

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Lea VUKANOVIĆ

**RAZMNOŽEVANJE POPROVE METE (*Mentha piperita* L.) S STEBELNIMI POTAKNJENCI IN  
MIKROPROPAGACIJO TER KARAKTERIZACIJA  
RAZMNOŽENIH ODBRANK**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Lea VUKANOVIĆ

**RAZMNOŽEVANJE POPROVE METE (*Mentha piperita* L.) S  
STEBELNIMI POTAKNJENCI IN MIKROPROPAGACIJO TER  
KARAKTERIZACIJA RAZMNOŽENIH ODBRANK**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**REPRODUCTION OF PEPPERMINT (*Mentha piperita* L.) USING  
STEM CUTTINGS AND MICROPROPAGATION AND  
CHARACTERIZATION OF THE PROPAGATED PLANTS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek študija biotehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko ter na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin na Oddelku za agronomijo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Dea BARIČEVIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

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

Datum zagovora: 9. 3. 2012

Delo 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.

Lea Vukanović

### KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Dn
DK	UDK 633.8: 582.929.4: 57.086.63: 631.532 (043.2)
KG	poprova meta/ <i>mentha piperita</i> /mikropropagacija/stebelni potaknjenci/parna destilacija/eterično olje/tankoplastna kromatografija
KK	AGRIS F02
AV	VUKANOVIĆ, Lea
SA	BARIČEVIČ, Dea (mentorica)/BOHANEK, Borut (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2012
IN	RAZMNOŽEVANJE POPROVE METE ( <i>Mentha piperita</i> L.) S STEBELNIMI POTAKNJENCI IN MIKROPROPAGACIJO TER KARAKTERIZACIJA RAZMNOŽENIH ODBRANK
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 44 str., 5 pregl., 17 sl., 39 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Z diplomsko nalogo smo želeli ugotoviti ali način razmnoževanja poprove mete vpliva na končne lastnosti rastline. Rastline smo razmnožili na dva načina. Prvi je bil s stebelnimi potaknjenci v rastlinjaku, drugi pa z mikropropagacijo v <i>in vitro</i> razmerah. Rastline smo namnožili do zadostnega števila, nato pa jih v različnih terminih presadili v rastlinjak ter na polje. Rastline pridobljene s stebelnimi potaknjenci smo razdelili na dve skupini in prvo oktobra 2010 presadili na njivo, drugo pa šele maja naslednje leto. Prav tako smo tkvno razmnožene rastline razdelili na dve skupini, z različnimi termini aklimatizacije. Eno skupino smo aklimatizirali pozno jeseni 2010, drugo pa pozimi 2011. Obe skupini smo presadili na njivo pozno spomladsi, istočasno kot drugo skupino stebelnih potaknjencev. Rastline iz vseh štirih skupin smo poleti v prvem letu rasti, pred cvetenjem, poželi, jim izmerili različne morfološke lastnosti ter jih posušili. Izmerjene lastnosti smo statistično obdelali in ugotovili, da so bile le pri štirih od petnajstih lastnostih razlike statistično značilne. Te lastnosti so bile dolžina internodijev, širina glavnega stebla, širina listov ter število poganjkov. Deskriptorski list, po katerem smo delali, sicer priporoča izvajanje meritev šele v drugem letu starosti, kar je verjetno tudi bilo potrebno takšnim rezultatom. Iz posušenih listov smo s parno destilacijo ekstrahirali eterično olje. Poleg tega smo posušene liste zmleli in pripravili izvlečke listov. Pripravljene vzorce smo analizirali s tankoplastno kromatografijo (TLC) in sestavine primerjali s standardi določenimi v Evropski farmakopeji 5.0. Analizo smo naredili z dvema različnima reagentoma (fosfomolibdenski in anisaldehidni reagent). Anisaldehidni reagent se je izkazal za primernejšega, saj so se komponente vzorcev lepše obarvale in je bilo vizualno vrednotenje lažje. Ugotovili smo, da so eterična olja vsebovala vse spojine primerljive s štirimi standardi (mentol, mentil acetat, cineol, timol), medtem ko v ekstraktih listov razen mentola ni bilo nobenih poznanih snovi. Poleg tega je analiza s TLC pokazala, da se vzorci štirih skupin med seboj ne razlikujejo in zavrnila našo hipotezo, da način razmnoževanja vpliva na lastnosti vegetativno razmnoženih rastlin.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

- DN Dn  
DC UDC 633.8: 582.929.4: 57.086.63: 631.532 (043.2)  
CX peppermint/*mentha piperita*/microppropagation/stem cuttings/steam distillation/essential oils/thin layer chromatography  
CC AGRIS F02  
AU VUKANOVIĆ, Lea  
AA BARIČEVIČ, Dea (supervisor)/BOHANEC, Borut (co-supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Study program of biotechnology  
PY 2012  
TI REPRODUCTION OF PEPPERMINT (*Mentha piperita* L.) USING STEM CUTTINGS AND MICROPROPAGATION AND CHARACTERIZATION OF THE PROPAGATED PLANTS  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO X, 44 p., 5 tab., 17 fig., 39 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The aim of our research was to determine whether the mode of reproduction has any influence on morphological and biochemical characteristics of plants. Plants were propagated in two ways; by stem cuttings in a greenhouse or by microp propagation *in vitro*. We propagated plants to a sufficient number, planted them into the greenhouse and then transplanted in the field at different times. Plants propagated using stem cuttings in May 2010 were divided in two groups. The first group was transplanted in the field in October 2010 while the second group was transplanted in May the next year. Microp propagated plants were divided in two groups based on the time of acclimatization. One group was acclimatized in late autumn of 2010 and the other one during the winter of 2011. Plants from both groups were transplanted in the field in late spring 2011, at the same time as the second group of stem cuttings. We harvested plants from all four groups before flowering in the summer. Then we measured several morphological properties of the plants and dried them. Measured characteristics were statistically analysed and the results showed that only four characteristics out of fifteen were statistically distinctive. These four characteristics were the length of internodes, width of the main stem, leaf width and number of shoots per plant. Draft descriptors list, which we used to determine the characteristics, recommends measuring plants in their second year of growth and that was probably one of the reasons why we got such results. We used steam distillation to extract essential oil from dried leaves. Beside that we ground the dried leaves and use them to make leaf extracts. We analyzed the prepared samples with thin layer chromatography (TLC) and compared the ingredients with standards determined in European Pharmacopoeia 5.0. The analysis was carried out with two different reagents (phosphomolybdic and anisaldehyde reagent). The visual evaluation was easier with the use of anisaldehyde reagent because the sample components colored up clearer. We found out that the essential oils had all the ingredients comparable to the four standard solutions (menthol, menthyl acetate, cineole, thymol) while leaf extracts contained only menthol. TLC analysis didn't show any differences between samples from the four groups of plants. Those results rejected our hypothesis about the influence of the mode of plant propagation on plant morphological and biochemical characteristics.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	X
Slovarček	XI
<b>1           UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2           PREGLED OBJAV</b>	<b>2</b>
2.1       POPROVA META ( <i>Mentha piperita L.</i> )	2
<b>2.1.1   Pridelovanje poprove mete</b>	4
<b>2.1.2   Bolezni poprove mete</b>	5
<b>2.1.3   Droga poprove mete</b>	5
2.1.3.1 List poprove mete	5
2.1.3.2 Eterično olje poprove mete	6
<b>2.1.4   Uporaba poprove mete</b>	7
2.2       RASTLINSKE TKIVNE KULTURE IN MIKROPROPAGACIJA	8
<b>2.2.1   Osnove mikropropagacije</b>	8
<b>2.2.2   Sestava gojišča</b>	9
<b>2.2.3   Mikropropagacija poprove mete</b>	10
2.3       PRETOČNA CITOMETRIJA	11
2.4       PARNA DESTILACIJA	12
2.5       TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA	12
<b>2.5.1   Osnove kromatografije</b>	12
<b>2.5.2   Način delovanja TLC</b>	13
2.5.2.1 Nanos vzorcev na nosilec	13
2.5.2.2 Razvijanje kromatografske plošče	14

2.5.2.3	Detekcija in vrednotenje rezultatov	15
<b>2.5.3</b>	<b>Prednosti in slabosti TLC</b>	15
<b>2.5.4</b>	<b>Retencijski faktor</b>	16
<b>2.5.5</b>	<b>Uporaba TLC</b>	16
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE</b>	17
3.1	ZAČETNI MATERIAL	17
3.2	SAJENJE STEBELNIH POTAKNJENCEV	17
3.3	MIKROPROPAGACIJA	18
<b>3.3.1</b>	<b>Priprava gojič</b>	18
<b>3.3.2</b>	<b>Razkuževanje rastlinskega materiala in vzpostavljanje tkivnih kultur</b>	19
<b>3.3.3</b>	<b>Aklimatizacija rastlin</b>	20
3.4	SAJENJE NA POLJE	21
3.5	KARAKTERIZACIJA RAZMNOŽENIH ODBRANK POPROVE METE	23
<b>3.5.1</b>	<b>Pretočna citometrija</b>	23
<b>3.5.2</b>	<b>Morfološke značilnosti</b>	24
<b>3.5.3</b>	<b>Destilacija</b>	25
<b>3.5.4</b>	<b>Tankoplastna kromatografija (TLC)</b>	26
3.5.4.1	Priprava vzorcev in standardov	26
3.5.4.2	Izvedba TLC	26
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	29
4.1	PRIMERJAVA RASTI POPROVE METE NA RAZLIČNIH GOJIČIH	29
4.2	MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI	30
4.3	PRETOČNA CITOMETRIJA	31
4.4	PARNA DESTILACIJA	32
4.5	TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA	32
<b>4.5.1</b>	<b>Popravki evropske farmakopeje</b>	32
<b>4.5.2</b>	<b>Vizualizacija s fosfomolibdenskim reagentom</b>	33
<b>4.5.3</b>	<b>Vizualizacija z anisaldehidnim reagentom</b>	34
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	36
5.1	RAZPRAVA	36
<b>5.1.1</b>	<b>Primerjava gojič za rast poprove mete</b>	36
<b>5.1.2</b>	<b>Statistična analiza morfoloških lastnosti</b>	36
<b>5.1.3</b>	<b>Velikost genoma</b>	37

<b>5.1.4</b>	<b>Primerjava vsebnosti eteričnih olj</b>	37
<b>5.1.5</b>	<b>Tankoplastna kromatografija</b>	38
5.2	<b>SKLEPI</b>	39
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	40
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	42
	<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava gojišč za rast in razmnoževanje poprove mete v <i>in vitro</i> pogojih..	18
Preglednica 2: Shema poskusa .....	21
Preglednica 3: Rezultati meritev različnih morfoloških lastnosti in analiza rezultatov .....	30
Preglednica 4: Velikost genoma (pg) preučevanih rastlin.....	31
Preglednica 5: Volumni (ml) eteričnega olja pridobljenega s parno destilacijo .....	32

## KAZALO SLIK

Slika 1: Križanje vrst mete .....	2
Slika 2: Poprova meta ( <i>Mentha piperita</i> ) (Jackson, 1939).....	3
Slika 3: Potek sajenja stebelnih potaknjencev .....	17
Slika 4: Subkultivacija poganjkov na gojišču 2.....	19
Slika 5: Aklimatizacija poganjkov v mini rastlinjaku .....	20
Slika 6: Aklimatizirane rastline pred presajanjem v lončke .....	20
Slika 7: Rastline presajene v lončke premera 10 cm .....	21
Slika 8: Rastline na laboratorijskem polju.....	22
Slika 9: Pretočni citometer Partec .....	23
Slika 10: Clevenger aparatura za parno destilacijo .....	25
Slika 11: Parametri nanosa vzorcev in razvijanja kromatografske plošče .....	27
Slika 12: Primerjava rasti poganjkov na 4 gojiščih 5 tednov po subkultivaciji .....	29
Slika 13: Rastlina iz skupine 1 .....	30
Slika 14: Rastlina iz skupine 4 .....	31
Slika 15: Vzorec redčen po predpisih Evropske farmakopeje 5.0 (2004) .....	32
Slika 16: TLC plošča z nanesenimi vzorci razvita v fosfomolibdenskem reagentu.....	34
Slika 17: TLC plošča z nanesenimi vzorci razvita v anisaldehidnem reagentu .....	35

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

TLC	Thin layer chromatography - tankoplastna kromatografija
BAP	6-benzilaminopurin
MS	Mešanica makro in mikroelementov gojišča Murashige and Skoog (1962)
B5	Mešanica makro in mikroelementov gojišča Gamborg in sod. (1968)
WPM	Mešanica makro in mikroelementov gojišča Lloyd in McCown (1980) - Woody plant medium
ADC	Automatic developement chamber - avtomatska razvijalna komora
pg	pikogram
PI	propidijev jodid
Ph. Eur.	Evropska farmakopeja, 5. izdaja (2004)

## SLOVARČEK

**Mikropopagacija** je osnovna tehnika razmnoževanja tkivnih kultur, ki omogoča hitro nespolno (vegetativno) razmnoževanje rastlin v *in vitro* razmerah.

**Pretočna citometrija** je metoda za določanje velikosti genoma. Na podlagi intenzitete oddane fluorescenčne svetlobe izračuna vsebnost DNA in nam jo poda v obliki 2C vrednosti.

**Parna destilacija** je metoda za ločevanje hlapnih snovi iz zmesi. Uporabljam jo za pridobivanje eteričnega olja iz rastlinskih delov (rastlinskih drog).

**Tankoplastna kromatografija** je tehnika porazdelitvene kromatografije. Stacionarno fazo predstavlja tanek sloj nosilca, ki je nanesen na trdno podlago (npr. stekleno ploščo). Mobilna faza pa je tekočina, ki se giblje prek stacionarne faze.

## 1 UVOD

Poprova meta je zelo uporabna rastlina v živilski industriji ter cenjeno domače zdravilo. Uporablja se v industriji pijač, bonbonov, žvečilnih gumijev, proizvodnji izdelkov za ustno nego ter v tobačni industriji. V obliki različnih pripravkov blagodejno vpliva na prebavila in živčni sistem. Je zelnata trajnica, ki se razmnožuje le vegetativno s potaknjenci. Ker se vedno iščejo novi načini za pridobivanje čim kvalitetnejših drog (listov) in eteričnih olj poprove mete, so metode za izboljšanje pridelka vedno dobrodošle.

V diplomske nalogi smo žeeli ugotoviti ali način razmnoževanja, s stebelnimi potaknjenci oziroma z mikropagacijo v *in vitro* razmerah, vpliva na končne morfološke lastnosti in vsebnost ter sestavo eteričnih olj. Zanimalo nas je ali lahko že sam način razmnoževanja poprove mete privede do višjega in kvalitetnejšega pridelka, večje mase rastline, večjega razmerje med listi in stebli ter višje vsebnosti in boljše kvalitete eteričnih olj. Poleg tega smo preverjali, če so prisotne razlike med jesenskim in spomladanskim sajenjem rastlin. Rastline smo v ta namen razdelili v štiri skupine. Prvo skupino smo razmnožili s potaknjenci in jo jeseni presadili na polje. Drugo skupino smo prav tako razmnožili s potaknjenci, vendar smo jo šele pozno spomladis presadili na polje. Tretjo in četrto skupino smo razmnožili z mikropagacijo in jih v različnih jesenskih ali zimskih terminih aklimatizirali ter jih istočasno z drugo skupino stebelnih potaknjencev presadili na polje.

