prepared. Using direct shoot length measurements and observations the optimal concentration of media components for each growth phase was determined. The highest level for induction of the shoots was shown at 0.1 mg / l NAA, and increasing the concentration had a negative effect on the induction of shoots. Increased concentration of BAP (2-3 mg/l) caused a reduction in the length of the stems, but explants formed several axillary shoots. GA₃ showed a positive effect on multiplication and elongation of shoots as well as increasing concentration of sucrose (30-50 g/l) had a positive effect on the growth of shoots. *In vitro* plant flowering was induced, but it is difficult to determine the correlation with the composition of the media. Also several types of containers with emphasis on aesthetic features were designed, that may be eligible for marketing, since they represent a competitive advantage over existing solutions.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 CILJI DELA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINA IN ŽLAHTNJENJE VRTNIC	3
2.1.1 Zgodovina vrtnic	3
2.1.2 Žlahtnjenje vrtnic	3
2.2 <i>IN VITRO</i> MIKROPROPAGACIJA VRTNIC	4
2.3 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA <i>IN VITRO</i> CVETENJE	5
2.3.1 Endogeni dejavniki	5
2.3.2 Eksogeni dejavniki	6
2.4 PREGLED RAZISKAV CVETENJA <i>IN VITRO</i>	7
2.5 RAZISKAVE REGULACIJE CVETENJA PRI VRTNICAH	10
2.6 SESTAVA GOJIŠČ ZA MIKROPROPAGACIJO <i>IN VITRO</i>	11
2.6.1 Mikro in makroelementi	11
2.6.2 Rastlinski rastni regulatorji	12
2.6.3 Vitamini	17
2.6.4 Ogljikovi hidrati	17
2.6.5 Zgoščevalci	18
2.7 TRŽNA UPORABA <i>IN VITRO</i> CVETOČIH POGANJKOV	18
2.7.1 Trgovanje okrasnih rastlin	18
3 MATERIAL IN METODE	22
3.1 POSTOPEK MIKROPROPAGACIJE TKIVNIH KULTUR	22
3.2 RASTLINSKI MATERIAL	22
3.2.1 Priprava matične rastline	23
3.2.2 Pogoji vzgoje	24
3.3 RAZKUŽEVANJE RASTLINSKEGA MATERIALA	24
3.3.1 Sterilizacija rastlinskega materiala	24
3.3.2 Sterilizacija pripomočkov	24
3.4 INDUKCIJA AKSILARNIH POGANJKOV	25
3.5 MIKROPROPAGACIJA <i>IN VITRO</i>	25

3.6	GOJIŠČA	26
3.6.1	Postopek priprave gojišč	26
3.6.2	Sestava gojišč	28
3.7	DOLOČANJE DOLŽINE POGANJKOV	29
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	29
4.1	VZPOSTAVITEV TKIVNE KULTURE	29
4.2	VPLIV NAA NA RAST INDUCIRANIH POGANJKOV	30
4.3	VPLIV BAP NA RAST INDUCIRANIH POGANJKOV	32
4.4	VPLIV GIBERELINSKE KISLINE NA RAST INDUCIRANIH POGANJKOV	35
4.5	VPLIV SAHAROZE NA RAST IN CVETENJE INDUCIRANIH POGANJKOV	37
4.6	INDUKCIJA CVETENJA <i>IN VITRO</i>	40
4.7	OBLIKOVANJE VSEBNIKOV	41
4.7.1	Tveganja in omejitve	42
4.7.2	Razlogi in načini uporabe	43
4.7.3	Ciljna skupina uporabnikov	43
5	SKLEPI	47
6	POVZETEK (SUMMARY)	48
6.1	POVZETEK	48
6.2	SUMMARY	50
7	VIRI	52
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam pogostih rastlinskih rastnih regulatorjev v tkivnih kulturah	14
Preglednica 2: Pregled posameznih gojišč s koncentracijami rastnih regulatorjev, saharoze, MS in agarja	27
Preglednica 3: Sestava MS + vitamini	28
Preglednica 4: Vpliv koncentracije giberelinske kisline na rast skupkov v obdobju enega meseca	35
Preglednica 5: Vpliv koncentracije saharoze na dolžino skupkov in rast	37
Preglednica 6: Prikaz sestave gojišč in uspešnost indukcije cvetenja	40

KAZALO SLIK

Slika 1: Primer <i>in vitro</i> cvetoče miniaturne vrtnice	1
Slika 2: Kemijske strukture avksinov: levo zgoraj – IAA , desno zgoraj - NAA, levo spodaj - IBA, desno spodaj - 2,4-D	14
Slika 3: Kemijske strukture citokininov: levo zgoraj – zeatin, desno zgoraj – BAP, levo spodaj – m-topolin, desno spodaj – TDZ	16
Slika 4: Kemijska struktura GA ₃	16
Slika 5: Prikaz gibanja industrijskih prihodkov od leta 2002 do 2015 v milijonih ameriških dolarjev	19
Slika 6: Grafični prikaz deležev izvoza cvetja po posameznih državah	20
Slika 7: Prikaz razmerij med posameznimi segmenti znotraj tržišča	20
Slika 8: Porazdelitev porabe sredstev za nakup notranjih rastlin po državah	21
Slika 9: Prikaz posameznih faz mikropropagacije	22
Slika 10: Primeri matičnih, zdravih in neokuženih rastlin	23
Slika 11: Prikaz stebela s označenimi dormantnimi aksilarni meristemi	24
Slika 12: Izsečki na trdnem gojišču za indukcijo aksilarnih meristemov	25
Slika 13: Izgled izsečkov v zgodnji fazi mikropropagacije	26
Slika 14: Vpliv koncentracije NAA na delež indukcije poganjkov iz izsečkov	30
Slika 15: Vpliv koncentracije NAA [mg/l] na dolžino induciranih poganjkov [cm]	31
Slika 16: Prikaz izsečkov na gojišču, ki vsebuje 0,2 mg/l NAA, 3 mg/l BAP, 3 % saharoze, MS in 7 g/l agar. Pri manjšem izsečku vidimo razvoj kalusa	32
Slika 17: Vpliv koncentracij BAP [mg/ml] na dolžino induciranih poganjkov [cm]	33
Slika 18: Vpliv koncentracije BAP na indukcijo poganjkov iz izsečkov	33
Slika 19: Prikaz rasti na gojišču, ki vsebuje 3 mg/l BAP, 0.1 mg/l NAA, 3 % saharoze, MS in 7 g/l agar	34
Slika 20: Videz izsečkov na gojišču, ki vsebuje 0,2 mg/l GA ₃	36
Slika 21: Videz izsečkov, ki vsebuje 0,2 mg/l GA ₃	36
Slika 22: Levo izgled izsečkov, ki so rastli na gojišču z 3 % saharoze, 3 mg/l BAP, 0.1 NAA, MS + vitamini, 7 g/l agar desno - primer cvetnega nastavka, ki kaže znake izsuševanja	38
Slika 23: Izgled izsečkov, ki so rastli in tvorili cvetne nastavke na gojišču z 4 % saharoze, 3 mg/l BAP, 0.1 NAA, MS + vitamini, 7 g/l agar	39
Slika 24: Primerki <i>in vitro</i> cvetočih vrtnic ter izseček s korenino	39
Slika 25: Prikaz različnih oblik vsebnikov	44

KAZALO PRILOG

Priloga A: Rezultati meritev dolžin poganjkov

Priloga B: Kratka predstavitev

Priloga C: World floriculture map 2015, Rabobank, Nizozemska

Priloga D: Primeri genotipov vrtnic

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

MS	Murashige & Skoog
BAP	6-benziladeninpurin
NAA	1-naftalenocetna kislina
DICA	natrijeva sol dikloroizocianurne kisline
GA ₃	giberelinska kislina
IAA	indol-3-ocetna kislina
2,4-D	2,4-diklorofenoksiocetna kislina
IBA	indol-3-maslina kislina
DIY	do it yourself (angl. 'naredi si sam')
SAM	apikalni meristem (angl. shoot apical meristem)
FM	cvetni meristem (angl. flowering meristem)

1 UVOD

In vitro cvetenje lahko pojasni ključne vplive procesa cvetenja s sočasnim nadzorovanim okoljem in aplikacijo rastlinskih rastnih hormonov. Medtem, ko se večina *in vitro* mikropropagacijskih metod osredotoča na vegetativno stopnjo rastlin, lahko nastanek cvetov *in vitro* med drugim ponudi tudi modelni sistem za iniciacijo in raziskave razvoja cvetov, ki je do zdaj še zelo neraziskan. Uspešno vzpostavljen protokol za *in vitro* cvetenje z uporabo rastlinskih rastnih regulatorjev, kot so citokini, giberelini in avksini, lahko tako služi kot pomembno orodje za nadaljnje raziskave indukcije cvetenja, iniciacije in razvoja cvetnih organov. Zaradi dolge vegetativne dobe, ki je značilna za vrtnice je *in vitro* mikropropagacija uporabna tudi pri žlahtniteljskih postopkih, predvsem zaradi visoke frekvence mutacij (Zeng in sod., 2013).

V tej nalogi želimo optimizirati sestavo gojišča in pogoje vzgoje ter ugotoviti kakšen komercialni potencial na trgu imajo cvetoči, miniaturni *in vitro* poganjki vrtnic (slika 1).



Slika 1: Primer *in vitro* cvetoče miniaturne vrtnice

Menimo, da je mogoče izzvati *in vitro* cvetenje v tkivni kulturi vrtnic in da so lahko cvetoči poganjki primerni za trženje, saj tovrstnih izdelkov do zdaj še ni na našem tržišču. V tem delu poskušamo ugotoviti najbolj ugodne pogoje in hranila za indukcijo *in vitro* cvetenja vrtnice s pomočjo določanja dolžine poganjkov, spreminjanjem sestave gojišča za pomnoževanje, koncentracije glukoze, rastnih regulatorjev in mineralov v gojišču.

1.1 CILJI RAZISKOVANJA

Osnovni namen naloge je proučiti možnosti izvedbe celovitega postopka mikropropagacije večih genotipov miniaturnih vrtnic z namenom indukcije cvetenja znotraj posodic za *in vitro* gojenje. Želimo vzpostaviti optimalne pogoje za inokulacijo, tvorbo skupkov poganjkov, izdolževanje in indukcijo cvetnih brstov. Namen dela je pripraviti cvetoče poganjke, ki bi imeli tržno vrednost. Poleg optimizacije postopka tkivnih kultur želimo tudi proučiti več oblik vsebnikov, ki bi zaradi svoje poudarjene estetske funkcije lahko bili primerni za trženje.

1.2. DELOVNE HIPOTEZE

- mogoča je vzpostavitev tkivne kulture izbranih genotipov vrtnic
- možno je optimizirati gojišča za razmnoževanje poganjkov
- pričakujemo različen odziv in nezaželjene pojave
- predvidevamo, da je mogoče izzvati *in vitro* cvetenje
- možno je omogočiti prenos skupkov poganjkov v tržno oblikovane vsebnike

Predvidevamo, da bo mogoča vzpostavitev tkivne kulture izbranih genotipov vrtnic in da bo mogoče optimizirati gojišča za razmnoževanje poganjkov. V tej fazi pričakujemo različen odziv genotipov ter možnost nezaželenih pojavov (hiperhidracija, ekstremno razraščanje, itd.), kar želimo spremljati in iskati ustrezne rešitve. Predvidevamo, da bo mogoče izzvati *in vitro* cvetenje in s tem omogočiti prenos skupkov poganjkov v tržno oblikovane posodice.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA IN ŽLAHTNENJE VRTNIC

2.1.1 Zgodovina vrtnic

Vrtnica je od nekdaj imela močan romantičen vtis in čeprav so številne rastline enako lepe in dišeče, pa ravno decentna in subtilna nežnost ter težavnost njene vzgoje dodajata k njeni privlačnosti (Taylor, 2014).

Zgodovina vrtnic je dolga. Je mešanica Zahodne in Kitajske kulture, saj njen izvor izvira iz časov, ko so evropski raziskovalci odhajali na Kitajsko po svilo, vrnili pa so se s primerki vrtnic, ki jih do takrat še niso videli. Posledica tovrstnih odkritij so bili tudi novi hibridi vrtnic, ki so postavili temelje za nove oblike trgovanja z rastlinami, med drugim tudi za današnji integrirani sistem cvetličarn in vrtnih centrov. Večino vrtnic so prvotno gojili v posodah in šele nato v okrasnih vrtovih. Tradicija uporabe vrtnic obstaja še iz antičnih časov, ko so jih Rimljani uporabljali v dekorativne, parfumske in medicinske namene. Tudi kasneje, med drugo svetovno vojno, ko se je Anglija soočala s pomanjkanjem vitamina C, so uporabili šipkov sirup kot nadomestek limon. Med drugim imajo skoraj vse evropske države vsaj eno izmed legend o vrtnici. Tako je v Franciji dobro znan *Le roman de la rose*. Pa tudi v Aziji, na Kitajskem, kjer verjamejo, da vrtnica povzema pomen življenja (Taylor, 2014).

2.1.2 Žlahtnenje vrtnic

Vrtnica je ena izmed pomembnejših komercialno uporabnih okrasnih rastlin. Je zelo priljubljena predvsem zaradi različnih barv, oblik, atraktivnega vonja in dalj časa trajajočega socvetja, kar pa se odraža tudi v kompleksnih žlahtniteljskih programih in opraševanju (Zeng in sod., 2013).

Število vrst po svetu je med 100 in 200, čeprav ni usklajenega dogovora o točni številki, saj so meje med posameznimi vrstami zabrisane. Poznamo številne vrste iz Zahodne in Centralne Azije ter Evrope, manjše število iz Severne Amerike ter nekaj primerkov iz Indije. Največ vrst izvira prav iz Azije, med drugim Himalaje, Kitajske in Japonske. Zgodovinske pomembnejše so predvsem *R. sempervirens*, *R. moschata*, *R. setigera* iz katerih so nastale bolj znane sorte kot sta Rosa 'Blush Noisette' in Rose 'Champney's Pink Cluster' (Taylor, 2014).

Vrtnica uspeva v bolj zmernih, severnih krajih. Paleontologi so našli fosile stare 35.000.000 let v krajih, kot sta Oregon in Washington, medtem ko niso odkrili nobene avtohtone v Afriki ali Avstraliji. Eden izmed naravno prisotnih hibridov je *Rosa x damascena* Mill, ki jo najdemo v Vzhodni Evropi in Zahodni ter Centralni Aziji. Ima velik

ekonomski pomen, saj jo vzgajajo zaradi aromatičnih venčnih listov. Venčni listi so destilirani v eterično olje, ki se v angleščini imenuje *rose otto* ali *rose attar* (beseda *attar* izhaja iz arabske besede in pomeni parfumist, lekarnar). Venčni listi vsebujejo hlapna olja kot so beta-damascenon, beta-damascon, beta-ionon in druge. Industrija ima dolgo tradicijo (od leta 1000 n.š.) in uporablja večino (80 %) surovin iz Bolgarije (Bendahmane in sod., 2013).

Ena glavnih težav žlahtnjenja novih sort vrtnic je pomanjkljiva alelna variabilnost, ki predstavlja omejitev pri hibridizaciji tarčnih alelov iz divjih tipov na račun poliploidne bariere. Več kot polovica divjih tipov je poliploidov (Vamosi in Dickinson, 2006) in sicer od $2n = 2x = 14$ do $2n = 8x = 56$ (Rogers, 2009) in tudi trajni pentaploidi kot na primer *Rosa canina*, za katero je značilna nenavadna asimetrična mejoza (Lim in sod., 2005 in Kovarik in sod., 2008). Kariotipizacija vrste *Rosa prealucens* iz himalajske regije je prikazala tudi dekaploidnost, kar je najvišja odkrita ploidnost vrtnic do zdaj (Bendahmane in sod., 2013). Nedavna študija namiguje na možne evolucijske mehanizme, ki spreminjajo ploidnost kot odziv na različne okoljske dejavnike, kot na primer izpostavljenost visokim temperaturam (Jian in sod., 2010). Glede na raziskave je primerna strategija, da presežemo poliploidno bariero in hibridiziramo tarčne divje alele v sodobne kultivarje, lahko tudi manipulacija temperature (Pécirix in sod., 2011).

2.2 IN VITRO MIKROPROPAGACIJA VRTNIC

Danes se vrtnice vzgajajo po celem svetu, kot rezano cvetje, lončnice in za dekoracijo vrta. Večinoma se za razmnoževanje vrtnic uporablja vegetativno razmnoževanje, medtem ko se semena uporabljajo za razmnoževanje vrste, vzgojo novih kultivarjev ali kot podlaga za cepiče (Wang in sod., 2002).

Glavna omejujoča dejavnika *ex vivo* vegetativnih metod sta predvsem počasno pomnoževanje in sezonska nihanja. In čeprav je kljub temu vegetativno razmnoževanje dominantna tehnika, ne zagotavlja zdravih in neokuženih rastlin. Ravno zato je v zadnjih letih *in vitro* propagacija sprožila revolucijo v komercialni vzgoji rastlin (Pati in sod., 2005).

Glavne prednosti tehnike *in vitro* so:

- neomejeno pomnoževanje,
- relativno kratek generacijski čas,
- proizvodnja zdravih in neokuženih rastlin,
- možnost proizvodnje skozi celo leto.

Medtem, ko se večina *in vitro* mikropropagacijskih metod osredotoča na vegetativno stopnjo rastlin pa lahko nastanek cvetov *in vitro* ponudi modelni sistem za iniciacijo in

raziskave razvoja cvetov, ki je do zdaj še zelo neraziskan. Prav tako prav je lahko tudi uporaben v *in vitro* žlahtnenju, zaradi visoke frekvence mutacij, ki je uporabna pri vrstah z dolgo vegetativno dobo (Zeng in sod., 2013).

Pod naravnimi ravnimi pogoji se prehod med vegetativno v reproduktivno fazo (cvetenje) pri rastlini zgodi po izgubi juvenilnosti. Cvetenje je tako obravnavano kot kompleksen proces, ki je reguliran s kombinacijo genetskih in okolijskih dejavnikov, kot so rastlinski rastni hormoni, ogljikovi hidrati, svetloba in pH gojišča. Načrtno cvetenje v kulturah lahko služi kot orodje za študije indukcije in razvoja cveta, kot tudi žlahtnjiteljskim programom, ki uporabljajo vrste z dolgo juvenilno dobo. Prav tako lahko postavi podlago za *in vitro* nastanek ploda, ki je metoda za raziskave fiziologije plodov in razvoja semen pod *in vitro* pogoji. *In vitro* cvetenje lahko tudi zmanjša vpliv zunanjih dejavnikov in pojasni ključne vplive procesa cvetenja z nadzorovanimi okolijskimi pogoji in uravnava aplikacijo rastlinskih rastnih hormonov (Awal in sod., 2013).

In vitro mikropropagacija vrtnic ima zelo pomembno vlogo v hitrem razmnoževanju kultivarjev z željenimi lastnostmi in produkcijo zdravih in neokuženih rastlin. Tekom zadnjih let so bili predstavljeni različni pristopi v literaturi. Predvsem mikropropagacija z uporabo apikalnih vršičkov ali nodalnih segmentov in razumevanje določenih potreb v različnih stopnjah razvoja (Carelli in Echeverrigaray, 2001). Kljub temu, da je več študij izvedenih o mikropropagaciji vrtnic, ki proučuje različne vidike na pomnoževanje, je komercialna uporaba tehnike omejena, predvsem zaradi nasprotujočih si rezultatov in nizke stopnje pomnoževanja pomembnejših kultivarjev (Moallem in sod., 2012).

2.3 DEJAVNIKI, KI VPLIVAJO NA *IN VITRO* CVETENJE

Sposobnost izsečkov, da oblikujejo cvetove *in vitro* je odvisna od številnih dejavnikov, tako zunanjih kot notranjih, kemijskih in fizikalnih, s katerimi so vsi medsebojno povezani v različnih kompleksnih in težko predvidljivih načinih.

2.3.1 Endogeni dejavniki

Cvet se razvije iz apikalnega meristema in vsebuje reproduktivne celice višjih rastlin. Pri večini rastlin okolje kontrolira (dolžina dneva in temperatura) prehod iz apikalnega v cvetni meristem. Kompleksni mehanizmi vzorčijo cvet, da nastanejo venčni in čašni listi ter prašniki in pestič. Tri razredi genov so vpletni v osnovno vzorčenje cveta: geni odgovorni za nastanek organov, kadastralni geni (določijo meje genske ekspresije značilne za posamezne organe) in meristem identifikacijski geni (pretvorijo apikalnega v cvetni meristem). Apikalni meristem se pretvori v socvetni meristem, ki lahko tvori enega ali več cvetnih meristemov. Razvoj cvetnih organov izhaja iz diferenciacije in povečanja celic cvetnega meristema. Štiri koncentrične strukture tvorijo cvetni meristem: čašni listi, venčni

listi, prašniki in pestič. Homeotične mutante imajo abnormalne cvetove. Poznamo tri razrede homeotičnih cvetnih mutacij, ki vplivajo na organe. Razred 1: *apetala2*, vpliva na 1. in 2. Razred, tako da nadomesti venčne liste s pestičem in čašne liste s prašniki. Razred 2, kot sta *pistillata* in *apetala3* vplivata na 2. in 3. razred 3: *agamous* vpliva na 3. in 4. razred. Cvetni meristem lahko razdelimo na tri prekrivajoče se regije A, B in C, kjer a igra vlogo v produkciji prašnikov, a in b v vlogi čašnih listov in b in c v vlogi venčnih listov, c v vlogi pestiča. Homeotične mutante izločijo a, b ali c vlogo. Kombinacija posameznih vlog vpliva na osnovno stanje razvoja cveta. *AGAMOUS* protein se izraža v centru cvetnega meristema, medtem ko se *APETALA3* izraža v zunanjih delih. *APETALA* in *AGAMOUS* imata skupno DNA vezavno domeno, MADS box. MADS box deluje kot transkripcijski faktor. MADS box geni so prisotni pri rastlinah, glivah in živalih in delujejo kot homeotični selektorski geni v podobni vlogi kot *HOX* geni pri živalih. Prav tako poznamo *CURLY LEAF* gene pri *Arabidopsis*, ki so podobni Polycomb genski družini pri *Drosophili*. *CURLY LEAF* proteini igrajo vlogo v konstantni represiji homeotičnih genov pri rastlinah. *SUPERMAN* je kadastralni gen, ki igra vlogo pri vzdrževanju meje med 3. in 4. vzorčenjem (Staveley, 2016).

