

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Saša PURKART

**MIKROPROPAGACIJA LINIJ RUKVICE (*Eruca
sativa* Mill.) NA RAZLIČNIH GOJIŠČIH**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Saša PURKART

**MIKROPROPAGACIJA LINIJ RUKVICE (*Eruca sativa* Mill.) NA
RAZLIČNIH GOJIŠČIH**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**MIKROPROPAGATION OF ROCKET LINES (*Eruca sativa* Mill.) ON
DIFFERENT GROWTH MEDIA**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija agronomije. Opravljeno je bilo na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorico diplomske naloge imenovala prof. dr. Marijano Jakše.

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

Član: prof. dr. Zlata LUTHAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

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

Saša Purkart

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 635.567:631.532:57.085(043.2)
KG	mikropropagacija/rukvica/ <i>Eruca sativa</i> /vegetativno razmnoževanje
KK	AGRIS F01
AV	PURKART, Saša
SA	JAKŠE, Marijana (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI	2012
IN	MIKROPROPAGACIJA LINIJ RUKVICE (<i>Eruca sativa</i> Mill.) NA RAZLIČNIH GOJIŠČIH
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 39 str., 27 pregl., 9 sl., 20 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	V diplomski nalogi smo poskušali s tehniko mikropropagacije razmnožiti dihaploidne linije navadne rukvice (<i>Eruca sativa</i> Mill.), ker linije slabo semenijo. Iz različnih delov rastline smo nabrali izsečke: iz stranskih brstov, cvetnih popkov in mladih listov. Razkužen rastlinski material smo inokulirali v steklene kozarce s polipropilenskim pokrovom Ø 55 x 72 mm in v petrijevke Ø 90 x 15 mm, v katere smo v prvem delu poskusa nalili gojišče B5 (Gamborg in sod., 1968) s hormoni 0,5 mg/l BAP in 0,1 mg/l IAA in ga poimenovali G1. V vsak steklen kozarec smo inokulirali po 4 izsečke iz stranskih brstov v 4 ponovitvah, v vsako petrijevko po 5 izsečkov iz cvetnih popkov v 4 ponovitvah in v vsako petrijevko po 10 izsečkov iz mladih listov. Inokuliran rastlinski material smo gojili na gojišču zaprtih posodah v rastni komori pri temperaturi 24 °C in s fotoperiodo 16 ur svetlobe in 8 ur teme. Velik problem nam je predstavljala močna vitrifikacija, zato smo vse poganjke zavrgli. V drugem delu poskusa smo uporabili druga gojišča za inokulacijo in za koreninjenje poganjkov. Osnovna komponenta je bilo gojišče MS (Murashige in Skoog, 1962), hormonska sestava v gojiščih za inokulacijo je bila 0,5 mg/l BAP in 0,1 mg/l IAA (G2) ter 0,5 mg/l BAP in 0,2 mg/l NAA (G3), v gojiščih za koreninjenje pa 1,0 mg/l KIN in 0,2 mg/l NAA (G4), ter brez hormonov (G5). Glede na rezultate iz prvega dela poskusa smo se odločili, da nadaljujemo poskus le z izsečki iz stranskih brstov. V vsako gojišče za indukcijo (G2 in G3) smo inokulirali po 288 izsečkov (po štiri izsečke v en steklen lonček v 4 ponovitvah – od vsake linije po 16 izsečkov). Tudi v drugem delu poskusa se je pojavila močna vitrifikacija. Na gojišču G3 je nastalo v povprečju 10,98 poganjkov iz stranskih brstov in je bilo statistično značilno boljše ($p=0,005$) od gojišča G2 z 8,73 poganjki. Skupno smo dali na aklimatizacijo v mini rastlinjak napolnjen s šotnim substratom 47 ukoreninjenih poganjkov.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Dn
DC UDC 635.567:631.532:57.085(043.2)
CX micropropagation/rocket/*Eruca sativa*/vegetative propagation
CC AGRIS F02
AU PURKART, Saša
AA JAKŠE, Marijana (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
PY 2012
TI MIKROPROPAGATION OF ROCKET LINES (*Eruca sativa* Mill.) ON
DIFFERENT GROWTH MEDIA
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 39 p., 27 tab., 9 fig., 20 ref.
LA sl
AL sl/en
AB With micropropagation technique we have tried to reproduce dihaploid rocket lines (*Eruca sativa* Mill.) because they have difficulties by making seeds. Explants have been collected from different parts of rocket (lateral buds, flower buds and young leaves). Disinfected plant material have been inoculated in glass jar Ø 55 x 72mm with polypropylene cover (baby jar) and in petri dishes Ø 90 x 15 mm, which have been filled with medium B5 (Gamborg et al., 1968) and hormones 0.5 mg/l BAP and 0.1 mg/l IAA (named medium G1). This medium have been used in the first part of our experiment. In each glass jar 4 explants have been inoculated from lateral buds and in each petri dish 5 explants from flower buds in 4 repetitions. Explants of young leaves have been also inoculated in petri dishes – 10 explants per petri dish. All plant material have been prepared in laboratory in aseptic chamber. Inoculated plant material have been cultivated on medium in closed dishes and put in growing chamber (T = 24 °C; photoperiod = 16 hours of light and 8 hours of dark). Problems have been caused by vitrification, that is why all shoots have been discarded. In second part of the experiment we have used MS (Murashige & Skoog, 1962) medium for inoculation with different hormone combinations (0.5 mg/l BAP; 0.1 mg/l IAA named medium G2 and 0.5 mg/l BAP; 0.2 mg/l NAA named medium G3) and MS medium (with 1.0 mg/l KIN in 0.2 mg/l NAA named medium G4 and without hormones named medium G5) for root production. Based on the results of the first part of the experiment, we decided to continue only with explants from lateral buds. In each medium 288 explants have been inoculated (4 explants per glass jar in 4 repetition – from each line 16 explants in each medium). Also in new mediums vitrification have been noticed. On medium G3 10,98 shoots was generated in average which was significantly better than 8,73 shoots in medium G2. 47 vitrified shoots with roots have been transplanted in minigreenhouse filled with peat substrate.

KAZALO VSEBINE

	Ključna dokumentacijska informacija	III
	Key words documentation	IV
	Kazalo vsebine	V
	Kazalo preglednic	VII
	Kazalo slik	IX
	Okrajšave	X
1	UVOD	1
1.1	NAMEN NALOGE	2
1.2	CILJI NALOGE	2
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	SISTEMATIKA RUKVICE	3
2.2	MORFOLOGIJA RUKVICE	3
2.3	UPORABA RUKVICE	4
2.3.1	Uporaba v prehrani, kmetijstvu, medicini	5
2.3.2	Popularnost rukvice skozi čas	5
2.4	TEHNOLOGIJE PRIDELOVANJA NAVADNE RUKVICE	6
2.5	GENERATIVNO RAZMNOŽEVANJE	6
2.6	VEGETATIVNO RAZMNOŽEVANJE <i>IN VITRO</i>	6
2.6.1	Mikropropagacija	6
2.6.1.1	Vloga mikro in makroelementov	8
2.6.1.2	Vloga rastlinskih rastnih hormonov	8
2.6.1.3	Vloga agarja	8
2.6.1.4	Vloga vitaminov	9
2.6.1.5	Vloga saharoze	9
2.6.1.6	Vpliv pH gojišča	9
2.6.2	Dihaploid	9
3	MATERIAL IN METODE DELA	10
3.1	MATERIAL	10
3.1.1	Sestava gojišč	10
3.2	METODE DELA	11

3.2.1	Priprava rastlinskih hormonov	13
3.2.2	Priprava in sterilizacija gojišč	13
3.2.3	Sterilizacija pribora	14
3.2.4	Priprava rastlinskega materiala za inokulacijo	14
3.2.5	Sterilizacija rastlinskega materiala	14
3.2.6	Inokulacija na gojišče	15
3.2.6.1	Potek poskusa	16
3.2.6.2	Stranski brsti pri 1. delu poskusa	16
3.2.6.3	Cvetni popki	17
3.2.6.4	Listni diski	18
3.2.6.5	Stranski brsti pri 2. delu poskusa	18
3.2.7	Obdelava podatkov	20
4	REZULTATI	21
4.1	PRVI DEL POSKUSA	21
4.1.1	Stranski brsti	21
4.1.2	Cvetni popki	23
4.1.3	Listni diski	25
4.1.4	Sklepi 1. dela poskusa	25
4.2	DRUGI DEL POSKUSA	25
4.2.1	Inokulacija izsečkov iz stranskih brstov na gojišče G2	25
4.2.2	Inokulacija izsečkov iz stranskih brstov na gojišče G3	28
4.2.3	Statistična primerjava gojišč G2 in G3	32
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	33
5.1	RAZPRAVA	33
5.2	SKLEPI	35
6	POVZETEK	36
7	VIRI	38

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava MS in B5 gojišč (Bohanec, 1992: 139)	11
Preglednica 2: Hormonska sestava gojišč B5 in MS za razmnoževanje in koreninjenje rukvice.....	12
Preglednica 3: Potrebne koncentracije hormonov v 1 l gojišča in koncentracije uporabljenih hormonov v založnih raztopinah	13
Preglednica 4: Inokulacija stranskih brstov DH linij rukvice na gojišče G1	17
Preglednica 5: Prvo bonitiranje/subkultiviranje poganjkov iz stranskih brstov rukvice na gojišče G1	17
Preglednica 6: Drugo bonitiranje poganjkov iz stranskih brstov rukvice na gojišče G1	17
Preglednica 7: Inokulacija cvetnih popkov DH linij rukvice na gojišče G1	17
Preglednica 8: Prvo bonitiranje/subkultiviranje poganjkov iz cvetnih popkov rukvice na gojišče G1	18
Preglednica 9: Drugo bonitiranje poganjkov iz cvetnih popkov rukvice na gojišče G1	18
Preglednica 10: Inokulacija listnih diskov DH linij rukvice na gojišče G1	18
Preglednica 11: Inokulacija stranskih brstov iz DH linij rukvice na gojišči G2 in G3	18
Preglednica 12: Prvo bonitiranje in subkultiviranje poganjkov iz stranskih brstov DH linij rukvice na gojišči G4 in G5	19
Preglednica 13: Drugo bonitiranje in subkultiviranje poganjkov iz stranskih brstov DH linij rukvice na gojišči G4 in G5	19
Preglednica 14: Tretje bonitiranje in subkultiviranje ukoreninjenih poganjkov iz stranskih brstov DH linij rukvice v mini rastlinjaku.....	19
Preglednica 15: Število inokuliranih izsečkov iz stranskih brstov navadne rukvice, odgnalih, okuženih in brez poganjkov na gojišču G1 pri prvem bonitiranju	21

Preglednica 16: Število prvič subkultiviranih poganjkov iz izsečkov stranskih brstov navadne rukvice na gojišče G1, število okuženih, ukoreninjenih in neukoreninjenih oz. propadlih poganjkov pri drugem bonitiranju	22
Preglednica 17: Število inokuliranih izsečkov iz cvetnih popkov navadne rukvice, odgnalih, okuženih in brez poganjkov na gojišču G1 pri prvem bonitiranju	23
Preglednica 18: Število prvič subkultiviranih poganjkov iz cvetnih popkov navadne rukvice na gojišču G1, število okuženih, ukoreninjenih in neukoreninjenih oz. propadlih poganjkov pri drugem bonitiranju	24
Preglednica 19: Število inokuliranih izsečkov listnih diskov navadne rukvice, subkultiviranih, okuženih in brez poganjkov pri prvem bonitiranju	25
Preglednica 20: Število subkultiviranih izsečkov navadne rukvice iz G2 na gojišči G4 in G5, število okuženih in število izsečkov brez poganjkov pri prvem bonitiranju	26
Preglednica 21: Število drugič subkultiviranih poganjkov navadne rukvice na gojišči G4 in G5, število okužb in število izsečkov brez poganjkov iz izsečkov stranskih brstov pri drugem bonitiranju	27
Preglednica 22: Število ukoreninjenih in propadlih poganjkov navadne rukvice na gojiščih G4 in G5 v pri tretjem bonitiranju	28
Preglednica 23: Število subkultiviranih izsečkov navadne rukvice iz gojišča G3 na gojišči G4 in G5, število okuženih in število izsečkov brez poganjkov pri prvem bonitiranju.	29
Preglednica 24: Število subkultiviranih poganjkov navadne rukvice na gojišči G4 in G5, število okuženih in število izsečkov brez poganjkov iz izsečkov stranskih brstov pri drugem bonitiranju.....	30
Preglednica 25: Število ukoreninjenih in propadlih poganjkov navadne rukvice na gojiščih G4 in G5 pri tretjem bonitiranju	31
Preglednica 26: Analiza variance za število poganjkov navadne rukvice na dveh gojiščih G2 in G3 v štirih ponovitvah	32
Preglednica 27: Preizkus mnogoterih primerjav za odvisno spremenljivko število poganjkov navadne rukvice na ponovitev pri inokulaciji na različni gojišči G2 in G3	32