Predvidevali smo, da bodo pri rastlinah, presajenih na polje pred zimo in tistimi, ki smo jih presadili spomladis, prisotne razlike v zunanjem izgledu in tudi v vsebnosti in sestavi eteričnih olj. Prav tako smo pričakovali razlike med rastlinami vzgojenimi tradicionalno s stebelnimi potaknjenci in tistimi vzgojenimi v tkivnih kulturah, saj so bili zunanji dejavniki med rastjo rastlin drugačni. Glede na izpostavljenost zunanjim dejavnikom smo pričakovali, da bo sestava eteričnega olja prve skupine različna od ostalih treh.

Rastline smo v prvem letu starosti poželi, jih posušili in iz njih s parno destilacijo ekstrahirali eterično olje. Pridobljeno olje in izvlečke listov smo nato analizirali s tankoplastno kromatografijo. Predpostavili smo, da se bodo vzorci izvlečkov in eteričnih olj pridobljenih iz listov različnih skupin, kot tudi vzorci izvlečkov in eteričnih olj znotraj skupine razlikovali.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 POPROVA META (*Mentha piperita* L.)

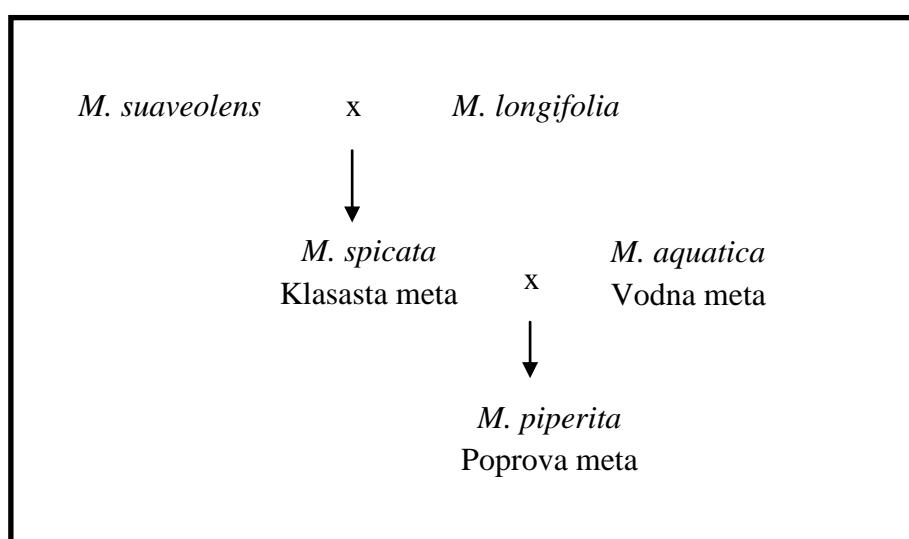
Red: **ustnatičevci** (Lamiales)

Družina: **ustnatice** (Lamiaceae)

Rod: **meta** (*Mentha*)

Vrsta: **poprova meta** (*Mentha piperita*)

Po Evropski farmakopeji (European Pharmacopoeia, 2004), sta glavni učinkovini poprove mete eterično olje (*Mentha piperita aethroleum*), ter njeni listi (*Mentha piperita folium*).



Slika 1: Križanje vrst mete

Izvor poprove mete je neznan. Samonikle v naravi ni (Rode, 2001). Razmnožuje se le vegetativno. Vzrok sterilnosti je večkratna hibridna narava *M. piperita* (Slika 1). Le-ta je 4 - kratni hibrid, nastal s spontanim, naravnim križanjem različnih vrst rodu *Mentha*: *Mentha rotundifolia* (*M. suaveolens*) x *M. silvestris* (*M. longifolia*) = *M. viridis* (*M. spicata*); *M. viridis* (klasasta meta) x *M. aquatica* (vodna meta) = *Mentha piperita* L. (Baričevič, 1996a).

Poprova meta je večletna rastlina iz družine ustnatic (Lamiaceae), ki v višino zraste od 40 do 100 cm. Steblo je štirirobo, zeleno, pri vrhu rahlo rdečkasto nadahnjeno. Razvejanost se prične takoj pri zemlji. Korenina se močno razraste s številnimi živicami, ki se razvijejo 5 cm pod zemljo in na površini zemljишča. Površinske živice razvijejo v kolencih nov koreninski sistem in tako omogočajo hitro razmnoževanje in širjenje vrste (Wagner, 1980). Listi so dolgi od 4 do 8 cm in široki do 2,5 cm, nasprotni in pecljati. Njihova oblika se razlikuje od sorte do sorte (od suličastih do jajčastih), vsi so ob robu nazobčani ter goli ali porasli z dlačicami (Rode, 2001). Drobni rdečkasto beli ali temno vijoličasti cvetovi so

zbrani v navideznih vretencih in tvorijo podolgovato, klasu podobno socvetje (Slika 2). Cveti od junija do avgusta. Semena ne tvori (Kromar, 1992).



PLATE VII.—*Mentha piperita*. The source of *Oleum Menthae Piperitae* (peppermint oil). (From Jackson: *Experimental Pharmacology and Materia Medica*.)

Slika 2: Poprova meta (*Mentha piperita*) (Jackson, 1939)

Glede na habitus, barvo listov, odpornosti na bolezni in mraz, vsebnost in sestavo eteričnega olja, se ločita in sta v nasadih razširjeni 2 obliki poprove mete (Baričevič, 1996a). Morfološko in taksonomsko je osnova vseh sort vrsta *Mentha piperita* L. var. *officinalis*, ki jo delimo na dve osnovni oblici (Wagner, 1980):

- temno zelena (var. *piperita* f. *rubescens*) z rahlo rdečkasto nadahnjenimi žilami in jajčastimi listi. Pri njej prevladujejo lastnosti vrste *Mentha aquatica*. Sorte: 'Mitcham' (Anglija), 'Multimentha' (Nemčija), 'Bolgarska 36A', 'Krasnodarska' in 'Priluskaja I' (Rusija);
- svetlo zelena (var. *piperita* f. *pallescens*) z zelenim stebлом in z nekoliko večjimi suličastimi listi. V njej prevladujejo lastnosti *Mentha viridis*. Sorte: 'Ukrajinska nr. 541' (Ukrajina), 'Priluskaja II' in 'Priluskaja nr. 6' (Rusija), 'Wirtenburška' (Nemčija).

### **2.1.1 Pridelovanje poprove mete**

Pridelovanje poprove mete se je pričelo okoli l. 1805 v Angliji. Trenutno je pridelovanje te zdravilne rastline močno razvito v ZDA in Aziji. V Evropi je največ pridelujejo v vzhodnih državah (Rusiji, Bolgariji), v Italiji je pridelava razširjena predvsem v Piemontu (skoraj na 400 ha). Pridelujo jo tudi v Angliji, Nemčiji, Franciji in Španiji. Ocenjujejo, da se prideluje v svetu na površini 200 000 ha (Baričevič, 1996a).

V svetu se še vedno pretežno prideluje angleška sorta 'Micham', čeprav se pojavljajo nove sorte, ki izvirajo iz omenjenih oblik. V seznam domačih in udomačenih tujih sort kmetijskih rastlin so bili v času bivše Jugoslavije vpisani 'BPK-7960', 'BPP-7965', 'Multimentha' in 'Yugo-Mitcham' (Adamović, 2000).

Poprova meta dobro uspeva tako na vlažnih in topih sredozemskih območjih kot v zmernem podnebju. Na nizke temperature ni močno občutljiva. Zahteva dosti vlage, zlasti v času cvetenja in suho vreme v času košnje. Primerna so humusna, struktorna in rodovitna tla – černozem, aluvialni nanosi in črnice z uravnanim zračno-vodnim režimom (Baričevič, 1996a). V hladnih krajih, na večjih nadmorskih višinah (nad 700 m) in krajih, ki so izpostavljeni vetru, ne daje zadovoljivih rezultatov (Wagner, 1980).

V literaturi se pojavljajo različni podatki o trajnosti te rastline. Opisujejo jo kot enoletnico (Wagner, 1980), dvo, tri ali redkeje štiriletno poljščino (Baričevič, 1996a) ter celo kot trajnico (Rode, 2001). Rode (2001) je poleg tega zapisal, da je meta izključno gojena rastlina, ki se razmnožuje s stranskimi nad in podzemnimi poganjki. Hitro se širi, zato jo je treba nadzorovati. Razmnoževanje poteka s potaknjenci ali z živicami. Te dobimo, če poganjke, ki smo jih izkopali in očistili, narežemo tako, da ima vsaka živica tri očesca. Posadimo jih spomladi ali jeseni v globino 5 do 10 cm. Živice lahko jeseni posadimo tudi v lončke in jih uporabljamo čez zimo.

V kolobarju jo lahko uvrstimo na isto mesto po 6-8 letih. Zahteva globoko jesensko obdelavo. Hkrati za osnovno obdelavo gnojimo z uležanim hlevskim gnojem in z mineralnimi gnojili (fosfor in kalij). Sadilni material (stolone) pridobivamo iz enoletnega nasada, po navadi jeseni. Iz zemlje jih izorjemo s plugom in jih takoj zatem sadimo na stalno mesto ali pa jih posadimo v zaščiten prostor, kjer čakajo do spomladanskega sajenja.

Pred sajenjem njivo obdelamo in s plugom pripravimo brazde na medvrstni razmik 40-70 cm (globina brazde 10 cm), v katere ročno ali strojno polagamo podzemna stebla na razmik v vrsti 15 cm ter jih pokrijemo z zemljo. Med vegetacijo medvrstni prostor večkrat (2-3 krat) plitvo (10-12 cm) obdelamo in hkrati oplevemo med rastlinami v vrsti. Po potrebi namakamo s po 30 mm vode (Baričevič, 1996a).

Jesensko sajenje ima več prednosti, ker omogoča zgodnejšo žetev in boljši pridelek. Visok pridelek pa je seveda odvisen tudi od pravilne nege. Potrebno je redno okopavanje, pletev, zalivanje, zaščita pred boleznimi in škodljivci (Wagner, 1980).

### 2.1.2 Bolezni poprove mete

Najnevarnejša bolezen v nasadih poprove mete je metina rja *Puccinia menthae* Pers, ki povzroča na listih in listnih pecljih temne pege in lahko povzroči popolno uničenje listja. Napad pospešuje deževno vreme (Baričevič, 1996a). Bolezen se najprej pojavi na spodnjih listih in se nato hitro širi. Nadaljnje širjenje lahko preprečimo z žetvijo (Wagner, 1980). Takoj ko odkrijemo pojav rje, rastline porežemo in nenapadene dele posušimo, ostanke pa uničimo. Nevarnost rje je večja na rastiščih, ki niso prevetrena in se tam rada zadržuje megle (Rode, 2001). Poleg rje pridelavo mete ogrožajo še *Septoria menthae* Saec., ki povzroča listno pegavost in gliva *Erysiphe galeopsidis* DC., ki povzroča pepelasto plesen. Nadzemne dele rastlin napadajo listne uši (Aphidae) in škržati (Cicadinae). Podzemne dele lahko poškodujejo grli hroščev iz družine Scarabaeidae in strune hroščev pokalic (Elateridae) (Baričevič, 1996a).

### 2.1.3 Droga poprove mete

#### 2.1.3.1 List poprove mete

Poprova meta skupaj z ostalimi rastlinami (melisa, žajbelj...) iz družine ustnatic predstavlja največji delež v skupini zdravilnih listovk. Zdravilne listovke so tiste rastline, pri katerih uporabljam v zdravilne namene liste (list=folium, listi=folia). V listih so žleze, kjer se tvori eterično olje, ki ima zaščitno nalogo in privablja žuželke. Liste lahko obiramo neposredno z rastline v nasadu ali pa rastlino požanjemo in potem potrgamo liste. Nikoli ne obiramo ali žanjemo mokrih rastlin. Poleg tega moramo vedeti, kdaj je v določeni rastlini prisotnih največ učinkovin. Poprovo meto nabiramo v zgodnjih jutranjih urah, ker je podnevi količina eteričnega olja v njej manjša zaradi izhlapevanja (Wagner, 1980). Žanjemo jo dvakrat. Prvič konec julija, ko je približno polovica rastlin zacvetela (največja količina zelene mase in eteričnega olja), drugič pa konec avgusta ali v začetku septembra (Baričevič, 1996a).

Če trgamo liste neposredno z rastline, moramo paziti, da ne potrgamo več kot eno tretjino listov, ker rastlina lahko oslabi. Pred sušenjem moramo izločiti vse poškodovane liste, plevel in druge primesi (Wagner, 1980). Za proizvodnjo droge sušimo maso na prostem ali v zračni sušilnici (v tankih slojih, da ne pride do gnitja) pri temperaturi 30-42 °C. Po sušenju strojno ali ročno ločimo liste od stebel (Baričevič, 1996a). Suh listi ob dotiku šumijo, ne smejo pa se zdrobiti. Ohraniti morajo značilno naravno zeleno barvo in vonj, ki pri dobrem skladiščenju ostane eno leto in več. Za skladiščenje izberemo suh in zračen prostor (Wagner, 1980).

Droga mora biti popolnoma suha, čista, brez primesi drugih rastlin, naravne zelene barve in brez temnih rumenih listov. Da dobimo 1 kg suhega listja, je potrebno 5 do 10 kg svežega zelišča mete (razmerje suha : sveža droga je 1:5-10). Pridelek znaša med 2000 do 2500 kg/ha *folium Menthae piperitae* oziroma 3000 do 5000 kg/ha suhega zelišča (*herba*) (Wagner, 1980).

### 2.1.3.2 Eterično olje poprove mete

V rastlinah poleg vrstno nespecifičnih primarnih metabolitov nastajajo tudi vrstno specifični sekundarni metaboliti. Za razliko od primarnih metabolitov, ki so v rastlinskem organizmu neposredno povezani z energetskim metabolizmom in so bistveni za sintezo strukturnih elementov ter za rast in razvoj rastlin (sladkorji, aminokisline, maščobne kisline, nukleinske kisline in njihovi polimeri), sekundarnim pogosto ni mogoče opredeliti fiziološke ali evolucijske funkcije.

V skupino sekundarnih metabolitov poleg eteričnih olj prištevamo še polisaharide, anorganske spojine, organske/sadne kisline in aminokisline, izoprenoide, aromatske spojine, flavonoide, čreslovine, grenčine in alkaloide (Baričevič, 1996b).