Prehod v cvetni meristem je pod okolijsko in genetsko kontrolo. Cvetenje pri *Arabidopsis* je kontrolirano s tako zunanjimi kot notranjimi faktorji. Apikalni meristem generira liste med vegetativno fazo in se preobrazi v cvetni meristem v eni izmed dveh možnih poti. Dokončni prehod pomeni, da socvetni meristem postane terminalni. Nedeterminantni prehod pa pomeni, da cvetni meristem postane več cvetnih meristemov (kot pri *Arabidopsis*). *Leafy* in *apetala1* so geni, ki identificirajo cvetni meristem. Mutante v tem delu delno pretvorijo cvet v poganjke (Staveley, 2016).

2.3.2 Eksogeni dejavniki

Čeprav obstajajo številne študije o mikropropagaciji vrtnic, je le malo objav na temo cvetenja *in vitro*. V teh študijah igrajo rastlinski rastni regulatorji poglavitno vlogo pri indukciji, vendar pa je uspeh močno odvisen tudi od kultivarjev (Pati in sod., 2005). Torej fiziološko stanje donorske rastline, vir izsečka, sestavine gojišča, koncentracije rastnih regulatorjev in pogoji vzgoje prav tako vplivajo na *in vitro* cvetenje. Pri večini *in vitro* metod se uporabljajo 6- benziladenin, zeatin, thidiazuron, kinetin ter kombinacije rastnih regulatorjev z ostalimi hranili. Vpliv fiziološkega stanja, sestavin gojišča in pogojev vzgoje na *in vitro* morfogenezo cvetov je vrstno-specifičen (Zeng in sod., 2013).

Za nastanek cvetnega brsta rastlina potrebuje veliko svetlobe. Predvsem bela, dolgovalovna rdeča ali modra svetloba lahko spodbudijo njihov nastanek. Da se cvetni popek odpre je potrebna tudi saharoza (Hartig in Beck, 2006). Vendar pa eksperimenti kažejo, da samo saharoza ni dovolj, saj izsečki v temi niso tvorili cvetnih nastavkov. Tako svetloba, kot tudi saharoza delujeta kot signal, ki je nujen za nastanek cvetov in aktivnost

encima vakuolarne invertaze, ki uravnava metabolizem saharoze (Bendahmane in sod., 2013).

V razvoj cvetov so vključeni tudi rastlinski rastni regulatorji giberilini. Raziskave so pokazale, da inhibitorji giberelinske kisline kot sta paklobutrazol in ancimidol (v 50 μ M koncentraciji) inhibirata nastanek cvetov in da so biosintezni geni giberilinske kisline pozitivno regulirani med samim procesom cvetenja (Choubane in sod., 2012).

2.4 PREGLED RAZISKAV CVETENJA *IN VITRO*

Ker je lahko uspešno optimiziran protokol, pri katerem dosežemo visoko stopnjo cvetenja lahko tudi model za študije razvoja cvetnih organov, bomo na kratko pregledali trenutne trende in prihodnost raziskav na tem področju.

Študije razvoja cvetnih organov predstavlja področje rastlinske biologije, kjer bo razvoj potreben skupaj z multidisciplinarnimi prijemi, predvsem vpliv molekularno-genetskih mehanizmov na fiziologijo oziroma rast na celičnem nivoju. Predvsem so v zadnjem času aktualne raziskave, ki proučujejo signalne mehanizme, ki posledično sprožijo razvoj, kontrolo ureditve socvetja in vzorčenje cvetnega meristema (opp. angl. *patterning*), razvoj individualnih tipov cvetnih organov, razvoj moških in ženskih gametofit, določanje spola in druge teme, ki so sorodne žlahtniteljskim programom, cvetna simetrija in druge teme ki se tičejo rastlina-opraševalec interakcij in ne na zadnje, razvoj ploda in semen. Vse te teme so predmet raziskav, ki vključujejo evolucijski vidik, predvsem glede na očitno raznolikost cvetne strukture, ki jo najdemo pri kritosemenkah. V tehničnem smislu, študije razvoja cvetov lahko vključujejo kompletni set metod moderne biologije: *in vivo* ter *in vitro* eksperimente, poljske poskuse, paleontologijo, mikroskopska in makroskopska opazovanja, genetiko, genomiko, proteomiko, molekularno biologijo, biokemijo, biofiziko, bioinformatiko in filogenetiko (Scutt in Vandenbussche, 2014).

V zadnjih 25 letih je sicer opazen napredek v opisu molekulskih mehanizmov, ki kontrolirajo različne vidike razvoja cvetnih organov, od fazne spremembe, ki sproži cvetenje do končnega razvoja plodu in semen. Kakorkoli pa so raziskave skoraj ekskluzivno temeljile na majhnem številu modelnih vrst, med katerimi je najpogostejše *Arabidopsis thaliana*. Študije razvoja cvetnih organov je zato potrebno razširiti na širšo filogenetsko okolje cvetočih rastlin in njihovih bližnjih sorodnikov, npr. golosemenk. Študije nadaljnjih, širših modelov, bi lahko ponudile vpogled v to, kar pri manjših modelih ni očitno. Uporaba teh modelov bi prav tako lahko omogočila razlago, kako so nastale prve cvetoče rastline, čeprav predvidevamo, da iz golosemenkam podobnega prednika in med drugim tudi kako se je tako hitro diferencirala, da je postala ena glavnih rastlinskih skupin, ki dominira floro. Prednosti za družbo so očitne, saj človeško življenje temelji v veliki meri prav na cvetočih rastlinah, predvsem na plodovih in semenih, ki nastanejo iz njih (Scutt in Vandenbussche, 2014).

Cvetovi, plodi in semena, so ključnega ekonomskega pomena pri številnih kritosemenkah, prav tako pa zaradi svoje raznolike biologije struktur, porajajo zanimanje pri številnih znanstvenikih. Evolucijski vidik razvoja cvetov prav tako ponuja bogato področje za študije in čeprav je struktura cvetov opazno konzervirana skozi evolucijo, je število, oblika in ureditev cvetnih organov tako raznolika, da lahko tvori širok spekter oblik, med približno 400.000 vrstami kritosemenk. Drugi zanimiv vidik evolucije kritosemenk ustvarja vprašanje o golosemenkam podobnemu predniku, dogodku, ki ga je Charles Darwin opisal kot '*abominable mystery*' (opp: slaba oz. ne željena skrivnost) (Rout in sod., 2006).

Da bi odkrili izvor kritosemenk so raziskovalci primerjali genoma kritosemenk in golosemenk in ustvaril seznam ortologov. Fokusirali so se predvsem na MADS-box družino transkripcijskih faktorjev, ki igrajo centralno vlogo v razvoju cvetov. Druga študija proučuje časovne točke, ko se rastlina odloči za reprodukcijo. Ni presenetljivo, da so se razvili subtilni in kompleksni mehanizmi, ki sprožijo kombinacijo okoljskih in endogenih signalov, ki dovoljujejo rastlini cvetenje v optimalnem času (Gramzow in sod., 2014). Pri Shrestha in sod. (2014) so primerjali odziv in mehanizme regulacije časovnih točk glede na dolžino dneva v dveh modelnih rastlinah *Arabidopsis thaliana* in rižu. Ugotovili so, da so sorte riža, ki se med seboj razlikujejo glede na geografsko lokacijo, nosilke različnih alelnih oblik regulatorjev, ki uravnavajo cvetenje.

Cvetenje se odraža v razvoju številnih struktur in raznoliki cvetni arhitekturi. Zdi se, da so subtilne razlike v homolognih genih odgovorne za nastanek tako različnih socvetnih struktur, ki so tudi različno adaptirane na tip razmnoževanja, opraševanja in strukture plodov in semen (Pal, 2012).

Regulacija prehoda v cvetenje pri *Arabidopsis* lahko poteka po večih poteh: avtonomni, vernalizacijski, giberelinsko odvisni in dolgodnevni (angl. long-day). Geni avtonomne in vernalizacijske poti kontrolirajo progresivno zmanjšanje ekspresije FLOWERING LOCUS C (FLC), močan represor cvetenja, ki lahko 'zazna' progresijo v vegetativnem razvoju in prezimovanju, oziroma FLC kodira MADS-box transkripcijski faktor, ki se preferenčno ekspresira v SAM (angl. *shoot apical meristem*) pred prehodom v cvetenje (Michaels in Amasino, 1999). Pozitivni regulatorji FLC ekspresije v avtonomni in vernalizacijski poti so raznoliki, vključuje in vključujejo faktorje, ki so odgovorni v modifikacije kromatina. V glavnem so v zadnjih letih opisali vlogo histonskih metiltransferaz, histonskih deacetilaz, ATP-odvisnimi kromatin-remodelirajoče faktorji in Polycomb podobnimi kompleksi v regulaciji FLC ekspresije (He in Amasino, 2005). Tudi drugi kromatinski regulatorji imajo vlogo pri regulaciji prehoda SAM iz vegetativne v reproduktivno fazo. Ti regulatorji vključujejo *Arabidopsis* proteine LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN1 (LHP1), ki je homolog *Drosophila* HP1 in EARLY BOLTIN in SHORT DAYS (EBS), ki so potrebni za FLOWERING LOCUS T (FT) represijo. SWI2/SNF2- podobni kromatin remodelirajoči faktor AtBRM prav tako represira ekspresijo CONSTANS (CO) in pozitivni aktivator FT.

Številni kromatinski faktorji kontrolirajo vegetativni razvoj z vzdrževanjem FM (angl. *floral meristem*) genov v inaktivnem stanju med fazo cvetenja (Guyomarc'h in sod., 2005).

Arabidopsis homologi *Drosophila* Polycomb kompleksov so vključeni v represijo razvojnega programa cvetenja med vegetativno fazo. Na primer, cvetno-specifičen AGAMOUS (AG) in APETALA3 (AP3) geni so ekspresirani v *clf*, *emf2* in *fie* mutantnih listih. CLF, FIE, EMF2 predstavljajo tri potencialne podenote namanj enega izmed rastlinskih Polycomb kompleksov, ki so najverjetneje vpleteni v represijo ekspresij FM-specifičnih genov med vegetativno fazo. Nedavno so dokazali, da derepresija ekspresije AG v *clf* listih korelira z izgubo metilacije lizina 9 in 27 na histonu h3 in pridobitev metilacije lizina 4 na histonu h3 v AG, ki je nenehno v tarčni kromatinski modifikaciji in tako represira AG ekspresijo v divjem tipu vegetativnih organov (Schubert in sod., 2004). Acetilacija histonov je prav tako vključena v FM-specifično gensko regulacijo pri *Arabidopsis*-u. Prav tako zmanjšanje histonske deacetilazne aktivnosti sproži pleiotropični defekt v vegetativnem in reproduktivnem razvoju pri navadnem repnjakovcu, med drugim se odraža v zakasnjem prehodu v cvetenje in nastanku semen. Ekotopično ekspresija SUPERMAN (SUP) so opazili v listih pri rastlinah, kjer je bila premajhna produkcija histonske deacetilaze AtHD1. Mutacije v ATCHN5 genih za histonsko deacetilazno transferazo inducirajo pleiotropični učinek na razvoj in so vpletene v ekspresijski vzorec transkripcijskih faktorjev, ki kontrolirajo aktivnost cvetnega meristema, med drugim WUS, AG, AP1 in AP2, kar se nato odraža v preklopu socvetnega meristema v terminalni cvet. Prav tako je AG in AP2 ekspresijska pot v FM regulirana z mikroRNA (Guyomarc'h in sod. 2005).

Fernandez-Nohales in sod. (2014) so identificirali novo mutacijo, ki je pokazala, da je za kontrolo ureditve socvetja pri *A. thaliana* v eni točki odgovoren metabolizem kratkoverižne RNA, ki reprimira ključni regulator TERMINAL FLOWER1. Engelhorn in sod. (2014) so se osredotočili na analizo genskih interakcij med ULTRAPETALA1 in LEAFY, in zaključili, da ti regulatorji delujejo v ločenih poteh, ki na koncu inducirajo ekspresijo AGAMOUS v sredini cvetnega meristema. Mantegazza in sod. (2014) so ponudili intenzivno analizo REM genske skupine, o kateri je bilo do zdaj bolj malo znanega. Ugotovili so, da ti geni mogoče igrajo vlogo v zgodnjem razvoju cvetov.

V eni izmed raziskav so analizirali tudi ortologe dveh stročnic *Pisum sativum* and *Medicago truncatula* za CRABS CLAW (CRC) transkripcijski faktor, ki regulira več vidikov pestiča in razvoj nektarja med *A. thaliana* in stročnicami. Ugotovili so, da se CRC ortologi ne razlikujejo med seboj. (Fourquin in sod., 2014). Costanzo in sod. (2014) pa so identificirali vlogo WOX genske skupine, ki naj bi bila vpletena v zgodnji razvoj.

S pomočjo *in vitro* cvetenja lahko torej gensko manipuliramo z namenom, da odstranimo alternativne regulatorne oz. kontrolne sisteme, ki so potrebni za nadaljnje raziskave indukcije cvetenja, socvetja in morfogeneze cvetov. *In vitro* cvetenje lahko uporabljamo

tudi kot orodje za pospešitev žlahtnjenja ali pa z namenom pridobivanja določenih sestavin iz cvetnih organov (Bendahmane in sod., 2013).

2.5 RAZISKAVE REGULACIJE CVETENJA PRI VRTNICAH

Molekulski mehanizmi, ki regulirajo proces cvetenja so dobro raziskani pri sezonskih rastlinah, medtem ko pri je pri trajnicah razumevanje teh mehanizmov šele v začetkih. Raziskovalci so proučili stanje raziskav družine Rožnic (Rosaceae). Nedavne molekularne raziskave so pokazali, da so homologi proteina TERMINAL FLOWER (TFL1) glavni regulatorji tako pri prehodu iz juvenilne v odraslo dobo kot tudi iz vegetativne v reproduktivno fazo (Kurokura in sod., 2013).

Raziskovalci so kasneje ugotovili, da je v razvoju rastlin prehod v cvetenje uravnavan z dvema homolognima proteinoma FLOWERING LOCUS T (FT) in TERMINAL FLOWER 1 (TFL1). Florigen FT promovira prehod v reprodukcijo in cvetenje, medtem ko TFL1 represira ta prehod. Kljub pomenu te regulacije, molekularni mehanizmi, ki bi razložili nasprotujoče si delovanje FT in TFL1, ostajajo skrivnost (Wickland in Hanyawa., 2015).

Zanimiva je študija, ki opisuje TFL1 homolog KSN, ki je regulator kontinuirnega cvetenja pri vrtnicah in jagodah. Raziskovalci so dokazali, da je za kontinuirno cvetenje vrtnic kontrolirano s pomočjo ortologov družine TERMINAL FLOWER 1. Kontinuirano cvetenje je značilno za genotipe CF (angl. *continuous-flowering*), medtem ko so rastline, ki cvetijo le enkrat letno definirane kot OF genotip (angl. *once-flowering*). Raziskovalci so ustvarili šest parov mutant CF/OF ob prisotnosti retrotranspozona v intronu homologa TFL1. Zaradi prisotnosti retrotranspozona je bil blokiran gen v CF genotipih in odsotnost represorja je sprožila kontinuirano cvetenje. Pokazali so, da mutacija z delecijo v kodirajoči regiji TFL1 sproži premik bralnega okvirja, kar povzroči kontinuirano cvetenje (Iwata in sod., 2012).

Vloga giberilinov je dobro raziskana pri modelni rastlini *Arabidopsis thaliana*, ki je sezonska rastlina. Manj je znano o vplivu giberilinov na trajnice. Ugotovili so, da je GA inhibirala cvetenje v OF genotipih, medtem ko pri CF ni bilo vpliva. V študiji so proučevali molekularni vpliv GA na cvetenje in vpletenost RoKSN pri inhibiciji. Pri OF vrtnicah je zunanja aplikacija GA₃ v obdobju enega meseca inhibirala cvetenje. Na molekulskem nivoju so ugotovili, da so se akumulirali RoKSN transkripti takoj po nanosu

GA₃, ki je v povezavi z inhibicijo cvetenja. Drugi geni, kot na primer RoFT in RoSOC1 in RoAP1 so bili represirani v RoKSN odvisni poti, medtem ko RoLFY in RoFD niso bili pod vplivom RoKSN. RoKSN promotor je vseboval GA- odvisen cis element, katerega delecija je zavrla odziv GA v heterolognem sistemu. Kljub zunanjem dodatku GA inhibitorja to ni imelo vpliva na represijo RoKSN. Ugotovili so, da predvsem spomladi GA inhibira

cvetenje, medtem ko lahko poleti cvetenje kotrolirajo tudi drugi faktorji (Randoux in sod., 2012).

2.6 SESTAVA GOJIŠČ ZA MIKROPROPAGACIJO *IN VITRO*

Sestava gojišč je ključnega pomena za uspeh tkivne kulture. Običajno se tekom postopka *in vitro* tkivnih kultur določi osnovno gojišče, ki se nato spreminja glede na želeno fazo oz. odziv.

Pregled literature ima pomemben pomen pri izbiri sestave gojišča, ker imajo različne rastlinske vrste različne potrebe po hranilih. V primeru pomanjkanja literature te ugotovitve temeljijo na preizkušanju in ugotavljanju odziva. Pomembno je pregledati delovanje rastlinskih rastnih regulatorjev, sestave soli, ogljikovih hidratov, ter gojišča. Pristop optimizacije gojišča je odvisen od namena, torej ali želimo inducirati kalus, somatsko embriogenezo, kulturo anter ali proliferacijo poganjkov. (Smith, 2012)

V glavnem gojišče vsebuje anorganske soli in organske komponente kot so rastlinski rastni regulatorji, vitamini, ogljikovi hidrati in zgoščevalci. Kot pomožne snovi se uporabljajo tudi aminokisline, antibiotiki ali drugi naravni kompleksi (George in sod., 2008).

2.6.1 Mikro in makroelementi

Soli v gojišču lahko razdelimo na mikro in makroelemente. Minerali, ki so prisotni v gojišču predstavljajo gradbene enote za sintezo organskih molekul ali kot katalizatorji encimskih reakcij. Ioni raztopljenih soli igrajo pomembno vlogo pri transportu ioniziranih molekul, osmotski regulaciji in vzdrževanju elektrokemijskega potenciala (George in sod., 2008).

Železo, baker, mangan, kobalt, molibden, bor, jod, nikelj, klor in aluminij so mikroelementi, medtem ko so magnezij, kalcij, žveplo, fosfor, dušik in kalij makroelementi. Ta razdelitev pretežno temelji na potrebah rastlin po teh elementih. Potrebe po mikroelementih so majhne, zato so tudi prisotne v nižjih koncentracijah, predvsem v mikromolarnih koncentracijah. Potrebe po makroelementih so občutno višje in so ponavadi prisotne v milimolarnih koncentracijah. Kljub temu, da imajo rastline manjše potrebe po mikroelementih, pa lahko njihovo pomanjkanje povzroči negativne učinke na rast in razvoj. Potrebe rastlin po nekaterih mikroelementih še zdaj ostajajo pretežno nejasne.

Kobalt, aluminij in nikelj so lahko uporabni za rastlino, vendar verjetno niso esencialni. Pri večini mikroelementov ima mineralni del soli pomen za rastlino, medtem ko negativno nabit anion ponavadi nima esencialnega pomena. Tako je glavna aktivnost bakra ion Cu^{2+} (Hartig in Beck, 2006).

Pri makroelementih je potreba rastlin toliko večja. Pri makroelementih so pomembni tako anioni, kot tudi kationi teh elementov, na primer pri kalijevelem nitratu sta pomembna tako K^+ kot tudi NO_3^- . V skupini makroelementov so soli, ki vsebujejo dušik, pretežno v obliki kalijevega, amonijevega in kalcijevega nitrata najpogostejše. Dušik, žveplo in fosfor so komponente proteinov in nukleinskih kislin. Magnezij in mikroelementi tvorijo esencialne dele vitaminov pri številnih reakcijah. Kalcij in borova kislina se v glavnem nahajata v celični steni, kjer ima predvsem kalcij pomembno vlogo stabilizacije biomembran. Natrij in klor pa sta pomembna pri osmotski regulaciji, vzdrževanju elektrokemijskega potenciala in aktivaciji številnih encimov (George in sod., 2008).