KAZALO SLIK

Slika 1: Tankolistni dvoredec (levo) in obzidni dvoredec (desno) (foto: Ugrinović, 2006) ..	2
Slika 2: Cvet in rastlina navadne rukvice (<i>Eruca sativa</i> Mill.) (Eruca ..., 2012)	4
Slika 3: Lusk – plod navadne rukvice (foto: M. Jakše).....	4
Slika 5: Inokulirani izsečki iz stranskih brstov navadne rukvice (foto: M. Jakše, 2008)	15
Slika 7: Shematski prikaz poskusa mikropropagacije navadne rukvice	16
Slika 8: Regeneranti iz stranskih brstov navadne rukvice (foto: M. Jakše, 2008)	22
Slika 9: Regeneranti iz cvetnih popkov navadne rukvice (foto: M. Jakše, 2008)	24

OKRAJŠAVE

B5	→ gojišče, ki so ga uporabili Gamborg in sodelavci, 1968
MS	→ gojišče Murashige in Skoog, 1962
IAA	→ indol očetna kislina
NAA	→ α -naftalen očetna kislina
BAP	→ 6-benziloamino purin
KIN	→ kinetin (6-furfurilamino purin)
G1	→ gojišče B5 s hormoni BAP in IAA
G2	→ gojišče MS s hormoni BAP in IAA
G3	→ gojišče MS s hormoni BAP in NAA
G4	→ gojišče MS s hormoni KIN in NAA
G5	→ gojišče MS, brez hormonov
L	→ linija
DH	→ dihaploid

1 UVOD

Navadna rukvica je avtohtona rastlina, ki raste na območjih južne Evrope in centralne Azije, kjer so jo pridelovali že v antiki. Pri nas ne raste samoniklo, je pa ponekod, predvsem na Primorskem, podivjana, ob nasipih, zidovih in poteh. Danes je navadna rukvica postala zanimiva rastlina tako v Evropi kot tudi v Ameriki, predvsem zaradi svojega izrazitega vonja in okusa, obenem pa je tudi dober vir vitamina C in železa (Bianco, 1995). Specifičen okus je eden od razlogov za vse večje povpraševanje po tej rastlini. Pred približno desetletjem se je na slovenskem tržišču pojavila rukvica v dveh različicah listov, in sicer rastline s pernato deljenimi listi in druge z manj deljenimi listi in nazobčanim listnim robom (Leskovšek, 2008). Rastlini se po videzu močno razlikujeta, vendar obe označujemo z imenom rukvica, ki smo ga prevzeli od Italijanov (ital. »rucola«) (Černe, 2000).

Slovenski pridelovalci so začeli gojiti najprej navadno rukvico (*Eruca sativa* Mill.), katere seme je bilo mogoče kupiti v Sloveniji in kasneje še t.i. divjo rukvico, ki jo pravilno imenujemo tankolistni dvoredec (*Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC.) in ima bolj pekoč okus (Černe, 2000).

Z imenom »rukvica« imenujemo laično več rastlin iz družine križnic (Brassicaceae), med katere sodita tudi rodova rukvica (*Eruca*) in dvoredec (*Diplotaxis*). Vrste iz teh dveh rodov imajo bogato genetsko raznolikost v samem izgledu rastlin, vzorcu razrasti, pigmentaciji, obliki plodov in njihove velikosti in barvi semena. Rod *Diplotaxis* združuje divje sorodnike kulturnih rastlin, ki spadajo v družino križnic in so pomembni v prehrani ljudi in živali. Divji sorodniki predstavljajo potencialni vir genov za potrebe žlahtnjenja (Bianco, 1995).

V prehrani so pod imenom rukvica razširjene predvsem tri vrste. Večji, nekoliko manj narezani in običajno manj aromatični listi so značilni navadno rukvico (*Eruca sativa* Miller), manjši, bolj narezani listi z močnejšim okusom pa za vrsti *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. (tankolistni dvoredec) in *Diplotaxis muralis* (L.) DC. (obzidni dvoredec) (slika 1). Vse tri vrste uvrščamo v družino križnic (Brassicaceae) in podobno kot druge vrste iz rodov *Eruca* in *Diplotaxis*, izhajajo iz Sredozemlja in zahodne Azije (Ugrinović, 2006).

Vrsti *Diplotaxis tenuifolia* in *Diplotaxis muralis* sta enoletni ali večletni (korenine prezimijo in iz njih spomladi odžene nova rastlina) zelnati, pri dnu oleseneli rastlini, po višini nekoliko nižji kot navadna rukvica. Venčni listi so rumeni, seme pa je podobne barve in oblike, vendar drobnejše (1 do 1,2 mm) kot pri vrsti *E. sativa*. Obe vrsti pri nas rasteta divje v naravi, najdemo ju predvsem ob poteh, zidovih, na pustih tleh pa tudi na njivah in v vinogradih. Najpogostejše rasteta na plitvih tleh alkalne reakcije. V pridelavi je zaradi svojih morfoloških lastnosti razširjena predvsem vrsta *D. tenuifolia* (Ugrinović, 2006).



Slika 1: Tankolistni dvoredec (levo) in obzidni dvoredec (desno) (foto: Ugrinović, 2006)

1.1 NAMEN NALOGE

Na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin so s kulturo mikrospor pridobili dihaploidne rastline rukvice, ki so jih želeli razmnožiti. Dihaploidne linije služijo pri postopku pridobivanja novih sort rukvice, ki postaja vse bolj popularna rastlina tudi v slovenski kulinariki. Ker linije slabo semenijo, smo se odločili, da jih poskušamo razmnožiti s tehniko mikropropagacije. Najprej je potrebno raziskati iz katerih delov rastline (izsečkov) dobimo največje število novih rastlin in katera sestava gojišča je primernejša.

1.2 CILJI NALOGE

Cilj naloge je bil določiti primeren postopek za klonsko razmnoževanje rukvice. Ti postopki seveda niso primerni za pridelavo rukvice, pač pa so zelo pomemben del novejših žlahtniteljskih postopkov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SISTEMATIKA RUKVICE

Rukvico (*Eruca*) uvrščamo med dvokaličnice (Dicotyledonae), v red Capparales in družino križnic (Brassicaceae). Za navadno rukvico (*Eruca sativa* Mill.) poznamo več sinonimov, in sicer: *Eruca versicaria* (L.) Cav. ssp. *sativa* (P. Mill.) Thellung, *Brassica eruca* L., *Eruca eruca* (L.) Aschers. & Graebn. in *Raphanus eruca* (L.) Crantz (Plants profile, 2008).

Različna poimenovanja rukvice, tako v slovenskem kot tudi v drugih jezikih, pričajo o njeni priljubljenosti in razširjenosti. Pri nas so poleg najbolj uveljavljenega izraza rukola, poznani še izrazi, kot so dihalnik, lažnica, rumena železnica, ruka, rokula, rikula, rigula itd. (Žnidarčič, 2006).

Poimenovanje rukvice v drugih jezikih (Bianco, 1995):

- angleško: rocket, salad rocket, wild rocket
- francosko: roquette, roquette, diplotaxe des murs
- nemško: rauke, doppelsame, raukette
- italjansko: rughetta, ruca, rukola selvatika, arucula
- indijsko: taramira, jamba.

2.2 MORFOLOGIJA RUKVICE

Navadna rukvica (*Eruca sativa* Mill.) je enoletna rastlina, ki zraste v višino do 100 cm (slika 2). Steblo je nekoliko razraslo in dlakavo, koreninski sistem pa je tanek in krhek. Spodnji listi so pecljati, gornji pa so bolj ali manj pernato deljeni, z dolgo podolgovato končno ploskvijo. Cvet rukvice je tipičen cvet križnic, sestavljen iz štirih venčnih listov, dolgih 10-12 mm, ki so kremno beli z vijoličnimi žilami, iz štirih čašnih listov, šestih prašnikov in pestiča (slika 2) (Leskovšek, 2008).



Slika 2: Cvet in rastlina navadne rukvice (*Eruca sativa* Mill.) (Eruca ..., 2012)

Plod je lusk, ki je na 3-4 mm dolgem peclju, je podolgovat, pokončen, bolj ali manj vzporeden steblu, nepravilno stisnjen in čvrsto napihnjen. Lusk je dolg 12-25 mm, širok pa 3-5 mm. Zaklopka luska je čvrsta z izrazito srednjo žilo. Kljun (izrašča iz luska, je brez semen) je 5-10 mm dolg, stisnjen in mečaste oblike. Semena so majhna, elipsoidna ali sploščena (Gomez-Campo, 1995). Semena se svetijo in imajo različne odtenke barv od rumeno zelene do rjave. Dolžina semen variira od 1,7-3 mm. Teža 1000 semen je 2 g (slika 3) (Bianco, 1995).



Slika 3: Lusk – plod navadne rukvice (foto: M. Jakše)

2.3 UPORABA RUKVICE

Listi rukvice se uporabljajo kot sestavina za solate in kot zeliščna zdravila. Semena so vir 4-metiltiobutil glukozinolatov, za katere verjamemo, da so koristni za zdravje človeka. Olje iz semen je bogato z eruka maščobno kislino, ki je dolga veriga maščobnih kislin, ki se uporablja izključno v industriji kot lubrikant. Rukvica je tudi odporna na sušo in gorčično uš. Zaradi teh karakteristik rukvico štejemo med obetavne genetske vire za

izboljšanje ostalih rastlin iz družine križnic in tudi kot modelno rastlino za preučevanje metabolizma dolge verige maščobnih kislin, biosintezo glukozinolatov in odpornosti na stres (Zhang, 2005).

2.3.1 Uporaba v prehrani, kmetijstvu, medicini

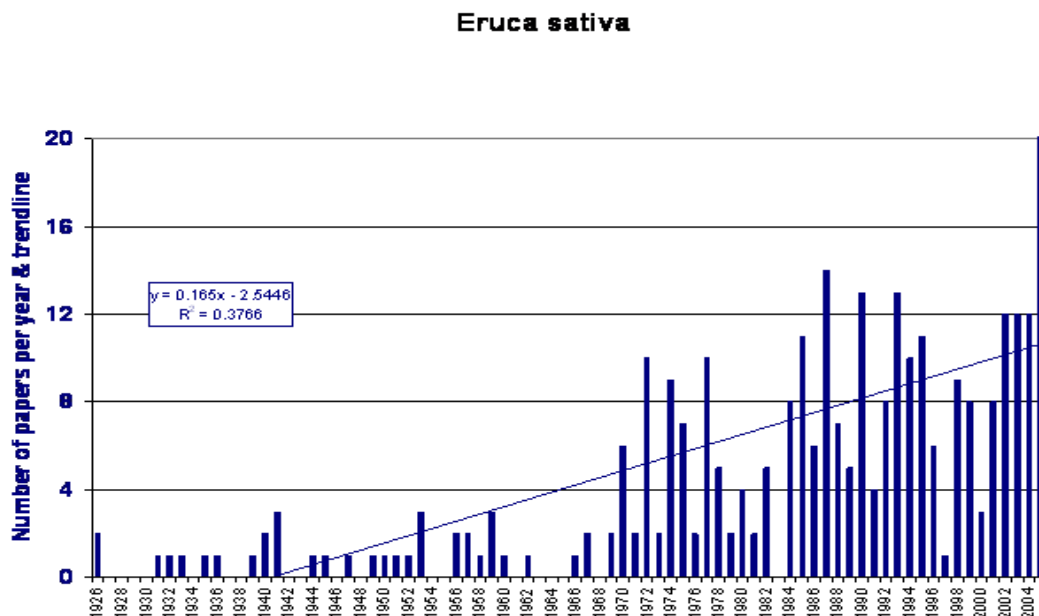
Že v času Rimljanov je bila rukvica poznana kot dobra začimba, saj listi rukvice vsebujejo glukozinolate, ki dajejo pekoč okus. V italijanskih restavracijah poleti ni solate, ki ne bi imela dodanih nekaj listov rukvice (Pignone, 1997).

Olja in ekstrakti iz listov kažejo potencial kot repelenti za insekte. Na lepljiva semena rukvice se lahko ujamejo ličinke komarjev. V španski provinci Cordoba so z rukvico hranili ličinke repnega belina: 96% ličink je propadlo. Ugotovili so tudi, da listni ekstrakti rukvice, ki vsebujejo glukozinolate, neugodno vplivajo na preživetje in razvoj bub, na življenjsko dobo, reprodukcijsko dobo in plodnost gorčične uši (Bianco, 1995).

Rukvica se v medicini uporablja v različne namene: proti vnetju, za strjevanje krvi, prečiščevanje, deluje kot diuretik, deluje pomirjevalno, spodbujevalno, odvajalno, proti skorbutu (Bianco, 1995)

2.3.2 Popularnost rukvice skozi čas

Popularnost rukvice iz leta v leto narašča, predvsem zadnjih 20 let, kot lahko razberemo tudi iz slike 4.