Eterična olja so hlapne zmesi različnih biogenih spojin, med katerimi prevladujejo mono- in seskviterpeni in aromatski fenilpropanovi derivati. Eterična olja nastajajo v vseh rastlinskih delih v posebnih celicah in se kopičijo v posebnih votlinicah, ki so lahko (Baričevič, 1996b):

- oljne žleze, kot na primer žlezne dlake ali luske, v njih se izloča eterično olje iz epidermalnih celic navzven in se nabira med celično steno in kutikulo (Lamiaceae, Asteraceae)
- oljne votline, ki so nastale z raztpljanjem parenhimskih celic (Coniferae, Rutaceae)
- šizogeno nastale votlinice, ki nastajajo zaradi medsebojnega razmika tkivnih celic (Apiaceae)
- ekskretorne celice, ki so izolirane od ostalega tkiva s suberinsko plastjo, tako da lahko kopičijo eterično olje (Zingiberaceae).

Eterično olje poprove mete pridobivamo s parno destilacijo posušene rastline. Olje je svetlo rumena tekočina z vonjem po pepermintu (Farrell, 1985). Kvantitativna sestava eteričnega olja je odvisna od zunanjih dejavnikov, kakovost pa od vsebnosti prostega mentola in razmerja med tem in esterificiranim mentolom (Baričevič, 1996b). Olje katerekoli poprove mete vsebuje iste sestavine, glede na geografsko območje rasti se razlikuje le razmerje med njimi (Farrell, 1985). Poleg eteričnih olj poprova mete vsebuje še 6 – 12 % čreslovin ter flavonoide (Baričevič, 1996b).

Odstotek vsebnosti eteričnega olja v posušenih listih poprove mete je v literaturi dokaj uniformen in znaša 0,5 – 4 % (Robbers in Tyler, 2000; Baričevič, 1996b; Wagner, 1980). V Ph. Eur. 5.0 (2004) je zapisano, da mora cela droga (list) vsebovati vsaj 12 ml/kg, rezana pa vsaj 9 ml/kg eteričnega olja.

Čeprav različni avtorji navajajo podobne podatke o vsebnosti eteričnega olja, pa najdemo različne podatke o njegovi sestavi in o deležih posamezne komponente. V eteričnem olju prevladuje mentol, katerega vsebnost se ocenjuje od 40 % (Scavroni in sod., 2005;

Baričevič, 1996b; Croteau in sod., 2005) vse do 70 % (Robbers in Tyler, 2000; Wagner, 1980). Poleg mentola so v eteričnem olju prisotni še esterificiran mentol (do 20 %), menton (15-32 %), mentofuran, izomenton, mentofuran (več kot 5 % mentofurana odločilno poslabša kakovost vonja in okusa), evkaliptol in nekateri drugi monoterpeni (Robbers in Tyler, 2000; Baričevič, 1996b). Scavroni in sod. (2005) so zapisali, da eterično olje vsebuje tudi visok delež (35 %) mentil acetata ter manjši delež (pod 2 %) limonena. Nekateri avtorji omenjajo tudi 1,8-cineol (Farrell, 1985; Mucciarelli in sod., 2007) ter  $\alpha$ - in  $\beta$ - pinen (Farell, 1985; Adam in sod., 2009; Golebiowski in sod., 2008).

#### **2.1.4 Uporaba poprove mete**

Poprova meta je imela visoko uporabno vrednost že v 50ih letih našega štetja, ko je grški farmakolog in botanik Dioscorides zapisal, da zmanjšuje zatekanje tumorjev. Kasneje so različni zdravilci ugotovili, da blagodejno vpliva na želodec in zaustavlja želodčne težave. Poleg tega so za prenehanje glavobolov predlagali mazanje z oljem po čelu in okoli temena (Farrell, 1985).

V fitoterapiji se droga in pripravki na njeni osnovi uporabljam notranje kot (Baričevič, 1996a; Baričevič, 1996b; Prijatelj, 2006):

- spazmolitik (blaži krče gladkih mišic v prebavilih, žolčniku in urinarnem traktu),
- antiseptik (preprečuje razvoj kužnih kali; posebno ob vnetjih na področju želodca in črevesja),
- holagogum (pospešuje nastajanje žolča v jetrih in njegovo izločanje v črevo),
- stomahikum (povečuje izločanje želodčnega soka in peristaltiko želodca, zato se hrana boljše razgradi in hitreje absorbira)
- hiperemizirajoče sredstvo (v pripravkih zoper revmo),
- lokalni anestetik (povzroča neobčutljivost določenega dela telesa brez izgube zavesti) pri zobobolu, vnetju ustne sluznice ali žrela, vnetjih sklepov in bolečinah v mišicah,
- sedativ (zmanjša pretirano razdražljivost centralnega živčnega sistema in s tem pomaga pri nevrozi, razdražljivosti, napetosti in tesnobi),
- karminativ (preprečuje nastajanje oziroma olajša izločanje črevesnih plinov),
- ekspektorans (povečuje izločanje bronhialne sluzi, s tem pa redči gost in lepljiv izloček v pljučih in lajša izkašljevanje),
- dekongestiv (zmanjša naval krvi in otekanje nosne sluznice in s tem lajša dihanje skozi nos in blaži znake prehlada).

Dodajamo jo mnogim čajnim mešanicam za izboljšanje okusa. Poleg zdravilnih namenov jo uporabljam tudi v kozmetiki in prehrambni industriji, v farmacevtski industriji pa jo uporabljam za izdelovanje eteričnega olja in za pripravo različnih pripravkov (Wagner, 1980). Eterično olje poprove mete se uporablja pri izdelavi bonbonov, žvečilnih gumijev, sladoledov, sladic, napitkov, izdelkov za nego zob, za proizvodnjo razkužil, v parfumeriji

ter v tobačni industriji (Baričevič, 1996a; Farrell, 1985). Uporabljamo jo kot sredstvo za izboljšanje vonja in okusa (Baričevič, 1996b).

Ker je poprova meta označena z oznako GRAS (generally recognised as safe) velja za varno živilo (Robbers in Tyler, 2000) in se pogosto uporablja tudi v kulinariki. Dodajamo jo različnim omakam, jagnjetini ter raznim ledenim pihačam (koktejlom), sadnim solatam in sladoledom. Ker je močnega vonja in okusa, jo uporabljamo v manjših količinah. Sveže liste sesekljamo, suhe pa zdrobimo med prsti (Wagner, 1980). V slovenski kuhinji uporabljamo poprovo meto v poticah in drugem pecivu, redkeje pa kot dodatek jedem. Iz nje pripravljamo tople in hladne napitke. Je tudi rastlina za odišavljanje kisa in žganja (Rode, 2001).

Zaradi pokrivenosti, cvetov in arome je primerna kot okrasna rastlina, vendar jo je priporočljivo posaditi na samostojno ograjeno gredico, če ne želimo, da preraste ostala zelišča v vrtu. Je zelo dobra medonosna rastlina (Rode, 2001).

Eterično olje poprove mete je zelo uporabno tudi v aromaterapiji. V obliki inhalacij pomirja vnetja dihalnih poti, olajša dihanje in tudi povečuje zbranost pri delu. Eterično olje zmanjšuje znamenja potovalne bolezni, poleg tega pa je zelo cenjeno za sprostilne masaže. Dodajajo ga vodi za polivanje v savnah ter kopelim in prelivom za spiranje rok in nog (Rode, 2001).

Poprova meta je pomembna tudi kot rastlina v biodinamičnem vrtnarjenju. Kot soseda zelju odvrača kapusovega belina in pripomore k boljšemu pridelku paradižnika, solate in korenja. Poprova meta je slaba soseda kamilicam. Rastlina je odvračalo za mravljje in uši. Metino eterično olje odganja tudi miši in druge glodavce ter molje, gosenice, listne uši in muhe (Rode, 2001).

## 2.2 RASTLINSKE TKIVNE KULTURE IN MIKROPROPAGACIJA

### 2.2.1 Osnove mikropropagacije

Rastlinske tkivne kulture so metode ohranjanja, rasti in razmnoževanja rastlin v *in vitro* razmerah. Obsegajo številne tehnike, ki se uporabljajo v raziskovalne namene in za žlahtnjenje rastlin. Osnovna tehnika tkivnih kultur je mikropropagacija, ki omogoča hitro nespolno (vegetativno) razmnoževanje rastlin v *in vitro* pogojih.

Rastline razmnožujemo z mikropropagacijo, kadar želimo skrajšati čas razmnoževanja in vzgojiti veliko število rastlin na majhnem prostoru, neodvisno od letnega časa, ali kadar je klasično razmnoževanje dolgotrajno in težavno. Omogoča vzgojo genetsko enotnega materiala (klonov) (Ravnikar, 1996).

V postopkih tkivnih kultur razlikujemo dve glavni poti regeneracije brstov: po poti iz apikalnih in aksilarnih meristemov in po poti iz adventivnih meristemov. Ti lahko nastajajo neposredno iz inokuliranega tkiva ali pa nastopa kot vmesna faza kalus. Za začetek mikropropagacije na prvi način, uporabimo dele rastlin z apikalnimi in aksilarnimi brsti. Če smo to uspešno opravili (aseptičnost, hipersenzitivnost), so ob enem vršičku nastali številni novi, kar imenujemo kulturo poganjkov. Poganjke je v tej fazi možno gojiti teoretično neomejeno dolgo z načinom, ki ga imenujemo subkultiviranje poganjkov. V tej fazi se vzorec bodisi ohranja ali razmnožuje. Naslednji stopnji sta koreninjenje in aklimatizacija sadik. V primeru, da želimo doseči brezvirusne sadike, gre iniciacija po zgoraj nakazani poti, to je iz meristemskih vršičkov preko tehnik odstranjevanja virusov do kulture poganjkov. V mikropropagaciji je ta pot gotovo najbolj razširjena, ker je možnost genetskih sprememb majhna, uspeh iniciacije pa velik. Značilnost druge poti pa je, da zahteva diferenciacijo brstov (adventivnih meristemov) iz že drugače diferenciranih tkiv, ostale faze so enake (Bohanec, 1992).

### 2.2.2 Sestava gojišča

Za uspešnost tkivnih kultur je pomembno, da izberemo optimalno gojišče za rast. Večinski delež gojišča predstavlja voda. Ena glavnih sestavin gojišč so anorganske spojine (makro in mikro elementi). Gojišča se razlikujejo v koncentracijah soli, ki jih vsebujejo. Gojiščem dodajamo tudi organske spojine, in sicer vitamine (tiamin, niacin, piridoksin, mioinozitol...), saj so nujno potrebni v različnih metabolnih poteh (metabolizem ogljikovih hidratov, delujejo kot koencimi ter sodelujejo pri sintezi aminokislin). Zelo pomembno vlogo pri tkivnih kulturah imajo dodani ogljikovi hidrati. Največkrat se v gojiščih za mikropropagacijo uporablja saharoza, lahko pa uporabimo tudi glukozo, fruktozo, manitol, sorbitol in druge.

Najpomembnejši dejavnik rasti rastlin v tkivnih kulturah so hormoni. Najosnovnejši skupini sta avksini in citokinini. Poznamo še gibereline, abscizinsko kislino ter etilen. Avksini so skupina rastlinskih hormonov, ki v visokih koncentracijah vplivajo na nastanek adventivnih korenin, v nizkih koncentracijah na nastanek poganjkov, poleg naštetega vplivajo še na celično delitev, nastanek in rast kalusa, zavirajo rast stranskih brstov ter zavirajo rast korenin. V to skupino spadajo indol ocetna kislina (IAA), indol maslena kislina (IBA), 1-naftalen ocetna kislina (NAA), fenil ocetna kislina (PAA), 2,4-diklorofenoksi ocetna kislina (2,4-D), 2,4,5-triklorofenoksi ocetna kislina (2,4,5-T), pikloram, dicamba, paraklorofenoksi ocetna kislina (pCPA) in benzo(b)selenienil ocetna kislina (BSAA). Nizka koncentracija avksinov v gojišču stimulira rast korenin, visoka pa deluje inhibitorno na nastanek novih organov in stimulira razvoj kalusa (Gaspar in sod., 1996).

Citokinini so druga pomembnejša skupina rastlinskih hormonov, ki v visokih koncentracijah vplivajo na nastanek adventivnih poganjkov, inhibirajo nastanek korenin, vplivajo na celično delitev ter na nastanek in rast kalusa, stimulirajo razvoj stranskih

poganjkov, zavirajo izdolževanje poganjkov in inhibirajo staranje listov. V skupino citokinov spadajo zeatin, zeatin ribozid, 2-izopentenil adenin (2iP), izopenteniladenozin (iPA), 6-benzilaminopurin (BAP), kinetin (KIN), tidiazuron (TDZ), N-(2-kloro-4-piridil)-N'-fenil urea (CPPU), 6-(3.hidroksibenzilamino) purin (meta-topolin). Kot avksini pospešujejo delitev celic, a verjetno na drug način. Najbolj znani so kot sodelujoči pri tvorbi kalusa in pospeševalci aksilarnega razraščanja (Gaspar in sod., 1996).

Na koncu gojišču umerimo pH vrednost ter mu dodamo strjevalec. Poznamo več različnih strjevalcev. Najpogosteje uporabljan je agar, ki ga gojišču dodamo od 0,6 do 1%. Poznamo še agarozo, gellan gum, charageenan in druge.

Poleg ustreznega gojišča, so za rast in razvoj zelo pomembni zunanji dejavniki. Potrebna je natančna kontrola intenzitete in trajanja osvetlitve ter temperature. Zunanje dejavnike lahko kontroliramo z gojenjem rastlin v rastnih komorah (Ravnikar, 1996).

### **2.2.3 Mikropropagacija poprove mete**

Mikropropagacijo mete lahko izvedemo po poti iz apikalnih ali aksilarnih meristemov ali iz internodijev in izsečkov petiol po poti iz adventivnih meristemov. Vse našteto so za mikropropagacijo leta 2009 uporabili Sarwar in sod.. Za regeneracijo poganjkov so izbrali  $\frac{1}{2}$  MS z vitaminimi, ki so mu dodali različne koncentracije hormonov (0,5 do 2 mg/l) N6-benzilaminopurina (BAP) ali kinetina (KIN) ali BAP in KIN v kombinaciji z 0,5 ali 1 mg/l naftalenocetne kisline (NAA). Dodali so še 3% (w/v) saharoze in 0,8% agarja. Na vseh gojiščih je meta uspešno rasla, pri čemer so ugotovili, da imajo apikalni meristemi in nodiji več možnosti za regeneracijo kot internodiji in petiole. Najvišjo frekvenco regeneracije poganjkov so opazili na gojišču z dodanim BAP v koncentraciji 1,5 mg/l. S to raziskavo so dokazali, da je možno vzpostaviti organogenezo iz izsečkov iz različnih delov rastline, potrebno je le določiti optimalne koncentracije rastlinskih hormonov.