Sestava anorganskih soli v tkivnih kulturah se lahko razlikuje, vendar pa je Murashige in Skoog (MS) gojišče najbolj razširjeno. Prvotno je bilo gojišče razvito za vzdrževanje kalusa pri tobaku. MS gojišče je takratnim raziskovalcem zagotavljala, da anorganska hranila niso bila limitni dejavnik za prirast tobaka in s tem so tudi zmanjšali potrebe po organskih dodatkih kot so kvasni ekstrakt, kokosovo mleko, kazeinski hidrolizat in rastlinski ekstrakti. MS v primerjavi z drugimi formulacijami ponavadi vsebuje visoke vsebnosti natrija, kalija in amonija. Ravno zato, ker je MS gojišče zelo bogato v vsebnosti anorganskih soli, velja omeniti tudi, da je lahko za nekatere rastlinske vrste ta vsebnost previsoka. Da bi se izognili tem problemom, se lahko uporablja mikroelemente v celostni koncentraciji, medtem ko se makroelemente zmanjša za polovico do tretje četrtine originalne koncentracije. Včasih se MS z vitamini lahko nadomesti z vitamini po Linsmaier-ju ali z Gamborg B5 gojiščem glede na višje koncentracije tiamina v povezavi s potrebami rastle (Davies, 2004).

2.6.2 Rastlinski rastni regulatorji

V rastlinski fiziologiji, so rastni regulatorji substance ki se sintetizirajo v zelo majhnih količinah v točno določenih delih organizma in se nato transportirajo do tarčnih tkiv, kjer imajo vpliv. Tako se na primer pri kaljenju ječmenovih semen sintetizirajo giberelini in se sprostijo, ko embrio difundira proti alevronski plasti. Tam inducira sintezo in izločanje hidrolitičnih encimov. Ti encimi nato katalizirajo razgradnjo rezervnih molekul v manjše fragmente, ki jih embrij lahko uporabi za rast. Drugi primer je inhibicija aksilarnih brstov s sintezo avksinov v apeksu, ki se transportira po stebelu. Za razliko od živalskih hormonov, sinteza rastlinskih rastnih regulatorjev ni omejena samo na specifično tkivo, ampak se lahko pojavi v številnih tkivih. Čeprav se transportirajo tudi v oddaljena tkiva pa pogosto delujejo tudi na mestu sinteze. Druga lastnost rastlinskih hormonov je pomanjkanje specifičnosti, saj vplivajo na širok spekter procesov. Avksini tako na primer spodbujajo celično izdolževanje, celično delitev, nastanek primarnega vaskularnega tkiva, adventivnih korenin, senescence, rast plodov, rast aksilarnih brstov in ekspresijo spola. Pri rastlinah *ex vivo*, rastni regulatorji potujejo po ksilemu in floemu (izjema je polarni transport avksinov). V tem kontekstu velja omeniti tudi, da je zaradi dolgih razdalj ta transport preko

difuzije zelo počasen in lahko traja približno en teden, da prepotujejo razdaljo dveh centimetrov. Zunanji dodatek poviša nivo rastnih regulatorjev v tarčnem tkivu, koliko pa je odvisno od stopnje transporta. Poleg tega je lokalno povišanje koncentracije prehodnega pomena, saj se hitro inaktivirajo. Inaktivacija je lahko ireverzibilna (oksidacija) ali reverzibilna (konjugacija s sladkorji ali aminokislinami). Ponavadi le majhne količine dodanih regulatorjev ostane v prosti obliki. Dokazali so, da za avksine obstaja ravnotežje med prosto in konjugirano obliko, medtem ko je manj kot 1 % proste oblike. Etilen je izjema, vendar se zaradi plinske strukture le-ta pri rastlinah hitro izloči v okolico. Rastlinski rastni regulatorji prav tako lahko vplivajo na senzitivnost tarčnega tkiva. Lahko se zgodi, da celice v določenem tkivu ali določeni razvojni stopnji hormonskega signala ne prepoznavajo ustrezno ali pa so nezmožne zelenega odziva. Dodajanje eksogenih rastnih regulatorjev med drugim vpliva tudi na sintezo in razgradnjo endogenih hormonov, tako teh ki spadajo v isto skupino kot tudi drugih. Nazoren primer je vpliv avksinov na indukcijo sinteze etilena. Vse to je rezultat kompleksne situacije, kjer je ponavadi težko odkriti vzrok nastanka (George in sod., 2008).

Vendar pa večina znanja o rastnih regulatorjih izhaja iz *in vitro* raziskav, saj imajo *in vitro* eksperimenti številne prednosti. Glavne prednosti so:

- tkivne kulture omogočajo aplikacijo hormonov preko poškodovanih površin izsečka,
- ni mikrobnega razpada apliciranih hormonov,
- mogoče so študije vpliva hormonov na posamezne rastlinske organe.

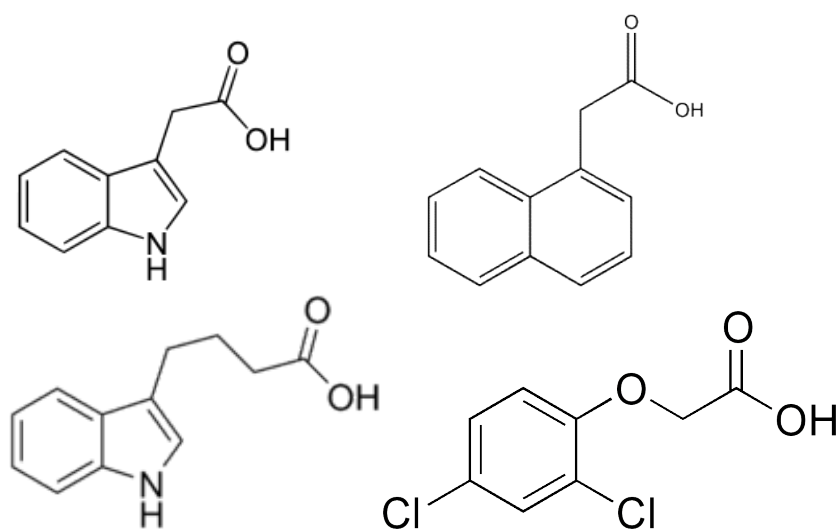
V tkivnih kulturah, se v glavnem uporabljajo za stimulacijo adventivne regeneracije korenin, poganjkov in embrijev, indukcijo aksilarnih brstov in nastanek kalusa. Večinoma se v tkivne kulture dodajajo le avksini in citokini, predvsem zaradi kvantitativnega vpliva (povečanje števila celic in volumna). Uporabljajo se v koncentracijah od 1- 10 μM (0.02–2 mg/l). Ena glavnih tem raziskav je ravno spreminjanje koncentracij in tipov rastnih regulatorjev (George in sod., 2009).

Pri raziskavah odziva rastlin na rastne stimulatorje ponavadi opazimo zvonu podobno obliko krivulje. Pri nizkih koncentracijah učinka ni, medtem ko je pri visokih koncentracijah učinek inhibitoren. Največji učinek dosežemo pri vmesnih vrednostih. Za detekcijo optimalnih koncentracij se ponavadi uporablja najprej širok nabor koncentracij (npr. 0, 0.1, 1, 10, 100 μM) in nato ožji izbor koncentracij. Velja tudi omeniti, da hormoni delujejo v logartimični skali (Davies, 2004). Tip in koncentracija rastlinskih rastnih regulatorjev se močno razlikujeta glede na željeni odziv. Seznam najbolj pogosto uporabljenih rastnih regulatorjev, njihove okrajšave in mase so v preglednici 1 (George in sod., 2008).

Preglednica 1: Seznam pogostih rastlinskih rastnih regulatorjev v tkivnih kulturah (cit. po George in sod., 2008)

Rastlinski rastni regulator	Okrajšave	MM
absizinska kislina	ABA	264,3
indol-3-ocetna kislina	IAA	175,2
naftalenocetna kislina	NAA	186,2
2,4-diklorofenoksiocetna kislina	2,4-D	221,0
indol-3-maslena kislina	IBA	203,2
6-furfurilaminopurin	Kinetin	215,2
6-benzil-aminopurin	BA	225,2
N6 (2-izopentenil)-adenin	2iP	203,3
trans-6-(4-hidroksil-3-metilbut-2-enil)amino purin	zeatin	219,2
giberlinska kislina	GA3	346,2
tidiazuron	TZD	220,2

Avksine (IAA, NAA, 2,4-D, IBA) potrebuje večina rastlinskih celic za delitev in iniciacijo korenin (slika 2). V višjih koncentracijah, avksini lahko ustavijo morfogenezo.

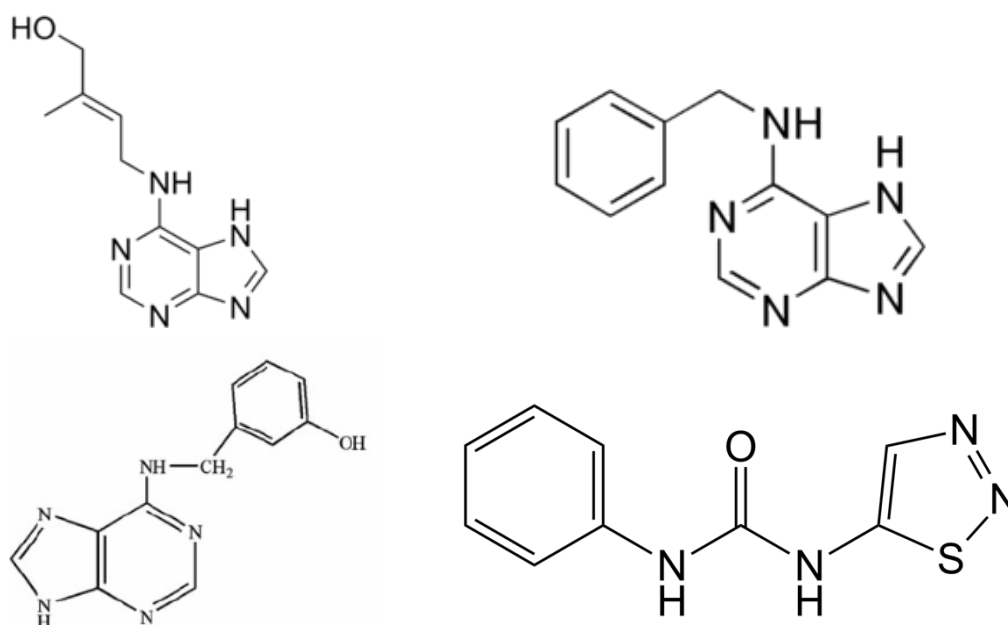


Slika 2: Kemijske strukture glavnih predstavnikov avksinov: levo zgoraj-IAA , desno zgoraj-NAA, levo spodaj - IBA, desno spodaj - 2,4-D. (cit. po Davies, 2004)

Avksin 2,4-D se pogosto uporablja za indukcijo kalusa, medtem ko se IAA, IBA in NAA uporabljajo za nastanek korenin. Poznamo naravno prisotne avksine: IAA, IBA, 4-Cl-IAA, fenilocetna kislina (PAA) in konjugate le-teh. Kemijski analogi so: NAA, 2,4-D, 2,4,5-triklorofenolocetna kislina, benzojska kislina (dicamba) in drugi. Glavne kemijske strukture so predstavljene na sliki 4. Naravni in sintezni avksini so nizko molekularne, organske snovi, ki vsebujejo indolni ali aromatski obroč ter pripeto karboksilno skupino. So kristalinični in le rahlo topni v vodi, vendar dobro topni v organskih topilih (etanol, metanol, aceton, dietil eter in dimetil sulfoksid, DMSO) ali kot šibke kisline tudi v

bazičnih vodnih raztopinah. (NaOH, KOH). Z izjemo IAA so relativno stabilni in obstojni v gojiščih tkivnih kultur. IAA je manj obstojna in je predvsem občutljiva na UV svetlobo in prisotnost oksidantov. Tako naravno prisotni indolni avksini kot tudi njihovi sintezni analogi pa kljub različnih strukturah izkazujejo podobne učinke. Prav tako so šibke organske kisline. Stopnja aktivnosti posameznih avksinov v različnih postopkih je zelo raznolika. Ne razlikuje se samo od rastlinske vrste, ampak tudi od vrste organa, tkiva, celice in tudi starosti in fiziološkega stanja rastline, tkiva oz. celic. Verjetno je ravno zaradi visoke nestabilnosti IAA ponavadi manj učinkovita kot sintezni avksini kot sta 2,4-D in NAA (George in sod., 2008).

Citokinini pospešijo celično delitev, proliferacijo in morfogenezo poganjkov. Kemijske strukture glavnih citokininov so prikazane na sliki 3.

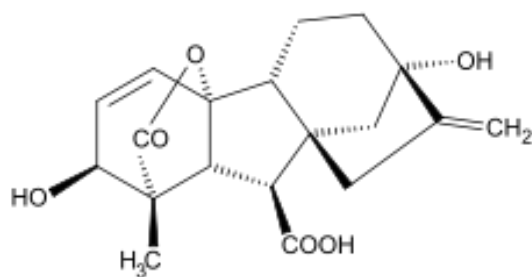


Slika 3: Kemijske strukture citokininov: levo zgoraj – zeatin, desno zgoraj – BAP, levo spodaj – m-topolin, desno spodaj – TDZ. (cit. po Davies, 2004)

Thidiazuron (TDZ) ima tudi citokininsko aktivnost in je učinkovit v nizkih koncentracijah za stimulacijo formacije poganjkov. Kot tudi pri avksinih, tudi pri citokininih poznamo naravno prisotne in sintezne različice. Prvi odkriti citokinin je kinetin, izoliran v laboratoriju raziskovalcev Miller in Skoog in kasneje identificiran kot 6-furfuril aminopurin. Čeprav kinetin ni priznan kot naravno prisoten citokinin, predvidevamo da je nastal iz originalnega izolata s strukturno prerazporeditvijo. Številni naravno prisotni citokinini so tako strukturno sorodni kinetinu, ali kot proste baze, glukozidi, ribozidi (ZR, iPA, DHZR) ali nukleotidi. To so na primer *trans*-zeatin, iP in dihidrozeatin. Zaradi prisotnosti dvojne vezi v stranski verigi ima molekula zeatina dve možni konfiguraciji, kjer je v naravi prevladuje *trans*-izomer (Schaller in sod., 2015).

Čeprav se naravno prisotni citokinini uporabljajo v raziskavah, pa se v komercialnih laboratorijih večinoma uporabljajo njihove sintezne različice. Poznamo več kemijskih analogov, ki so visoko aktivni. To so večinoma N⁶-adeninski derivati ali 4-alkil aminopteridini ali 6-benziloksipurini (George in sod., 2008). Dolgo časa je veljalo, da je BAP sintezni citokinin, vendar so nedavno odkrili, da je prisoten tudi v naravi. Zgoraj opisani citokinini so purinskega tipa, medtem ko poznamo tudi nepurinske, kot sta tidiazuron (TDZ) in forklorfenurom (CPPU). Ti molekuli imata visoko aktivnost in sta predvsem uporabni pri lesnatih rastlinah. Meta-topolin je aktivni aromatski citokinin, prvotno izoliran iz topola. Tako kot zeatin in BAP se na mesto C9 veže riboza, ki pa nima vpliva na aktivnost. Učinek m-topolina v gojišču je podoben BAP, vendar glede na raziskave izsečki izkazujejo boljše koreninjenje (Schaller in sod., 2014).

Giberelinska kislina se ne uporablja zelo pogosto v tkivnih kulturah predvsem zato, ker lahko inhibira rast kalusa in pod avksinom induciran nastanek adventivnih korenin, se pa uporablja za študije morfogeneze. Poznamo več sto različnih molekul giberelinov, kjer so GA₃ (giberelinska kislina), GA₁, GA₄ in GA₇ najpogostejše. Kemijska struktura GA₃ je na sliki 4 (Davies, 2004).



Slika 4: Kemijska struktura GA₃ (cit. po Davies, 2004)

Vpliva tudi na cvetenje in prehod med fazami (tranzicija iz juvenilne v reproduktivno stanje), prekine dormanco semen, poganjkov, spodbuja razpad semenskih rezerv in sproži izdolževanje. Sintezo giberelinov inhibirajo paklobutrazol, flurprimidol in ancimidol. V tkivnih kulturah se celo ti inhibitorji uporabljajo pogosteje kot sami giberilini, predvsem zaradi vpliva na nastanek poganjkov, zorenje embrijev, koreninjenje poganjkov, uporabljajo pa se tudi kot zaviralci izdolževanja ter za lažjo aklimatizacijo. Velja tudi omeniti, da določeni inhibitorji GA sinteze vplivajo tudi na sintezo abscizinske kisline (Davies, 2004). Rastopina GA₃ ni termostabilna, zato se založna raztopina ne avtoklavira, ampak se pripravi pred uporabo in pred tem filtrsko sterilizira (Smith, 2012).

2.6.3 Vitamini

Vitamini imajo katalitično funkcijo v encimskih reakcijah. Vitamin, ki je pomemben za rastline je predvsem tiamin (B₁). Tudi drugi vitamini, kot sta nikotinska kislina (B₃) in piridoksin (B₆) se uporabljata v tkivnih kulturah, ker z njima lahko pospešimo celični odziv. Inozitol je tudi pogost vitamin v tkivnih kulturah, ki značilno stimulira rast in razvoj, vendar pa nima esencialnega pomena. Pomen drugih vitaminov je težko presoditi, njihov vpliv se lahko razlikuje od vrste do vrste ter pri nekaterih lahko naredi več škode, kot koristi (George in sod., 2008).

2.6.4 Ogljikovi hidrati

Ker celice v kulturi ponavadi niso fotosintetsko aktivne potrebujejo tudi vir ogljikovih hidratov. Ogljikovi hidrati so substrat za respiracijo, igrajo vlogo v sintezi številnih metabolitov, so gradbene enote makromolekul (škrob, celuloza) ter vplivajo na pretok sokov skozi floem. Ogljikovi hidrati vplivajo tudi na številne razvojne procese. Saharoza igra vlogo pri razvoju dormance, nastanku založnih organov in zorenja somatskih embrijev (Yaseen in sod., 2013) Nedavne študije predvidevajo, da nivo saharoze igra regulatorno vlogo pri uravnavanju prehoda iz juvenilne faze v reproduktivno fazo ali cvetenje (George in sod., 2008).

V tkivne kulture se največkrat kot vir ogljikovih hidratov dodajata saharoza ali glukoza. Pogosto se uporablja obseg koncentracij od 2 % do 9 % (20 – 90 g/l oz. 58 – 263 mM), medtem ko je normalna koncentracija ponavadi 3 %. Invertaze, ki jih sprošča izseček v tkivo razgradijo saharozo na glukozo in fruktozo. Tako so izsečki izpostavljeni mešanici saharoze, fruktoze in glukoze. V tkivnih kulturah ogljikovi hidrati igrajo tudi pomembno vlogo pri regulaciji osmoze. Prisotnost saharoze ponavadi inhibira nastajanje klorofila. V višjih rastlinah pod naravnimi pogoji je saharoza glavni produkt fotosinteze, ki se transportira skozi različna tkiva preko floema (Smith, 2012).

V primeru podaljšanega avtoklaviranja so sladkorji podvrženi karamelizaciji. Do karamelizacije prihaja, ko se sladkorji segrevajo, razpadejo in tvorijo melanoide. To so rjave, visoko molekularne spojine, ki inhibirajo celično rast. Rumena do svetlo rjava barva gojišča je indikacija, da je postopek avtoklaviranja predolg. Tako gojišče praviloma zavržemo (Smith, 2012).

2.6.5 Zgoščevalci

Večina eksperimentov temelji na trdnih gojiščih, za katera je potreben dodatek zgoščevalcev kot so na primer agar, agaroz, gerlit in karagenan (Smith, 2012). To so polimeri, snovi, ki v vodi nabrekajo in tvorijo polimerno mrežo, ki znotraj zadržuje vodo. Največkrat se uporablja agar. Agar je naravna snov, ki se pridobiva iz različnih vrst

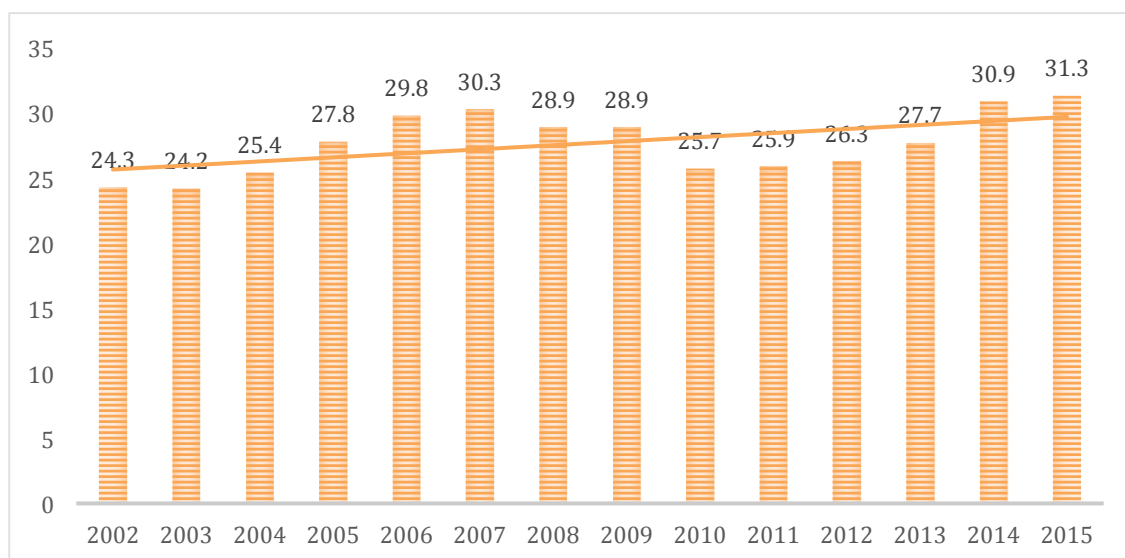
morskih alg. Kvaliteto določamo glede na vsebnost mineralov, nečistoč, moči gela in vlažnosti (George in sod., 2008).