Slika 4: Popularnost rukvice skozi čas (Popularity..., 2012)

2.4 TEHNOLOGIJE PRIDELOVANJA NAVADNE RUKVICE

Posevek zasnujemo pri pridelovanju v rastlinjaku in na prostem, s setvijo z natančno sejalnico v vrstice na medvrstno razdaljo 10 cm ali z ročno setvijo na manjšem zemljišču. Za 1000 m² porabimo 2,5 do 3 kg semena, globina setve je od 0,5 do 1 cm. S tolikšno količino semena dosežemo gostoto 1500 do 2000 rastlin na m², ki pa se razpolovi že ob prvi košnji. Posevek rukole lahko zasnujemo tudi z vzgojo sadik. V takem primeru seme rukvice posejemo v gojitvene plošče in sadike presadimo na zaprte hidroponske sisteme ali na gredice, prekrte s črno folijo. Rukolo lahko vzgojimo tudi v gojitvenih ploščah kot semihidroponsko obliko pridelovanja (Osvald in Kogoj-Osvald, 2003).

2.5 GENERATIVNO RAZMNOŽEVANJE

Generativno razmnožujemo tiste rastline, ki tvorijo velike količine semen pri katerih je tovrstni način razmnoževanja najhitrejši in najenostavnejši.

Navadna rukvica je, kar se tiče rastnih dejavnikov, precej nezahtevna. Občutljiva je na temperaturo, ki je pomemben dejavnik za kalitev, rast in razvoj. Dolgi dan vpliva na pojav cvetenja, zato je smiselno rukvico gojiti v kratkem dnevu, saj ob dolgem dnevu hitro požene v cvet.

V poletnem času, ko so temperature okoli 25 °C, seme rukvice kali v 24 urah po setvi, medtem ko v hladnejšem obdobju, ko so temperature med 10 in 15 °C, kali 2-3 dni dlje (Pimpini in Enzo, 1997).

2.6 VEGETATIVNO RAZMNOŽEVANJE *IN VITRO*

Pri vegetativnem razmnoževanju *in vitro* iz izsečka rastline v sterilnih razmerah vzgojimo na posebej pripravljenem gojišču novo rastlino. Rastlinske celice imajo veliko sposobnost regeneracije in diferenciacije. Temu pojavu rečemo totipotentnost, ko iz ene celice lahko nastane cela nova rastlina (Bohanec, 1992).

Rastlinska tkivna kultura v širšem pomenu beseda je tehnika, pri kateri gojimo rastline, njihove organe, tkiva ali posamezne celice na znanih trdnih in tekočih gojiščih ali hranilnih podlagah v laboratorijskih sterilnih razmerah (George, 2008).

Ena izmed tehnik tkivnih kultur za vegetativno razmnoževanje je mikropropagacija.

2.6.1 Mikropropagacija

Mikrorazmnoževanje je brez dvoma temeljna tehnika tkivnih kultur. Večina komercialnih firm se ukvarja s to tehniko. Mikropropagacija je tudi osnova vseh ostalih tehnik, kajti končna faza tudi zahtevnejših postopkov je rastlina, ki jo s temi metodami ohranjamo in razmnožujemo (Bohanec, 1992).

Mikrorazmnoževanje uporabljamo pri (Jazbec in sod., 1995):

- vzgoji brezvirusnega sadilnega materiala
- hitrem razmnoževanju novih sort ali selekcioniranih genotipov
- razmnoževanju rastlin, ki se po klasičnem načinu razmnožujejo težko ali prepočasi.

Ločimo več faz v procesu mikropropagacije (Bohanec, 1992):

Faza 0: priprava materinih rastlin

Faza 1: iniciacija kulture

Faza 2: razmnoževanje poganjkov

Faza 3: podaljševanje poganjkov in koreninjenje

Faza 4: aklimatizacija.

Tehnika mikropropagacije je sestavljena iz več faz in vsaka posebej je zelo pomembna za uspešnost mikropropagacije. Najprej je potrebno pripraviti izsečke iz materinih rastlin. Te lahko nabiramo iz različnih tkiv in organov (nezreli embriji, apikalni meristemi, meristemi v stranskih brstih, kambijske cone v čebulicah, gomoljih). Za tem sledi iniciacija kulture, to je izrez primerne tkiva ter razkuževanje, rastlinski material je lahko notranje ali površinsko okužen z bakterijami ali glivicami. Razkužen rastlinski material od razkuževanja dalje obravnavamo kot sterilan. Vsi postopki potekajo v komorah za aseptično delo. Tudi orodje za delo (pincete, skalpeli, igle) občasno razkužujemo z avtoklaviranjem ali suhim steriliziranjem, med delom pa lahko orodje pomakamo v alkohol in razkužujemo z gorilnikom ali suhim sterilizatorjem. Zelo pomemben vir okužb je tudi človek; roke si umijemo, lahko si jih razkužimo z alkoholom, vzorce držimo kolikor se le da stran od sebe v notranjost komore. Za fazo iniciacije sledi faza razmnoževanja poganjkov. To je faza ko inokulum zraste in začne oblikovati nove poganjke. Postopek je uspešen, če nastane čim večje število poganjkov v čim krajšem času. Sledi faza koreninjenja. Poganjke, ki smo jih dovolj razmnožili, je sedaj potrebno ukoreniniti. Za koreninjenje *in vitro* običajno izbiramo gojišča z znižano koncentracijo makro in mikroelementov, z znižano koncentracijo saharoze in agarja, brez hormonov ali le z avksini. Koreninjenje *in vivo* pa je neposredno v substratu za aklimatizacijo. Postopek je relativno preprost. Poganjke pikiramo v posodice s substratom, orosimo ter primerno zalijemo. Koreninjenje *in vivo* lahko celo poveča uspeh mikropropagacije ter močno zniža stroške. Zadnja faza mikropropagacije je aklimatizacija. V tej fazi poganjke, rasle v heterotrofnih razmerah, ponovno navajamo na avtotrofni način rasti. Uspeh aklimatizacije je odvisen od vpliva predhodnjih laboratorijskih postopkov in vpliva dejavnikov, izbranih v procesu aklimatizacije. V času mikropropagacije pa lahko nastanejo določene reakcije ki negativno vplivajo na rast in razvoj. Prva reakcija, ki nastane po inokulaciji je hipersenzitivnost. Ta nastane zaradi mehaničnih poškodb tkiva, ki se zato pri nekaterih rastlinah odziva z oblikovanjem fenolov in pigmentov ali z odmiranjem sosednjih celic. Lahko se pojavi vitifikacija, to je nezaželen pojav, ki lahko nastopi takoj po inokulaciji, lahko šele v enem od kasnejših ciklov subkultiviranja. Značilno za ta pojav je, da poganjki postanejo »steklasti«, to je nenormalno prosojni, tkiva so polna vode in večkrat tudi nabrekla. Možni predhodni znaki vitifikacije so motnje listnih rež, ki ostajajo stalno

odprte in to, da nimajo epikutikularnega voska. Neugoden pojav, ki ga lahko opazimo pri nekaterih vrstah *in vitro* gojenih rastlin je odmiranje vršičkov, ki lahko povzroči velik zastoj rasti ali celo propad vzorcev. Velik problem v postopku mikropropagacije pa predstavljajo bakterijske in glivične okužbe (Bohanec, 1992).

2.6.1.1 Vloga mikro in makroelementov

Mikro- in makroelementi so esencialni elementi (=nujno potrebni) brez katerih rastlina ne more normalno zaključiti svojega življenjskega kroga, do tvorbe kalivih semen. Makroelementi so: C, H, N, O, P, S, K, Ca, Mg, Fe. Mikroelementi so: Mn, B, Cu, Zn, Li, Co, Mo, Cl, J.

Tako kot v naravi se tudi v *in vitro* razmerah ob neustrezni sestavi elementov lahko pojavijo kloroze, rjavenja vršičkov in podobno. Četudi so bile raziskave makro- in mikroelementov, potrebnih za rast tkivnih kultur, že opravljene pretežno v šestdesetih letih prejšnjega stoletja, danes več avtorjev ugotavlja, da bi bilo potrebno optimizirati sestavo hranil za različne skupine rastlin (Bohanec, 1992).

2.6.1.2 Vloga rastlinskih rastnih hormonov

Najpomembnejša skupina snovi, ki je omogočila celoten razvoj metod tkivnih kultur, so rastlinski hormoni (ali fitoregulatorji, rastlinske rastne substance). Poznamo več skupin rastlinskih hormonov, za tehnike tkivnih kultur pa sta najpomembnejši skupini avksini in citokinini. Od avksinov se največ uporablja naravni avksin indol očetna kislina (IAA), ter sintetični α -naftalen očetna kislina (NAA), indol maslena kislina (IBA) in 2,4-diklorofenoksiocetno kislino (2,4-D). Izmed citokininov sta zelo uspešna naravna citokinina zeatin in N^6 -(δ^2 -izopentenil) adenin (2iP). Največ uporabljena sintetična citokinina pa sta 6-benzilamino purin (BAP) in kinetin (6-furfurilamino purin) (KIN) (Bohanec, 1992).

Rastlinski rastni hormoni so najpomembnejši notranji dejavniki, ki uravnavajo rast in razvoj rastline. Hormoni so organske molekule, ki so udeležene pri regulaciji rasti in razvoja in ne služijo kot hranila. Njihov učinek je lahko stimulacija ali zaviranje določenih procesov. Avksini stimulirajo rast koleoptile in stebila in zavirajo rast korenin (Vodnik, 2008a). Citokinini pa vplivajo na povečano delitev celic, povečujejo rast brstov in stranskih poganjkov, stimulirajo odpiranje listnih rež, zavirajo rast stranskih korenin in povečujejo sintezo klorofila in razvoj kloroplastov (Vodnik, 2008b).

2.6.1.3 Vloga agarja

Agar je sredstvo za strjevanje gojišč, ki je sestavljen iz 70 % agaroze in 30 % agaropektina. Agar je izvleček iz rdečih alg, kar pomeni, da izhaja iz biotično različnega materiala in kemično različno onesnaženega okolja. Zato ima izbira vrste agarja velik pomen za uspeh *in vitro* vzgoje (Bohanec, 1992).

2.6.1.4 Vloga vitaminov

Skoraj vsa gojišča vsebujejo vitamine, nekatera le enega, druga pa tudi pet ali več. Gojišča namenjena za mikropropagacijo, dostikrat ne vsebujejo več kot treh osnovnih vitaminov, medtem ko gojišča za gojenje posameznih celic ali protoplastov večkrat zahtevajo večje število vitaminov (Bohanec, 1992).

Raziskav o potrebnosti vitaminov za posamezne vrste rastlin ni veliko, zato ne preseneča dejstvo, da se za isti namen včasih uspešno uporabljajo gojišča z zelo kompleksno sestavo vitaminov in tudi gojišča, ki morda vsebujejo le tiamin (Bohanec, 1992).

2.6.1.5 Vloga saharoze

Največkrat uporabljeni in pogosto edini vir energije v *in vitro* kulturah je ogljikov hidrat - saharoza. Pogosto je saharoza tudi dodatni vir ogljika.

Saharози pripisujejo tudi vpliv na osmotsko stanje gojišča. Alternativni viri ogljikovih hidratov so še glukoza, fruktoza, sorbitol, manitol, maltoza in drugi (Bohanec, 1992).

2.6.1.6 Vpliv pH gojišča

Večina postopkov priporoča uravnavo pH v območju med 5.0 in 6.5, z optimumom okoli 6.0. V tem območju naj bi bile dodane anorganske snovi najboljše dostopne rastlinskim celicam. Običajno se nastavi pH pred avtoklaviranjem, vendar se med avtoklaviranjem pH zniža (Bohanec, 1992).

2.6.2 Dihaploid

Dihaploid (DH) je praviloma celica ali organizem, nastal z reduciranjem tetraploidnega organizma; danes v uporabi kot organizem, nastal s podvajanjem haploidnega organizma; ker so kot haploidni večinoma dejansko mišljeni monoploidni organizmi, so z izrazom dihaploid mišljeni homozigotni diploidni organizmi (Bohanec, 1992).

Dihaploidne rastline lahko nastanejo spontano ali pa s podvajanjem kromosomov. Tretiranje s sredstvi za podvajanje lahko izvršimo *in vitro* v začetnih fazah indukcije haploidov ali *in vivo* oziroma *in vitro* na že pridobljenih haploidnih rastlinah. Dihaploidne rastline so teoretično popolni homozigoti. S samooprašitvijo dihaploidnih rastlin pa pridobimo seme čiste homozigotne linije (Leskovšek, 2008).

3 MATERIAL IN METODE DELA

3.1 MATERIAL

Na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin so s kulturo mikrospor pridobili dihaploidne (DH) rastline navadne rukvice, ki so jih želeli razmnožiti. Na voljo smo imeli 50 dihaploidnih linij, ki so imele oznake kot je navedeno v preglednicah 4 do 14.