Pred tem sta že leta 1985 Rech in Pires mikropropagirala 6 vrst mete. Uporabila sta MS gojišče z dodano saharozo v kombinaciji z različnimi koncentracijami hormonov. Izbrala sta 0,5, 1 ali 2 mg/l  $\alpha$ -naftalenocetne kisline (NAA), 2,4-diklorofenoksiacetne kisline (2,4-D), indol-3-octene kisline (IAA), kinetina (KIN) ter 6-benzilaminopurina (BAP). Ugotovila sta, da se pri uporabi BAP pojavi največ poganjkov. Pomembna ugotovitev je bila tudi, da prestavljanje na gojišče za koreninjenje ni potrebno, saj pri dodanem BAP, po določenem času, začnejo korenine rasti same. Spontano koreninjenje (brez dodatka avksinov) se je pojavilo tudi pri Ghanti in sod. leta 2004. Korenine so bile kratke in so se pojavile v majhnem številu, zato so rastline vseeno prestavili na gojišče za koreninjenje. Ugotovili so, da so korenine debelejše, daljše in temnejše obarvane, kadar so v gojišče dodali NAA. Pri dodatku IBA so bile korenine tanke, kratke in svetlejše barve.

V literaturi se pojavljajo tudi druge kombinacije gojišč za mikropropagacijo poprove mete. Wang in sod. so leta 2009 uporabili MS gojišče brez vitaminov, mu dodali B5 vitamine, tidiazuron (TDZ), zeatin (ZT), 10% kokosove vode, 20 g/l saharoze in 0,75% agarja. Za

mikropropagacijo so izbrali internodije poprove mete. Ugotovili so, da je regeneracijski proces na takem gojišču enostaven, zelo učinkovit in ponovljiv.

Faure in sod. (1998) so z uporabo dveh različnih gojišč dokazali, da je možno doseči skoraj 80% regeneracijo poganjkov iz listnih izsečkov poprove mete. Najprej so material 2 tedna gojili na MS gojišču z dodanim manitolom, BAP in IBA, nato pa so kulture poganjkov prenesli na MS gojišče, ki je namesto manitola vseboval saharozo, dodali pa so mu še NAA, BAP in tidiazuron.

### 2.3 PRETOČNA CITOMETRIJA

Pretočna citometrija je hitra in učinkovita metoda za določanje velikosti genoma, ki se pogosto uporablja za določanje ploidnosti rastline.

Pretočni citometer je naprava, ki meri svetlobo, ki fluorescira ali se odbije od delca. Za določanje ploidnosti uporabljamo interfazna jedra pridobljena iz somatskih ali generativnih celic. Svetlobo lahko oddaja visoko tlačna živosrebrova svetilka (HBO lamp) s širokim spektrom ali pa laserska svetilka z ozko valovno dolžino. Jedra obarvamo z DNA specifičnimi fluorokromi, ki po absorbciiji ekscitirane svetlobe oddajajo dolgo valovno fluorescenco. Oddana svetloba gre skozi specifične optične filtre in dikroična zrcala (odbije svetobo krajše valovne dolžine, ki je potrebna za eksitacijo in prepusti oddano/emitirano svetobo daljše valovne dolžine, ki jo opazujemo). Za vsak delec fotocelice detektirajo signal in izmerijo enega ali več parametrov. Pretočni citometer lahko izmeri več kot 1000 jeder na sekundo. Računalnik obdela pridobljene podatke in jih istočasno prikaže na ekranu na linearni ali logaritmični skali (Bohanec, 2003).

C-vrednost označuje količino DNA v nepodvojenem haploidnem genomu rastline. Jedro torej v G<sub>1</sub> fazi celičnega cikla, ko sta prisotni 2 kopiji genoma, vsebuje 2C DNA vrednost (Doležel in Bartoš, 2005).

Pretočni citometer na podlagi intenzitete fluorescenčne svetlobe izračuna vsebnost DNA, zato za določanje velikosti genoma neznani rastlini nujno potrebujemo rastlino s poznano 2C vrednostjo (standard). Vzorca rastlin zmešamo in analiziramo skupaj. Na podlagi znane 2C vrednosti lahko izračunamo iskano velikost genoma (Doležel in Bartoš, 2005).

Velikost genoma pri poprovi meti še ni dobro raziskana. V rodu *Mentha* so izmerjene velikosti le za 5 vrst, te pa se v 2C vrednosti močno razlikujejo (Olszewska in Osiecka, 1984; Voirin, 1999). 2C vrednost po podatkih iz leta 1984 za poprovo meto znaša 0,65 pg (Olszewska in Osiecka), Voirin in sod. pa so leta 1999 izmerili, da je velikost genoma 2,28 pg.

## 2.4 PARNA DESTILACIJA

Destilacija je proces, pri katerem tekočinsko zmes dovedemo do vrenja. Paro, ki pri tem nastaja, odvajamo in kondenziramo. Kondenzirana tekočina se imenuje destilat. Ta vsebuje višjo koncentracijo lažje hlapnih komponent, kot jo ima prvotna raztopina. Po destilaciji v bučki ostane ostanek, ki vsebuje več težje hlapne komponente, kot jo je imela prvotna raztopina. Z destilacijo dosežemo razdelitev tekočinske mešanice v dvoje novih mešanic. Ločevanje je lahko skoraj popolno, če ima zmes tekoče komponente, katerih temperatura vrelišča je močno različna (Ignatowitz, 1996).

Destilacija z vodno paro se uporablja za čiščenje lahko ali težko hlapnih, temperaturno neobstojnih organskih tekočin, ki se z vodo ne mešajo. Takšne snovi so npr. maščobe, eterična olja ali destilati nafte z visokim vreliščem. Za izvedbo destilacije z vodno paro uporabljamo kot pomožno sredstvo pregreto vodno paro, ki jo uvajamo v tekočinsko zmes, tako, da prične vreti. Temperatura vrelišča zmesi se zaradi uvajanja vodne pare močno zniža. Zmes zavre pri nižji temperaturi kot katerakoli posamezna komponenta. Tako lahko z destilacijo z vodno paro očistimo temperaturno občutljive snovi, ne da bi jih izpostavili nevarnosti termičnega razkroja. Mešanica pare, ki se dviga iz mešanice tekočin v destilacijskem kotlu, vsebuje poleg lahko hlapnih komponent tudi vodno paro. V kondenzatorju se zmes hlapov kondenzira in kondenzat vodimo v posebno ločevalno posodo. Tam se loči v destilat in vodo, saj se komponente z vodo ne mešajo (Ignatowitz, 1996).

Pri poprovi meti moramo upoštevati, da premlade ali prestare rastline ne dajejo kakovostnega eteričnega olja. Za destilacijo uporabimo bodisi svežo maso (največ 24 ur po košnji in vsebuje 50 – 60% vode) ali posušeno maso (Baričevič, 1996a).

## 2.5 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA

### 2.5.1 Osnove kromatografije

Večina vzorcev, ki jih danes analiziramo, je v obliki zmesi. Če želimo pravilno določiti količino ali delež posamezne komponente, moramo zato le-te med seboj najprej ločiti in šele nato vsako posebej ovrednotiti. Za ločevanje komponent zmesi se uporablajo različne separacijske tehnike. Najbolj razširjena separacijska tehnika je kromatografija. Prvič se je pojavila ob začetku stoletja, vendar ni imela vpliva na razvoj analizne kemije vse do leta 1950, ko so pričeli uporabljati prve komercialno dostopne plinske kromatografe (Prošek in Pukl, 1991).

Kromatografski sistem, na katerem poteka ločevanje zmesi snovi, je sestavljen iz dveh faz. Prva je stacionarna faza, ki je lahko trdna ali tekoča, druga pa je mobilna faza, ki je tekočina ali plin in se giblje skozi ali preko stacionarne faze. Pri kromatografiji potuje vzorec, ki je raztopljen v mobilni fazi, preko stacionarne faze. Zaradi različnih fizikalnih in kemijskih interakcij med molekulami vzorca, stacionarne in mobilne faze, se posamezne

komponente ločujejo (Prošek in Pukl, 1991). Relativna hitrost potovanja v takem sistemu za določen tip molekul je rezultat porazdelitve med mobilno fazo in dejavniki, ki ta proces upočasnujejo. Najpomembnejši zaviralni faktor je navadno adsorpcija, lahko pa tudi naboj, velikost, afiniteta do določene snovi itd. (Anderluh in sod., 2009).

V osnovi je tehnična izvedba kromatografij vedno tankoplastna ali kolonska. Tankoplastne tehnike so pretežno analitske, kolonske pa se v glavnem uporabljajo v preparativne namene. Danes se nekaterih kromatografij praktično ne uporablja več (npr. papirna kromatografija), druge pa so dosegle izreden razvoj, kar velja zlasti za nekatere oblike tekočinske kromatografije (HPLC, FPLC, afinitetna kromatografija itd.). Te vedno bolj izpopolnjene oblike kromatografij temeljijo na izredno mehansko odpornih nosilcih ali na nosilcih, ki specifično vežejo določene snovi. Na ta način se hitrost in kakovost ločitve bistveno povečata (Anderluh in sod., 2009).

V večini primerov je stacionarna faza narejena tako, da je trdni nosilec pokrit s tanko plastjo težko hlapnega, bolj ali manj polarnega topila. Pri planarni kromatografiji (planar chromatography – PC) je mobilna faza tekoča. Stacionarna faza je nanešena v obliki tanke plasti na poseben nosilec, ki je običajno steklena plošča. Najbolj razširjena oblika planarne kromatografije je tankoplastna kromatografija (thin layer chromatography – TLC) (Prošek in Pukl, 1991).

S papirno in adsorpcijsko kromatografijo ločujemo snovi na osnovi polarnosti. Pri obeh kromatografskih metodah matriks vsebuje vezano vodo, ki predstavlja stacionarno fazo. Ta je pri papirni kromatografiji vezana na celulozo, pri adsorpcijski kromatografiji pa na tanek sloj nekega nosilca. Stacionarna faza se na take delce adsorbira, oziroma zasede njihove intersticielne prostore (v samih delcih), prostore med delci pa vedno napolni mobilna faza. Papirna in tankoplastna kromatografija se pretežno uporablja za ločevanje majhnih molekul (Anderluh in sod., 2009).

### 2.5.2 Način delovanja TLC

Adsorpcijsko kromatografijo lahko izvajamo v tankoplastni ali kolonski tehniki. Tankoplastna adsorpcijska kromatografija (TLC) je porazdelitvena kromatografija v ožjem pomenu besede. Razvila se je zaradi potreb po uspešnejšem ločevanju lipidov, ker papirna kromatografija v ta namen ni zadostovala (Anderluh in sod., 2009).

#### 2.5.2.1 Nanos vzorcev na nosilec

Pri TLC za nosilce uporabimo snovi, ki tvorijo ob nanosu na trdno ravno podlago enakomerne tanke površine. Najpogosteje se uporabljajo silikagel, celit,  $MgO_2$ ,  $Al_2O_3$  ali magnezijev silikat, pa tudi organske substance, kot so celuloza, poliamid ali polietilen. TLC tehnike uporabljamo večinoma le za ločevanje majhnih molekul. Stacionarno fazo pri TLC predstavlja tanek sloj nosilca, debel od 0,25 do 0,5 mm, ki je uniformno nanesen na stekleno ali plastično ploščo (Anderluh in sod., 2009).

Pri kromatogramih, na katerih so vzorci naneseni v črto, se navadno doseže boljša ločljivost posameznih komponent vzorca kot pri kromatogramih, na katerih so vzorci naneseni v točko. Ročno nanašanje v črto z brizgalkami, opremljenimi z dozatorji ter z mikropipetami, se danes pri analiznem delu opušča, ker so napake pri ročnem nanašanju v črto večje kot pri nanašanju v točko. Optimalno nanašanje v črto omogočajo polavtomatski in avtomatski nanašalci (npr. Linomat III, IV, TLC autosampler (Camag)). Z njimi se vzorci nanašajo z razprševanjem. Nanašalci omogočajo nanašanje večjih volumnov (do in celo preko 100 µl) ter nanašanje viskoznih vzorcev. Prednost pri nanašanju z razprševanjem v črto je tudi v tem, da se lahko na ploščo nanesejo različni volumni vzorcev in standardov. Nanesenim vzorcev na plošči se lahko dodajajo določene količine referenčnih standardov ali reagentov, s katerimi se vzorci derivatizirajo direktno »in situ« na TLC plošči pred razvijanjem kromatograma. Razdalje med nanosi morajo biti enake, pri vseh nanosih pa mora biti enaka tudi razdalja do spodnjega roba plošče (Prošek in Pukl, 1991).

#### 2.5.2.2 Razvijanje kromatografske plošče

Ploščo umestimo v kromatografsko razvijalno komoro, v katero smo predhodno nalili mobilno fazo. Parcialni tlak topila mora biti v vsej komori enakomeren, ker le tako omogočimo pravilno potovanje mobilne faze. Razvitje kromatograma je podobno kot pri papirni kromatografiji. Porazdelitev pri TLC poteka med različnimi komponentami mobilne faze, ki je navadno sestavljena iz mešanice bolj ali manj polarnih organskih topil in vode, ter nosilcem z molekularno vezano vodo (Anderluh in sod., 2009).

Ploščo postavimo vertikalno v posodo in topilo začne zaradi kapilarnosti potovati navzgor in z njim potujejo tudi sestavine vzorca. Med razvijanjem mobilna faza s sorbenta lahko odstranjuje molekule preadsorbiranega topila ali zmesi topil, s plasti pa lahko v plinsko fazo, odvisno od parnega tlaka, hlapijo njene posamezne komponente. Med razvijalcem, v katerega je potopljena plast, in fronto, do katere je v določenem trenutku po plasti pripravovala mobilna faza, obstaja gradient. Sestava mobilne faze zato ni enaka sestavi razvijalca (Prošek in Pukl, 1991).

Pri adsorpcijski kromatografiji mora imeti razvijalec primerno afiniteto, tako do sorbenta, kot do preiskovane spojine. Če se molekule topila vežejo na sorbent, je verjetnost, da bo preiskovana spojina našla mesto na sorbentu, manjša. Med potovanjem se molekule topljencev za krajši ali daljši čas vežejo na sorbent ali stacionarno fazo. Hitrost njihovega potovanja je zato manjša od hitrosti mobilne faze (fronte). Ko fronta mobilne faze doseže zgornji rob plošče in je ločevanje končano, je položaj madežev na plošči odvisen od hitrosti potovanja posameznih komponent. Molekule, ki so se dalj časa zadrževale v mobilni fazi, so na plošči bliže fronti, molekule, ki so bile dalj časa vezane na sorbent ali stacionarno fazo, pa so bliže startu. Položaj posameznih ločenih komponent pri TLC označujemo z  $R_f$  vrednostjo (Prošek in Pukl, 1991).