2.7 TRŽNA UPORABA *IN VITRO* CVETOČIH POGANJKOV

Povrnimo se nazaj k misli, da so lahko *in vitro* cvetoči poganjki zanimivi tudi za tržno uporabo. Da bi lahko proučili tržni potencial, o katerem bomo podrobneje govorili v razpravi, smo za uvod zbrali statistične podatke o tržišču, zadnje aktualne trende ter kupne navade potrošnikov. Iz tega bomo poskusili ugotoviti osnovne kazalce, ki lahko predvidijo nadaljnji uspeh na trgu. V svetovnem smislu, se ta segment imenuje florikultura in vključuje trgovanje z okrasnimi rastlinami, lončnicami in rezanim cvetjem.

2.7.1 Trgovanje okrasnih rastlin

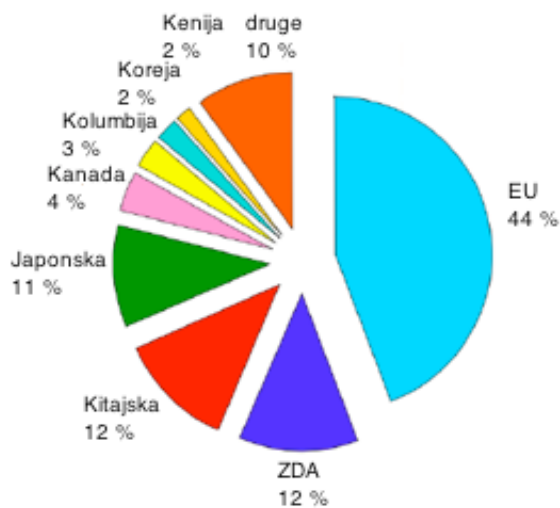
Rabobank iz Nizozemske podrobno opisuje trenutno stanje tržišča in distribucijo okrasnih rastlin po svetu. Prispevek, v katerega je vključen tudi grafični prikaz trenutnih tokov in distribucije okrasnih rastlin je v prilogi 2. Po napovedih Rabobank lahko v naslednjih desetih letih pričakujemo nadaljnjo rast trga, globalne proizvodnje in nadaljevanje trgovanja, čeprav je možna rahla nestabilnost. Predvsem finančna kriza je močno vplivala na trg v Ameriki in Evropi. Če je bil to včasih znan kot močan trg, je od leta 2009 precej bolj nestabilen. Globalni izvoz celotnega trga je leta 2015 znašal 31.3. milijonov ameriških dolarjev v primerjavi z 25.9 milijoni v letu 2011 in 24.3 milijoni v letu 2001. To pomeni, da ima trg v zadnjih letih počasno a očitno rast, katere trend lahko pričakujemo tudi v prihodnjih letih (slika 7) (World ..., 2015).



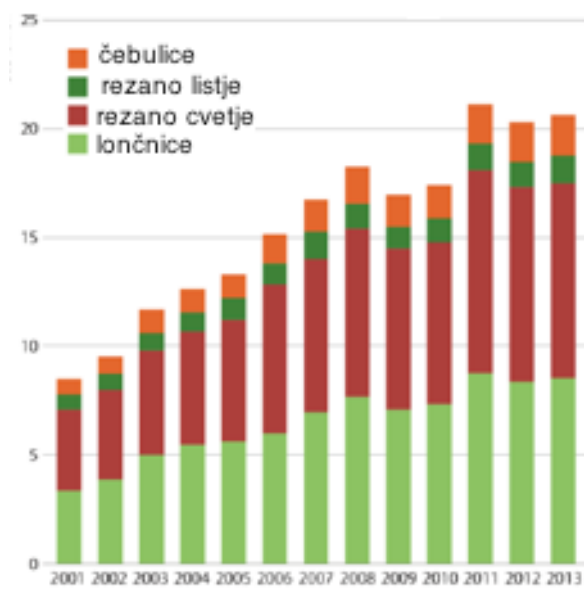
Slika 5: Prikaz gibanja industrijskih prihodkov od leta 2002 do 2015 v milijonih ameriških dolarjev (World ..., 2015)

Povzemamo trenutne trende po podatkih vira World floriculture map (2015) :

- Potrošnja cvetja in rastlin je stabilna na glavnih tržiščih Zahodne Evrope, Združenih državah in na Japonskem. Stabilnost ni samo rezultat ekonomske krize, ampak tudi povečane prodaje v nizko cenovnih trgovinah.
- Trend je tudi rast priljubljenosti darilnega programa.
- Tržišča, ki kažejo rast, vključno s Centralno in Vzhodno Evropo, se zdijo bolj nestabilna kot uveljavljena tržišča.
- Oddaljene destinacije, kjer so lahko cvetlice proizvedene za nizko ceno in pri katerih je transport po zraku predrag so postale bolj dostopne zato, ker so večje količine cvetja lahko transportirane s pomočjo ladijskih zabojnikov. To je povzročilo premik v tržišču.
- Konkurenca tretjih držav se je povečala. Čeprav Nizozemska šteje 52 % globalne izmenjave rezanega cvetja (tako lastne produkcije kot uvoza) so države, kot je Kolumbija (15 % delež) in Ekvador, Kenija in Etiopija pridobile na veljavi. Grafični prikaz deležev posameznih držav je na sliki 6.
- Pojav spletne tehnologije in rast veletrgovin je povečal pomen krajših transportnih verig, med drugim povečano sodelovanje z manj posrednih povezav in boljšo dostopnost informacij.

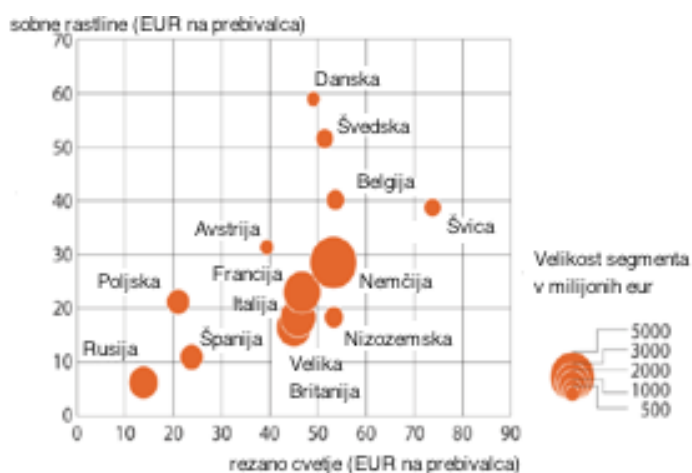


Slika 6: Grafični prikaz deležev izvoza cvetja po posameznih državah (World ..., 2015)



Slika 7: Prikaz razmerij med posameznimi segmenti znotraj tržišča. Horizontalna os predstavlja leta od 2001 do 2013 ter vertikalna os predstavlja velikost segmenta v milijonih ameriških dolarjev (World ..., 2015)

Na sliki 7 vidimo, da je rezano cvetje glavna skupina, ki se trguje globalno. Tik za rezanim cvetjem so lončnice, ki se trgujejo bolj regionalno. Napredek v logistiki (predvsem razvoj medoceanskega trgovanja z zabojniki) je omogočili enostavnejši transport, kar je omogočilo globalno širjenje trga. Zaradi tega napovedujejo nadaljnjo rast, kljub temu, da je v ZDA in Evropi v zadnjem času opazna stagnacija trga. To je verjetno povezano z ekonomskimi vplivi, predvsem v primeru rezanega cvetja, ki ima visoko korelacijo na račun kratkega roka trajanja. Potrošnja na prekrivnih rastlinah je predvsem povezana s podnebnimi razmerami. Drugi dejavniki, kot so dostopnost in verske in kulturne tradicije igrajo pomembno vlogo pri nakupu. Količina porabe po posameznih državah je nazorno prikazana na sliki 8. Opazen je premik kupcev k nižje razrednim trgovinam. To so predvsem supermarketi, diskonti in DIY-trgovine (opp. 'naredi si sam'), ki so še posebej popularni. Premik kupcev v DIY trgovine je predvsem opazen v Nemčiji. Čeprav je Rusija za Evropo relativno močan trg, kjer je opazna rast, pa je stabilnost tržišča negotova (World ..., 2015).



Slika 8: Porazdelitev porabe sredstev za nakup notranjih rastlin po državah (World ..., 2015)

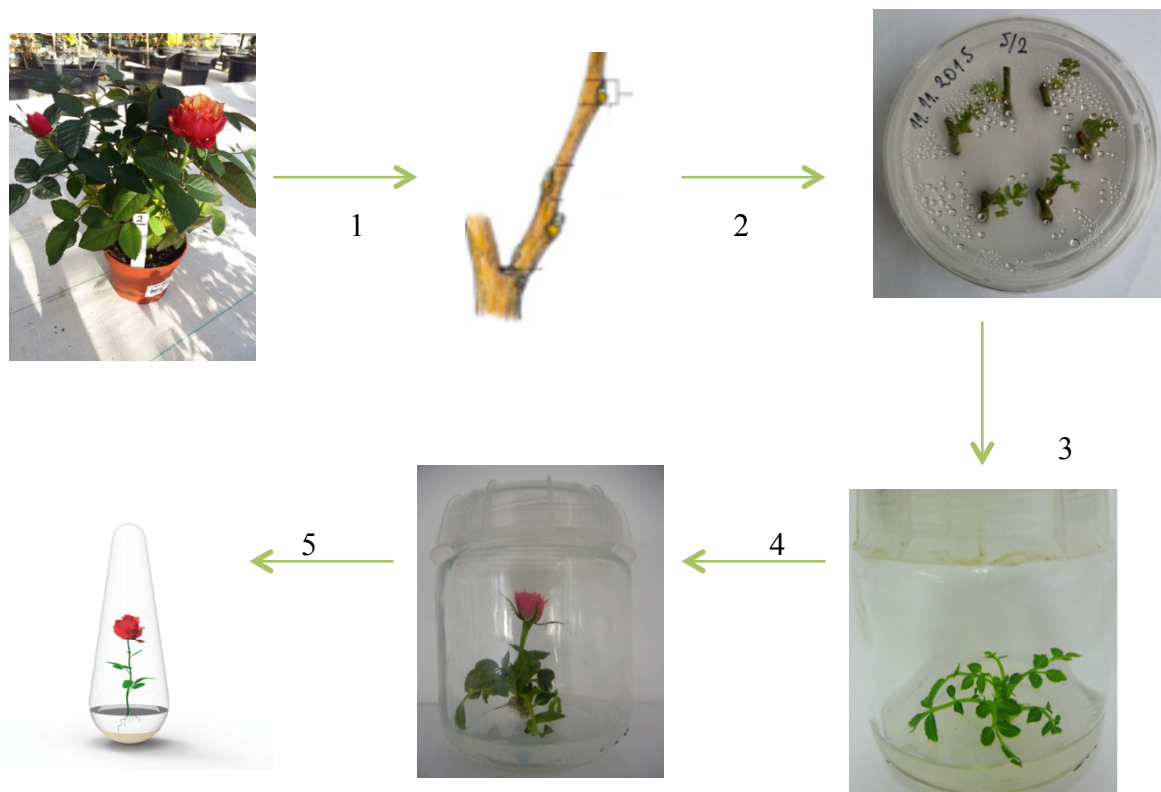
Glede raziskavo Ipsos-Insight floraltrends consumer tracking študijo iz leta 2005 smo pregledali navade kupcev ter časovne priložnosti nakupov.

Potrošniki večinoma kupujejo ne glede na priložnost oziroma koledarski datum. Takih je kar 85, kar pomeni da je večina nakupov naključnih, medtem ko je nakupov vezanih na datum le 14 %. Večina je odgovorila, da za to nimajo posebnega razloga (50 %), ostali nakupi so bili za dekoracijo doma (13 %), za spomin (5 %), za obletnice in ljubezenske namene (3 %), za lažje okrevanje (2 %) in drugo (27 %). Potrošniki kupujejo predvsem zase (63 %), ali kot darilo (13 %). Večino nakupov opravijo ženske (77 %) in le 23 % moški. Prav tako večino rezanega cvetja kupujejo ženske (65 %) in manj moški (35 %). Izmed kategorij so aktualne zunanje rastline (46 %), sledi rezano cvetje (34%) in cvetoče oz. sobne rastline (20%). Glede na statistiko iz leta 2015 je trg sobnih rastlin znašal okoli 7 milijonov ameriških dolarjev (Ipsos-Insight floraltrends consumer tracking, 2005).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POSTOPEK MIKROPROPAGACIJE TKIVNIH KULTUR

Postopek lahko razdelimo v več faz, kar je prikazano na sliki 9.



- 1 priprava matične rastline
- 2 sterilizacija
- 3 indukcija aksilarnih meristemov
- 4 razmnoževanje poganjkov
- 5 cvetenje
- 6 prenos v estetski vsebnik

Slika 9: Prikaz posameznih faz mikropropagacije

3.2 RASTLINSKI MATERIAL

Izbrali smo sorte vrtnic proizvajalca Kordes rosen (Nemčija):

- Eden Rose 85 ® / Pierre de Ronsard ® (Meilland, 1985)
- Jacques Cartier (Moreau-Robert, 1868)
- Beverly ® (W. Kordes' Söhne, 2007)
- Duftzauber 84 ® (W. Kordes' Söhne, 1984)

- Gloria Dei (Meilland, 1945)
- Lions-Rose ® (W. Kordes' Söhne, 2002)
- Sebastian KNEIPP ® (W. Kordes' Söhne 1997)
- Flirt 2011® (W. Kordes' Söhne, 2011)

Za tržne namene, ki jih obravnavamo v tem delu bi bilo potrebno predhodno pridobiti soglasje žlahtnjiteljev oz. lastnikov izbranega rastlinskega materiala ali zagotoviti, da izbran genski material ni zaščiten. Vrtnice smo naročili preko hitre pošte, zaradi česar smo nekatere dobili v prosti obliki, samo kot koreninske grude ter odrezanim zgornjim delom, brez aktivnih poganjkov. Zato smo le-te najprej posadili v substrat in jih gojili v rastlinjaku Biotehniške fakultete. Matične rastline smo vzgajali pri temperaturi 22 °C in 40% zračne vlage dokler niso razvile dovolj poganjkov za nadaljnje raziskave. Primeri označenih rastlin so na sliki 10. Kot vir izsečkov smo za nadaljnje raziskave izbrali le neokužene rastline, ki so bile ustrezno označene. Vsi primerki rastlin niso enakomerno odganjali aktivnih poganjkov, ali so kazali znake okužb, zato nismo izbrali vseh genotipov za raziskavo.

3.2.1 Priprava matične rastline

Za raziskavo smo vzeli le primerke sort 'Flirt', 'Beverly', 'Jacques Cartier' in 'Gloria Dei'. Lastnosti in rezultate po posameznih sortah lahko podamo le v obliki naših opazovanj rasti in pojavov in ne po posameznih meritvah.



Slika 10: primeri matičnih, zdravih in neokuženih rastlin

V predelu kolena, med glavnim stebлом in poganjkom smo odrezali 1-3 cm dolge nodalne izsečke po protokolu, ki ga opisuje Zeng in sod., 2013. Primerni del izsečka je prikazan na sliki 11. Izbrali smo skupno 92 nodalnih izsečkov, ki so vsebovali dormantne aksilarne meristeme in jih prenesli v laboratorij za vzpostavitev *in vitro* tkivne kulture.



Slika 11: prikaz stebela s označenimi dormantnimi aksilarni meristemi

3.2.2 Pogoji vzgoje

Vse tkivne kulture smo vzgajali v rastni komori pri temperaturi 23 ± 1 °C in 16 urni fotoperiodi (16 h svetloba in 8 h tema) hladne fluorescentne luči s pretokom fotonov $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Kulture smo subkultivirali v 21 dnevni intervalih, glede na literaturo, ki so jo objavili Pati in sod. (2005).

3.3 RAZKUŽEVANJE RASTLINSKEGA MATERIALA

3.3.1 Sterilizacija rastlinskega materiala

Izsečke smo prenesli v laboratorij in jih predtretirali pod tekočo vodo 10 minut, da bi odstranili fenolne spojine, ki nastanejo ob ranitvi. Fenolne spojine lahko povzročajo rjavenje in odmiranje tkiva. Poleg tega predtretiranje pod tekočo vodo pripomore k odstranjevanju mikroorganizmov, ki se zadržijo na površini. Rezultati sterilizacije so posledično veliko boljši. Po predhodnem spiranju smo nato izsečke trikrat zaporedoma površinsko sterilizirali z 1,66 % DICA (Sigma) in tremi kapljicami Tween® 20 (Sigma), 3 minute. Površinsko sterilizirane izsečke smo nato petkrat zaporedoma sprali z avtoklavirano vodo (Murovec in sod., 2010).

3.3.2 Sterilizacija pripomočkov

Da bi zagotovili popolnoma sterilne pogoje smo vse potrebne pripomočke (skalpel, pincete) sterilizirali v visokotemperaturnem grelcu. Celoten postopek menjave gojišč in sterilizacija materiala je potekal v brezprašni komori, ki smo jo predhodno razkužili z 70% etanolom. Prav tako smo predhodno avtoklavirali gojitvene posodice ter gojišča v avtoklavu pri 121°C in tlaku 1,13 bar (Bohanec, 1992).

3.4 INDUKCIJA AKSILARNIH POGANJKOV

Sterilne izsečke smo v brezprašnem prostoru sterilno prenesli na avtoklavirana gojišča s 0,1 mg/l NAA, 2 mg/l BAP, 2% saharoze, 4,4 g/l MS + vitamini in 7 g/l agar, z namenom

indukcije aksilarnih meristemov (slika 12). Sledili smo protokolu Zeng in sod., 2013. V tej fazi pogosto prihaja do okužb, če izsečki predhodno niso bili ustrezno sterilizirani ali, če je prišlo do napake pri prenosu. Pogosto se lahko zgodi tudi, da so izsečki slabo odrezani, kar lahko povzroči večjo verjetnost okužb ali pa se kasneje pokaže kot odmiranje tkiva. Za oceno indukcije aksilarnih brstov smo prešteli število izsečkov, ki so uspešno tvorili poganjke po 14 dneh od prenosa. Nato smo jih subkultivirali na gojišča za mikropropagacijo.

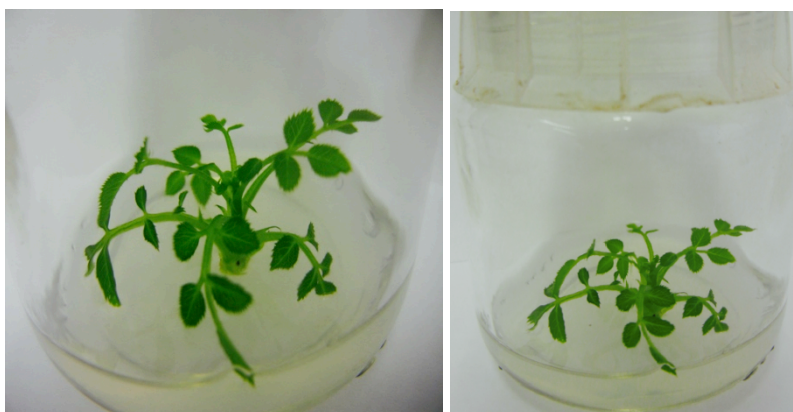


Slika 12: Izsečki na trdnem gojišču za indukcijo aksilarnih meristemov

3.5 MIKROPROPAGACIJA *IN VITRO*

Po 14 dneh v primarni kulturi smo izsečke prenesli v gojišča od 0,1 do 0,4 mg/l NAA. Po prvih rezultatih smo ugotovili, da je za poganjke najbolj ugodna koncentracija 0,1 mg/l NAA. Koncentracijo 0,1 mg/l NAA smo zato dodali v naslednja gojišča, kjer smo spreminjali koncentracije BAP. Preizkusili smo 0,1, 2, 3 in 4 mg/l BAP ter ugotovili, da je 3 mg/l najbolj ugodna koncentracija za indukcijo večjega števila poganjkov na enem izsečku. Zato smo za nadaljnje poskuse izbrali 3 mg/l BAP, vendar ob odsotnosti NAA ter dodajali giberelinsko kislino v koncentraciji 0,1 in 0,2 mg/l. Prav tako smo preizkusili spremenjene vsebnosti saharoze, z namenom indukcije cvetenja. Izbrali smo koncentracije 20, 30, 40 in 50 g/l saharoze ob dodatku 3 mg/l BAP in 0,1 mg/l NAA.