Uporabljen material, instrumenti in kemikalije - sestavine v času poskusa:

- ➔ 50 dihaploidnih linij navadne rukvice
- ➔ škarje, cedila, pincete, skalpeli
- ➔ petrijevke Ø 90 x 15 mm, stekleni kozarci Ø 55 x 72 mm s polipropilenskim pokrovom
- ➔ merilna bučka, čaša, erlenmajerice, Shoot steklenice s plastičnim pokrovom na navoj, kapalka
- ➔ parafilm, alufolija
- ➔ tehtnica, avtomatske pipete
- ➔ električni magnetni mešalec s teflonskim magnetom
- ➔ pH meter
- ➔ mikrovalovna pečica, avtoklav
- ➔ suhi sterilizator
- ➔ brezprašna komora, rastna komora, hladilnik
- ➔ 70% etanol
- ➔ dinatrijeva dikloroizocianurna kislina (16,6 g/l)
- ➔ detergent Tween 20, bidestilirana voda
- ➔ agar, saharoza
- ➔ gojišča: B5, MS
- ➔ hormoni: IAA, BAP, NAA, KIN iz založnih raztopin
- ➔ 1N KOH, 1N HCl,

3.1.1 Sestava gojišč

Prvo gojišče B5 (Gamborg in sod., 1968), katerega sestava je prikazana v preglednici 1, je dvokomponentno; eno komponento sestavljajo makro- in mikroelementi (3051,98 mg/l), drugo komponento pa vitamini (112,0 mg/l). Temu smo dodali 20 g/l saharoze, 8 g/l Daishin agarja, 0,1 mg/l IAA (indol očetna kislina) in 0,5 mg/l BAP (6-benzilamino purin).

Gojišče B5 smo prenehali uporabljati, ker so rastline postajale močno vitrificirane in tudi poganjki so porjaveli, zato smo se odločili za novo gojišče MS (Murashige in Skoog, 1962).

Novo gojišče MS (4405,2 mg/l), katerega sestava je prikazana v preglednici 1, je sestavljeno iz mikro- in makroelementov ter organskih snovi. Uporabili smo ga v štirih

različnih variantah glede na hormonsko sestavo (preglednica 2), v vseh pa je bila enaka količina saharoze (20 g/l) in agarja (8 g/l). pH smo umerili na 5.8.

Preglednica 1: Sestava MS in B5 gojišč (Bohanec, 1992: 139)

Sestavine (mg/l)	MS (Murashige in Skoog, 1962)	B5 (Gamborg in sod., 1968)
<i>Makroelementi</i>		
NH_4NO_3	1650	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	134
KNO_3	1900	2500
KH_2PO_4	170	-
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	-	150
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	440	150
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	370	250
<i>Železo</i>		
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	27,8
$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	37,2	37,2
<i>Mikroelementi</i>		
H_3BO_3	6,2	3
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	13,2
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	2
KJ	0,83	0,75
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025
<i>organske snovi</i>		
Glicin	0,2	-
Inotizol	100	100
Niacin	0,5	1
Piridoksin-HCl	0,5	1
Tiamin-HCl	0,1	10

3.2 METODE DELA

S poskusom smo začeli decembra 2007. V rastlinjaku Biotehniške fakultete Oddelka za agronomijo, smo nabirali izhodni material za razmnoževanje. V poskusu mikropropagacije smo kot izhodni material uporabili različne dele dihaploidnih rastlin rukvice in sicer stranske brste, cvetne popke in listne diske.

V prvem delu poskusa smo od 50 rastlin naključno izbrali 30 rastlin, od tega smo na 17 rastlinah nabrali stranske brste, na 10 rastlinah cvetne popke in na 3 mlade liste. Pred inokulacijo rastlinskega materiala na gojišče smo rastlinski material sterilizirali s postopkom, ki je opisan v poglavju 3.2.4 Sterilizacija rastlinskega materiala. Stranske brste smo nastavljali na gojišče v steklene kozarce po štiri izsečke, cvetne popke v petrijevke po pet izsečkov in listne diske ravno tako v petrijevke po deset izsečkov. Uporabili smo gojišče B5, kateremu smo dodali 0,1 mg/ml IAA in 0,5 mg/ml BAP iz založnih raztopin, ki smo ga imenovali G1. To isto gojišče z enako hormonsko sestavo smo uporabili tudi za subkultiviranje.

V drugem delu poskusa smo uporabili še preostalih 18 rastlin (dve rastlini sta v času poskusa propadli), in se na podlagi rezultatov iz prvega dela poskusa odločili, da nastavljamo samo izsečke iz stranskih brstov, saj izsečki cvetnih popkov in listnih diskov niso dali zelenih rezultatov. Razkuževanje je potekalo enako kot v prvem delu poskusa, izsečke stranskih brstov smo ravno tako nastavljali na gojišče v steklene kozarce po štiri na en kozarec v štirih ponovitvah. Uporabili pa smo nova gojišča. Za inokulacijo smo uporabili gojišče MS v dveh različicah. Eno gojišče, imenovano G2, je vsebovalo 0,5 mg/ml BAP in 0,1 mg/ml IAA iz založnih raztopin, drugo gojišče, imenovano G3, pa je vsebovalo 0,5 mg/ml BAP in 0,2 mg/ml NAA iz založnih raztopin. Tudi za subkultiviranje smo se odločili za nova gojišča. Uporabili smo MS gojišče v dveh različicah. Gojišče G4 je vsebovalo 1,0 mg/ml KIN in 0,2 mg/ml NAA. Gojišče G5 pa ni vsebovalo hormonov.

Preglednica 2: Hormonska sestava gojišč B5 in MS za razmnoževanje in koreninjenje rukvice

Oznaka gojišča	Osnovno gojišče	Hormoni (mg/l)	Uporaba
G1	B5	BAP 0,5 in IAA 0,1	za inokulacijo stranskih brstov, cvetnih popkov in listnih diskov ter za subkultiviranje
G2	MS	BAP 0,5 in IAA 0,1	za inokulacijo stranskih brstov
G3	MS	BAP 0,5 in NAA 0,2	za inokulacijo stranskih brstov
G4	MS	KIN 1,0 in NAA 0,2	za subkultiviranje
G5	MS	BREZ HORMONOV	za subkultiviranje

Vsa gojišča so vsebovala saharozo, kot strjevalec gojišča smo uporabili agar, pH smo umerili na 5,8.

Poskus mikropropagacije je potekal v laboratoriju za aseptično delo, kjer smo ves čas ohranjali aseptično regeneracijo stranskih brstov (cvetnih popkov in listnih diskov) in sproti opazovali spremembe.

3.2.1 Priprava rastlinskih hormonov

Rastlinske hormone smo si vnaprej pripravili kot založne raztopine in jih hranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C. Založne raztopine smo pripravili tako, da smo v 100 ml čaši na tehtnici zatehtali določeno količino hormona; 20 mg BAP, 10 mg KIN, 25 mg IAA in 2 mg NAA. Citokininom (BAP in KIN) smo dodali nekaj kapljic 1M HCl, avksinom (IAA in NAA) pa nekaj kapljic 1M KOH za raztapljanje. Nato smo do 100 ml dolili destilirano vodo in tako pripravljeno založno raztopino shranili v hladilnik.

Preglednica 3: Potrebne koncentracije hormonov v 1 l gojišča in koncentracije uporabljenih hormonov v založnih raztopinah

HORMON	KONCENTRACIJA (mg/l)	KONCENTRACIJA V ZALOŽNI RAZTOPINI
BAP	0,5	20 mg/100 ml H ₂ O
IAA	0,1	25 mg/100 ml H ₂ O
KIN	1	10 mg/100 ml H ₂ O
NAA	0,2	2 mg/100 ml H ₂ O

Glede na potrebno količino hormona iz založne raztopine v gojišču, smo izračunali volumen, ki ga je bilo potrebno odpipetirati iz založne raztopine. To smo izračunali po naslednji formuli:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \quad \dots(1)$$

C_1 ... potrebna koncentracija hormona v gojišču

V_1 ...volumen 1 l

C_2 ... koncentracija hormona v založni raztopini

V_2 ...volumen odpipetirane založne raztopine

Po zgoraj navedeni formuli smo izračunali, da je potrebno odpipetirati 2,5 ml BAP, 0,4 ml IAA, 10 ml KIN in 10 ml NAA iz založnih raztopin za pripravo 1 l gojišča.

3.2.2 Priprava in sterilizacija gojišč

Gojišča smo pripravili tako, da smo najprej v čašo zatehtali mikro- in makroelemente, vitamine in saharozo (20 g/l). Vse skupaj smo prelili z nekaj bidestilirane vode in dodali hormone iz založnih raztopin. Pripravljeno mešanico smo mešali s teflonskim magnetom na magnetnem električnem mešalniku. Ko je postala mešanica homogena, smo v merilni bučki določili končni volumen z dodajanjem bidestilirane vode do oznake in nato raztopino spet prelili nazaj v čašo, da smo lahko izmerili pH vrednost. pH vrednost smo merili ob stalnem mešanju na magnetnem mešalu. Z dodatkom 1N KOH smo pH vrednost zvišali, z 1N HCl pa znižali na pH 5,8. Ko je bil pH umerjen, smo zatehtali še potrebno količino agarja (8 g/l) in ga dodali raztopini ter raztapljali v mikrovalovni pečici, dokler raztopina ni

postala bistra. Bistro raztopino smo prelili v Shoot steklenice, jih zaprli s plastičnimi pokrovi na navoj, vendar ne popolnoma, da je bila v procesu avtoklaviranja omogočena izmenjava pare. Avtoklaviranje je razkuževanje gojišča z vročo paro v avtoklavu pri temperaturi 121 °C, tlaku 1,1 bar in času 20 minut. Po končani sterilizaciji je sledilo razlivanje gojišča v sterilne steklene posodice in petrijevke, ki so bile tudi sterilizirane v avtoklavu pod enakimi pogoji kot gojišče. Razlivanje je potekalo v brezprašni komori, kjer smo pokrite petrijevke in steklene posodice pustili, da so se ohladile in da se je gojišče v njih strdilo.

3.2.3 Sterilizacija pribora

Za delo smo potrebovali pribor: pincete, igle, skalpele, cedila, ki je moralo biti za uspešno izolacijo sterilno. Pincete, igle in skalpele smo občasno sterilizirali v avtoklavu (20 minut, 121 °C, 1,1 bar). Med samim delom v aseptični komori pa smo orodje razkuževali s plinskim gorilnikom, vsakič ko smo vzeli nov vzorec. Pri tem pa smo pazili, da se je orodje dovolj ohladilo, saj bi z vročim orodjem lahko poškodovali tkivo rastline. Cedila, vsako posebej zavito v alufolijo, smo sterilizirali samo z avtoklaviranjem (20 minut, 121 °C, 1,1 bar) in za vsak vzorec uporabili novo, sterilno cedilo.

Delovno površino smo pred začetkom dela in tudi med delom očistili z alkoholom (70% etanol). Z alkoholom smo si razkužili tudi roke, saj človek lahko predstavlja velik vir okužb.

3.2.4 Priprava rastlinskega materiala za inokulacijo

Rastlinski material smo zrezali na izsečke primerne velikosti in oblike. Nodije s stranskimi brsti smo narezali na približno 1 cm velike izsečke v obliki črke »Y«, kjer smo pričakovali, da bodo nastali poganjki.

Listne diske smo izrezali iz mladih listov, v obliki kvadrata, velikosti približno 1 cm².

Stranske brste in listne diske smo razkuževali po tem, ko smo izrezali primerne izsečke.

Cvetne popke smo najprej razkužili (postopek razkuževanja je opisan v naslednjem poglavju), nato smo cvetne popke prerezali na pol v smeri od vršička proti peclju in ga nastavili na gojišče z zgornjim delom navzdol.

3.2.5 Sterilizacija rastlinskega materiala

Površinska sterilizacija rastlinskega materiala je potekala v brezprašni komori. Za to smo uporabili dinatrijevo dikloroizocianurno kislino (DIA) v koncentraciji 16,6 g/l. V 100 ml erlenmajerico smo nalili 50 ml bidestilirane vode, erlenmajerico pokrili z dvema plastema alufolije in jo avtoklavirali (20 minut, 121 °C, 1,1 bar). Zatehtali smo 0,83 g dinatrijeve dikloroizocianurne kisline in jo dodali vnaprej pripravljeni vodi in temu dodali še štiri kapljice detergenta Tween 20. Čas razkuževanja za stranske brste je bil 10 minut, za listne diske 6 in za cvetne popke 20 minut. V času razkuževanja se je rastlinski material v

razkužilu mešal na električnem magnetnem mešalniku. Po končanem razkuževanju smo rastlinski material dali v erlenmajerico z 50 ml bidestilirane avtoklavirane vode za 5 minut in vmes nekajkrat premešali, po 5 minutah smo prelili izsečke skozi cedilo. Postopek izpiranja smo ponovili še dvakrat, da smo čim bolj odstranili ostanke razkužila. Sterilen rastlinski material smo nato inokulirali na gojišče.