Poleg izbranega sorbenta oz. nosilca stacionarne faze in topila oz. sistema topil za razvijanje, vpliva pri TLC na potovanje spojin še vrsta dejavnikov. Najpomembnejši so: relativna vлага, tip kadi za razvijanje kromatograma, nasičenje kadi s parami topila ali sistema topil za razvijanje, preadsorpcija topila ali zmesi topil na plast sorbenta (kondicioniranje plasti), velikost in homogenost delcev sorbenta, aktivnost plasti, enakomernost nanosa oziroma kvaliteta plasti, prepustnost plasti sorbenta (mikroskopska ureditev), volumen nanesenega vzorca, način nanašanja vzorca, velikost madeža na startu, gradient v plasti, hitrost potovanja mobilne faze, turbulanca mobilne faze v plasti, temperatura, vezalec sorbenta v plasti, predpriprava plasti, smer razvijanja (ascendentno/horizontalno), nečistoče v topilih, pot razvijanja, konvekcija v plinsko fazo in pH (Prošek in Pukl, 1991).

Najpomembnejši dejavnik, ki vpliva na potovanje spojin po TLC, je vлага. Vpliva ne le na aktivnost plasti pri adsorpcijski kromatografiji, ampak ima odločilen vpliv tudi na lastnosti stacionarne faze pri porazdelitveni kromatografiji. Rezultati so najbolj ponovljivi, če se TLC plošče razvijajo pri določeni stalni vlagi. Ta se lahko vzdržuje v sodobnih prekatnih običanjih kadeh (twin-trough, Camag) ter horizontalni kadi (Camag) nad nasičeno raztopino ustrezne soli ali nad zmesjo žveplove kisline in vode. Na rezultat močno vpliva tudi prednasičenje plasti sorbenta z razvijalcem, vodo ali drugim topilom ali zmesjo topil. Plast sorbenta se lahko pred razvijanjem nasiti s parami topil v posebni kadi ali pa v običajni prekatni ali horizontalni kadi (Prošek in Pukl, 1991).

#### 2.5.2.3 Detekcija in vrednotenje rezultatov

Za detekcijo lis v primeru brezbarvnih vzorcev lahko uporabimo različne prijeme. Če ločene snovi absorbirajo UV- ali vidno svetobo, ploščo lahko osvetlimo in snovi detektiramo kot obarvane ali fluorescenčne lise. Snovi, ki z ustreznimi barvnimi reagenti dajo barvno reakcijo, lahko detektiramo tako, da ploščo popršimo z ustreznim reagentom. Večino organskih snovi lahko zasledimo tudi tako, da ploščo popršimo z določeno kemikalijo (npr. s koncentriranim amonijevim sulfatom, z jodovimi parami ali s cerijevim sulfatom v kisli raztopini) in jo segrejemo pri 100 °C, kar povzroči pooglenitev in pojav črnih in rjavih lis na mestih, kjer se nahajajo ločene snovi (Anderluh in sod., 2009).

Količino snovi določimo z merjenjem zmanjšanja intenzitete odbite svetlobe obarvanih lis glede na ozadje s pomočjo posebnih aparatur – denzitometrov. Po končanem ločevanju ostanejo komponente v plasti, kjer se ovrednotijo. Pri GC in LC se kolone uporabljam večkrat, pri PC pa se plast sorbenta uporabi samo enkrat in se plošča po končanem ločevanju zavrže (Prošek in Pukl, 1991).

#### 2.5.3 Prednosti in slabosti TLC

Tankoplastna kromatografija deluje na principu porazdelitve snovi glede na topnost v topilu in je v preteklosti zamenjala papirno kromatografijo. Prednosti pred papirno kromatografijo so kratek čas priprave vzorcev, večja občutljivost in ponovljivost metode.

Ločljivost je pri TLC mnogo boljša, saj so delci stacionarne faze manjši in pogosteješi kot papirna vlakna. Poleg tega je prednost TLC v večji izbiri nosilcev, kar omogoča boljšo ločljivost, lažjo detekcijo in izolacijo substanc iz kromatograma. Prednost so tudi nizki stroški rutinskih analiz, ter možnost analize velikega števila vzorcev. Ker so kromatografske plošče namenjene enkratni uporabi, jih lahko po koncu analize shranimo za kasnejšo identifikacijo in kvantifikacijo (Ismail in Nielsen, 2010).

Prednost TLC pred kolonskimi izvedbami porazdelitvenih kromatografij je predvsem v tem, da je razmerje med nosilcem in topljencem precej večje kot pri ustreznih kolonskih izvedbi. Ker so delci nosilca pri TLC zelo majhni ( $<0,1$  mm), je razmerje površine proti volumnu zelo veliko, to pa omogoča veliko delovno površino glede na količino nosilca. S tako majhnimi delci kolon ne moremo napolniti, ker se kolona zamaši in se pretok mobilne faze močno zmanjša. S pomočjo TLC najpogosteje ločujemo lipide, aminokisline, peptide, alkaloide in nukleotide (Anderluh in sod., 2009).

Slabe strani TLC so predvsem slabša učinkovitost ločevanja kot pri HPLC, težka uporaba klasičnih obratnofaznih nosilcev, težko nadzorovanje pogojev ločevanja (klasična TLC je odprt sistem; vpliv okolice je zelo velik, kar se odraža v relativno slabi ponovljivosti meritev celo na isti plošči), za pravilni potek rutinske TLC je potrebna relativno velika izkušenost analitikov, večja kot pri HPLC, zaradi neodvisnih opravil je popolna avtomatizacija tehnike zapletena (Prošek in Pukl, 1991).

#### **2.5.4 Retencijski faktor**

Pri tankoplastni kromatografiji posamezne komponente okarakteriziramo glede na njihov retencijski faktor ( $R_f$ ). Retencijski faktor je definiran kot razmerje med razdaljo, ki jo prepotuje komponenta (preučevana snov) in razdaljo, ki jo prepotuje topilo (mobilna faza).  $R_f$  vrednost ni vedno konstantna za enako topilo, saj je odvisna od različnih faktorjev, kot so kvaliteta stacionarne faze, vlažnost, dolžina razvijanja plošče in temperatura (Ismail in Nielsen, 2010).  $R_f = a/b$ , kjer je  $a$  razdalja, ki jo je prepotovala določena snov, in  $b$  razdalja, ki jo je prepotovala mobilna faza (Anderluh in sod., 2009).  $R_f$  je lahko manjši ali enak 1.

#### **2.5.5 Uporaba TLC**

TLC uporabljamo za čiščenje zmesi snovi. Uporablja se za klinične raziskave, v forenziki, farmaciji, industriji pridelave hrane in dodatkov ter v kozmetiki (Ismail in Nielsen, 2010). Metoda je zelo pomembna v prehrambeni industriji in laboratorijih za kontrolo kakovosti ter za analizo kmetijskih pridelkov in rastlin (Sherma, 2000).

Z ustreznim povečanjem debeline nosilca in večjimi nanosi vzorcev lahko TLC uporabljamo tudi v preparativne namene. Kljub temu, da je TLC v osnovi oblika porazdelitve kromatografije, pa pri njeni uporabi večkrat prihaja do nespecifične adsorpcije snovi iz vzorca na nosilec (Anderluh in sod., 2009).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 ZAČETNI MATERIAL

Konec maja 2010 smo dobili 100 sadik poprove mete 'Priluskaja I' (vir Terezija Nikolčič). 75 sadik smo uporabili za vegetativno razmnoževanje s stebelnimi potaknjenci, 25 pa za razmnoževanje s pomočjo mikropropagacije v tkivnih kulturah. Ko so rastline dovolj zrastle, smo naredili nove potaknjence oziroma jih, v primeru tkivnih kultur, subkultivirali (v sterilnih pogojih razrezali na posamezne nodije in jih prestavili na novo gojišče).

#### 3.2 SAJENJE STEBELNIH POTAKNJENCEV

Pridobljen material (75 od 100 sadik), smo takoj (konec maja 2010) razrezali na posamezne nodije, spodnji del namazali z avksinsko pasto (0,5% IBA, smukec ter euparen ® fungicid) ter vsak internodij posebej narahlo posadili v stiroporne multiplošče s substratom za potaknjence (slika 3). Rastline smo na začetku enkrat dnevno pršili z vodo, kasneje, ko so se ukoreninile, pa smo jih zalivali dvakrat do trikrat na teden, odvisno od zunanje temperature. Po približno dveh mesecih smo jih presadili v večje posamezne lončke ( $r=10$  cm) in iz vršičkov naredili nove potaknjence. Po dveh mesecih smo tudi novo vzgojene rastline presadili v lončke, kjer so rastle do presajanja na njivo.



Slika 3: Potek sajenja stebelnih potaknjencev

### 3.3 MIKROPROPAGACIJA

#### 3.3.1 Priprava gojišč

Za rast in razmnoževanje rastlin *in vitro* smo preizkusili 4 različna gojišča (Preglednica 1).

Preglednica 1: Sestava gojišč za rast in razmnoževanje poprove mete v *in vitro* pogojih

Gojišče 1	Gojišče 2	Gojišče 3	Gojišče 4
½MS z vitaminimi	MS brez vitaminov	B5 brez vitaminov	WPM z vitaminimi
	B5 vitaminii	B5 vitaminii	
1 mg/l BAP	1 mg/l BAP	1 mg/l BAP	1 mg/l BAP
30 g/l saharoze	30 g/l saharoze	30 g/l saharoze	30 g/l saharoze
8 g/l agarja	8 g/l agarja	8 g/l agarja	8 g/l agarja
pH 5,7	pH 5,7	pH 5,7	pH 5,7

Navodila za pripravo 1 l gojišča so sledeča: najprej natehtamo ustrezno količino anorganskih soli in vitaminov gojišča MS (Murashige in Skoog, 1962), gojišča B5 (Gamborg in sod., 1968), gojišča WPM (Lloyd in McCown, 1980), dodamo 1 mg BAP (6-benzylaminopurin), 30 g saharoze in vse s pomočjo magnetnega mešalnika raztopimo v približno 900 ml bidestilirane vode. Ko se vse sestavine raztopijo pripravljeno raztopino prelijemo v litrsko bučko in dolijemo bidestilirano vodo do oznake za 1 liter. Nato na pH metru izmerimo pH raztopine in ga s pomočjo kislin (HCl) in baz (NaOH) uravnamo na 5,7. Po umerjanju pH raztopino prelijemo v Schott steklenico, ki je primerna za avtoklaviranje pri visoki temperaturi, dodamo 8 g agarja ter avtoklaviramo 20 minut na 121 °C pri 110kPa. Po avtoklaviranju gojišče v brezprašni komori razlijemo v sterilne posode.

Na začetku smo uporabljali sterilne kvadratne petrijevke s 25 prostorčki, kasneje, ko so rastline te petrijevke prerasle, pa smo jih prestavili v sterilne ovalne posode.

Rastline razmnožene na teh štirih gojiščih smo kasneje subkultivirali na gojišče 2, saj se je izkazalo kot najbolj primerno za rast.

### 3.3.2 Razkuževanje rastlinskega materiala in vzpostavljanje tkivnih kultur

Od začetnega materiala smo vzeli 25 rastlin (ostalo smo porabili za vegetativno razmnoževanje s potaknjenci), jih razrezali na nodije in odstranili liste. Vse postopke od tu naprej smo izvajali s sterilnim priborom (pinceta, skalpel, cedilo) v sterilnih pogojih v brezprašni komori.

Nodije smo razkužili z 10 minutnim mešanjem v 1,66% raztopini dikloroizocianurne kisline (DICA), ki smo ji dodali 2-3 kapljice močila Tween 20 za boljšo močljivost. Po razkuževanju smo nodije trikrat sprali s sterilno bidestilirano vodo ter jih inokulirali na gojišča.

Razkužene nodije z apikalnimi in aksilarnimi meristemi smo previdno položili na 4 različna gojišča v kvadratne posodice za gojenje. Rastline smo gojili v rastni komori pri 23 °C in 16 urni fotoperiodi. Ko so bili poganjki dovolj veliki (preveliki za ločen prostor v petrijevki), smo jih prestavili v večje posode z enakim gojiščem. V eno posodo smo dali od 6 do 10 poganjkov, ki prostorsko niso bili ločeni med seboj. Rastline, ki so uspešno rastle v sterilnih pogojih, smo subkultivirali enkrat mesečno (slika 4).



Slika 4: Subkultivacija poganjkov na gojišču 2

### 3.3.3 Aklimatizacija rastlin

Rastline smo prestavljali v mini rastlinjake za aklimatizacijo od septembra 2010 do aprila 2011 (slika 5). Ko so rastline prerastle velikost mini rastlinjakov (slika 6), smo posamezno rastlino presadili v lonček premera 10 cm (slika 7) in jo gojili do maja 2011, ko smo vse rastline presadili na polje.



Slika 5: Aklimatizacija poganjkov v mini rastlinjaku



Slika 6: Aklimatizirane rastline pred presajanjem v lončke



Slika 7: Rastline presajene v lončke premera 10 cm

### 3.4 SAJENJE NA POLJE

Rastline smo presadili na laboratorijsko polje Biotehniške fakultete v dveh terminih. Oktobra 2010 smo presadili polovico rastlin, ki smo jih vzgojili iz stebelnih potaknjencev, maja 2011 pa preostalo polovico rastlin, vzgojenih iz stebelnih potaknjencev in vse rastline, ki smo jih vzgojili s pomočjo mikropropagacije. Glede na tip razmnoževanja rastlin in čas presajanja na polje, smo rastline razdelili v štiri skupine, kar prikazuje preglednica 2. Skupno smo presadili na polje 900 sadik, za vsako skupino nekaj več kot 200 rastlin.

Preglednica 2: Shema poskusa

Skupina	Način razmnoževanja rastlin	Presajanje na polje	Žetev
1	potaknjenci	oktober 2010	julij 2011
2	potaknjenci	maj 2011	julij 2011
3	mikropropagacija aklimatizacija sep 2010 – jan 2011	maj 2011	julij 2011
4	mikroporpagacija aklimatizacija feb – apr 2011	maj 2011	julij 2011

Za presajanje smo pripravili njivo širine 10 metrov in dolžine 20 metrov. Tla smo preorali in odstranili ostanke rastlin. Pripravljeno njivo smo prekrili s črno folijo za sajenje, ki nam omogoča delno omejitev rasti plevelov. Folijo smo na stranicah in ponekod po sredini pritrtili z žebelji. Rastline smo sadili v vrste, ki so bile med seboj oddaljene 20 cm, posamezne rastline v vrsti pa so bile prev tako razmaknjene za 20 cm. Glede na te razdalje smo v folijo izrezali kvadrate s stranico 10 cm. Na razdalji 250 cm smo naredili prehod širok 30 cm (slika 8).



Slika 8: Rastline na laboratorijskem polju

Rastline smo ob pomanjkanju vode zalivali v zgodnjih jutranjih urah in jih enkrat mesečno opleli. Rastline so nato rastle do julija 2011, ko smo izbrane rastline pred cvetenjem poželi, posušili in ovrednotili.