Koncentracije po posameznih gojiščih so podane v preglednici 2. Po 21-ih dneh smo izsečke subkultivirali na gojišča z različnimi koncentracijami giberelinske kisline oziroma saharoze, da bi inducirali cvetenje. Sestava je prav tako podana v preglednici. Po 8 tednih smo odčitali rezultate cvetenja in rasti. Rast poganjkov smo merili z neposrednim merjenjem dolžine ter spremljali značilnosti rasti tekom vzgoje (slika 13).



Slika 13: Izgled izsečkov v zgodnji fazi mikropropagacije

3.6 GOJIŠČA

3.6.1 Postopek priprave gojišč

Najprej smo v čašo natehtali MS z vitamini (Duchefa), dodali saharozo (Duchefa) ter dopolnili z dvakrat destilirano vodo (ddH₂O) do 2/3 volumna. Čašo smo postavili na magnetno mešalo ter mešali, dokler se MS in saharoza nista raztopila. Nato smo iz založnih raztopin dodali ustrezne koncentracije rastnih regulatorjev: BAP, NAA oz. GA₃ (Duchefa). Za tem smo vsebino čaše prenesli v merilno bučko ter umerili volumen do ustreznega volumna. Vsebino smo prenesli nazaj v čašo ter s pomočjo pH metra (Mettler Toledo) umerili pH na 5.8 ob konstantnem mešanju, dokler se vrednost ni umirila na vrednosti 5.8. Vsebino čaše smo prenesli v Schott steklenice in v gojišča dodali agar (Sigma). Tako pripravljena gojišča smo avtoklavirali 20 minut pri 121°C in tlaku 1,13 bar. Po končanem avtoklaviranju smo gojišča prenesli v brezprašno komoro. Ko se je temperatura gojišč spustila na primerno temperaturo smo jih aseptično prelili v končne vsebnike (petrijevke, steklene oz. plastične posodice). Da bi zagotovili popolno sterilnost gojišč smo jih pustili v laboratoriju pri sobni temperaturi par dni, da smo lahko izločili morebitna okužena gojišča (Bohanec, 1992).

3.6.2 Sestava gojišč

Za vzpostavitev primarne tkivne kulture ter indukcijo poganjkov smo sterilizirane izsečke v brezprašnem prostoru aseptično prenesli na avtoklavirano trdno gojišče, ki je vsebovalo:

- 0,1 mg/l NAA,
- 2 mg/l BAP,
- 2% saharoze,
- 4,4 g/l MS + vitamini,
- 7 g/l agar.

Po dveh tednih indukcije poganjkov je sledil je prenos na gojišče z različnimi koncentracijami:

- α - aminoocetne kisline (NAA),
- benzilaminopurina (BAP),
- giberelinske kisline (GA3),
- saharoze.

Koncentraciji MS z vitamini ter agarja sta v vseh gojiščih enaki. Za lažji pregled gojišč so koncentracije prikazane v preglednici 2. Prav tako je sestava gojišča MS + vitamini podana v preglednici 3.

Za vsako koncentracijo smo pripravili tri ponovitve gojišč. V vsako izmed pripravljenih gojišč smo prenesli po 3 izsečke, kar je znašalo 9 ponovitev za posamezno koncentracijo gojišča. Potrebno je tudi omeniti, da je dejansko število vzorcev in število izsečkov za posamezno gojišče tekom poskusa različno, saj relativno pogosto prihaja do okužb ali odmiranja rastlinskega materiala.

Rezultati so predstavljeni kot povprečje meritev iz posameznega gojišča. Povprečna dolžina skupkov je predstavljena s standardno napako aritmetične sredine, katero izračunamo po enačbi 1.

Preglednica 2: Pregled posameznih gojišč s koncentracijami rastnih regulatorjev, saharoze, MS in agarja.

Št. gojišča	Konc. NAA [mg/l]	Konc. BAP [mg/l]	Konc. GA3 [mg/l]	Konc. saharoze [g/l]	Konc. MS [g/l]	Konc. Agar [g/l]
1	-	3	-	30	4,4	7
2	0,1	3	-	30	4,4	7
3	0,2	3	-	30	4,4	7
4	0,3	3	-	30	4,4	7
5	0,4	3	-	30	4,4	7
6	0,1	2	-	30	4,4	7
7	0,1	1	-	30	4,4	7
8	0,1	-	-	30	4,4	7
9	-	3	0,1	30	4,4	7
10	-	3	0,2	30	4,4	7
11	0,1	3		40	4,4	7
12	0,1	3		50	4,4	7

Preglednica 3: Sestava MS + vitamini (Kors, 2016)

Mikroelementi	mg/l	μM
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.11
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.10
FeNaEDTA	36.70	100.00
H ₃ BO ₃	6.20	100.27
KI	0.83	5.00
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.90	100.00
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	1.03
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.60	29.91
Makroelementi	mg/l	mM
CaCl ₂	332.02	2.99
KH ₂ PO ₄	170.00	1.25
KNO ₃	1900.00	18.79
MgSO ₄	180.54	1.50
NH ₄ NO ₃	1650.00	20.61
Vitamini	mg/l	μM
Glicin	2.00	26.64
mio-Inozitol	100.00	554.94
nikotinska kislina	0.50	4.06
piridoksin HCl	0.50	2.43
tiamin HCl	0.10	0.30

3.7 DOLOČANJE DOLŽINE POGANJKOV

Dolžino poganjkov smo določali ob vsaki subkultivaciji s pomočjo neposrednih meritev. Izsečke smo postavili na sterilen pladenj ter začrtali dolžino izsečka na pladnju. Izsečke smo prestavili na gojišče in kasneje odčitali dolžine v centimetrih. Izsečke smo zaradi hitrega izsuševanja čimprej prenesli na novo gojišče. Iz posameznih dolžin smo izračunali povprečne vrednosti posameznih izsečkov in odmik standardne napake aritmetične sredine (S.E.). S.E. izračunamo po enačbi 1, pri čemer oznake pomenijo: σ – standardni odklon od aritmetične sredine in N – število ponovitev. Vrednosti smo izračunali s pomočjo računalniškega orodja MS Excel.

$$S.E. = \frac{\sigma}{\sqrt{N}}$$

... (1)

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

V tem poglavju bomo predstavili in interpretirali rezultate, ki smo jih pridobili z eksperimentalnim delom.

Proces smo razdelili v štiri faze, ki si sledijo v različnih časovnih intervalih: priprava matične rastline, sterilizacija, indukcija aksilarnih meristemov, razmnoževanje poganjkov, *in vitro* cvetenje ter prenos v estetski vsebnik. Za vsako fazo rasti (indukcija aksilarnih meristemov, razmnoževanje poganjkov ter *in vitro* cvetenje) smo pripravili različna gojišča in s pomočjo meritev dolžin poganjkov in opazovanj poskusili ugotoviti optimalno koncentracijo sestavin gojišča. Pričakovali smo možnost nezaželenih pojavov kot je ekstremno razraščanje, hiperhidracija itd., kar smo spremljali s pomočjo opazovanj. Predvideli smo, da bo mogoče izzvati *in vitro* cvetenje in da lahko omogočimo prenos skupkov poganjkov v tržno oblikovane vsebnike.

V preglednicah in grafih povzemamo meritve dolžin poganjkov s pomočjo povprečne vrednosti ter standardno napako odmika od aritmetične sredine (S.E.) izračunano po enačbi 1. Sposobnost indukcije poganjkov iz izsečkov predstavljamo v obliki deležev, kjer je podano število uspešno induciranih izsečkov od celokupnega števila izsečkov na posameznem gojišču. Meritve so opravljene v treh tednih po subkultivaciji. Za lažjo predstavbo in kasnejšo interpretacijo prilagamo za vsako preizkušano koncentracijo tudi slike izsečkov ter opis opazovanj.

V drugem delu te razprave obravnavamo tudi prenos poganjkov v tržno oblikovane vsebnike ter analiziramo morebitna tveganja.

4.1 VZPOSTAVITEV TKIVNE KULTURE

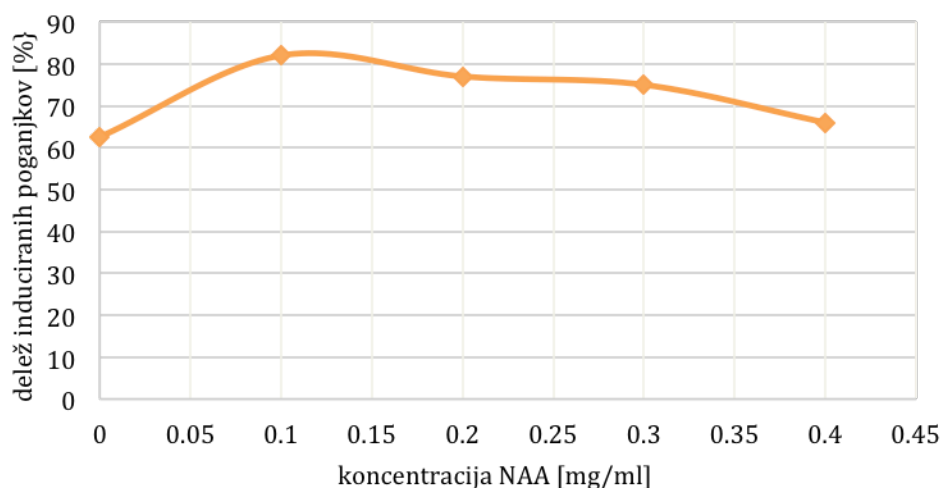
Primarno kulturo smo inducirali na trdnem gojišču, ki je vsebovalo 0,1 mg/l NAA, 2 mg/l BAP, 2% saharoze, 4,4 g/l MS z vitamini in 7 g/l agar. Po 14 dneh smo odčitali rezultate vzpostavitve tkivne kulture. Izračunali smo stopnjo indukcije poganjkov ter stopnjo okuženosti. Večina izsečkov je bila po sterilizaciji neokuženih ter je izkazovala znake rasti, s čimer smo potrdili našo hipotezo, da je mogoča vzpostavitev tkivne kulture vrtnic.

Aksilarni poganjki so se pojavili po 14 dneh v primarni kulturi. Od skupno 92 izsečkov je bilo po 14 dneh v primarni kulturi okuženih 35 izsečkov, kar znaša 38,1%. Od skupno 57 neokuženih izsečkov, 13 izsečkov ni izkazovalo znakov rasti, kar znaša 22,8%. Celokupen izkoristek vzpostavitve tkivne kulture je bil torej 44/92 ali 47,8%. Če bi zmanjšali stopnjo okužb (38%), je bila stopnja indukcije poganjkov relativno uspešna (22%). Od začetnih izbranih osmih sort je imelo zdrave in aktivne poganjke le 4 primerkov rastlin. Zaradi neenakomerne razporejenosti posameznih sort, lahko razlike med posameznimi genotipi podamo le na podlagi opazovanj rasti in ne posameznih meritev.

Glede na raziskave Jabbaryadeh in Khosh-Khui (2005) položaj izsečka na gojišču (horizontalno, vertikalno) nima vpliva na rast, vendar pa je pomembno zagotoviti dober stik med gojiščem in izsečkom. To je pomembno predvsem ob premikanju vsebnikov, saj se lahko zgodi da izsečki izgubijo stik z gojiščem.

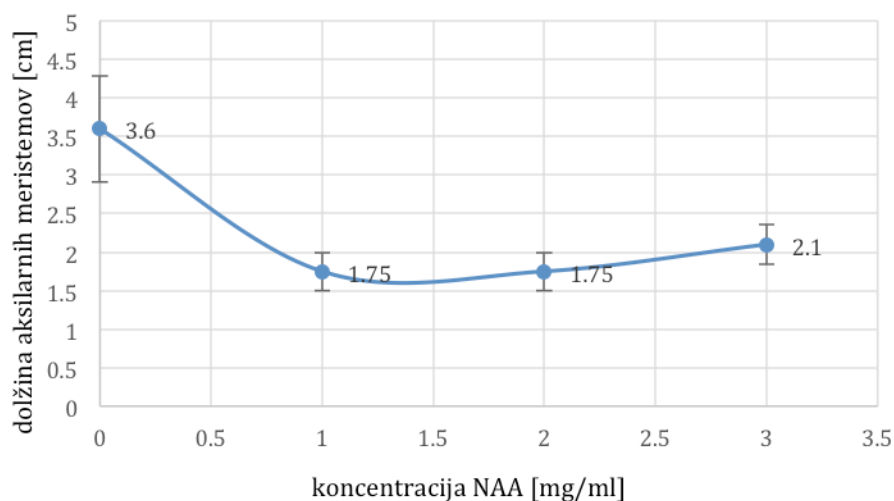
4.2 VPLIV NAA NA RAST INDUCIRANIH POGANJKOV

Preizkusili smo vpliv 0, 0,1, 0,2, 0,3 in 0,4 mg/l NAA na gojiščih ob dodatku 4,4 g/l MS, 3 mg/l BAP, 3% saharoze in 7 g/l agarja na rast poganjkov. Dolžine (cm) in deleži induciranih poganjkov (%) so prikazani na sliki 14 in 15, ter v preglednici 1 v prilogi 1. Videz izsečkov je prikazan na sliki 16.



Slika 14: Vpliv koncentracije NAA na delež indukcije poganjkov iz izsečkov.

Iz grafa na sliki 14 vidimo, da se stopnja indukcije poganjkov povečuje do koncentracije in doseže maksimalno vrednost v koncentraciji 0,1 mg/l NAA. V koncentracijah višjih od 0,1 mg/l NAA se stopnja indukcije poganjkov zmanjšuje, kjer najnižjo vrednost doseže pri najvišji preizkuseni koncentraciji NAA, 0,4 mg/l. Iz tega lahko sklepamo, da najvišjo stopnjo indukcije poganjkov dosežemo pri koncentraciji 0,1 mg/l NAA in da povečanje koncentracije nad to vrednostjo, negativno vpliva na indukcijo poganjkov.



Slika 15: Vpliv koncentracije NAA [mg/l] na dolžino induciranih poganjkov [cm].

Na grafu na sliki 15 vidimo izstopanje krivulje pri podatku 0,4 mg/l NAA, kar povezujemo z začetno večjo velikost izsečka, ki je bil v tem primeru za 2 cm večja od povprečja, saj smo uporabili daljši izseček, saj je bila preizkušana vrtnica sorte 'Beverly', ki ima debelejšše steblo. Če izločimo vrednost 0,4 mg/l NAA vidimo krivuljo v obliki zvona, o kateri smo govorili v uvodu in prikazuje za rastne regulatorje značilno krivuljo. Pri nizkih koncentracijah učinka ni, medtem ko je pri visokih koncentracijah učinek inhibitoren. Največji učinek dosežemo pri vmesnih vrednostih (George in sod., 2008). Vmesna vrednost ali maksimum krivulje je pri 0,1 mg/l, kar je tudi najbolj ugodna koncentracija za indukcijo poganjkov, kot vidimo iz krivulje na sliki 15. To je tudi v skladu z rezultati Jabbaryadeh in Khosh-Khui (2005) ki so v članku navedli 0.1 mg/l IBA kot najbolj ugodno koncentracijo avksinov za proliferacijo poganjkov vrtnic. Tudi Wang in sod.. (2002) navajajo kot najbolj ugodno koncentracijo 0,1 mg/l NAA. Avksine (IAA, NAA, 2,4-D, IBA) potrebuje večina rastlinskih celic za delitev in iniciacijo korenin. V višjih koncentracijah, avksini lahko ustavijo morfogenezo in povzročijo nastanek kalusa (George in sod., 2008). Pri izsečkih z razvojem kalusa je opazna zavrta rast. To vidimo tudi na grafu na sliki 15, saj so bili poganjki na gojišču z 0,2 mg/l in 0,3 mg/l krajši v primerjavi z 0,1 mg/l NAA.

Opazovanja:

- 0,4 mg/L NAA: izrazito razraščanje, ob vznožju je poganjalo več stebel. Posamezni izseček ima tudi po 9 novo zrastle in v povprečju 3-4 poganjke. Le eden izseček je odmrl, listi so porumeneli, steblo se je skrčilo in izsušilo. Listi so svetlo zeleni in ni nastanka kalusa.

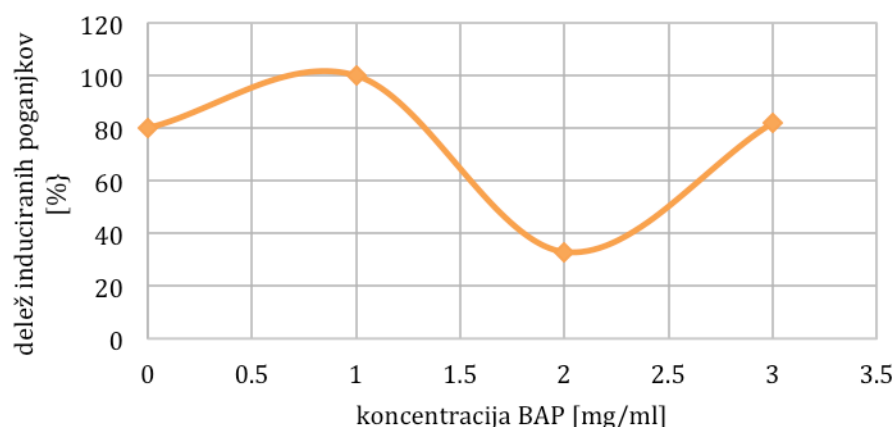
- 0,3 mg/l NAA: nastal je kalus, ki pa ni bil tako izrazit kot pri 3 mg/l BAP. Listi so bili svetlo zeleni in so postajali obarvani vijolično. Razvitih je bilo več poganjkov na enem izsečku.
- 0,2 mg/l NAA: razvoj kalusa, svetlo zeleni listi. Izsečki tvorijo več poganjkov na enem izsečku. Opazimo, da se sorta Jacques Cartier odziva slabše kot 'Flirt', kjer ni prišlo do odmiranja listov. Videz izsečkov je na sliki 16.
- 0,1 mg/l NAA: izrazito bujna rast z razvitimi listi temno zelene barve.
- 0 mg/l NAA: od treh izsečkov je poganjal le eden, z dvema stebeloma, ki sta bili izrazito majhni in s svetlo zelenimi listi.



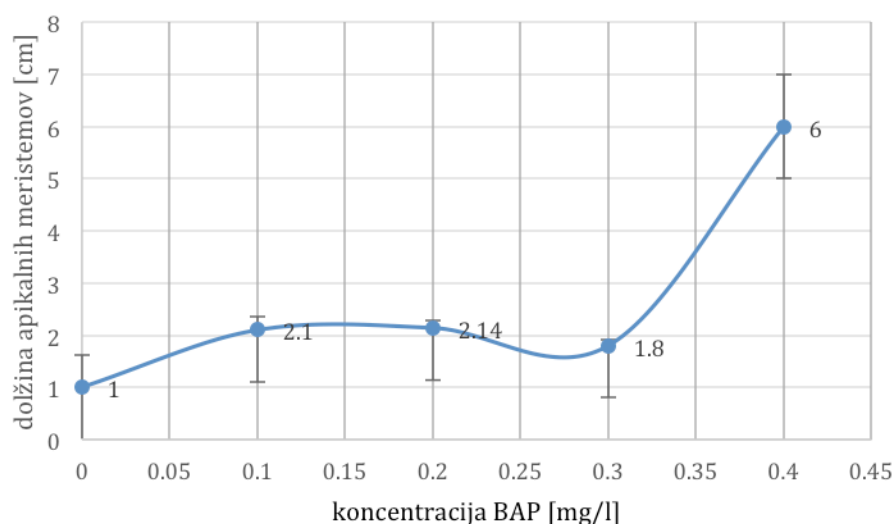
Slika 16: Prikaz izsečkov na gojišču, ki vsebuje 0,2 mg/l NAA, 3 mg/l BAP, 3% saharoze, MS in 7 g/l agar. Pri manjšem izsečku vidimo razvoj kalusa.

4.3 VPLIV BAP NA RAST INDUCIRANIH POGANJKOV IZ IZSEČKOV VRTNIC

Preizkusili smo vpliv 0, 1, 2, in 3 mg/l BAP na gojiščih ob dodatku 4,4 g/l MS, 0,1 mg/l NAA, 3% saharoze in 7 g/l agarja. Na slikah 17 in 18 povzemamo meritve s pomočjo povprečne vrednosti. Posamezne meritve so predstavljene v preglednici 2 prilogi 1. Meritve smo opravili v 3 tednih po subkultivaciji. Videz izsečkov je prikazan na sliki 19.



Slika 17: Vpliv koncentracije BAP na delež indukcije poganjkov iz izsečkov



Slika 18: Vpliv koncentracije BAP [mg/l] na dolžino induciranih poganjkov [cm]

Na grafu na sliki 18 vidimo, da povečanje koncentracije BAP z 1 mg/ml na 3 mg/ml povzroči zmanjšanje dolžine poganjkov. Pati in sod. (2005) so ugotovili, da hormon BA pri vrtnicah promovira višje število poganjkov na izseček v primerjavi s KIN, medtem ko 2-*Ip* kaže vmesne rezultate. Kakorkoli, pa poganjki ob prisotnosti 2-*ip* In KIN niso preživel po prenosu *ex vivo*. Ugotovili so tudi, da prisotnost BA zmanjša izdolževanje poganjkov v primerjavi z 2-*Ip*, kar je tudi v skladu z našimi ugotovitvami, da BA zavira izdolževanje.