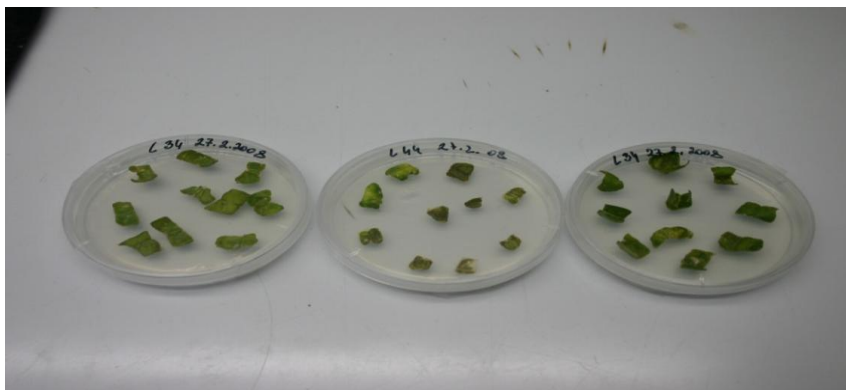
3.2.6 Inokulacija na gojišče

Stranske brste smo inokulirali na sterilno gojišče v steklene kozarce Ø 55 x 72 mm s polipropilenskim pokrovom. V steklen kozarec smo inokulirali po štiri izsečke (slika 5). Listne diske in cvetne popke pa smo inokulirali na sterilno gojišče v petrijevke Ø 90 x 15 mm, in sicer po deset listnih diskov na petrijevko (slika 6) in po pet cvetnih popkov na petrijevko. Petrijevke in steklene kozarce smo oblepili s parafilmom, da ne bi prišlo do sekundarnih okužb in izhlapevanja.

Inokulirane stranske brste, listne diske in cvetne popke smo gojili v rastni komori, s fotoperido 16 ur svetlobe in 8 ur teme in pri temperaturi 24 °C.



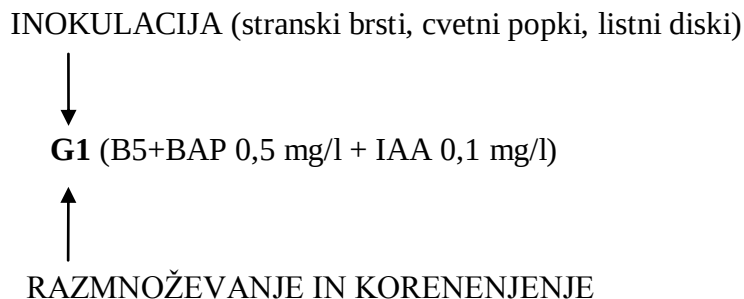
Slika 5: Inokulirani izsečki iz stranskih brstov navadne rukvice (foto: M. Jakše, 2008)



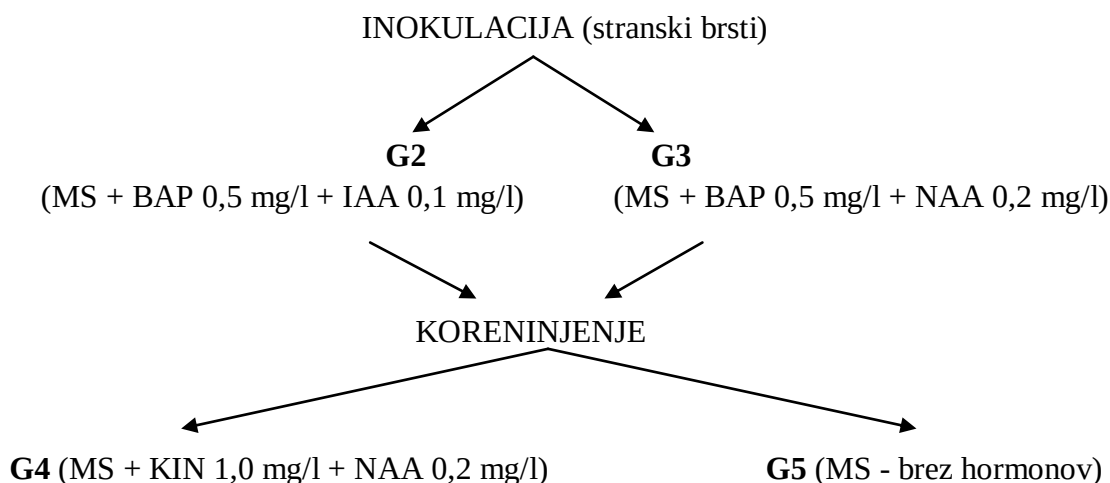
Slika 6: Listni diski navadne rukvice (foto: M. Jakše, 2008)

3.2.6.1 Potek poskusa

1. del poskusa



2. del poskusa



Slika 7: Shematski prikaz poskusa mikropropagacije navadne rukvice

3.2.6.2 Stranski brsti pri 1. delu poskusa

Na gojišče G1 v 4 terminih smo skupno inokulirali 272 izsečkov stranskih brstov (preglednica 4). V vsak steklen kozarec smo inokulirali štiri izsečke v štirih ponovitvah, se pravi, da smo od vsake dihaploidne linije rukvice inokulirali po 16 izsečkov.

Preglednica 4: Inokulacija stranskih brstov DH linij rukvice na gojišče G1

Datum	Stranski brsti DH linij inokulirani na gojišče G1
18.dec.07	L12, L13, L31, L41, L81
19.dec.07	L7, L49, L52, L85
20.dec.07	L28, L29, L30, L50
21.dec.07	L25, L82, L83, L86

Prvo bonitiranje smo opravili v dveh terminih po 25-27 dneh, glede na datum inokulacije rastlinskega materiala na gojišče (preglednica 5).

Preglednica 5: Prvo bonitiranje/subkultiviranje poganjkov iz stranskih brstov rukvice na gojišče G1

Datum	Prvo bonitiranje/subkultiviranje DH linij
14.jan.08	L7, L12, L13, L31, L41, L49, L52, L81, L85
15.jan.08	L25, L28, L29, L30, L50, L82, L83, L86

Drugo bonitiranje smo opravili v dveh terminih 23 dni po prvem bonitiranju (preglednica 6).

Preglednica 6: Drugo bonitiranje poganjkov iz stranskih brstov rukvice na gojišče G1

Datum	Drugo bonitiranje DH linij
6.feb.08	L7, L12, L13, L31, L41, L49, L52, L81, L85
7.feb.08	L25, L28, L29, L30, L50, L82, L83, L86

3.2.6.3 Cvetni popki

Na gojišče G1 smo v dveh terminih skupno inokulirali 200 izsečkov iz cvetnih popkov (preglednica 7). V vsako petrijevko smo inokulirali pet izsečkov v štirih ponovitvah, kar pomeni, da smo od vsake dihaploidne linije inokulirali po dvajset izsečkov.

Preglednica 7: Inokulacija cvetnih popkov DH linij rukvice na gojišče G1

Datum	Cvetni popki DH linij inokulirani na gojišče G1
8.jan.08	L4, L22, L27, L33, L39
9.jan.08	L43, L53, L80, L87, L88

Prvo bonitiranje smo opravili v dveh terminih 24-26 dni po inokulaciji (preglednica 8).

Preglednica 8: Prvo bonitiranje/subkultiviranje poganjkov iz cvetnih popkov rukvice na gojišče G1

Datum	Prvo bonitiranje/subkultiviranje DH linij
1.feb.08	L4, L22, L27, L33, L39
4.feb.08	L43, L53, L80, L87, L88

Drugo bonitiranje smo opravili v enem terminu 24 oz. 27 dni po prvem bonitiranju (preglednica 9).

Preglednica 9: Drugo bonitiranje poganjkov iz cvetnih popkov rukvice na gojišče G1

Datum	Drugo bonitiranje DH linij
28.feb.08	L4, L22, L27, L33, L39, L43, L53, L80, L87, L88

3.2.6.4 Listni diski

Na gojišče G1 smo v enem terminu skupno inokulirali 30 izsečkov listnih diskov (preglednica 10). V vsako petrijevko smo dali po deset izsečkov od vsake dihaploidne linije rukvice.

Preglednica 10: Inokulacija listnih diskov DH linij rukvice na gojišče G1

Datum	Listni diski DH linij inokulirani na gojišče G1
17.jan.08	L34, L38, L44

Po 25 dneh, 11.feb.2008, smo opravili prvo bonitiranje vseh treh DH linij.

3.2.6.5 Stranski brsti pri 2. delu poskusa

10.mar.2008 smo pripravili nova gojišča za inokulacijo in za koreninjenje rastlin. V vsako gojišče, G2 in G3 smo inokulirali po 16 izsečkov od vsake dihaploidne linije rukvice. V vsak steklen kozarec smo inokulirali po štiri izsečke v štirih ponovitvah. Na gojišče G2 smo inokulirali 288 izsečkov stranskih brstov, ravno toliko smo jih inokulirali tudi na gojišče G3. Skupno smo v šestih terminih na gojišča G2 in G3 inokulirali 576 izsečkov (preglednica 11).

Preglednica 11: Inokulacija stranskih brstov iz DH linij rukvice na gojišči G2 in G3

Datum	DH linije inokulirane v gojiščih G2 in G3
13.mar.08	L1, L48, L54
14.mar.08	L37, L40, L42
17.mar.08	L5, L10, L11
18.mar.08	L20, L45, L51
19.mar.08	L16, L18, L46
20.mar.08	L32, L35, L84

Pri prvem bonitiranju, ki smo ga opravili v štirih terminih 22-26 dni po inokulaciji, smo pridobljene nove poganjke subkultivirali na nova gojišča (preglednica 12). Od vsake linije in iz vsakega gojišča (G2 in G3) smo približno polovico poganjkov prestavili na gojišče G4, drugo polovico pa na gojišče G5.

Preglednica 12: Prvo bonitiranje in subkultiviranje poganjkov iz stranskih brstov DH linij rukvice na gojišči G4 in G5

Datum	Prvo bonitiranje/subkultiviranje DH linij rukvice na G4 in G5
8.apr.08	L1, L37, L40, L48, L54
9.apr.08	L5, L10, L11, L42
10.apr.08	L18, L20, L45, L46, L51
11.apr.08	L16, L32, L35, L84

Drugo bonitiranje smo opravili v petih terminih 30-36 dni po prvem bonitiranju (preglednica 13).

Preglednica 13: Drugo bonitiranje in subkultiviranje poganjkov iz stranskih brstov DH linij rukvice na gojišči G4 in G5

Datum	Drugo bonitiranje/subkultiviranje DH linij rukvice na G4 in G5
8.maj.08	L1, L40, L48, L54
9.maj.08	L11, L37, L42
12.maj.08	L5, L10, L45, L51
13.maj.08	L16, L18, L20, L46
14.maj.08	L32, L35, L84

Tretje bonitiranje in presajanje v minirastlinjak napolnjen s šotnim substratom smo opravili v petih terminih 25-27 dni po drugem bonitiranju (preglednica 14). Minirastlinjak smo postavili v rastlinjak na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete in rastline redno oskrbovali (zračili in zalivali).

Preglednica 14: Tretje bonitiranje in subkultiviranje ukoreninjenih poganjkov iz stranskih brstov DH linij rukvice v mini rastlinjaku

Datum	Tretje bonitiranje/subkultiviranje DH linij
2.jun.08	L1, L40, L48, L54
3.jun.08	L11, L37, L42
6.jun.08	L5, L10, L45, L51
9.jun.08	L16, L18, L20, L46
10.jun.08	L32, L35, L84

3.2.7 Obdelava podatkov

Prvi del poskusa nismo statistično izvednotili, saj smo uporabili le eno gojišče za inokulacijo, razmnoževanje in koreninjenje (G1). Pri drugem delu poskusa pa smo statistično izvednotili primerjavo gojišča G2 in G3 z analizo variance in analizo s poskusom mnogoterih primerjav – Duncan-ov test pri 5 % tveganju s programom Statgrafics Plus.

4 REZULTATI

4.1 PRVI DEL POSKUSA

V prvem delu poskusa smo inokulirali izsečke iz stranskih brstov, cvetnih popkov in listnih diskov na gojišče G1. Enako gojišče smo uporabili tudi za koreninjenje novonastalih poganjkov.

4.1.1 Stranski brsti

Preglednica 15: Število inokuliranih izsečkov iz stranskih brstov navadne rukvice, odgnalih, okuženih in brez poganjkov na gojišču G1 pri prvem bonitiranju

DH linija	Število izsečkov			
	inokuliranih	odgnalih	okuženih	brez poganjkov
L7	16	0	16	0
L12	16	6	7	3
L13	16	5	6	5
L25	16	4	10	2
L28	16	0	16	0
L29	16	8	8	0
L30	16	13	2	1
L31	16	3	13	0
L41	16	8	8	0
L49	16	5	11	0
L50	16	13	3	0
L52	16	11	4	1
L81	16	8	6	2
L82	16	14	0	2
L83	16	7	8	1
L85	16	7	9	0
L86	16	13	0	3
Σ	272	125	127	20

Pri prvem bonitiranju, ki smo ga izvedli 25-27 dni po inokulaciji, smo dobili naslednje rezultate: iz 272 inokuliranih izsečkov stranskih brstov smo dobili 239 poganjkov (iz 125 stranskih brstov) oz. 46,0 % izsečkov je naredilo nove poganjke, ki smo jih subkultivirali na gojišče G1, 127 oz. 46,7 % izsečkov je bilo okuženih, 20 oz. 7,3 % izsečkov pa ni naredilo novih poganjkov (preglednica 15).