Ko smo rastline poželi in jih ustrezno označili, smo cele (stebla z listi), v sušilniku sušili 2 dni pri  $40^{\circ}\text{C}$ , nato pa smo jih v papirnatih vrečkah shranili za nadaljnje vrednotenje.

### 3.5 KARAKTERIZACIJA RAZMNOŽENIH ODBRANK POPROVE METE

#### 3.5.1 Pretočna citometrija

Pretočno citometrijo smo tekom celotnega poskusa izvedli trikrat. Uporabili smo jo le za preverjanje nenavadne rasti v tkivni kulturi. Za določitev velikosti genoma smo uporabili pretočni citometer Partec (slika 9).



Slika 9: Pretočni citometer Partec

Prvič smo citometrijo uporabili začetek novembra 2010, ko smo želeli ugotoviti, če se zelene, lepo rastoče rastline poprove mete po velikosti genoma razlikujejo od rjavih, zakrnelih rastlin. Rastline so bile gojene na istem gojišču, vendar so bile zelene rastline okužene z neznano bakterijo, zakrnele pa so bile na videz neokužene. Za kontrolo smo uporabili liste vidno okužene mete in jih primerjali s tremi vzorci zakrnele mete. Za velikostni standard smo uporabili navadno deteljo (*Trifolium repens* L.) z znano velikostjo jedrnega genoma, in sicer 2,07 pg/2C.

Ponovno smo uporabili analizo s pretočnim citometrom sredi novembra 2011, ko smo med seboj primerjali vzorce štirih različnih neidentificiranih met, ki najpogosteje rastejo na vrtu, poleg teh pa smo izmerili še vzorec poprove mete gojene v rastlinjaku ter mete iz tkivne kulture.

Ker zgornji rezultati niso bili v skladu z našimi pričakovanji, smo v rastlinjaku naključno izbrali 12 rastlin, jih označili in odvzeli apikalne poganjke. Poganjke smo nato sterilizirali in iz njih vzpostavili tkivne kulture. Konec februarja 2011 (3 mesece kasneje) smo izmerili velikost genoma matičnim rastlinam iz rastlinjaka in poganjkom, ki so zrasli v tkivni kulturi ter primerjali rezultate.

Vzorce za analizo smo pripravili tako, da smo izbrali ustrezen list poprove mete (lahko tudi več manjših listov), mu dodali enako velik košček navadne detelje, ju prelili z LB01 pufrom in sesekljali s svežo britvico. Vzorec smo nato prefiltrirali skozi 30 µm filter in dodali LB01 raztopino do 2 ml. Dodali smo raztopino propidijevega jodida (PI) ter RNAzo do dosežene koncentracije 50 µg/ml obeh. Pripravljene vzorce smo nato analizirali s pretočnim citometrom in kot rezultat dobili histogram vsebnosti jedrne DNA. Za vsako rastlino smo pripravili in izmerili le en vzorec, s programom Flomax pa smo določili izračun velikosti genoma.

Sestavine za pripravo modificiranega LB01 pufra so sledeče: 15 mM Tris, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0,5 mM spermin tetrahidroklorid, 80 mM KCl, 20 mM NaCl, 0,1% (v/v) Triton X-100, umerili pa smo pH na vrednost 9,0.

### 3.5.2 Morfološke značilnosti

V navodilih deskriptorskega lista za poprovo meto je zapisano, da je karakterizacijo rastlin bolje opraviti v drugem letu rasti rastlin, saj se v tem času značilnosti vrste povsem izrazijo. Ker bi to v primeru moje diplomske naloge pomenilo še dodatno leto čakanja, smo lastnosti preučevali v prvem letu po sajenju na polje.

Kot sem zapisala že prej, smo imeli 4 skupine rastlin. Od vsake skupine smo po predpisih deskriptorskega lista naključno izbrali 10 rastlin, ki smo jim izmerili različne lastnosti in jih opisali. Ker je bil osnovni deskriptorski list preobsežen in je vseboval poglavja, ki jih še nismo mogli opisati (na primer dolžina, barva, pogostnost cvetov), smo izbrali za nas najbolj zanimive lastnosti in jih primerjali med sabo. Merili smo višino in širino posamezne rastline, dolžino in širino glavnega steba, pri čemer je bila dolžina glavnega steba enakovredna višini rastline ter število poganjkov. Poleg tega smo za vsako od desetih rastlin v posameznem obravnavanju, izmerili dolžino in širino 10 listov, dolžino 10 internodijev ter dolžino 10 listnih pecljev (petiol). Preučevali smo tudi 4 različne opisne lastnosti, in sicer barvo steba, prisotnost dlačic na steblu, barvo listov ter prisotnost dlačic na listih. Vsaki rastlini smo takoj po žetvi izmerili svežo maso in po sušenju v sušilniku še suho maso.

Rezultate smo na koncu statistično obdelali s statističnim programom R ter grafičnim vmesnikom R Commander (R development core team, 2011). Opisnih lastnosti nismo analizirali, saj se med skupinami in med rastlinami znotraj skupin, niso razlikovale. Za analizo smo pri lastnostih z več meritvami (dolžina in širina listov, dolžina internodijev ter dolžina petiole) uporabili povprečno vrednost za posamezno rastlino. Za vsako od 4ih skupin smo primerjali 10 lastnosti na 10 rastlinah. Najprej smo za posamezno lastnost glede na skupino naredili Levenov test homogenosti varianc. Rezultate, ki so ustrezali predpostavkam, smo analizirali z analizo variance (enosmerna ANOVA) in Tukeyevim HSD testom.

### 3.5.3 Destilacija

Destilacijo smo izvedli po navodilih opisanih v Ph. Eur. 5.0 (2004), ki smo jih rahlo priredili. Najprej smo natehtali 20,0 g posušene rastlinske droge, pri čemer smo odstranili steba in morebitne rjave liste. Liste smo nato pretresli v 500 ml bučko, prelili z 200 ml destilirane vode in umestili v električni grelec. Nato smo pripravili Clevenger destilacijsko aparaturo, jo vpeli v bučko in pritrdili na stojalo (slika 10). S pomočjo gumijastih cevi smo vzpostavili stalni pretok hladne vode čez del aparature imenovan hladilnik. V aparaturom smo po navodilu farmakopeje dolili destilirano vodo ter prižgali grelec.

Od trenutka, ko je po steni pritekla prva kapljica eteričnega olja, smo destilirali še 2 uri pri hitrosti 3-4 ml/min. Po preteku dveh ur smo grelec ugasnili in s tem prekinili vrenje droge. Ko sta se po 15 min aparatura in olje dovolj ohladila, smo ustavili še pretok hladne vode in po 10 min izmerili volumen pridobljenega eteričnega olja. Volumen smo izmerili tako, da smo počasi premaknili trojni ventil in iztočili vodo iz merilnega dela. Po končanem merjenju smo zelo počasi izpuščali vodo, dokler nismo prišli do eteričnega olja. Čisto olje (brez dodatka vode) smo nato natočili v steklene 1,5 ml rjave viale, jih zaprli, ustrezno označili in do nadaljnjega shranili pri 4 °C.



Slika 10: Clevenger aparatura za parno destilacijo

### 3.5.4 Tankoplastna kromatografija (TLC)

#### 3.5.4.1 Priprava vzorcev in standardov

Za analizo s tankoplastno kromatografijo smo uporabili 16 vzorcev eteričnega olja in 16 vzorcev izvlečka zmletih listov poprove mete. Za vsako od štirih rastlin smo naredili 4 ponovitve. Vzorce smo pripravili po navodilih za izvedbo TLC zapisanih v Ph. Eur. (2004), vendar smo morali nekaj korakov prirediti oziroma popolnoma spremeniti, saj je očitno pri zapisu navodil prišlo do napak.

Vzorce eteričnih olj smo pripravili tako, da smo natehtali 0,1 g predhodno pripravljenega eteričnega olja, ki smo ga raztopili v 10 ml toluena. Pripravljeno raztopino smo shranili pri 4 °C.

Za vzorce ekstraktov smo morali najprej zmleti 5 g posušenih listov poprove mete. Za mletje smo uporabili mlinček z vodnim hlajenjem. Ko smo liste zmleli v fin prah, smo odvzeli 0,2 g, temu dodali 2 ml metilen klorida, dobro premešali in centrifugirali 5 min pri 4500 rpm, da so se trdni delci posedli na dno. Supernatant smo prelili v 100 ml bučke, ki smo jih pritrtili na rotavapor (Büchi) in pri 40 °C do suhega izparili vzorce. Ostanek (suha snov na stenah bučke) smo raztopili v 10 ml toluena.

Standarde (vsi Sigma-Aldrich) smo pripravili po navodilih evropske farmakopeje, vendar se tudi tu izbrane koncentracije niso izkazale za najboljše, zato smo poskusili še z nekaterimi drugimi koncentracijami. Prvotno smo pripravili 4 standarde, in sicer 50 mg mentola, 20 µl cineola, 10 mg timola in 10 µl mentila acetata, ki smo jih raztopili v 10 ml toluena. Kasneje smo postopoma višali koncentracijo mentil acetata na 50, 100, 150, 300 µl/10 ml toluena, da bi dobili boljše rezultate. Poleg tega smo po nekaj poskusih timol nadomestili z borneolom v koncentraciji 100 mg / 10 ml toluena.

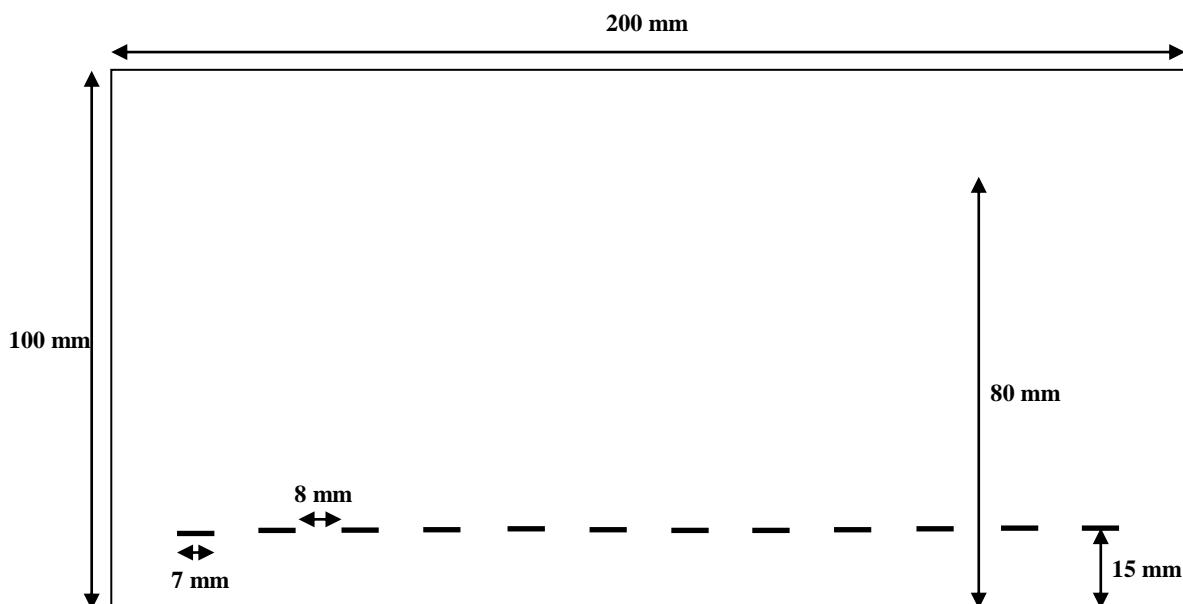
TLC smo ponovili z anisaldehidnim derivatizacijskim reagentom, ki ga priporoča Eu. Ph. Tokrat smo standarde redčili po navodilih Ph. Eur. Torej 50 mg mentola, 20 µl cineola, 10 mg timola in 10 µl mentil acetata.

#### 3.5.4.2 Izvedba TLC

Za izvedbo TLC smo uporabili TLC silica gel F<sub>254</sub> plošče, velikosti 10 x 20 cm, ki smo jih pritrtili na podlogo in s pomočjo Linomata IV (Camag) nanje nanesli vzorce. Linomat je sestavljen iz mikroinjekcije in avtomatskega nanašalca, v katerega vpnemo injekcijo. Preden začnemo z delom, moramo priklopiti zračni kompresor, saj aparatura nanaša vzorce s pomočjo tlaka, ki ga ustvari kompresor. Na aparaturi lahko nastavljamo količino izbrizganega vzorca, oddaljenost le-tega od spodnjega in stranskih robov, širino vzorca, hitrost nanosa vzorca in ostale parametre. Aparatura tudi sama označi že zapolnjena mesta, da slučajno ne bi prišlo do dvojnega nanosa. Pomembno je, da med vsakim nanosom mikroinjekcijo dobro speremo v ustreznem topilu, ki je bil v našem primeru toluen. Po

navodilih evropske farmakopeje je najustreznejši volumen za nanos vzorcev 20 µl in za standarde 10 µl.

Za diplomsko nalogu smo izbrali širino nanosa vzorca 7 mm, prostor med posameznimi vzorci 8 mm, vzorce pa smo nanesli 15 mm od spodnjega roba plošče (slika 11).



Slika 11: Parametri nanosa vzorcev in razvijanja kromatografske plošče

Glede na to, da smo imeli 32 vzorcev za analizo in 4 standardne raztopine, smo želeli pripraviti 4 plošče za vsak reagent. Zaradi težav (opisano v poglavju Rezultati), smo bili primorani pripraviti več plošč. Na vsako izmed štirih plošč smo nanesli 8 vzorcev in 4 standarde. Standardi so bili za vse plošče isti, vzorci pa so se razlikovali. Vzorce smo razdelili na skupine tako, da smo na vsako ploščo nanesli en vzorec vsake skupine, torej za vsako skupino en vzorec eteričnega olja in en vzorec ekstrakta listov. Da bi se izognili morebitnimi napaki zaradi mesta nanosa na plošči, smo na vsako ploščo vzorce nanesli v drugačnem vrstnem redu, tako, da vzorec ni bil dvakrat na istem mestu.

Po končanem nanašanju vzorcev, smo kromatografsko ploščo postavili v ADC (automatic development chamber, Camag) komoro, v katero smo predhodno natočili mobilno fazo etil acetat : toluen (5:95). Plošča je v komori nameščena vertikalno, zato je pomembno, da je del z nanesenimi vzorci na spodnji strani.

V ADC smo vnesli program razvijanja, ki je bil sestavljen iz 5 min priprave (nasičenje komore z mobilno fazo), sledilo mu je približno 25 min razvijanja plošče (čas v katerem mobilna faza doseže določeno fronto, v našem primeru je bilo to 80 mm od spodnjega roba plošče), 2 min sušenja ter na koncu še 30 sec segrevanja.