V študiji Pati in sod. (2005) navajajo, da višja koncentracije BA (5.0 mg/l) tudi vpliva na hiperhidracijo, kar smo tudi mi opazili ob povišani koncentraciji BAP. Glede na članek, se hiperhidracija pri vrtnicah pogosto pojavi ob prisotnosti nizkih koncentracij NAA (0,01-0,05 mg/l) in visokih koncentracijah BAP (5.0 mg/L) ali ob prisotnosti TDZ (ali LB in L12) ali zeatina (Pati in sod., 2005). To je v skladu z našimi rezultati, saj se je hiperhidracija pojavila gojiščih z 2 mg/l in 3 mg/l BAP ter 0.1 mg/l NAA. Tukaj velja

omeniti, da se pojav hiperhidracije včasih imenuje tudi vitifikacija. Hiperhidracija je negativen pojav, saj so hiperhidrirane rastline nezmožne koreninjenja ter nastanka normalnih, cvetočih rastlin. Pojav pogosto opazimo na gojiščih z nizko koncentracijo agarja, kar lahko uravnavamo s povišanjem koncentracije.

Raziskovalci so ugotovili, da razmerje 1.0 mg/l BA in 0.5 mg/l NAA pozitivno vpliva na pomnoževanje v primerjavi s samo BA, kjer se zmanjša število poganjkov (Pati in sod., 2005). S povišanjem koncentracije BAP smo z meritvami in opazovanji ugotovili, da le-ta negativno vpliva na izdolževanje, vendar pa kljub temu skupki rastejo bujno in tvorijo številne poganjke. Jabbarzadeh in Khosh-Khui (2005), so kot optimum za proliferacijo poganjkov vrtnic navedli kombinacijo 2.5-3 mg/l BA in 0.1 mg/l IBA. Zaradi pojava hiperhidracije ne moremo z zagotovostjo potrditi primerne koncentracije BAP. V primeru tržne uporabe bi bilo potrebno o razmerju število poganjkov in dolžine, saj BAP zmanjša izdolževanje, vendar poveča število poganjkov. Lahko bi opravili tudi dodatne preizkuse s širšim razponom koncentracij in tako poskusili s pomočjo rezultatov ugotoviti najbolj ugodno koncentracijo.

Opazovanja:

- 3 mg/l BAP: razvili in odzivali zelo bujno, opazimo pojav hiperhidracije
- 2 mg/l BAP: smo prav tako opazili lepo zasnovo in razraščanje, vendar je bila prav tako kot pri BAP 3 mg/l opazna hiperhidracija. Pri genotipu 'Flirt' je bila še bolj izrazito opazna hiperhidracija.
- 1 mg/l BAP: smo opazili predvsem različen odziv med genotipoma 'Flirt' in 'Beverly'. Pri sorti 'Beverly' so bili listi bolj temno zelene barve in tudi večja velikost skupka. Sorta 'Flirt' je manjša in ima bolj svetlo zelene liste. To smo sicer opazili tudi pri gojiščih z spremenjenimi vrednostmi NAA.



Slika 19: Prikaz rasti na gojišču, ki vsebuje 3 mg/l BAP, 0.1 mg/l NAA, 3% saharoze, MS in 7 g/l agar

4.4 VPLIV GIBERELINSKE KISLINE NA RAST INDUCIRANIH POGANJKOV IZ IZSEČKOV VRTNIC

Preizkusili smo vpliv 0, 0,1 in 0,2 mg/l GA₃ na gojiščih ob dodatku 4,4 g/l MS, 3 mg/l BA, 2% saharoze in 7 g/l agarja. V preglednici 6 povzemamo meritve s pomočjo povprečne vrednosti. Meritve smo opravili v 3 tednih po subkultivaciji. Videz izsečkov je prikazan na slikah 20 in 21.

Preglednica 4: Vpliv koncentracije giberelinske kisline na rast skupkov v obdobju enega meseca

GA ₃	dolžina apikalnih meristemov (povprečna vrednost) [cm]	dolžina apikalnih meristemov po enem mesecu[cm]
0	2,6 ± 0,27 ^a	4,4 ± 0,61 ^a
0,1	2,5 ± 0,34 ^a	7,1 ± 0,40 ^a
0,2	2,9 ± 0,08 ^b	7,7 ± 0,41 ^b

a – povprečna vrednost 7 izsečkov, b – povprečna vrednost 8 izsečkov

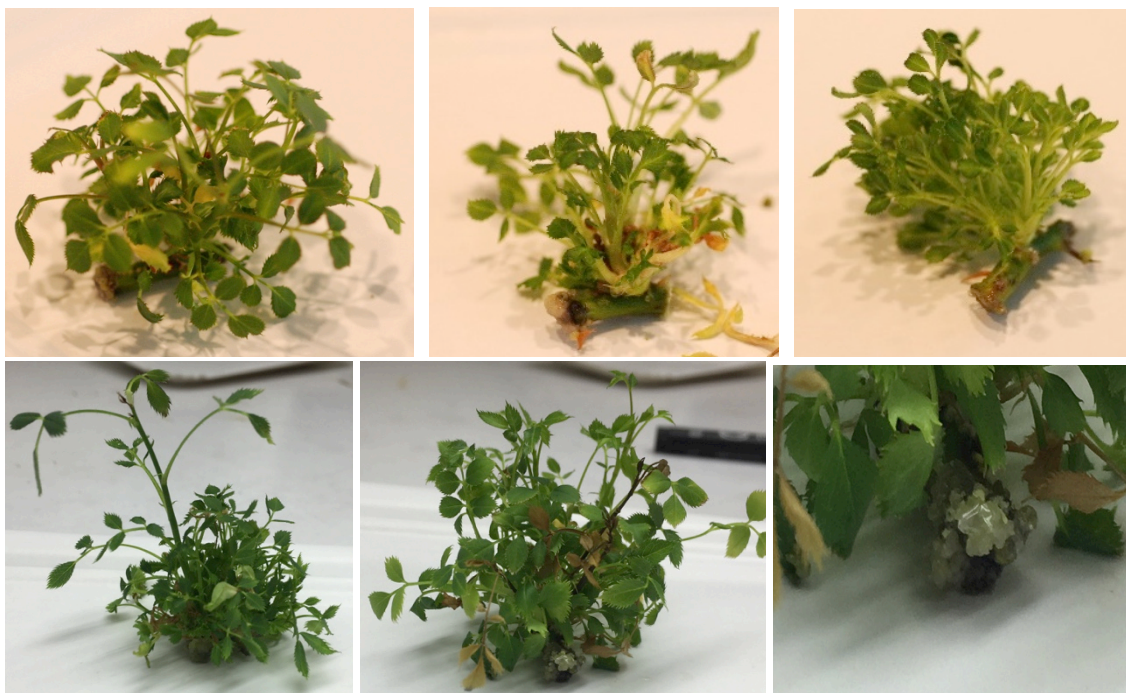
Po podatkih v literaturi naj bi giberelinska kislina pomembno vplivala na cvetenje ter ga celo inducirala. (Bendahmane in sod., 2013 in Choubane in sod., 2012). Znano je tudi, da giberelinska kislina vpliva povzroči izdolževanje (George in sod., 2008). S pomočjo meritev, ki so prikazane v preglednici 6 vidimo, da se je dolžina iz začetnih 2,5-2,9 cm povečala na 7,1 cm oziroma v najvišji koncentraciji 0,2 mg/l GA₃ do 7,7 cm. Iz tega lahko sklepamo, da GA₃ pozitivno vpliva na izdolževanje. To vidimo tudi na sliki 21. Prav tako smo na gojišču z dodatkom 0,1 mg/l GA₃ opazili pojav cveta, kar vidimo na sliki 20. Iz nepojasnjene razloga smo opazili izsuševanje cvetnega nastavka. Za nadaljne zaključke bi lahko preizkusili pogostejšo subkultivacijo ter tako zmanjšali izsuševanje. Pri koncentraciji višji od 0,1 mg/l GA₃ nismo opazili cvetnih nastavkov smo pa opazili nekaj kalusa. Prav tako Pati in sod. (2005) navajo 0,1 mg/l kot optimalno koncentracijo za razmnoževanje poganjkov vrtnic.

Opazovanja:

- 0,1 mg/l GA₃: dva skupka poganjkov s cvetovi od skupno sedmih izsečkov (28%). Pojav zrelega cveta, z odprtimi prašniki (slika 20), pri drugem cvetni nastavek. Skupki so s tvorili dobro zasnovo in razraščanje, med vsemi je bilo na gojiščih najbolj izrazito izdolževanje. Tudi izsuševanje cvetnih brstov.
- 0,2 mg/l GA₃: lepa zasnovo za nadaljnjo rast, vendar izsečki niso tvorili cvetnih nastavkov kot pri 0,1 GA₃. Opazno je bilo podaljševanje glavnega poganjka, vendar ne tako izrazito, kot pri 0,1 mg/l GA₃. Opazili smo kalus, vendar manj kot pri ostalih (slika 21).



Slika 20: Prikaz cvetoče vrtnice na gojišču, ki vsebuje 0,1 mg/l GA₃.



Slika 21: Videz izsečkov na gojišču, ki vsebuje 0,2 mg/l GA₃

4.5 VPLIV SAHAROZE NA RAST IN CVETENJE AKSILARNIH IZSEČKOV VRTNIC

Preizkusili smo vpliv 30, 40 in 50 g/l saharoze na gojiščih ob dodatku 4,4 g/l MS, 3 mg/l BA, 0.1 mg/l NAA in 7 g/l agar. V preglednici 7 povzemamo naše meritve s pomočjo povprečne vrednosti. Meritve smo opravili v 3 tednih po subkultivaciji. Videz izsečkov je prikazan na slikah 22, 23 in 24.

Preglednica 5: Vpliv koncentracije saharoze na dolžino skupkov in rast

Koncentracija Saharoze [g/l]	dolžina skupka [cm]	dolžina skupka po enem mesecu [cm]
30	$2,6 \pm 0,27^a$	$4,4 \pm 0,61^a$
40	$2,25 \pm 0,42^b$	$5,5 \pm 0,30^b$
50	$2,8 \pm 0,44^b$	$5,5 \pm 0,88^b$

a – povprečna vrednost 7 izsečkov, b – povprečna vrednost 6 izsečkov

Po podatkih saharoza pozitivno vpliva na rast in nastanek cvetov, zato smo preizkušali povišane koncentracije saharoze. Raziskovalci so proučevali vpliv različnih sladkorjev (glukoze, saharoze, manitola, sorbitola in galaktoze) na rast v koncentracijah 20 g/l. Ugotovili so, da so poganjki, ki so rastle na glukozi in saharozi, daljši in tvorili več poganjkov. Nato so proučevali različne koncentracije glukoze in saharoze in ugotovili, da ni imelo opazne razlike na rast. Pri saharozi so opazili najmanjši pojav hiperhidracije v primerjavi z ostalimi ogljikovimi hidrati (Yaseen in sod., 2013).

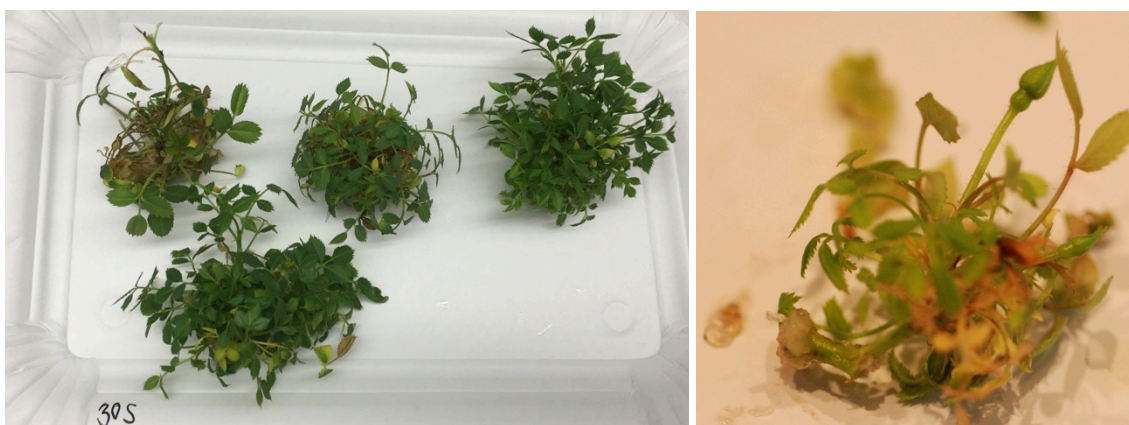
Pri gojiščih z višjo vsebnostjo saharoze smo opazili hitrejše izsuševanje rastlin. Izsečki so tvorili cvetni nastavek, ki pa se je nato v rasti ustavil in se izsušil, prav tako kot pri povišani koncentraciji giberelinske kisline (0,2 mg/l). Čeprav smo opazili močno razraščanje in tudi tvorbo korenin smo lahko opazili sušenje listov, ki je potekalo od spodnjih listov navzgor. Ena izmed možnosti je, da je zaradi povišane koncentracije saharoze prišlo do povišanja osmotskega potenciala vode, kar ima kot negativno posledico slabšo dostopnost vode. Vendar smo to opazili tudi pri nižji koncentraciji 30 g/l in pri gojiščih z dodatkom giberelinske kisline. Za nadaljnje zaključke bi bilo smiselno skrajšati čas subkultivacije ter tako izločiti pomanjkanje hranil kot faktor izsuševanja.

Na gojiščih s povišano koncentracijo saharoze smo opazili pojav korenin in hitrejšo rast v obdobju enega meseca. Wang in sod (1997) navajajo, da so pri *Dendrobium candidum* izsečki s koreninami sicer cveteli *in vitro*, vendar pa je bil odstotek *in vitro* cvetenja nižji kot pri izsečkih brez korenin. Literatura navaja, naj bi bile korenine glavno mesto sinteze citokininov in da so posledično skupki s koreninami bolj občutljivi na zunanji dodatek citokininov kot skupki brez korenin. Po drugi strani pa naj bi bile korenine tudi mesto za nekatere substance, ki so potrebne za iniciacijo cvetenja ter tudi za sprošanje signalov, ki inhibirajo cvetenje, kot so opazili pri tobaku (McDaniel, 1996).

Podatki meritev so podani v preglednicah 7 in 8. V primerjavi z 30 g/l saharoze je pri 40 g/l saharoze opazna hitrejša rast v obdobju enega meseca, kjer se je dolžina iz 2,25 cm povišala na 5,5 cm. Na gojišču, ki je vsebovalo 50 g/l saharoze lahko iz podatkov vidimo, da se je v enem mesecu dolžina poganjka povišala s 2,8 cm na tudi do 8 cm, kar je večja razlika kot pri 30 g/l in 40 g/l saharoze. Iz tega lahko sklepamo, da povišana koncentracija ugodno vpliva na rast poganjkov, vendar so iz nepojasnejenega razloga odmirali cvetni nastavki. Da bi zmanjšali izsuševanje, bi lahko opravili pogostejšo subkultivacijo ali zmanjšali gostoto gojišča, s čimer bi povečali dostopnost vode.

Opazovanja:

- 30 g/l saharoze: manjši poganjki v primerjavi s 40 g/l in 50 g/l saharoze. Tvorba cvetnega nastavka ter izsuševanje.
- 40g/l saharoze: tvorba dveh cvetnih nastavkov in korenin, tudi pojav kalusa in bujnega razraščanja brez izsuševanja.
- 50 g/l saharoze: razvoj kalusa. Iz nepojasnenega razloga so na novo nastali cvetni nastavki odmirali.



Slika 22: Levo - izgled izsečkov, ki so rastle na gojišču z 3% saharoze, 3 mg/l BAP, 0.1 NAA, MS + vitamini, 7 g/l agar desno - primer cvetnega nastavka, ki kaže znake izsuševanja



Slika 23: Izgled izsečkov, ki so rastli in tvorili cvetne nastavke na gojišču z 4% saharoze, 3 mg/l BAP, 0.1 NAA, MS + vitamini, 7 g/l agar



Slika 24: Primerki *in vitro* cvetočih vrtnic ter izseček s korenin

4.6 INDUKCIJA *IN VITRO* CVETENJA

Odstotki cvetočih izsečkov so prikazani v preglednici 6 in so izračunani s pomočjo deležev posameznih cvetočih rastlin in celokupnega števila izsečkov na izbranem gojišču. V preglednici vidimo, da so nam tako v primeru giberelinske kisline kot tudi povišane saharoze zacveteli primerki poganjkov iz induciranih aksilarnih izsečkov.

Preglednica 6: Prikaz sestave gojišč in uspešnost indukcije cvetenja v %

Koncentracija NAA [mg/l]	Koncentracija BAP [mg/l]	Koncentracija GA ₃ [mg/l]	Koncentracija saharoze [g/l]	Indukcija cvetov (%) ^a
-	3	-	30	-
0,1	3	-	30	5/23 (21%)
0,2	3	-	30	2/9 (22%)
0,3	3	-	30	-
0,4	3	-	30	-
0,1	2	-	30	-
0,1	1	-	30	-
0,1	-	-	30	-
-	3	0,1	30	2/7 (28%)
-	3	0,2	30	-
0,1	3	-	40	2/6 (33%)
0,1	3	-	50	2/6 (33%)

Kljub našemu predvidevanju, da saharoza in giberilnska kislina pozitivno vplivata na cvetenje, so nam zacveteli primerki, ki niso rasli na gojiščih s povišano koncentracije saharoze in brez dodatka giberelinske kisline, ampak so vsebovali 3 mg/l BAP in 0.1-0.2 mg/l NAA. Glede na literaturo lahko avksini zavrejo pozitiven učinek BA na *in vitro* cvetenje (Goh in Yang, 1978). Wang in sod. (1997) prav tako navajajo, da lahko dodatek NAA zavre tvorbo cvetov. Morda je tudi zunanji dodatek NAA v zadnji fazi *in vitro* cvetenja povzročil odmiranje cvetnih nastavkov, zato bi bilo smiselno proučiti tudi gojišča za cvetenje brez dodatka NAA. Vsekakor imamo premalo podatkov, da bi lahko sklepali, kaj je vplivalo na delež cvetočih rastlin, saj se rezultati med seboj preveč razlikujejo.

Glede na raziskave Zeng in sod. (2013), lahko na cvetenje pozitivno vpliva tudi različna temperatura podnevi in ponoči, kjer je nočna temperatura nižja od dneвне. Prav tako v literaturi lahko v primeru giberilinske kisline ugotovimo, da poleg zunanjega dodatka hormonov na nastanek cveta pomembno vpliva tudi svetloba (Choubane in sod. 2012). Smiselno bi bilo proučiti še več različnih zunanjih pogojev, kot je na primer sprememba temperature ali stopnja osvetlitve. Nizko-temperaturni program za *in vitro* cvetenje so dokumentirali v študijah *Phalenopsis*-a. Giberelini in temperatura so vplivali na vsebnost

sladkorjev in posledično na cvetenje pri *Phalenopsis*-u, saj so sladkorji signal ki ima vlogo pri rasti in morfogenezi (Chia in sod., 1994). Glede na literaturo temperaturna razlika podnevi in ponoči favorizira akumulacijo sladkorjev (Bernier in sod., 1993).

Wang in sod. (2009) navajajo, da celokupni čas od primarne kulture in čas do subkultivacije igrata bistveno vlogo pri indukciji cvetenja *in vitro*. Poganjki so na videz kazali različno fiziološko stanje in stopnjo, kar se odraža tudi pri raznolikih odstotkih pojava *in vitro* cvetenja pri različnih gojišči. Pojav morda lahko pripišemo raznoliki stopnji endogenih hormonov, stopnji osvetlitve, temperaturi, času subkultivacije ali pa drugim nepojasnenim razlogom.

4.7 OBLIKOVANJE VSEBNIKOV

Znanje in uporabo rastlinske biotehnologije bi radi predstavili na nov način, zato smo se povezali skupaj z grafičnim oblikovanjem in ustvarili več oblik izdelkov, ki jih bomo slikovno ponazorili in opisali. V nadaljevanju bomo pregledali možne načine uporabe, premislili bomo pa tudi o ciljnih trgih, sami ravni tveganja in omejitvah.

Cilj je, da znanje rastlinske biotehnologije, predstavimo na uporabniku uporaben način. Ekonomsko uporabno vrednost bi predstavljal estetsko oblikovan izdelek, ki vsebuje *in vitro* cvetočo rastlino. Končni izdelek bi se postavil v različne prostore z različnimi nameni (*ex vivo*). Gre torej za postopek prenosa *in vitro* vzgojenih rastlin v *ex vivo* pogoje. Tekom naše raziskave smo se osredotočili na sestavo gojišč, vendar bi bile v primeru tržne uporabe potrebne dodatne raziskave, da bi lahko odgovorili na vprašanja kot je na primer sterilnost, izmenjava plinov in rok uporabnosti. Dodatne raziskave bi bile potrebne tudi, da bi poiskali rešitve za navedena tveganja in odkrili morebitne dodatne omejitve.