Slika 8: Regeneranti iz stranskih brstov navadne rukvice (foto: M. Jakše, 2008)

Preglednica 16: Število prvič subkultiviranih poganjkov iz izsečkov stranskih brstov navadne rukvice na gojišče G1, število okuženih, ukoreninjenih in neukoreninjenih oz. propadlih poganjkov pri drugem bonitiranju

DH linija	Število poganjkov			
	prvič subkultiviranih na G1	okuženih	ukoreninjenih	neukoreninjenih/propadlih
L7	0	0	0	0
L12	9	1	8	0
L13	8	2	5	1
L25	11	8	1	2
L28	0	0	0	0
L29	19	4	12	3
L30	19	0	17	2
L31	7	0	5	2
L41	12	4	5	3
L49	8	0	8	0
L50	29	8	15	6
L52	17	2	11	4
L81	10	0	8	2
L82	32	4	21	7
L83	13	3	5	5
L85	15	4	7	4
L86	30	7	18	5
Σ	239	47	146	46

Pri drugem bonitiranju, ki smo ga opravili 23 dni po prvem bonitiranju, smo opazili naslednje: od 239 subkultiviranih poganjkov iz izsečkov stranskih brstov je bilo okuženih 47 oz. 19,7 % poganjkov, 146 oz. 61,1 % poganjkov je naredilo korenine, 46 oz. 19,2 % poganjkov ni naredilo korenin. Vse ukoreninjene poganjke smo zaradi močne vitifikacije zavrgli (preglednica 16).

4.1.2 Cvetni popki

Preglednica 17: Število inokuliranih izsečkov iz cvetnih popkov navadne rukvice, odgnalih, okuženih in brez poganjkov na gojišču G1 pri prvem bonitiranju

DH linija	Število izsečkov			
	inokuliranih	odgnalih	okuženih	brez poganjkov
L4	20	0	20	0
L22	20	5	9	6
L27	20	7	9	4
L33	20	4	4	12
L39	20	8	4	8
L43	20	3	6	11
L53	20	8	5	7
L80	20	4	5	11
L87	20	2	10	8
L88	20	7	4	9
Σ	200	48	76	76

Pri prvem bonitiranju, ki smo ga izvedli 24-26 dni po inokulaciji, smo iz 200 inokuliranih izsečkov cvetnih popkov dobili 67 poganjkov (iz 48 izsečkov) oz. 24,0 % izsečkov je naredilo nove poganjke, 76 oz. 38,0 % izsečkov je bilo okuženih, 76 oz. 38,0 % izsečkov ni naredilo novih poganjkov (preglednica 17).



Slika 9: Regeneranti iz cvetnih popkov navadne rukvice (foto: M. Jakše, 2008)

Preglednica 18: Število prvič subkultiviranih poganjkov iz cvetnih popkov navadne rukvice na gojišču G1, število okuženih, ukoreninjenih in neukoreninjenih oz. propadlih poganjkov pri drugem bonitiranju

DH linija	Število poganjkov			
	prvič subkultiviranih na G1	okuženih	ukoreninjenih	neukoreninjenih / propadlih
L4	0	0	0	0
L22	7	3	1	3
L27	9	4	2	3
L33	4	0	1	3
L39	11	11	0	0
L43	4	4	0	0
L53	13	1	6	6
L80	6	2	3	1
L87	2	0	0	2
L88	11	3	5	3
Σ	67	28	18	21

Pri drugem bonitiranju, ki smo ga opravili 24-27 dni po prvem bonitiranju smo ugotovili naslednje: od 67 subkultiviranih poganjkov je bilo 28 oz. 41,8 % okuženih, 18 oz. 26,9 % se jih je ukoreninilo, 21 oz. 31,3 % poganjkov pa ni naredilo korenin. Vse ukoreninjene poganjke smo zaradi močne vitifikacije zavrgli (preglednica 18).

4.1.3 Listni diski

Preglednica 19: Število inokuliranih izsečkov listnih diskov navadne rukvice, subkultiviranih, okuženih in brez poganjkov pri prvem bonitiranju

DH linija	Število izsečkov			
	inokuliranih	subkultiviranih na G1	okuženih	brez poganjkov
L38	10	0	0	10
L43	10	0	0	10
L44	10	0	10	0
Σ	30	0	10	20

Pri prvem bonitiranju, ki smo ga izvedli 25 dni po inokulaciji, nismo iz 30 inokuliranih izsečkov listnih diskov dobili nobenega poganjka, 20 izsečkov je bilo brez poganjkov, 10 pa jih je bilo okuženih. Vsi izsečki iz listnih diskov so že pri prvem bonitiranju propadli (preglednica 19).

4.1.4 Sklepi 1. dela poskusa

Že pri prvem bonitiranju smo opazili, da so poganjki iz vseh vrst izsečkov močno vitrificirani. Stanje se je do drugega bonitiranja še poslabšalo, zato smo se 4.mar.2008 odločili, da vse zavržemo, saj bi tako vitrificirane poganjke težko rešili, kljub temu da so nekateri naredili korenine.

Za nadaljevanje poskusa smo se odločili, da bomo uporabili samo izsečke iz stranskih brstov, ne pa tudi izsečke iz cvetnih popkov in listnih diskov, saj v prvem delu poskusa niso dali zelenih rezultatov. Uporabili pa smo tudi nova gojišča, tako za inokulacijo kot za ohranjanje kulture.

4.2 DRUGI DEL POSKUSA

4.2.1 Inokulacija izsečkov iz stranskih brstov na gojišče G2

Na gojišče G2 smo inokulirali 288 izsečkov iz stranskih brstov, po 16 izsečkov od vsake dihaploidne linije.

Preglednica 20: Število subkultiviranih izsečkov navadne rukvice iz G2 na gojišči G4 in G5, število okuženih in število izsečkov brez poganjkov pri prvem bonitiranju

DH linija	Število poganjkov subkultiviranih na gojišče		Število izsečkov	
	G4	G5	okuženih	brez poganjkov
L1	16	14	3	0
L5	18	16	2	0
L10	16	19	3	0
L11	23	20	0	0
L16	16	18	2	0
L18	19	16	0	3
L20	19	17	4	1
L32	14	16	7	1
L35	16	14	5	0
L37	20	21	0	0
L40	19	18	0	2
L42	11	8	8	0
L45	8	11	8	1
L46	26	27	0	0
L48	18	20	0	0
L51	24	22	0	0
L54	14	13	4	1
L84	20	22	0	2
Σ	317	312	46	11

Inolukiranih je bilo 288 izsečkov stranskih brstov rukvice. Pri prvem bonitiranju (22-26 dni po inokulaciji) izsečkov na gojišču G2 se je regenerirali 231 izsečkov, iz njih smo dobili 629 poganjkov oz. 80,2 % izsečkov je naredilo poganjke, 317 poganjkov smo subkultivirali na gojišče G4, 312 poganjkov pa smo subkultivirali na gojišče G5. Okuženih je bilo 46 oz. 16 % izsečkov, 11 oz. 3,8 % izsečkov ni naredilo novih poganjkov. Največ 53 novih poganjkov smo dobili pri DH liniji L46, najmanj 19 novih poganjkov smo dobili iz DH linij L42 in L45. Brez okužb so bile linije L11, L18, L37, L40, L46, L48, L51, L84 (preglednica 20).

Drugo subkultiviranje smo opravili 30-36 dni po prvem bonitiranju.

Preglednica 21: Število drugič subkultiviranih poganjkov navadne rukvice na gojišči G4 in G5, število okužb in število izsečkov brez poganjkov iz izsečkov stranskih brstov pri drugem bonitiranju

DH linija	Število poganjkov					
	subkultiviranih na gojišču		okuženih na gojišču		propadlih na gojišču	
	G4	G5	G4	G5	G4	G5
L01	10	7	0	4	6	3
L05	17	13	0	0	1	3
L10	13	10	0	9	3	0
L11	19	14	4	0	0	6
L16	15	14	0	2	1	2
L18	9	14	3	2	7	0
L20	17	17	0	0	2	0
L32	13	12	0	1	1	3
L35	13	14	0	0	3	0
L37	18	17	2	0	0	4
L40	10	14	8	2	1	2
L42	9	6	0	1	2	1
L45	5	8	2	0	1	3
L46	21	16	0	7	5	4
L48	13	12	2	3	3	5
L51	20	19	4	2	0	1
L54	8	8	4	0	2	5
L84	12	18	8	3	0	1
Σ	242	233	37	36	38	43

Pri drugem bonitiranju, smo iz gojišča G2 dobili naslednje rezultate: 242 oz. 76,3 % poganjkov smo drugič subkultivirali na G4, 233 oz. 74,7 % poganjkov smo drugič subkultivirali na G5. Na gojišču G4 je bilo okuženih 37 oz. 11,7 % poganjkov in propadlo jih je 38 oz. 12 %. Na gojišču G5 je bilo okuženih 36 oz. 11,5 % poganjkov, propadlo pa jih je 43 oz. 13,8 %. Največ novih poganjkov smo dobili pri DH liniji L46, in sicer 37 poganjkov, najmanj novih poganjkov smo dobili iz DH linije L45, in sicer 13 novih poganjkov. Brez okužb so bile linije L20 in L35 (preglednica 21).

Tretje bonitiranje smo opravili 25-27 dni po drugem bonitiranju.

Pri drugem bonitiranju smo opazili, da je pri veliki večini poganjkov nastopila vitrifikacija. Vse vitrificirane poganjke smo pustili do tretjega bonitiranja, če bi se stanje izboljšalo.

Preglednica 22: Število ukoreninjenih in propadlih poganjkov navadne rukvice na gojiščih G4 in G5 v pri tretjem bonitiranju

DH linija	Število poganjkov			
	ukoreninjenih na gojišču		propadlih na gojišču	
	G4	G5	G4	G5
L01	3	0	7	7
L05	1	3	16	10
L10	0	0	13	10
L11	2	0	17	14
L16	0	0	15	14
L18	0	2	9	12
L20	0	1	17	16
L32	0	1	13	11
L35	0	0	13	14
L37	1	0	17	17
L40	0	0	10	14
L42	0	0	9	6
L45	0	0	5	8
L46	1	0	20	16
L48	1	1	12	11
L51	1	1	19	18
L53	0	2	8	6
L84	1	1	11	17
Σ	11	12	231	221

Pri tretjem bonitiranju, smo dobili naslednje rezultate: na gojišču G4 se je ukoreninilo 11 poganjkov, 231 jih je propadlo in ni naredilo korenin. Na gojišču G5 se je ukoreninilo 12 poganjkov, 221 jih je propadlo in ni naredilo korenin. Vse poganjke iz gojišča G4 in G5 (23 poganjkov), ki so se ukoreninili smo dali na aklimatizacijo v mini rastlinjak, napolnjen z šotnim substratom. Vsi poganjki, ki so propadli, so propadli zaradi močne vitifikacije. Največ ukoreninjenih poganjkov je nastalo iz DH linije L05, in sicer 4; brez ukoreninjenih poganjkov pa so bile linije L10, L16, L35, L40, L42 in L45 (preglednica 22).

Iz gojišča G2 smo na gojišče G4 prvič subkultivirali 317 poganjkov, na gojišče G5 pa 312 poganjkov. Od 317 poganjkov iz gojišča G4 smo jih na alimatizacijo dali 11 (3,4%), od 312 poganjkov iz gojišča G5 pa 12 (3,8%). Od skupno 629 poganjkov smo jih dali na aklimatizacijo 23 (3,7%).

4.2.2 Inokulacija izsečkov iz stranskih brstov na gojišče G3

Na gojišče G3 smo inokulirali 288 izsečkov iz stranskih brstov, po 16 izsečkov od vsake dihaploidne linije.

Preglednica 23: Število subkultiviranih izsečkov navadne rukvice iz gojišča G3 na gojišči G4 in G5, število okuženih in število izsečkov brez poganjkov pri prvem bonitiranju.

DH linija	Število poganjkov subkultiviranih na gojišče		Število izsečkov	
	G4	G5	okuženih	brez poganjkov
L01	19	20	4	0
L05	24	26	0	0
L10	18	19	5	0
L11	28	31	0	0
L16	22	24	0	1
L18	24	23	0	0
L20	30	31	0	0
L32	20	17	4	0
L35	28	33	0	0
L37	24	25	3	0
L40	23	22	0	2
L42	18	20	6	0
L45	26	26	0	0
L46	14	16	4	1
L48	20	18	2	2
L51	22	20	3	0
L54	16	18	6	0
L84	12	14	7	1
Σ	388	403	44	7

Pri prvem bonitiranju (22-26 dni po inokulaciji) se je iz 288 inokuliranih izsečkov stranskih brstov regeneriralo 237 izsečkov, iz njih smo dobili 791 poganjkov oz. 82,3 % izsečkov je naredilo poganjke; 388 poganjkov smo subkultivirali na gojišče G4, 403 poganjke pa smo subkultivirali na gojišče G5. 44 oz. 15,3 % izsečkov je bilo okuženih, 7 oz. 2,4 % izsečkov pa ni naredilo novih poganjkov. Največ novih poganjkov smo dobili pri DH linijah L20 in L35, in sicer pri obeh linijah po 61 poganjkov, najmanj novih poganjkov smo dobili iz DH linije L84, in sicer 26 novih poganjkov. Brez okužb so bile linije L5, L11, L16, L18, L20, L35, L40, L45 (preglednica 23).