Ploščo smo nato vzeli iz ADC komore in jo vpeli v napravo za potopitev kromatografske plošče v derivatizacijski reagent (chromatogram immersion device, Camag). Aparatura je sestavljena iz posode za derivatizacijski reagent ter iz premičnega stojala za kromatografsko ploščo. Na aparaturi smo nastavili hitrost spuščanja plošče in čas potopitve plošče v reagent. Počakali smo, da se je odvečni reagent odcedil iz plošče, nato pa smo ploščo 5 min pustili na 100 °C. Visoka temperatura je povzročila aktivacijo reagenta in njegovo obarvanje, kar je pomenilo obarvanje ločenih komponent. Ploščo smo nato kvalitativno vrednotili na vidni svetlobi.

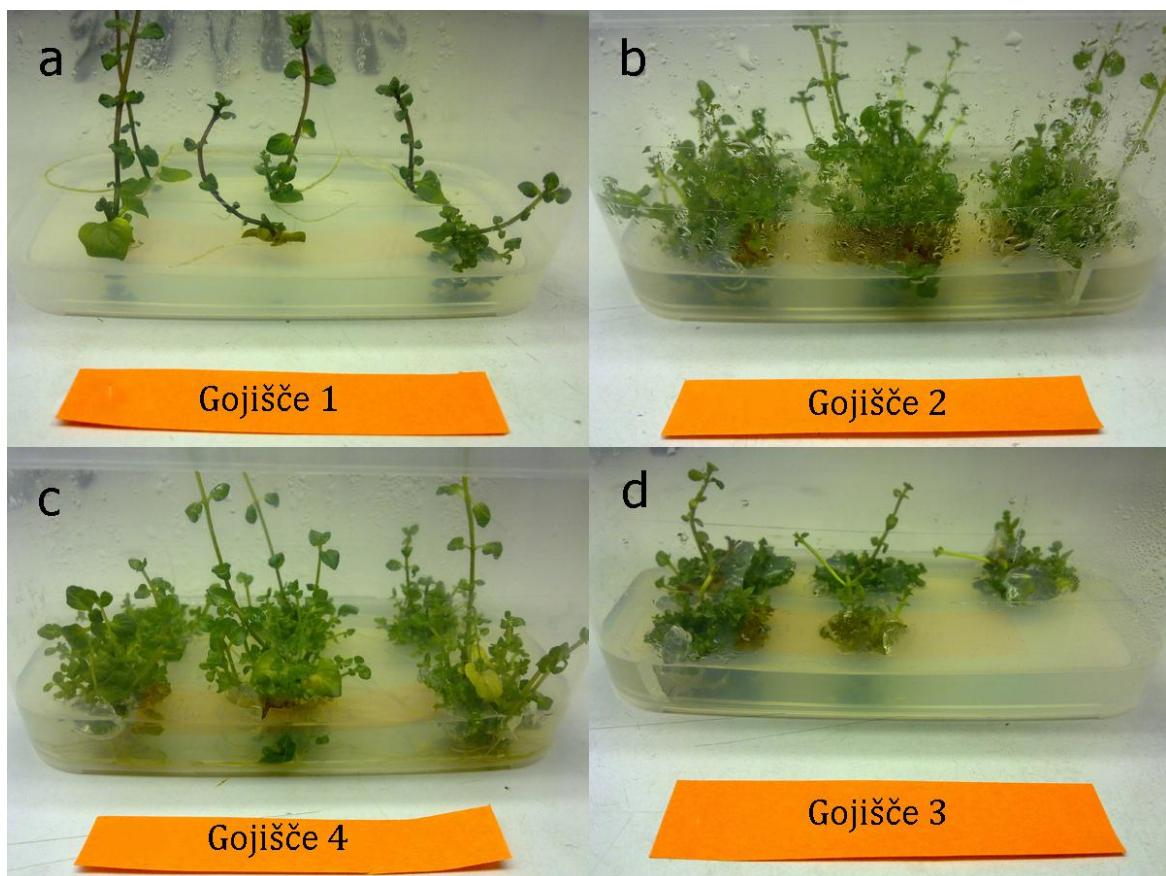
Za izvedbo tankoplastne kromatografije smo uporabili 2 različna derivatizacijska reagenta. Za vsakega smo pripravili 4 kromatografske plošče (2 ponovitvi enakih nanosov vzorcev). Najprej smo uporabili fosfomolibdenski reagent (20% etanolna raztopina fosfomolibdenske kisline), kasneje pa še anisaldehidni reagent (500 µl anisaldehida v 85 ml metanola, 10 ml ledocetne kisline in 5 ml koncentrirane žveplene kisline) (Wagner in Bladt, 1996).

## 4 REZULTATI

### 4.1 PRIMERJAVA RASTI POPROVE METE NA RAZLIČNIH GOJIŠČIH

Za vzpostavitev tkivnih kultur smo uporabili 4 različna gojišča (1/2 MS, MS z B5 vitaminimi, B5 z B5 vitaminimi ter WPM). Na koncu smo vse tkivne kulture gojili na MS gojišču z B5 vitaminimi, saj se je le-ta izkazal za najbolj optimalnega.

Po 5ih tednih od subkultivacije smo primerjali rast in razmnoževanje poganjkov na vseh 4 gojiščih in ugotovili naslednje. Na gojišču 1 so se rastline sušile, imele so slabe, majhne poganjke, ki so jim odpadali listi. Manjše število poganjkov je bilo dolgih in razvejanih z veliko listi (slika 12a). Na gojišču 2 je zrastlo mnogo majhnih poganjkov, ki so bili lepi, zeleni in normalnega videza. Kasneje je iz baze pognalo še več kratkih poganjkov, ki so se lepo razvili (slika 12b). Podobno je bilo tudi na gojišču 4, le da je bilo kratkih novih poganjkov manj (slika 12c). Na gojišču 3 so bili poganjki suhi in slabо razraščeni, imeli so suhe korenine, nekateri so bili tudi zeleni, vendar so rastli slabše kot na gojišču 2 in gojišču 4 (slika 12c).



Slika 12; Primerjava rasti poganjkov na 4 gojiščih 5 tednov po subkultivaciji

## 4.2 MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI

Rezultati meritev in statistična analiza rezultatov so prikazani v preglednici 3. Analiza je pokazala, da so statistično značilno različna povprečja le pri štirih lastnostih, in sicer pri dolžini in širini listov, pri širini glavnega steba ter pri številu poganjkov (slike 13 in 14). Pri ostalih lastnostih ni bilo statistično značilnih razlik pri 5% stopnji tveganja.

Preglednica 3: Rezultati meritev različnih morfoloških lastnosti in analiza rezultatov

	<b>Skupine</b>			
<b>Lastnosti</b>	1	2	3	4
<b>Višina (mm)</b>	$354,90 \pm 122,69$	$318,10 \pm 122,55$	$279,90 \pm 31,54$	$254,50 \pm 54,16$
<b>Širina (mm)</b>	$304,2 \pm 166,89a$	$377,00 \pm 175,63a$	$412,30 \pm 126,71a$	$311,60 \pm 35,77a$
<b>Širina gl. steba (mm)</b>	$3,59 \pm 0,95a$	$2,33 \pm 0,33b$	$2,44 \pm 0,36b$	$2,62 \pm 0,53b$
<b>Dolžina internodijev (mm)</b>	$24,44 \pm 6,22a$	$20,92 \pm 3,63a$	$21,41 \pm 3,46a$	$23,16 \pm 3,85a$
<b>Število poganjkov</b>	$7,50 \pm 9,45a$	$9,30 \pm 6,25a$	$31,00 \pm 15,30b$	$26,10 \pm 5,90b$
<b>Barva steba</b>	vijolično zelena	vijolično zelena	vijolično zelena	vijolično zelena
<b>Dlačice na steblu</b>	da	da	da	da
<b>Barva listov</b>	zeleni z rdečimi žilami			
<b>Dolžina listov (mm)</b>	$38,68 \pm 5,14a$	$27,93 \pm 3,68b$	$31,10 \pm 5,44b$	$33,52 \pm 5,78ab$
<b>Širina listov (mm)</b>	$21,90 \pm 3,14a$	$18,10 \pm 2,48b$	$19,48 \pm 2,45ab$	$20,82 \pm 2,64ab$
<b>Dolžina petiole (mm)</b>	$4,44 \pm 1,45a$	$3,72 \pm 0,99a$	$3,94 \pm 0,83a$	$4,02 \pm 0,76a$
<b>Dlačice na listih</b>	da	da	da	da
<b>Sveža masa (g)</b>	$64,02 \pm 70,37$	$33,53 \pm 17,90$	$75,19 \pm 40,94$	$38,52 \pm 7,88$
<b>Suha masa (g)</b>	$14,03 \pm 15,78$	$7,66 \pm 3,97$	$17,43 \pm 9,67$	$9,07 \pm 1,61$

S črkama a in b so označene vrednosti, ki so bile analizirane z ANOVO. Vrednosti, ki so označene z enako črko, se statistično značilno ne razlikujejo. Vrednosti, ki so označene z različnima črkama, pa imajo statistično značilno različna povprečja pri  $\alpha=0,05$ . Vrednosti, ki nimajo oznak, niso bile analizirane z ANOVO, saj niso ustrezale predpostavki o enakih variancah.



Slika 13: Rastlina iz skupine 1



Slika 14: Rastlina iz skupine 4

#### 4.3 PRETOČNA CITOMETRIJA

Pretočno citometrijo smo za določanje velikosti jedrnega genoma uporabili trikrat tekom diplomskega dela. Prvič smo primerjali lepo rastoče tkivne kulture z zakrnelimi in se je izkazalo, da so si rastline po velikosti genoma enake. Drugič smo primerjali neidentificirane vrste mete s tkivnimi kulturami poprove mete in smo z analizo pridobili zelo različne rezultate, ki jih nismo mogli razložiti, saj nismo poznali točnega izvora rastlin. Pri tem poskusu smo ugotovili, da imajo rastline vzgojene z mikropropagacijo ( $2C=2,88$  pg) skoraj trikrat večji genom kot pa izvorne rastline ( $2C=0,98$  pg) iz katerih smo začeli mikropropagacijo. Na podlagi teh rezultatov smo naredili še tretjo analizo, pri kateri pa nam je zaradi okužb v tkivnih kulturah in v rastlinjaku propadla večina vzorcev. Ostali so nam le trije vzorci (skupni za izvorno rastlino ter mikropropagirane klone), rezultati pa so pokazali, da se je pri dveh vzorcih velikost genoma v tkivni kulturi podvojila, pri enem pa je bila že v osnovi podvojena in je ostala enaka (preglednica 4).

Preglednica 4: Velikost genoma (pg) preučevanih rastlin

Vzorec	Velikost genoma (pg) izvorne rastline	Velikost genoma (pg) mikropropagirane rastline
1	1,637	2,908
2	1,625	2,881
3	2,977	2,792

#### 4.4 PARNA DESTILACIJA

S parno destilacijo na Clevengerjevi aparaturi smo pridobili eterično olje 4 skupin poprove mete. Količine pridobljenega eteričnega olja so se gibale od 0,13 ml vse do 0,85 ml. Povprečni volumen eteričnega olja je bil 0,43 ml pri skupinah 1 in 4, ter 0,67 ml pri skupinah 2 in 3 (preglednica 5).

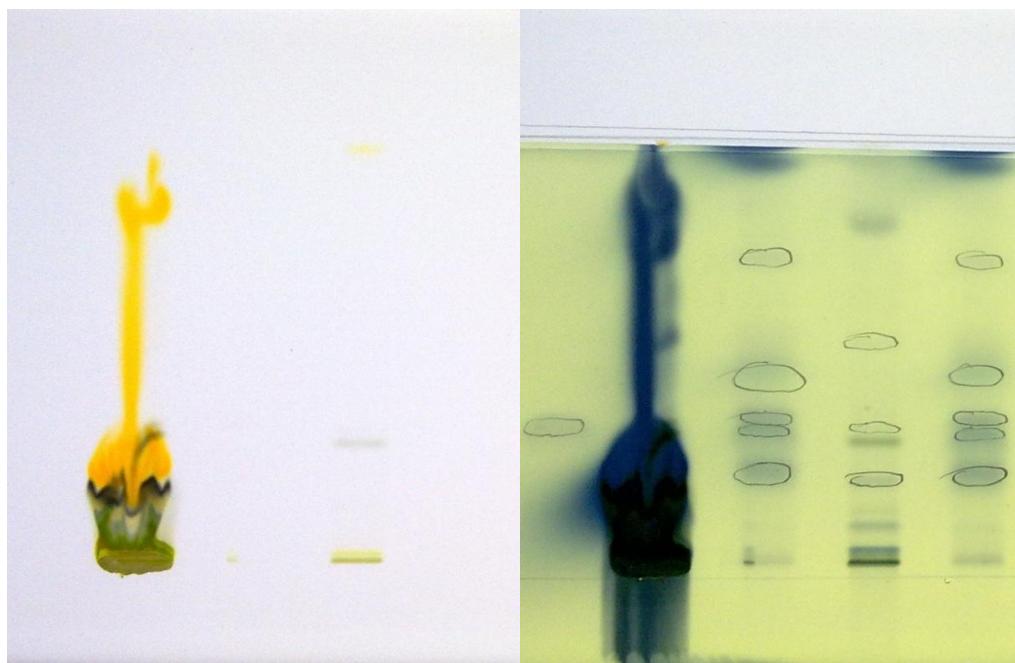
Preglednica 5: Volumni (ml) eteričnega olja pridobljenega s parno destilacijo

	<b>Skupina</b>			
<b>Ponovitev</b>	1	2	3	4
<b>1</b>	0,69	0,85	0,76	0,56
<b>2</b>	0,30	0,75	0,77	0,25
<b>3</b>	0,60	0,23	0,53	0,38
<b>4</b>	0,13	0,84	0,63	0,52
<b>Povprečna vrednost</b>	0,43	0,67	0,67	0,43

#### 4.5 TANKOPLASTNA KROMATOGRAFIJA

##### 4.5.1 Popravki evropske farmakopeje

Vzorce uprašene droge smo namesto filtracije centrifugirali 5 minut pri 4500 rpm, saj smo na ta način pridobili čistejše vzorce z manj usedline. Po evaporaciji smo vzorce raztopili v 10 ml toluena namesto v 0,1 ml, ker je bil drugače vzorec preveč koncentriran in ni prišlo do ustrezne ločbe na kromatografski plošči (slika 15).



Slika 15: Vzorec redčen po predpisih Evropske farmakopeje 5.0 (2004).  
Levo po razvitju v ADC komori, desno poobarjanju s fosfomolibdenskim reagentom

#### 4.5.2 Vizualizacija s fosfomolibdenskim ragentom

Uporabili smo 4 različne standarde (mentol, timol, cineol in mentil acetat) in jih ustreznno redčili po navodilih iz Evropske farmakopeje 5.0 (2004).