Da bi lažje predstavili idejo, ki bi imela tudi tržno vrednost in povečali zanimanje ter izboljšali videz smo se povezali z grafičnimi oblikovalci. Le-ti so nato izdelali grafične podobe glede na naše želje in jih predstavljamo v nadaljevanju. Slike so rezultat grafičnega prikaza Vesne Golob, Davida Tavčarja in Roberte Cetina.

Slika 25, ki prikazujejo različne oblike je simbolična. Vidimo rastline v vsebniku, ki sta v obliki kocke oziroma krogle. V primeru, da je oblika kvadratna, se vsebnik lahko samostojno postavi v prostor, medtem ko je v primeru krogle potrebna dodatna opora, v tem primeru je to viseča nit. Prav tako vidimo viseče krogle in viseče kapljice, ki služijo kot dekoracija prostora v večjem merilu. Na sliki tako lahko predstavljamo, da gledamo veliko dvojno okno, ki je na primer galerija ali del vhoda. Zaradi podaljšanih linij ustvarja večji in opaznejši videz. Na sliki je prikazan sistem vsebnikov, ki lahko v prostoru služi zelena stena ali pa postavitev v prostoru, ki hkrati služi kot polica za druge predmete. Rastline na sliki prikazujejo sistem satovja, ki eden izmed vzorcev narave, kar bi uporabnika spominjalo na vzorce iz narave. Na slikah so na primer sedeži, lahko pa so tudi

stebri, ki imajo zeleni pridihi. Na sliki je tudi prikazan sprejemni pult, ki lahko služi tudi kot miza ali klop v večjih objektih, kjer je večje število ljudi. Na sliki so predstavljeni vsebniki v obliki kock, ki bi se lahko tudi nalagale ena na drugo ali ena zraven druge, s čimer bi ustvarili podobo zelene stene. Vsekakor bi v sami zasnovi stene potrebovali še ogrodje, da bi lahko posamezne vsebnike poljubno menjavali.

4.7.1 Tveganja in omejitve

Tekom naše raziskave smo se osredotočili na sestavo gojišč, vendar bi bile v primeru tržne uporabe potrebne še dodatne raziskave, da bi lahko odgovorili na nekatera vprašanja oziroma poiskali rešitve za določena tveganja in omejitve.

Za zagotavljanje sterilnosti vsebnikov, ki je pogoj za uspeh tkivnih kultur bi bilo potrebno izdelati vsebnike, ki bi bili narejeni iz laboratorijskega oz. borovega stekla in bi jih lahko avtoklavirali. Prav tako bi se morali avtoklavirati tudi morebitni sestavni deli. V primeru, da bi uporabili navadno steklo bi za zagotavljanje aseptičnih pogojev lahko uporabili tudi kemično ali UV sterilizacijo. V našem primeru, smo prenos v vsebnike izvedli s pomočjo razkuževanja z etanolom, vendar to vsekakor ni dovolj za zagotavljanje popolne sterilnosti.

Vprašanje, ki se pogosto postavlja se tiče obstojnosti izdelka in s tem povezanega roka uporabnosti. Ker so naše raziskave potekale *in vitro* bi bilo potrebno rastline v končnih vsebnikih testirati za obstojnost v pogojih *ex vivo* ter tako določiti rok uporabnosti.

Eno izmed vprašanj je med drugim tudi kondenz. Ko smo izdelke prenašali v različne prostore smo pogosto opazili pojav kondenza ob nihanju temperature, vendar pa smo opazili tudi, da se je čez čas ta kondenz zadrževal na dnu posodice. Težavo s kondenzom bi lahko morebiti rešili s predhodnim ohlajanjem gojišča ali uporabo hidrofobnih sprejev na površini stekla. Zanimivo bi bilo preizkusiti ali lahko količino kondenza zmanjšamo z uporabo več slojev gojišča. To bi lahko naredili tako, da bi spodnji sloj vseboval nižje koncentracije agarja kot zgornji, s čimer bi vrhnji sloj morebiti lahko preprečili izhlapevanje vode in posledično na nastanek kondenza.

Omejitev bi lahko predstavljala tudi izmenjava plinov z okolico, kjer bi bilo potrebno zagotoviti zadosten dotok zraka, da se v vsebnikih ne bi kopičil etilen. Etilen povzroča predčasno senescenco, vendar pa bi v te namene lahko uporabili filtre z dodatkom snovi, kot je npr. KMnO_4 , ki veže etilen.

Če pogledamo izdelek z vidika uporabnika, lahko ugotovimo zanj morebitno pomanjkanje uporabnosti vsebnika, po tem ko se rastlina posuši oz. zmanjka hranil. Mislimo predvsem v oziru ponovne uporabe vsebnika, saj se le-ta ne odpira. Lahko bi poskusili ponovno uporabiti vsebnike ali pa bi razvili vsebnik, ki se lahko uporablja tudi v druge namene. V

primeru, da bi uporabili plastične vsebnike, ki bi morebiti uporabniki lahko menjavali po sistemu 'staro za novo', kjer bi bilo ob vračilu vsebnika, izdelek sorazmerno nižje vrednosti.

4.7.2 Razlogi in načini uporabe

S svojim videzom rastline uporabniku ponujajo izkušnjo lepote, narave in minljivosti časa. V velikih mestih, kjer je veliko pločnikov, zidov in betonskih zgradb, ljudem manjka stik z naravo. Zato je v zadnjem času opazen pojav, da si želijo stanovanje ali prostore ozeleniti, kar je prerastlo tudi v nov oblikovalski trend. Najbolj zaradi hitrega tempa življenja in obremenjujočih delovnih ur nimajo veliko časa za oskrbo in nego rastlin. Mimogrede tudi mlade generacije nimajo zadostnega znanja o vzgoji, zato jim rastline hitro propadejo ali pa se tega zato ne lotevajo. S pomočjo *in vitro* cvetočih rastlin bi lahko družbi in posamezniku ponudili rešitev in hkrati tudi zanimiv vpogled v razvoj rastline. Ker je rastlina v zaprtem vsebniku med drugim ne bi povzročala umazanije in težav s škodljivci v prostoru, kot je sicer običajno za lončnice. Do danes, kot primer sobnih rastlin poznamo predvsem lončnice in rezano cvetje, ki pa od uporabnika zahtevata tudi dodatno nego. Rastline v loncih, vsebujejo zemljo in posledično privabljajo žuželke, lahko se ustvari plesen ali pa rastlina odmre zaradi nepravilne oskrbe. Rezano cvetje sicer ne zahteva dodatne nege, vendar še hitreje propade. Lahko bi rekli, da so *in vitro* vzgojene rastline, ki so vstavljene v estetski vsebnik vmesna rešitev, ki je preprosta za uporabo, dlje obstojna kot rezano cvetje in ne predstavlja težav s škodljivci. Uporabniku vseeno ponudi zeleni zelen in lep videz. To je unikatna prednost, prav tako pa estetski videz ustvarja dodatno vrednost.

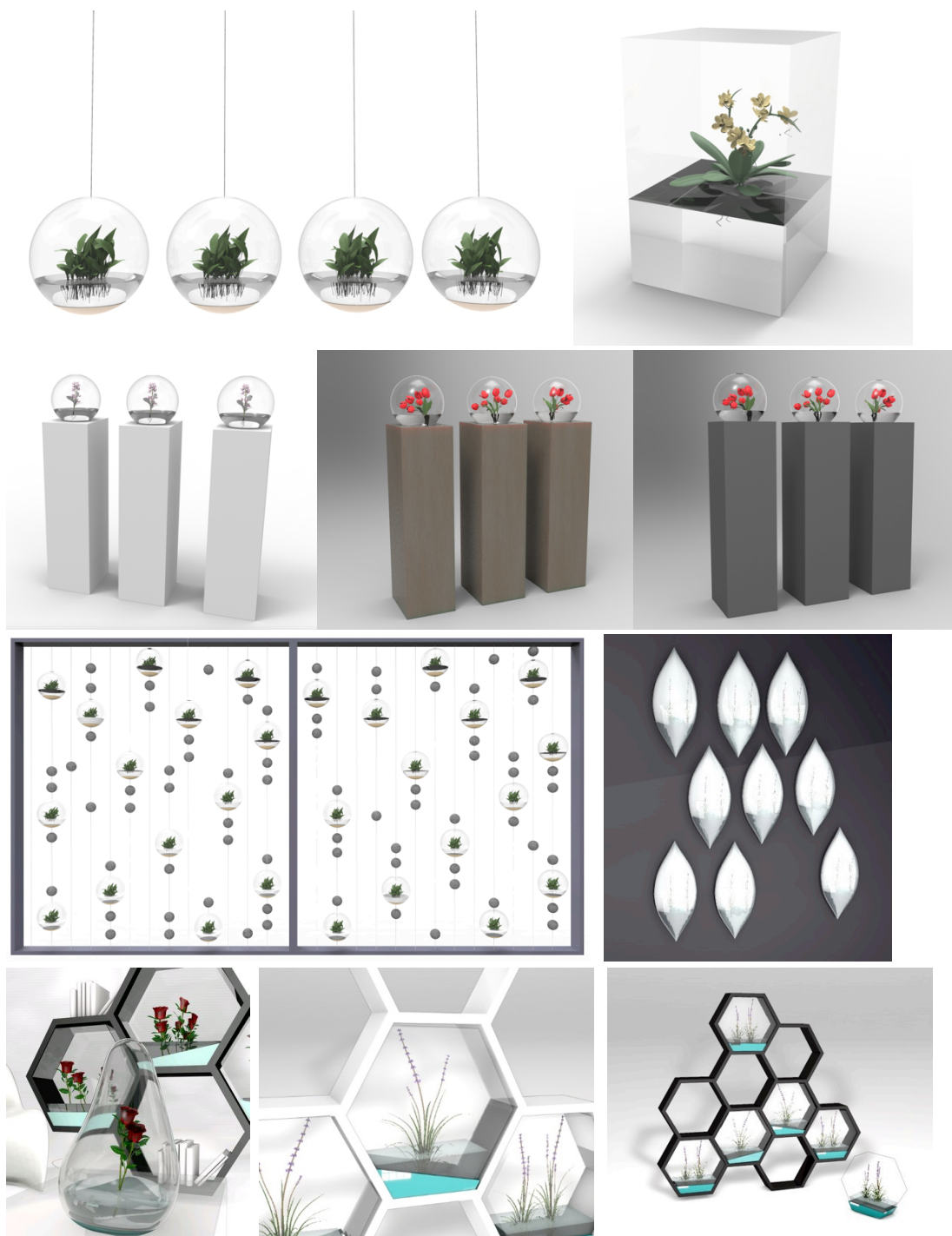
4.7.3 Ciljna skupina uporabnikov

Glede na tržne raziskave več nakupov cvetja opravijo ženske, kot moški. Medtem ko moški kupujejo cvetje predvsem zaradi obdarovanja, pa ženske kupujejo tudi brez posebnega razloga. Ciljni trgi izdelka bi zato lahko bili končni uporabniki, ki so navdušeni nad cvetjem, novostmi in rastlinami nasploh. Izdelek bi lahko tržili kot rešitev za ljudi, ki nimajo veliko časa, so veliko v službi, ali pa imajo radi najnovejšo tehnologijo. Ker je rastlina v gelu, ki je prozorno-modre barve, s tem ustvarja videz prihodnosti.

Izdelki bi se lahko prodajali direktno ali preko spleta. Povezali bi se lahko s trgovinami za notranje opremljanje prostorov in s cvetličarnami. Izdelke bi lahko razstavili v galerijah, šolah in javnih prostorih. Tržili bi tudi preko medijev in spleta ter družbenih omrežij, ter se partnersko povezali s ponudniki stekla ali plastike. Druga ciljna skupina bi lahko bili poslovni subjekti, kot so na primer večje pisarne. Predvsem pisarn, ki so urejene in prijazne ljudem. Prav tako velja tudi za občine, vrtce in bolnišnice. Med poslovnimi subjekti restavracije in hoteli namenijo velik del za menjavo cvetja in oskrbo rastlin predvsem, saj je potrebno redno menjavanje.



Slika 25: Predstavitev različnih oblik vsebnikov (od leve proti desni): zaprti vsebnik v ovalni obliki, vsebniki epruvete, vsebnik v obliki ovalne posode, shematski prikaz vsebnika z vsemi komponentami, ovalni vsebniki različnih barv, vsebnik za kaljenje semen ; (slika se nadaljuje)



Slika 25: Prikaz različnih oblik vsebnikov (od leve proti desni viseči vsebniki v obliki krogle, vsebnik v obliki kocke, različni prikazi vsebnikov na stebrih, viseči vsebniki v obliki stene, viseči vsebniki v obliki kapljic, vsebniki v amorfnih oblikah, sestavljajoči se vsebniki, ki tvorijo sistem ; slika se nadaljuje)



Slika 25: Prikaz različnih oblik vsebnikov (od leve proti desni: vsebniki v amorfni obliki, sestavljajoči se vsebniki, ki tvorijo sistem, prikaz vsebnikov s podstavki, prikaz mehanizma vsebnika, stoli v vključenem sistemom vsebnikov, sprejemni pult, miza oz. klop z vključenimi vsebniki, vsebniki v obliki kock, zelena stena)

5 SKLEPI

- Primarno kulturo smo inducirali na trdnem gojišču, ki je vsebovalo 0,1 mg/l NAA, 2 mg/l BAP, 2 % saharoze, 4,4 g/l MS z vitamini in 7 g/l agar-ja.
- Celokupen izkoristek vzpostavitve tkivne kulture je bil 44/92 ali 47,8 %. Če bi zmanjšali stopnjo okužb (38%), je bila stopnja indukcije poganjkov relativno uspešna (22 %).
- Po vzpostavitvi primarne kulture smo izsečke subkultivirali na MS gojišča z dodatkom od 0,1 do 0,4 mg/l NAA. Ugotovili smo, da najvišjo stopnjo indukcije poganjkov dosežemo pri koncentraciji 0,1 mg/l NAA in da povečanje koncentracije nad to vrednostjo, negativno vpliva na indukcijo poganjkov.
- Preizkusili smo od 0 do 4 mg/l BAP ter ugotovili, povečanje koncentracije BAP povzroči zmanjšanje dolžine poganjkov. Prav tako smo s povišanjem koncentracije BAP z meritvami in opazovanji ugotovili, da le-ta negativno vpliva na izdolževanje, vendar so kljub temu skupki rastli bujno in tvorili številne poganjke
- Hiperhidracija se je pojavila gojiščih z 2 mg/l in 3 mg/l BAP ter 0.1 mg/l NAA.
- Ob dodatku giberelinske kisline se je dolžina iz začetnih 2,5-2,9 cm povečala na 7,1 cm oziroma v najvišji koncentraciji 0,2 mg/l GA₃ do 7,7 cm. Iz tega smo ugotovili, da GA₃ pozitivno vpliva na izdolževanje..
- Na gojiščih s povišano koncentracijo saharoze smo opazili pojav korenin in hitrejšo rast v obdobju enega meseca. Na gojišču, ki je vsebovalo 50 g/l saharoze se je v enem mesecu dolžina poganjka povišala s 2,8 cm na tudi do 8 cm. Iz tega lahko sklepamo, da povišana koncentracija ugodno vpliva na rast poganjkov. Opazili smo tudi, da je višja vsebnost saharoze povzročila izsuševanje rastlin.
- Poganjki so na videz kazali različno fiziološko stanje in stopnjo, kar se odraža tudi pri raznolikih odstotkih pojava *in vitro* cvetenja pri različnih gojiščih ter odmiranju cvetnih nastavkov. Pojav morda lahko pripišemo raznoliki stopnji endogenih hormonov, stopnji ostvetlitve, temperaturi, času subkultivacije ali pa drugim nepojasnenim razlogom.
- Tekom naše raziskave smo se osredotočili na sestavo gojišč, vendar bi bile v primeru tržne uporabe potrebne še dodatne raziskave, da bi lahko odgovorili na nekatera vprašanja oziroma poiskali rešitve za določena tveganja in omejitve.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

V tem delu smo proučevali postopek mikropropagacije več genotipov miniaturnih vrtnic z namenom indukcije cvetenja znotraj posodic za *in vitro* gojenje. S pomočjo meritev dolžin poganjkov in opazovanj smo poskusili ugotoviti optimalno koncentracijo sestavin gojišč. Pričakovali smo možnost nezaželenih pojavov, kot je ekstremno razraščanje, hiperhidracija itd., kar smo spremljali s pomočjo opazovanj. Predvideli smo, da bo mogoče izzvati *in vitro* cvetenje in da lahko omogočimo prenos skupkov poganjkov v tržno oblikovane vsebnike.

Primarno kulturo smo inducirali na trdnem gojišču, ki je vsebovalo 0,1 mg/l NAA, 2 mg/l BAP, 2 % saharoze, 4,4 g/l MS z vitamini in 7 g/l agar. Večina izsečkov je bila po sterilizaciji neokuženih ter je izkazovala znake rasti, s čimer smo potrdili hipotezo, da je mogoča vzpostavitev tkivne kulture vrtnic. Celokupni izkoristek vzpostavitve tkivne kulture je bil torej 44/92 ali 47,8 %. Če bi zmanjšali stopnjo okužb (38 %), je bila stopnja indukcije poganjkov relativno uspešna (22 %). Od začetnih izbranih osmih sort je imelo zdrave in aktivne poganjke le 4 primerkov rastlin. Zaradi neenakomerne razporejenosti posameznih sort, lahko razlike med posameznimi genotipi podamo le na podlagi opazovanj rasti in ne posameznih meritev. Za raziskavo smo vzeli le primerke sort 'Flirt', 'Beverly', 'Jacques Cartier' in 'Gloria Dei'. V predelu kolena, med glavnim stebлом in poganjkom smo odrezali 1-3 cm dolge nodalne izsečke po protokolu, ki ga opisuje Zeng in sod., 2013. Kulture smo subkultivirali v 21 dnevni intervalih, glede na literaturo, ki so jo objavili Pati in sod., 2005.

Po vzpostavitvi primarne kulture smo izsečke subkultivirali na MS gojišča z dodatkom od 0,1 do 0,4 mg/l NAA. Ugotovili smo, da najvišjo stopnjo indukcije poganjkov dosežemo pri koncentraciji 0,1 mg/l NAA in da povečanje koncentracije nad to vrednostjo, negativno vpliva na indukcijo poganjkov. Koncentracijo 0,1 mg/l NAA smo zato dodali v naslednja gojišča, kjer smo spreminjali koncentracije BAP. Preizkusili smo od 0 do 4 mg/l BAP ter ugotovili, povečanje koncentracije BAP povzroči zmanjšanje dolžine poganjkov. Hiperhidracija se je pojavila gojiščih z 2 mg/l in 3 mg/l BAP ter 0,1 mg/l NAA. S povišanjem koncentracije BAP smo z meritvami in opazovanji ugotovili, da le-ta negativno vpliva na izdolževanje, vendar pa kljub temu skupki rastejo bujno in tvorijo številne poganjke. Jabbarzadeh in Khosh-Khui (2005), sta kot optimum za proliferacijo poganjkov vrtnic navedli kombinacijo 2,5-3 mg/l BA in 0,1 mg/l IBA. Zaradi pojava hiperhidracije ne moremo zagoto potrditi primerne koncentracije BAP.

Nato smo v nadaljnjih poskusih dodali v osnovno MS gojišče z dodatkom 0,1 mg/l NAA in 3 mg/l BAP tudi giberelinsko kislino v koncentraciji 0,1 in 0,2 mg/l. Ob dodatku giberelinske kisline se je dolžina iz začetnih 2,5-2,9 cm povečala na 7,1 cm oziroma v

najvišji koncentraciji 0,2 mg/l GA₃ do 7,7 cm. Iz tega smo ugotovili, da GA₃ pozitivno vpliva na izdolževanje. Prav tako smo na gojišču z dodatkom opazili pojav cveta, vendar smo iz nepojasnjene razloga opazili tudi izsuševanje cvetnega nastavka.

Prav tako smo preizkusili spremenjene vsebnosti saharoze, z namenom indukcije cvetenja. Izbrali smo koncentracije 20, 30, 40 in 50 g/l saharoze ob dodatku 3 mg/l BAP in 0.1 mg/l NAA. Na gojiščih s povišano koncentracijo saharoze smo opazili pojav korenin in hitrejšo rast v obdobju enega meseca. V primerjavi s 30 g/l saharoze je pri 40 g/l saharoze opazna hitrejša rast v obdobju enega meseca, kjer se je dolžina s 2,25 cm povišala na 5,5 cm. Na gojišču, ki je vsebovalo 50 g/l saharoze se je v enem mesecu dolžina poganjka povišala s 2,8 cm na tudi do 8 cm. Iz tega lahko sklepamo, da povišana koncentracija ugodno vpliva na rast poganjkov, vendar so iz nepojasnjene razloga odmirali cvetni nastavki. Da bi zmanjšali izsuševanje bi lahko opravili pogostejšo subkultivacijo ali zmanjšali gostoto gojišča, s čimer bi povečali dostopnost vode.