Drugo bonitiranje smo opravili 30-36 dni po prvem bonitiranju.

Preglednica 24: Število subkultiviranih poganjkov navadne rukvice na gojišči G4 in G5, število okuženih in število izsečkov brez poganjkov iz izsečkov stranskih brstov pri drugem bonitiranju

DH linija	Število poganjkov					
	subkultiviranih na gojišču		okuženih na gojišču		propadlih na gojišču	
	G4	G5	G4	G5	G4	G5
L1	17	11	0	6	2	3
L10	16	15	0	0	2	4
L11	24	18	4	8	0	5
L16	18	21	4	3	0	0
L18	24	20	0	2	0	1
L20	25	27	0	4	5	0
L32	11	12	2	0	7	5
L35	17	31	5	2	6	0
L37	22	24	1	0	1	1
L40	15	18	3	2	5	2
L42	13	14	2	0	3	6
L45	23	23	3	1	0	2
L46	12	14	1	0	1	2
L48	16	14	3	4	1	0
L5	20	23	0	2	4	1
L51	11	13	8	0	3	7
L54	11	14	2	0	3	4
L84	5	14	4	0	3	0
Σ	300	326	42	34	46	43

Pri drugem bonitiranju, ki smo ga izvedli 30-36 dni po prvem bonitiranju, smo na gojišču G3 dobili: 300 oz. 77,3 % poganjkov, ki smo jih drugič subkultivirali na gojišče G4, 326 oz. 80,9 % poganjkov smo drugič subkultivirali na gojišče G5. Na gojišču G4 je bilo okuženih 42 oz. 10,8 % poganjkov, 46 oz. 11,9 % jih je propadlo. Na gojišču G5 je bilo okuženih 34 oz. 8,4 % poganjkov, propadlo pa jih je 43 oz. 10,7 %. Največ 52 novih poganjkov smo dobili pri DH liniji L20, najmanj 19 novih poganjkov smo dobili iz DH linije L84. Brez okužb je bila linija L10 (preglednica 24).

Pri drugem bonitiranju smo opazili, da je pri veliki večini poganjkov nastopila vitifikacija. Vse vitificirane poganjke smo pustili do tretjega bonitiranja, če bi se stanje izboljšalo.

Tretje bonitiranje smo opravili 25-27 dni po drugem bonitiranju.

Preglednica 25: Število ukoreninjenih in propadlih poganjkov navadne rukvice na gojiščih G4 in G5 pri tretjem bonitiranju

DH linija	Število poganjkov			
	ukoreninjenih na gojišču		propadlih na gojišču	
	G4	G5	G4	G5
L01	1	0	16	11
L05	0	0	20	23
L10	1	0	15	15
L11	1	0	23	18
L16	2	1	16	20
L18	0	0	24	20
L20	1	1	24	26
L32	1	0	10	12
L35	0	2	17	29
L37	2	1	20	23
L40	0	2	15	16
L42	0	0	13	14
L45	4	1	19	22
L46	0	2	12	12
L48	1	0	15	14
L51	0	0	11	13
L54	0	0	11	14
L84	0	0	5	14
Σ	14	10	286	316

Pri tretjem bonitiranju, ki smo ga izvedli 25-27 dni po drugem bonitiranju, smo dobili 14 ukoreninjenih poganjkov na gojišču G4, 286 pa jih je propadlo in ni naredilo korenin. Na gojišču G5 smo dobili 10 ukoreninjenih poganjkov, 316 jih je propadlo in ni naredilo korenin. Vse ukoreninjene poganjke iz gojišča G4 in G5 (24 poganjkov) smo aklimatizirali v mini rastlinjaku, napolnjenim s šotnim substratom. Vsi poganjki, ki so propadli, so propadli zaradi hude vitifikacije. Največ, 5, ukoreninjenih poganjkov smo dobili iz DH linije L45. Brez ukoreninjenih poganjkov pa smo ostali pri linijah L05, L18, L42, L51, L54, L84 (preglednica 25).

Iz gojišča G3 smo na gojišče G4 prvič subkultivirali 388 poganjkov, na gojišče G5 pa 403 poganjke. Od 388 poganjkov iz gojišča G4 smo jih na aklimatizacijo dali 14 (3,6%), od 403 poganjkov iz gojišča G5 pa 10 (2,4%). Od skupno 791 poganjkov smo jih dali na aklimatizacijo 24 (3,0%).

Skupno smo iz gojišč G4 in G5 dali 47 ukoreninjenih rastlin na aklimatizacijo v mini rastlinjak napolnjen s šotnim substratom. Vse rastline so bile zelo močno vitificirane in so po nekaj dneh v šotnem substratu propadle.

4.2.3 Statistična primerjava gojišč G2 in G3

Na gojišču G2 je 80,2 % izsečkov iz stranskih brstov naredilo poganjke, okuženih odgnalih izsečkov je bilo 16 %, brez novonastalih poganjkov je bilo 3,8 % izsečkov - inokulirali smo 288 izsečkov, od teh je 231 izsečkov naredilo 629 poganjkov, okuženih je bilo 46 izsečkov, brez poganjkov pa 11 izsečkov. Na gojišču G3 je 82,3 % izsečkov iz stranskih brstov oblikovalo poganjke, okuženih odgnalih izsečkov je bilo 15,3 %, brez novonastalih poganjkov je bilo 2,4 % izsečkov – inokulirali smo 288 izsečkov, od teh je 237 izsečkov naredilo 791 poganjkov, okuženih je bilo 44 izsečkov, brez poganjkov pa 7 izsečkov. Če povzamemo, na gojišču G1 ni poglalo novih poganjkov 7,35 % inokuliranih izsečkov, na gojišču G2 3,8 % izsečkov in na gojišču G3 2,4 % izsečkov.

Preglednica 26: Analiza variance za število poganjkov navadne rukvice na dveh gojiščih G2 in G3 v štirih ponovitvah

Vir variabilnosti	VKO	SP	SKO	F	P-vrednost
OBRAVNAVANJA					
A: gojišče	182,25	1	182,25	8,1	0,0052
B: linija	319,222	17	18,7778	0,83	0,6505
C: ponovitev	141,833	3	47,2778	2,1	0,1035
OSTANEK	2743,92	122	22,4911		
SKUPAJ	3387,22	143			

Analiza variance za število poganjkov je pokazala, da na število poganjkov statistično značilno vpliva sestava gojišč. S 95 % gotovostjo trdimo, da so med gojišči G2 in G3 statistično značilne razlike. Statistično značilne razlike ni med linijami in med ponovitvami (preglednica 26).

Preglednica 27: Preizkus mnogoterih primerjav za odvisno spremenljivko število poganjkov navadne rukvice na ponovitev pri inokulaciji na različni gojišči G2 in G3

Gojišče	Število izsečkov	Povprečje regenerantov	Homogenost skupin
G2	72	8,73	A
G3	72	10,98	B

Preizkus mnogoterih primerjav za odvisno spremenljivko število poganjkov je pokazal, da je sestava gojišč statistično značilno vplivala na nastanek novih poganjkov. Število poganjkov je bilo statistično značilno večje pri izsečkih, inokuliranih na gojišče G3, kjer smo uporabili hormone 0,5 mg/l BAP in 0,2 mg/l NAA.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V poskus mikropropagacije smo v prvem delu vključili izsečke stranskih poganjkov, listne diske iz mladih listov in cvetne popke iz različnih dihaploidnih linij navadne rukvice. Rastlinski material smo nabirali v rastlinjaku Biotehniške fakultete, z nabiranjem smo začeli decembra 2007. Te diploidne rastline rukvice so bile pridobljene s kulturo mikrospor na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin.

V prvem in drugem delu poskusa smo površinsko razkužen rastlinski material (razkuževanje z 1,66% DIA) inokulirali na gojišče G1, katerega osnovna komponenta je bilo gojišče B5 (Gamborg in sod., 1968), ki smo mu dodali hormone v koncentracijah 0,5 mg/l BAP in 0,1 mg/l IAA. Na gojišče G1 smo inokulirali 272 izsečkov iz stranskih brstov, 30 izsečkov iz listnih diskov in 200 izsečkov iz cvetnih popkov. Na 46 % izsečkov iz stranskih brstov in na 24 % izsečkov iz cvetnih popkov so nastali poganjki, medtem ko na izsečkih iz listnih diskov poganjkov ni bilo.

Prvo bonitiranje in subkultiviranje na gojišče G1 smo opravili po približno 25 dneh od prvega nastavljanja na gojišče pri vseh treh vrstah izsečkov. Opazili smo, da se je pri večini poganjkov pojavila vitifikacija, vendar smo se odločili, da poganjke iz izsečkov stranskih brstov in cvetnih popkov vseeno subkultiviramo, listni diski pa so propadli že do prvega bonitiranja. Drugo bonitiranje smo tudi opravili po približno 25 dneh od prvega bonitiranja in opazili, da so bili poganjki še veliko bolj vitificirani kot pri prvem bonitiranju, zato smo vse zavrgli kljub temu, da so nekateri poganjki naredili korenine, saj bi tako močno vitificirani poganjki verjetno težko preživel aklimatizacijo.

V drug del poskusa smo vključili le izsečke iz stranskih brstov, saj so v prvem delu poskusa dali boljše rezultate in jih inokulirali na gojišče G2 in G3. Zamenjali smo tudi gojišča za koreninjenje. Za osnovno komponento vseh novih gojišč smo uporabili MS (Murashige in Skoog, 1962), temu pa smo dodajali različne kombinacije hormonov, saj smo želeli najti najboljšo kombinacijo za mikropropagacijo. Za izsečke iz stranskih brstov smo se odločili, ker cvetni popki in listni diski v prvem delu poskusa niso dali zelenih rezultatov. Gojišča pa smo zamenjali, ker smo upali na manjšo vitifikacijo in propadanje rastlin.

Želeli smo ugotoviti, katera kombinacija hormonov je boljša za tvorbo poganjkov; ali je boljše gojišče G2 s sintetičnim citokininom (BAP) in naravnim avksinom (IAA) ali gojišče G3 s sintetičnim citokininom (BAP) in sintetičnim avksinom (NAA). Statistično značilno boljše ($p = 0,0052$) je bilo gojišče G3, kjer je v povprečju nastalo 10,98 poganjkov iz stranskih brstov (preglednica 26 in 27).

Izsečke iz stranskih brstov smo inokulirali na gojišči G2 in G3. Osnovnemu MS gojišču smo dodali hormone v naslednjih koncentracijah 0,5 mg/l BAP in 0,1 mg/l IAA in ga imenovali G2, gojišču G3 smo dodali 0,5 mg/l BAP in 0,2 mg/l NAA. Po približno 25 dneh smo vse zdrave izsečke subkultivirali na gojišči za koreninjenje G4 in G5. Določili smo tudi nova gojišča za koreninjenje. Osnova teh dveh gojišč je bilo prav tako gojišče MS, vendar smo pri G4 uporabili hormone 1,0 mg/l KIN in 0,2 mg/l NAA, gojišče G5 je bilo gojišče brez hormonov. Po približno 30 dneh smo drugič bonitirali in neokužene izsečke ponovno subkultivirali v gojišči G4 in G5. Tretjič smo bonitirali po približno 55 dneh in izsečke, ki so naredili korenine, dali na aklimatizacijo v mini rastlinjak, napolnjen s šotnim substratom.

Na gojišče G2 smo inokulirali 288 izsečkov iz stranskih brstov. Nove poganjke je naredilo 80,2 % izsečkov in dobili smo 629 poganjkov, katere smo razdelili po gojiščih za koreninjenje G4 in G5. 317 novih poganjkov smo subkultivirali na gojišče G4, 312 poganjkov pa smo subkultivirali na gojišče G5. Drugič smo na gojišče G4 subkultivirali 76,3 % poganjkov (242 poganjkov), na gojišče G5 pa 74,7 % poganjkov (233 poganjkov). Ob tretjem bonitiranju smo na aklimatizacijo v minirastlinjak iz gojišča G4 dali 3,4 % ukoreninjenih poganjkov (11 poganjkov), iz gojišča G5 pa 3,8 % ukoreninjenih poganjkov (12 poganjkov), kar kaže na to, da prisotnost hormonov v gojišču ni pripomogla k boljšemu koreninjenju poganjkov.

Na gojišče G3 smo inokulirali 288 izsečkov iz stranskih brstov. Nove poganjke je naredilo 82,3 % izsečkov, dobili smo 791 poganjkov, 388 smo jih subkultivirali na gojišče G4 in 403 na gojišče G5. Drugič smo na gojišče G4 subkultivirali 77,3 % poganjkov (300 poganjkov), na gojišče G5 pa 80,9 % poganjkov (326 poganjkov). Ko smo bonitirali tretjič smo na aklimatizacijo v minirastlinjaku iz gojišča G4 dali 3,6 % ukoreninjenih poganjkov (14 poganjkov), iz gojišča G5 pa 2,4 % ukoreninjenih poganjkov (10 poganjkov). Tudi tu prisotnost hormonov v gojišču ni pripomogla k boljšemu koreninjenju poganjkov.