Tako v primeru dodatka giberelinske kisline kot tudi povišane saharoze so nam zacveteli primerki poganjkov iz induciranih aksilarnih izsečkov. Kljub predvidevanjem, da saharoza in giberilnska kislina pozitivno vplivata na cvetenje, so nam zacveteli primerki, ki niso rasli na gojiščih s povišano koncentracijo saharoze in brez dodatka giberelinske kisline, ampak so vsebovali 3 mg/l BAP in 0.1-0.2 mg/l NAA. Morda je zunanji dodatek NAA v zadnji fazi *in vitro* cvetenja povzročil odmiranje cvetnih nastavkov, zato bi bilo smiselno proučiti tudi gojišča za cvetenje brez dodatka NAA. Vsekakor imamo premalo podatkov, da bi lahko sklepali, kaj je vplivalo na delež cvetočih rastlin, saj se rezultati med seboj preveč razlikujejo. Poganjki so na videz kazali različno fiziološko stanje in stopnjo, kar se odraža tudi pri raznolikih odstotkih pojava *in vitro* cvetenja pri različnih gojiščih. Pojav morda lahko pripišemo raznoliki stopnji endogenih hormonov, stopnji osvetlitve, temperaturi, času subkultivacije ali drugih nepojasnjenih razlogov.

Proučili in predstavili smo tudi več oblik vsebnikov, ki bi zaradi svoje poudarjene estetske funkcije lahko bili primerni za trženje. Menimo, da imajo tovrstni primerki ugoden tržni potencial, saj predstavljajo konkurenčno prednost pred obstoječimi rešitvami ravno zaradi preproste uporabe in čistoče v primerjavi z lončnicami. Za namene notranje uporabe in v vsakodnevem življenju, kjer se veliko ljudi srečuje s pomanjkanjem časa se nam zdi smiselna uporaba rastlin, za katere ni potrebno dodatne nege. Ta aplikacija tkivnih kultur v okrasne namene je povsem nova in še ne raziskana. Menimo, da ima lahko veliko možnosti, vendar pa bi bilo za tržno uporabo treba opraviti še dodatne raziskave.

6.2 SUMMARY

In this work the process of micropropagation of multiple genotypes of miniature roses with the aim to induce flowering within containers for *in vitro* cultivation, was studied. Using shoot length measurements and observations, the optimal concentration of media components was determined. The possibility of undesirable phenomena such as extreme proliferation, hiperhydration, etc. was expected. Growth was monitored through observation. It was assumed that it is possible to induce *in vitro* flowering and that the transfer of flowering shoots in designed containers can be achieved.

The primary culture was induced on a solid medium that contained 0.1 mg/l NAA, 2 mg/l BAP, 2% sucrose, 4.4 g /l MS with vitamins and 7 g/l agar. Most of the explants were uninfected and after sterilization the signs of growth were recorded. We confirmed our hypothesis, that it is possible to establish a tissue culture of roses. The overall efficiency of the establishment of tissue culture was 44/92 or 47.8%. If the rate of infections (38%) was reduced, the rate of induction of shoots was relatively successful (22%). From the initial selected eight varieties only four were healthy and actively growing. Because of the uneven distribution of individual varieties, the differences between genotypes are based on observation of growth rather than individual measurements. For this study only varieties 'Flirt', 'Beverly', 'Jacques Cartier' and 'Gloria Dei' were selected. The shoots were cut off at 1-3 cm long nodal segments according to the protocol described by Zeng in sod., 2013. In 21 day intervals the cultures were subcultured, according to the literature Pati in sod., 2005.

Following the establishment of a primary culture, explants were subcultured on MS media with 0.1 to 0.4 mg/l NAA. The highest rate of induction of shoots was obtained on media with 0.1 mg/l NAA and increase in concentration above this value had a negative effect on the induction of shoots. Therefore 0.1 mg/l NAA was added to the media for further experiments, where the addition of BAP was tested. Concentrations from 0 to 4 mg/l BAP were tested. Increase in the concentration of BAP caused a reduction in stem length. Hyperhydration appeared on media with 2 mg/l and 3 mg/l BAP and 0.1 mg/l NAA respectively. Increase in concentration of BAP had a negative effect on multiplication and elongation, but nevertheless clusters grew and formed many shoots. Jabbarzadeh and Khosh-Khui. (2005) suggest combination of 2.5-3 mg / l BA and 0.1 mg / l IBA as optimal for the proliferation of the stems. Because of the emergence of hyperhydration, we can not confirm the appropriate concentration of BAP.

In subsequent experiments the basic MS media was supplemented with 0.1 mg/l NAA and 3 mg/l BAP and gibberellic acid at a concentrations from 0.1 mg/l to 0.2 mg l. With the addition of gibberellic acid the length from the initial 2.5 cm to 7.1 cm was observed and at the maximum concentration of 0.2 mg/l GA3 also to 7.7 cm. Measurements have shown

that GA₃ had a positive effect on multiplication and elongation. Also emergence of the flower was observed.

The concentrations of 20, 30, 40 and 50 g / l of sucrose were selected with the addition of 3 mg / l BAP and 0.1 mg/l NAA with the aim of flower induction. On media with high concentrations of sucrose, the emergence of roots and faster growth was observed in the period of one month. In comparison with 30 / l sucrose also explants on media with 40 g/l sucrose grew faster, wherein the length of 2.25 cm increased to 5.5 cm. On media containing 50 g/l sucrose shoot length increased from 2.8 cm to 8 cm in one month. This suggests that the increased concentration had beneficial effect on the shoots growth. To reduce wilting more frequent subcultivation or lowering the density of the medium, thereby increasing the availability of water could be tested.

In the case of added gibberellic acid, as well as increased sucrose, flowering occurred from axillary explants. Despite our assumption that sucrose and gibberellic acid have a positive effect on flowering, explants grown on media containing 3 mg/l BAP and 0.1-0.2 mg/l NAA have developed flowers. Perhaps the external addition of NAA in the final stage of *in vitro* flowering caused wilting of flowers, therefore it would be reasonable to test media without external addition of NAA. In any case, not enough data is available to suggest what impacted the proportion of flowering plants. Shoots showed different physiological status and degree, which is also reflected in diverse occurrence of *in vitro* flowering on different culture media. Phenomenon may be attributed to the diverse level of endogenous hormones, light rate, temperature, time of subculturing or other unexplained reasons.

Also several types of containers because of their emphasis on aesthetic features that may be eligible for marketing, were presented. Such product could have a favorable market potential, since it represents a competitive advantage over existing solutions, precisely because of the ease of use and cleanliness compared with potted plants. For the purposes of internal application in everyday life, where many people are faced with a lack of time, use of plants that do not require additional care is beneficial. It is our belief that such products can have a beneficial market potential, but it will be necessary to carry out further research.

7 VIRI

- Awal A., Bakrudeen A., Mat Taha R., Yaacob S. J., Mohajer S. 2013. Effect of adenine, sucrose and plant growth regulators on the indirect organogenesis and on *in vitro* flowering in *Begonia x Hiemalis* Fotsch. *Australian Journal of Crop Science*, 5: 691-698
- Azizi P., Rafil M. Y., Maziah M., Abdullah S. N. A., Hanafi M. M., Latif M. A., Rashid A. A., Sahebi M. 2015. Review: Understanding the shoot apical meristem regulation: a study of the phytohormones, auxin and cytokinin, in rice. *Mechanisms of Development*, 135: 1-15
- Bendahmane M., Dubois A., Raymond O., Le Bris M. 2013. Genetics and genomics of flower initiation and development in roses. *Journal of Experimental Botany*, 64, 4: 847-857
- Bernier G., Havelange A., Houssa C., Petitjean A., Lejeune P. 1993. Physiological signs that induce flowering. *Plant Cell*, 5: 1147-1155
- Bohanec B. 1992. Tehnike rastlinskih tkivnih kultur. Ljubljana. Biotehniška fakulteta: 168 str.
- Carelli B. P., Echeverrigaray S. 2001. An improved system for the *in vitro* propagation of rose cultivars. *Scientia Horticulturae*, 92: 69-74
- Choubane D., Rabot A., Mortreau E., Legourrierec J., Peron T., Foucher F., Ahcene Y., Pelleschi-Travier S., Leduc N., Hamama L., Sakr S. 2012. Photocontrol of bud burst involves gibberellin biosynthesis in *Rosa sp.* *Journal of Plant Physiology*, 169: 1271-1280
- Costanzo E., Trehin C., Vandenbussche M. 2014. The role of WOX genes in flower development. *Annals of Botany*, 114:1545-1553
- Crevillen P., Dean C. 2011. Regulation of the floral repressor gene FLC: the complexity of transcription in a chromatin context. *Current Opinion in Plant Biology*, 14:38-44
- Davies P. J. 2004. Plant hormones, physiology, biochemistry and molecular biology. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers: 833 str.
- Engelhorn J., Moreau F., Fletcher J. R., Charles C. C. 2014. ULTRAPETALA 1 and LEAFY pathways function independently in specifying identity and determinacy at the Arabidopsis floral meristem. *Annals of Botany*, 114: 1497-1505
- Fernandez-Nohales P., Domenech M., Martinez de Alba A. E., Micol J. L., Ponce M. R., Madueño F. 2014. AGO₁ controls Arabidopsis inflorescence architecture possibly by regulating TFL₁ expression. *Annals of Botany*, 114, 7:1471-1581
- Fourquin C., Primo A., Martinez-Fernandez I., Huet-Trujillo E., Ferrandiz C. 2014. The CRC ortholog from *Pisum sativum* shows conserved functions in carpel morphogenesis and vascular development. *Annals of Botany*, 114: 1535-1544
- George E. F., Hall A. M., De Klerk G. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd edition. Nizozemska, Springer Netherlands: 501 str.

- Goh C. J., Yang A. L. 1978. Effects of growth regulators and decapitation on flowering of *Dendrobium* orchid hybrids. *Plant Science Letters*, 12: 287-292
- Gramzow L., Weilandt L., Thiessen G. 2014. MADS genes genomic in conifers: towards determining the ancestral set of MADS-box genes in seed plants. *Annals of Botany*, 114:1407-1429
- Guo S., Sun B., Looi L., Gan E., Huang J. 2015. Co-ordination of flower development through epigenetic regulation in two model species: rice and *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*, 56, 5: 830-845
- Guyomarc'h S., Bertrand C., Delarue M., Zhou D., 2005. Regulation of meristem activity by chromatin remodelling. *Trends in Plant Science*, 10: 333-338.
- Hartig K., Beck E. 2006. Crosstalk between auxin, cytokinins, and sugars in the plant cell cycle. *Plant Biology*, 8: 389-396
- He Y., Amasino R. M. 2005. Role of chromatin modification in flowering-time control. *Trends in Plant Science*, 10: 30–35
- Ipsos-Insight FloralTrends Consumer Tracking Study. 2005. Združene države Amerike. <http://www.aboutflowers.com/about-the-flower-industry/consumer-trends?fontstyle=f-smaller> (9. 10. 2016)
- Iwata H., Gaston A., Remay A., Thouroude T., Kawamura K., Oyant L., Araki T., Denoyes B., Foucher F. 2012. The TFL₁ homologue KSN is a regulator of continuous flowering in rose and strawberry. *Plant Journal*, 69,1:116-125
- Jabbaryadeh Z., Khosh-Khui M. 2005. factors affecting tissue culture of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.). *Scientia Horticulturae*, 105: 475-482
- Jian H., Zhang H., Tang K., Li S., Wang Q., Zhang T., Qiu X., Yan H. 2010. Decaploidy in *Rosa praelucens* Byhouwer (*Rosaceae*) endemic to Zhongdian Plateau, Yunnan, China. *Caryologia*, 63: 162–167
- Kavand S., Kermani J. M., Haghnazari A., Khosravi P., Azimi R. M. 2011. Micropropagation and Medium-term Conservation of *Rosa pulverulenta*. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 33, 2: 297-301
- Kors F. T., Biochemicals, Plant cell and tissue culture, phytopathology, biochemical. 2010. Nizozemska, Duchefa Biochemie B.V.: 194 str. http://brochure.duchefa-biochemie.com/Duchefa_catalogus_2010_2012/ (4. 1. 2016)
- Kovarik A., Werlemark G., Leitch A. R., Souckova-Skalicka K., Lim Y. K., Khaitová L., Koukalova B., Nybom H. 2008. The asymmetric meiosis in pentaploid Dogroses (*Rosa sect. Caninae*) is associated with a skewed distribution of rRNA gene families in the gametes. *Heredity*, 101: 359–367
- Kurokura T., Mimida N., Battey N. H. 2013. The regulation of seasonal flowering in Rosaceae. *Journal of Experimental Botany*, 64: 4131-4141
- Lim K. Y., Werlemark G., Matyasek R., Bringloe J. B., Sieber V., Mokadem H. E., Meynet J., Hemming J., Leitch A. R., Roberts A. V. 2005. Evolutionary implications

- of permanent odd polyploidy in the stable sexual, pentaploid of *Rosa canina* L. *Heredity*, 94: 501–506
- Mantegazza O., Gregis V., Mendes M. A., Morandini P., Alves-Ferreira M., Patreze C. M., Nardeli S. M., Kater M. M., Colombo I. 2014. Analysis of the Arabidopsis REM gene family predicts functions during flower development. *Annals of Botany*, 114: 1459–1470
- McDaniel C. N. 1996. Developmental physiology of floral initiation in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Experimental Botany*, 47, 297: 465–475
- Michaels, S. D. and Amasino, R. M. 1999. FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell*, 11: 949–956
- Moallem S., Behbahani M., Mousavi E., Karimi N. 2012. Direct regeneration of *Rosa canina* through tissue culture. *Trakia Journal of Sciences*, 10: 23–25
- Murovec J., Eler K., Bohanec B. 2010. Adventitious shoot regeneration from leaf and internodal explants of *Mimulus aurantiacus* Curtis. *Propagation of Ornamental Plants*, 10, 1: 18–23
- Nak-Udom N., Kanchanapoom K., Kanchanapoom K., 2009. Micropropagation from cultured nodal explants of rose (*Rosa hybrida* L. cv. 'Perfume Delight'). *Journal of Science Technology*, 31, 6: 583–586
- Pal K. P. 2012. Evaluation, genetic diversity, recent development of distillation method, challenges and opportunities of *Rosa damascena*: A review. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 16: 1–10
- Pati K. P., Rath P. S., Sharma M., Sood A., Ahuja P. 2005. *In vitro* propagation of rose-a review. *Biotechnology Advances*, 24: 94–114
- Pécirix Y., Rallo G., Folzer H., Cigna M., Gudín S., Le Bris M. 2011. Polyploidization mechanisms: temperature environment can induce diploid gamete formation in *Rosa* sp. *Journal of Experimental Botany*, 62: 3587–3597
- Randoux M., Jeauffre J., Thouroude T., Vasseur F., Hamama L., Juchaux M., Sakr S., Foucher F. 2012. Gibberelins regulate the transcription of the continuous flowering regulator, RoKSN, a rose TFL₁ homologue. *Journal of Experimental Botany*, 63, 18: 6543–6554
- Rogers H. J. 2012. From models to ornamentals: how is flower senescence regulated?. *Plant Molecular Biology*, 82,6:563–574
- Rout G. R., Mohapatra A., Mohan J. S. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: a critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*, 24: 531–560
- Schaller E. G., Bishopp A., Kieber J. J., 2015. The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. *American Society of Plant Biologists*, 27, 1: 44–63

- Schaller E. G., Street H. I., Kieber J. J., 2014. Cytokinin and the cell cycle. *Current Opinion in Plant Biology*, 21: 7-15
- Scutt P. C., Vandenbussche M. 2014. Current trends and future directions in flower development research. *Annals of Botany*, 114: 1399-1406
- Shrestha R., Gomez A., Brambilla V., Fornara F. 2014. Molecular control of seasonal flowering in rice, arabidopsis and temperate cereals. *Annals of Botany*, 114: 1445-1458
- Smith R. 2012. *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*. 3rd edition. Department of Horticulture, Texas, Academic Press (Elsevier): 183 str.
- Staveley B., *Principles of Cell Biology*. Department of Biology, Memorial University of Newfoundland.
http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DB_06/DBNPlant.html (4. 12. 2016)
- Taylor J. M., 2014. *Visions of loveliness : great flower breeders of the past*. Athens, Ohio, Swallow Press: 200 str.
- Vamosi J. C., Dickinson T. A. 2006. Polyploidy and diversification: a phylogenetic investigation in *Rosaceae*. *International Journal of Plant Sciences*, 167: 349–358
- Wang G. Y., Chia Z. H., Chua N. H. 1993. *In vitro* flowering of orchid (*Dendrobium candidum*). *Biotechnology in Agriculture*, 373-378
- Wang G. Y., Xu Z. H., Cai D. F., Cai N. H. 1997. *In vitro* flowering of *Dendrobium candidum*. *Science in China*, 27: 229-234
- Wang G. Y., Yuan M. F., Hong Y. 2002. *In vitro* flower induction in roses. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 38: 513-518
- Wang Z.H., Wang L., Ye Q.S. 2009. High frequency early flowering from *in vitro* seedlings of *Dendrobium nobile*. *Scientia Horticulturae*, 122: 328-331
- Wickland P. D., Hanyawa Y. 2015. The FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1 Gene Family: Functional Evolution and Molecular Mechanisms. *Molecular Plant Journal*, 8: 983-997
- World floriculture map. 2015. Rabobank, Nizozemska.
https://www.rabobank.com/en/images/World_Floriculture_Map_2015_vanRijswijk_Jan2015.pdf (4. 1. 2016)
- Yaseen M., Touqueer A., Sablok G., Standardi A., Ahmad H. I. 2013. Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. *Molecular Biology Reports*, 40: 2837–2849
- Zeng S. J., Liang Y. Y., Wu K. L., Teixeira da Silva J. A., Duan J. 2013. *In vitro* flowering red miniature rose, *Biologia Plantarum*. 57: 401-409

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Borutu Bohancu za pomoč in podporo raziskovalnega dela ter vedno pozitivnega odnosa. Zahvaljujem se tudi vsem sodelavcem na Katedri za genetiko in rastlinsko biotehnologijo, predvsem tehnični sodelavki Nataši Hren. Zahvaljujem se tudi Jakobu Jeriha, študentu biologije, za pomoč pri delu. Zahvaljujem se tudi recenzentki prof. dr. Marjani Regvar za usmeritev ter pomoč pri pisanju. Zahvaljujem se tudi dr. Karmen Stopar, INDOK službi za usmeritev pri oblikovanju dela ter g. Nevenki Valič za organizacijo in vodenje postopkov. Zahvaljujem se tudi Študentski organizaciji Biotehniške fakultete, ki je z dogodkom Biostartup spodbudila raziskovalno delo ter Ljubljanskemu Univerzitetnemu Inkubarotju (LUI) zaradi katerega je to raziskovalno delo tudi podjetno obarvano. Ne nazadnje se zahvaljujem tudi očetu Jerneju, mami Ireni in fantu Marku za podporo pri pisanju.

Priloga A

Rezultati meritev dolžin poganjkov

Priloga A1: Vpliv različnih koncentracij NAA na povprečno vrednost dolžine, indukcijo brstov in število poganjkov

Koncentracija NAA	Dolžina apikalnih meristemov [cm]	Deleži indukcije poganjkov iz izsečkov v razmerjih in %
0	$1 \pm 0,62$	5/8 (62,5 %)
0,1	$2,10 \pm 0,26$	19/23 (82 %)
0,2	$2,14 \pm 0,14$	7/9 (77 %)
0,3	$1,8 \pm 0,12$	3/4 (75 %)
0,4	$6 \pm 1,0$	2/3 (66 %)

Priloga A2: Vpliv različnih koncentracij BAP na dolžino aksilarnih poganjkov, % indukcije brstov in število aksilarnih poganjkov.

Koncentracija BAP	dolžina apikalnih meristemov ^a [cm]	indukcija aksilarnih meristemov [%]
0	$3,6 \pm 0,69$	4/5 (80 %)
1	$1,75 \pm 0,25$	2/2 (100 %)
2	$1,75 \pm 0,25$	2/3 (66 %)
3	$2,10 \pm 0,26$	19/23 (82 %)

Priloga A3: Vpliv koncentracije giberelinske kisline na rast skupkov v obdobju enega meseca

Koncentracija GA ₃	dolžina apikalnih meristemov (povprečna vrednost) [cm]	dolžina apikalnih meristemov po enem mesecu [cm]
0	$2,6 \pm 0,27^a$	$4,4 \pm 0,61^a$
0,1	$2,5 \pm 0,34^a$	$7,1 \pm 0,40^a$
0,2	$2,9 \pm 0,08^b$	$7,7 \pm 0,41^b$

a – povprečna vrednost 7 izsečkov, b – povprečna vrednost 8 izsečkov

Preglednica A4: Vpliv koncentracije saharoze na dolžino skupkov in rast

Koncentracija Saharoze [g/l]	dolžina skupka [cm]	dolžina skupka po enem mesecu [cm]
30	$2,6 \pm 0,27^a$	$4,4 \pm 0,61^a$
40	$2,25 \pm 0,42^b$	$5,5 \pm 0,30^b$
50	$2,8 \pm 0,44^b$	$5,5 \pm 0,88^b$

a – povprečna vrednost 7 izsečkov, b – povprečna vrednost 6 izsečkov

Priloga B

Kratka predstavitev



Priloga D

Različni genotipi vrtnic



Lions-Rose®



Beverly®



Gloria Dei



Sebastian KNEIPP®



Flirt 2011®



Eden Rose 85®



Duftzauber 84®



Jacques Cartier



Abracadabra