Mogoče poganjkom ni ustrezala temperatura v rastni komori (24 °C) ali fotoperioda (16 ur svetlobe in 8 ur teme) in so zato tako močno vitrificirali.

Velik problem v poskusu mikropropagacije je predstavljala vitrifikacija novonastalih poganjkov, ki je najbrž posledica tudi tega, da so bile rastline rukvice že stare, nekatere med njimi so se že začele sušiti in propadati, ko smo nabirali izhodiščni material za mikrorazmnoževanje. Za uspešno mikropropagacijo je zelo pomembno, da uporabimo mlada in zdrava tkiva rastlin, pomembna je tudi prehranjenost in vodni režim rastlin pri katerih nabiramo material. Najverjetneje bi bil poskus uspešnejši, če bi bile rastline mlajše, saj so pri vseh kombinacijah gojišč nastali novi poganjki in kasneje tudi naredili korenine. Mogoče bi bilo smiselno pozornost usmeriti na sam problem vitrifikacije in reševati konkretno vitrifikacijo, na primer z dodatkom kokosovega ekstrakta, s povečanjem količine agarja, s pogostejšo subkultivacijo na gojišča in z dodajanjem komponent, ki preprečujejo vitrifikacijo (Bohanec, 1992).

5.2 SKLEPI

Po končanem poskusu, kjer smo ugotavljali iz katerih delov rastlin in v katerih gojiščih je mikropropagacija navadne rukvice (*Eruca sativa* Mill.) najbolj uspešna, lahko navedemo naslednje ugotovitve:

- Izsečki iz stranskih brstov so bili v poskusu mikropropagacije veliko boljši kot izsečki iz cvetnih popkov in listnih diskov.
Iz listnih diskov nismo dobili novih poganjkov, pri izsečkih iz cvetnih popkov se je odzvalo 24 % popkov, pri izsečkih iz stranskih brstov pa 46 %.
- Gojišče MS je bolj primerno od gojišča B5 za mikropropagacijo navadne rukvice.
Na gojišču G1 (B5) smo dobili 46 % regenerantov iz stranskih brstov, na gojišču G2 (MS) 80 % in na gojišču G3 (MS) 82 % regenerantov.
- Za indukcijsko gojišče je nekoliko bolj primerno gojišče, ki vsebuje sintetični avksin NAA (G3), kot gojišče, ki vsebuje naravni avksin IAA (G2).
V gojišču G2, kateremu smo dodali 0,1 mg/l IAA in 0,5 mg/l BAP smo iz 288 inokuliranih izsečkov stranskih brstov dobili 629 novih poganjkov; v gojišču G3, kateremu smo dodali 0,2 mg/l NAA in 0,5 mg/l BAP smo iz 288 inokuliranih izsečkov stranskih brstov dobili 791 novih poganjkov.
- Statistično značilno boljše ($p = 0,0052$) je bilo gojišče G3, kjer je v povprečju nastalo 10,98 poganjkov iz stranskih brstov na ponovitev, medtem ko na gojišču G2 8,73 poganjkov iz stranskih brstov na ponovitev.
- Prisotnost hormonov v gojišču za ohranjanje in ukoreninjenje ni pripomoglo k boljšemu ukoreninjenju.
Na gojišču G4, kateremu smo dodali 1,0 mg/l KIN in 0,2 mg/l NAA, se je ukoreninilo 25 od 705 poganjkov, kar predstavlja 3,5 % vseh poganjkov subkultiviranih na G4 iz G2 in G3.
Na gojišču G5, ki je bilo brez hormonov, se je ukoreninilo 22 od 715 poganjkov, kar predstavlja 3,1 % vseh poganjkov subkultiviranih na G5 iz G2 in G3.
- Velik problem tekom poskusa nam je predstavljala vitrifikacija, saj smo v prvem delu poskusa že ob prvem bonitiranju (po 25 dneh) opazili vitrifikacijo na večini poganjkov, ki se je do drugega bonitiranja še stopnjevala. V drugem delu poskusa pa se je pojavila ob drugem bonitiranju, to je približno 55 dni po inokulaciji.

6 POVZETEK

Navadna rukvica (*Eruca sativa* Mill.) je enoletnica, ki se običajno razmnožuje generativno s semeni. Ker se rukvica težko samooprašuje in ker je pomembno, da se ohranijo čiste linije (da ne pride do križanj), bi lahko bila mikropropagacija dober način kako ohranjati čiste linije, ki so pomembne v postopku žlahtnjenja rastlin. S poskusom smo želeli ugotoviti kakšna sestava gojišč je primernejša za *in vitro* gojenje navadne rukvice in iz katerih delov rastline dobimo največ regeneratov.

Rastlinski material smo gojili v rastlinjaku Biotehniške fakultete Oddelka za agronomijo. Poskus mikropropagacije smo izvedli v laboratoriju na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin. Poskus je potekal od decembra 2007 do sredine junija 2008.

Za poskus mikropropagacije smo imeli na voljo 50 dihaploidnih linij navadne rukvice, ki so bile dobljene s kulturo mikrospor. Ves rastlinski material za mikropropagacijo smo pripravili v laboratoriju in v komori za aseptično delo. Inokuliran rastlinski material smo gojili na gojišču v zaprtih posodah v rastni komori pri temperaturi 24 °C in s fotoperiodo 16 ur svetlobe in 8 ur teme. Cilj naše naloge je bil vzgojiti vitalne poganjke, ki bi bili primerni za aklimatizacijo.

V prvi del poskusa smo vključili stranske brste iz 17 dihaploidnih linij, cvetne popke iz 10 dihaploidnih linij in mlade liste iz 3 dihaploidnih linij navadne rukvice. Razkužen rastlinski material z 1,66% DIA smo inokulirali na gojišče B5 (Gamborg in sod., 1968) sestavljeno iz dveh komponent: 3051,98 mg/l makro- in mikroelementov in 112,0 mg/l vitaminov; dodali smo hormone BAP 0,5 mg/l in IAA 0,1 mg/l (G1). Enako gojišče smo uporabili tudi za ohranjanje in koreninjenje. Iz 272 izsečkov iz stranskih brstov smo dobili 239 novih poganjkov in od teh jih je 146 naredilo korenine; iz 200 izsečkov cvetnih popkov smo dobili 67 novih poganjkov od teh jih je 18 koreninilo; iz 30 listnih diskov nismo dobili nobenega novega poganjka. Velik problem so nam predstavljale glivične in bakterijske okužbe in zelo močna vitifikacija, zato smo vse poganjke zavrgli, saj bi tako močno poškodovane poganjke težko rešili.

V drugem delu poskusa smo določili nova gojišča za indukcijo (G2 in G3) in za ohranjanje in koreninjenje (G4 in G5). Osnovna komponenta indukcijskih gojišč in gojišč za ohranjanje in koreninjenje je bilo gojišče MS (Murashige in Skoog, 1962) (4405,2 mg/l). Gojišču G2 smo dodali 0,5 mg/l BAP in 0,1 mg/l IAA; gojišču G3 pa 0,5 mg/l BAP in 0,2 mg/l NAA. Gojišču G4 smo dodali 1,0 mg/l KIN in 0,2 mg/l NAA, gojišču G5 hormonov nismo dodali. Za nadaljevanje poskusa smo se odločili, da bomo uporabljali samo izsečke iz stranskih brstov iz 18 dihaploidnih linij navadne rukvice. V vsako gojišče (G2 in G3) smo inokulirali po 288 izsečkov (po štiri izsečke v en steklen lonček v štirih ponovitvah - od vsake linije po 16 izsečkov v gojišče G2 in po 16 izsečkov v gojišče G3). Na gojišču G3 smo v povprečju dobili 10,98 poganjkov iz stranskih brstov, kar je bilo statistično značilno boljše ($p = 0,0052$) od gojišča G2 z 8,73 poganjki. V gojišču G2 smo dobili 629 novih poganjkov; 317 smo jih subkultivirali na gojišče G4, 312 pa v gojišče G5. Iz gojišča G4

smo na aklimatizacijo v mini rastlinjak dali 11 ukoreninjenih poganjkov, iz gojišča G5 pa 12 ukoreninjenih poganjkov. Na gojišču G3 smo dobili 791 novih poganjkov, od teh smo jih 388 subkultivirali na gojišče G4, 403 poganjke pa na gojišče G5. Iz gojišča G4 smo na aklimatizacijo dali 14 ukoreninjenih poganjkov, iz gojišča G5 pa 10 ukoreninjenih poganjkov.

Tudi v drugem delu poskusa smo ob drugem bonitiranju opazili, da so poganjki vitrificirani, kar se je do naslednjega bonitiranja še stopnjevalo – vsi poganjki, katere smo dali na aklimatizacijo v minirastlinjak, so bili vitrificirani.

7 VIRI

- Bianco V.V. 1995. Rocket, an ancient underutilized vegetable crop and its potential. V: Rocket genetic resources network. Report of the first meeting, 13 – 15 November 1994, Lisbon, Portugal. Padulosi S. (ur.). Rim, International Plant Genetic Resources Institute: 35-57
- Bohanec B. 1992 Tehnike rastlinskih tkivnih kultur. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Center za rastlinsko biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin: 168 str.
- Černe M. 2000. Rukvica ali rukola. Kmetovalec, 68,11: 8-11
- Eruca sativa* Mill. (slike) iz wikipedia, the free encyclopedia
http://en.wikipedia.org/wiki/Eruca_sativa (21.5.2012)
- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50: 151-158
- George E.F.G. 2008. Plant tissue culture procedure – background. V: Plant propagation by tissue culture. Springer: 1-28
<http://www.springerlink.com/content/978-1-4020-50053#section=164347&page=3&locus=80> (25.9.2012)
- Gomez-Campo C. 1995. An introduction to the diversity of rocket (*Eruca* and *Diplotaxis* species) and their natural occurrence within the Mediterranean region. V: Rocket genetic resources network. Report of the first meeting, 13-15 November 1994, Lisbon, Portugal. Padulosi S. (ur.). Rim, International Plant Genetic Resources Institute: 20-21
- Jazbec M., Vrabl S., Juvanc J., Babnik M., Koron D. 1995. Sadni vrt. Ljubljana, Kmečki glas: 373 str.
- Leskovšek L. 2008. Indukcija haploidnih rastlin pri navadni rukvici (*Eruca sativa* Mill.) in tankolistnem dvoredcu (*Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC.). Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana: 66 str.
- Osvald J., Kogoj-Osvald M. 2003. Integrirano pridelovanje zelenjave. Ljubljana, Kmečki glas: 295 str.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. Physiologie Plantarum, 15: 473-497
- Pignone D. 1996. Present status of rocket genetic resources and conservation activities. V: Rocket: a Mediterranean crop of the world. Report of a workshop. 13-14 December, 1996, Legnaro, Italy. Padulosi S. in Pignone D. (ur.). International Plant Genetic Resources Institute: 2-12

Pimpini F., Enzo M. 1997. Present status and prospects for rocket cultivation in the Veneto region. V: Rocket: a Mediterranean crop of the world. Report of a workshop. 13-14 December, 1996, Legnaro, Italy. Padulosi S. in Pignone D. (ur.). International Plant Genetic Resources Institute: 51-66

Plants profile. 2008. Natural Conservation Resources Service, USDA.
<http://plants.usda.gov/> (27.12.2011)

Popularity of *Eruca sativa* over time. 2008. Australian new crops web site.
http://www.newcrops.uq.edu.au/listing/species_pages_E/Eruca_sativa.htm (30.7.2012)

Ugrinović K. 2006. Kvarkadabra - Kaj jemo, ko jemo rukolo?
<http://www.kvarkadabra.net/article.php/rukola> (21.5.2012)

Vodnik V. 2008a. Rastlinski rastni hormoni. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. Skripta:77str.
http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2711/Gradiva_Vodnik_Predavanja_Bolonja/Vodnik_P_Bolonja_AG-UNI-Fiziologija_rastlin-Hormoni-2008-09-1del.pdf (23.8.2012)

Vodnik V. 2008b. Rastlinski rastni hormoni 2.del. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta. Skripta:75str.
http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2711/Gradiva_Vodnik_Predavanja_Bolonja/Vodnik_P_Bolonja_AG-UNI-Fiziologija_rastlin-Hormoni-2008-09-2del.pdf (23.8.2012)

Zhang T., Cao Z. Y., X. Y. Wang. 2005. Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledon and hypocotyl explants of *Eruca sativa* Mill. In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant, 41:655-657, September-October 2005

Žnidarčič D. 2006. Rukvica. Moj mali svet, 38, 5: 36-37

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Marijani Jakše za strokovne nasvete in pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Zahvala gre tudi možu, staršem in vsem, ki so me podpirali in kakorkoli pomagali pri izdelavi diplomske naloge.