Standardi, razen mentil acetata, so bili dobro vidni in ustrezne intenzitete. Na plošči (slika 16) smo videli, da v ekstraktih ni prisotnega cineola, se pa v visoki koncentraciji pojavlja v vzorcih eteričnih olj. Vzorci eteričnih olj vsebujejo tudi veliko mentola, ki pa je pri ekstraktih slabo viden, vendar prisoten. Timol je bil na vseh ploščah dobro viden, vendar ga kljub opisu v evropski farmakopeji, v vzorcih nismo našli.

Ker nekateri standardi, pripravljeni po navodilih evropske farmakopeje, po razvitju plošče niso bili vidni, smo naredili različne razredčitve standardnih raztopin in iskali najprimernejšo. Največ težav smo imeli z mentil acetatom, saj ga pri koncentraciji 10 µl/10 ml toluena sploh ni bilo zaznati. Koncentraciji 50 µl/10 ml in 100 µl/10 ml sta se izkazali za boljši, vendar se lisa še vedno ni obarvala modro, kot navajajo v literaturi (Wagner, Bladt, 1996).

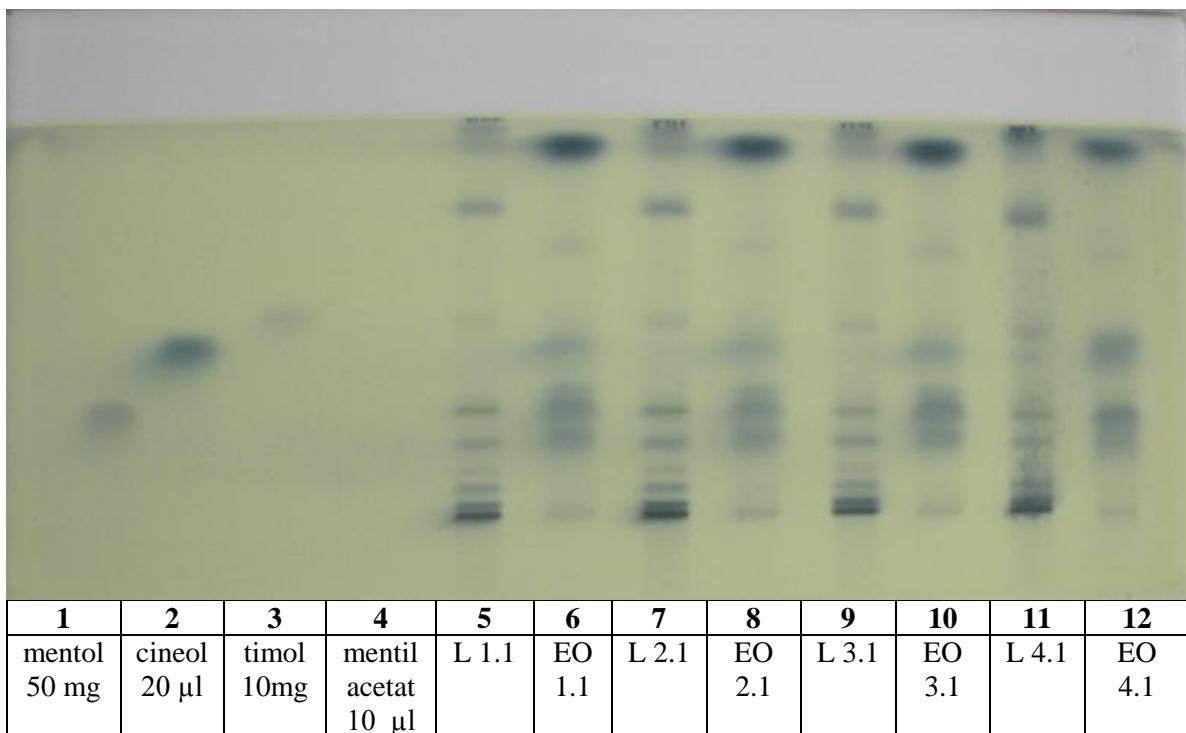
Poleg težav s standardom mentil acetatom, so se težave pojavile tudi pri mentolu. Tako pri standardu kot pri komponenti v vzorcih. Po nekaj opravljenih kromatografijah je začel mentol na ploščah bledeti. Z vsako naslednjo ploščo je bil manj viden. Na koncu ga sploh ni bilo več videti.

Od vseh snovi v izvlečkih je bila najbolj izrazita neznana komponenta, izločena malo pod fronto ( $R_f = 5,2/6,3 = 0,825$ ), ki pa se ni nahajala v vzorcih eteričnih olj.

Vsako razvito ploščo smo vrednotili takoj po segrevanju na 100 °C in rezultate zapisali. Na koncu smo vse plošče med seboj primerjali. Na posameznih ploščah so sicer izstopale določene ponovitve nekega vzorca, vendar v skupnem seštevku razlik med skupinami vzgojenih rastlin ni bilo. V večini primerov je bilo tako, da je ena ponovitev močno izstopala, ostale tri pa so bile povprečne ali podpovprečne.

Med vzorci eteričnih olj in izvlečkov listov pa so bile prisotne razlike. Razen mentola, ki je bil pri izvlečkih prisoten v nizki koncentraciji, niso vzorci imeli nobenih skupnih komponent. Ta rezultat je bil pričakovani, saj listi poleg eteričnih olj vsebujejo še druge sekundarne metabolite, medtem, ko so bili vzorci eteričnih olj brez drugih primesi.

Kratica **L** označuje izvleček zmletih listov posušene poprove mete (*Menthae piperitae folium*). Kratica **EO** označuje eterično olje poprove mete (*Menthae piperitae aethroleum*). Vsi vzorci so bili analizirani v štirih ponovitvah (slika 16).



L – izvleček zmletih listov

EO- eterično olje

Slika 16: TLC plošča z nanesenimi vzorci razvita v fosfomolibdenskem reagentu

#### 4.5.3 Vizualizacija z anisaldehidnim reagentom

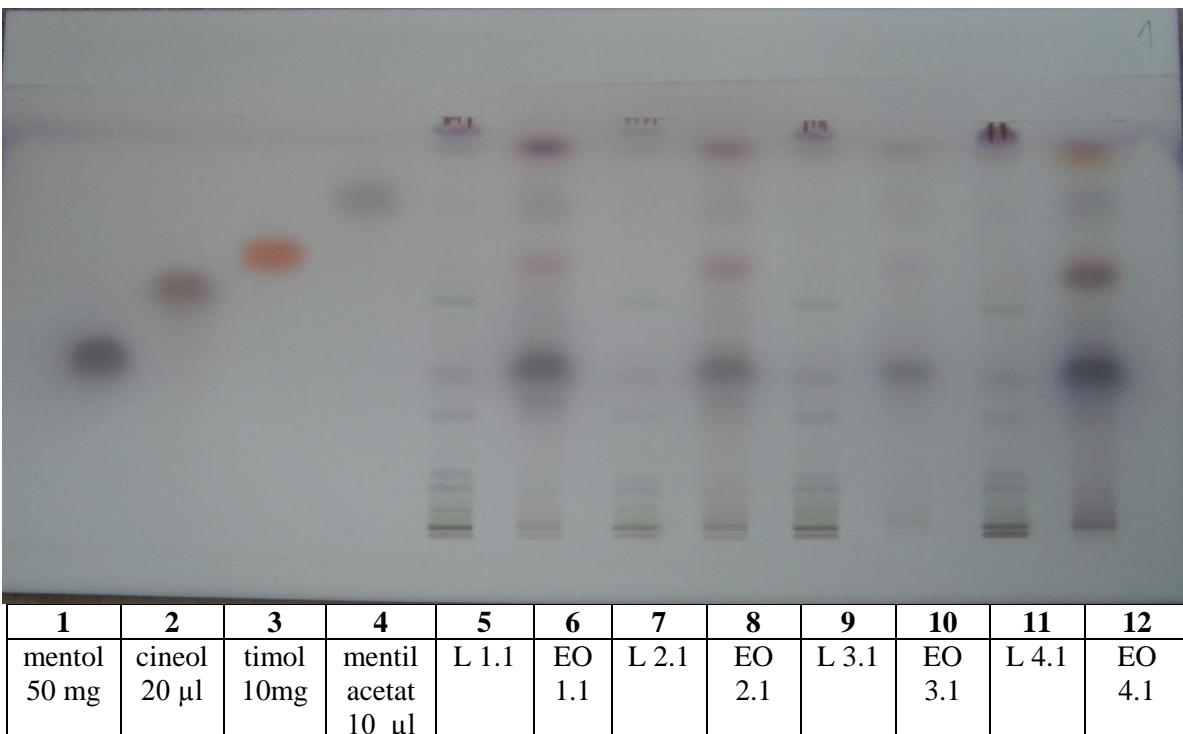
Zaradi nenavadnih rezultatov pri vizualizaciji s fosfomolibdenskim reagentom smo vse plošče z enakimi razporeditvami ponovili še z anisaldehidnim reagentom. Uporaba tega reagenta se je izkazala za primernejšo, saj so bile dobro vidne že predpisane koncentracije standardov (Ph. Eur., 2004). Reagent je komponente obarval z različnimi barvami, zato je bilo tudi vrednotenje lažje (slika 17).

Ugotovili smo, da se v izvlečkih v nizki koncentraciji pojavlja le mentol. Ostale komponente niso bile primerljive z izbranimi standardi. Tudi sicer so bili vzorci izvlečkov listov manj intenzivno obarvani, kar nakazuje na nizke koncentracije snovi v vzorcih.

Nasprotno pa smo ugotovili, da se v eteričnih oljih pojavljajo vse spojine primerljive s standardi. Mentol se je v vzorcih eteričnih olj pojavil v zelo velikih količinah. Nekaj je bilo tudi mentil acetata in verjetno mešanice cineola in timola. Spojini sta si po ločbi in barvi preblizu, da bi lahko točno vedeli, katera od njiju je v eteričnem olju. Poleg naštetih se v eteričnem olju pojavlja tudi neznana spojina, ki se je izločila tik pod fronto ( $R_f=0,99$ ).

Tako kot vizualizacija s fosfomolibdenskih reagentom, je tudi vizualizacija z anisaldehidnim reagentom dokazala, da razlik med skupinami ni.

Edina skupina, ki je na vseh ploščah izstopala, je skupina 4 (rastline aklimatizirane od februarja do aprila 2011 in presajene maja 2011). Pri teh vzorcih se je malo pod fronto ( $R_f = 0,97$ ) izločila oranžna komponenta, ki pa ni opisana nikjer v literaturi.



L – izvleček zmletih listov

EO- eterično olje

Slika 17: TLC plošča z nanesenimi vzorci razvita v anisaldehidnem reagentu

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Vsi poskusi v okviru te diplomske naloge so bili narejeni na eno leto starih rastlinah. Značilnosti pa se pri poprovi meti v celoti izrazijo šele v drugem letu starosti. To je bil verjetno tudi glavni razlog za majhne razlike v lastnostih rastlin iz osnovnih 4 skupin.

V našem poskusu smo želeli ugotoviti ali način razmnoževanja in čas gojenja vplivata na morfološke značilnosti, velikost genoma ter količino in sestavo eteričnih olj v poprovi meti. Velikost genoma smo izmerili s pretočnim citometrom, morfološke značilnosti pa smo opisali in izmerili s pomočjo deskriptorskega lista za poprovo meto. Količino eteričnih olj smo merili na Clevenger aparaturi neposredno po destilaciji, sestavo eteričnih olj pa smo določili s pomočjo TLC metode.

#### 5.1.1 Primerjava gojišč za rast poprove mete

Glede na dobre rezultate poskusa, ki jih navajajo Sarwar in sod. (2009), smo za naše poskuse prvotno izbrali gojišče 1, vendar se v našem primeru ni izkazal za primernega. V iskanju optimalnega gojišča smo sestavili še 3 nova in ugotovili, da je za nas optimalno gojišče 2 (gojišče z MS makro in mikroelementi z dodatkom B5 vitaminov, 30 g/l saharoze, 1mg/l BAP, 1 mg/l niacina, 1 mg/l piridoksina, 10 mg/l tiamina ter 100 mg/l inozitola). Sestavine v gojišču so spodbudile nastanek velikega števila novih poganjkov, poleg tega so rastline na gojišču začele tvoriti korenine. Prestavljanje na gojišče s hormoni za koreninjenje zato ni bilo potrebno in smo s tem preskočili en korak do aklimatizacije rastlin. Pridobljeni rezultati so v skladu z rezultati iz leta 2004 (Ghanti in sod.), kjer so prav tako ugotovili, da za uspešno koreninjenje poprove mete prestavljanje na gojišče za koreninjenje ni potrebno.

#### 5.1.2 Statistična analiza morfoloških lastnosti

S statistično analizo smo dokazali, da se skupine v večini lastnosti niso statistično značilno razlikovale. Razlog so bile prevelike razlike med rastlinami znotraj skupine. Skupine so se razlikovale v širini glavnega stebla, in sicer so imele rastline, ki so bile presajene na njivo oktobra 2010 in so prezimile na polju (skupina 1) širša stebla od rastlin iz ostalih treh skupin. Poleg tega so imele rastline iz prve skupine tudi daljše in širše liste. Razlog za to je različen čas presajanja na polje. Rastline iz prve skupine smo na polje presadili pred zimo. Nadzemni deli rastlin so med zimo propadli in zato so rastline začele poganjati že v začetku pomladi. Ostale rastline, so medtem rastle v rastlinjaku in smo jih zaradi neugodnih vremenskih razmer lahko presadili na njivo šele ob koncu pomladi. Rastline iz prve skupine so lahko v tem času že dobro razvile svoj koreninski sistem in se razrastle. Že v literaturi (Wagner, 1980) je zapisano, da ima jesensko sajenje več prednosti (omogoča zgodnejšo žetev in boljši pridelek), to pa smo dokazali tudi mi. Statistična analiza je

pokazala, da so imele rastline iz skupine 1, ki so bile na polje posajene jeseni, daljše in širše liste ter širše glavno steblo.

Rastline razmnožene z mikropropagacijo (skupini 3 in 4) so imele trikrat več poganjkov, kar je potrdila tudi statistična analiza. Takšni rezultati so bili pričakovani, saj so rastline iz skupin 3 in 4 rastle na gojišču z dodanimi citokinini, ki spodbujajo razraščanje stranskih poganjkov, medtem ko smo rastline iz skupine 1 in 2 razmnožili s stebelnimi potaknjenci, ki v najboljšem primeru poženejo dva poganjka in se nato počasi razraščajo.

V literaturi (Wagner, 1980) je zapisano, da je razmerje med suho in svežo maso pri poprovi meti 1:5. V našem primeru se je razmerje gibalo od 1:3,5 do 1:5,3, s povprečno vrednostjo 1:4,5. Naši rezultati se ujemajo z Wagnerjevim zapisom (1980), kar pomeni, da smo rastline poželi v primernem času in so bile primerne za nadaljnjo uporabo.

### 5.1.3 Velikost genoma

Rezultati so pokazali, da se velikost genoma mikropropagiranih rastlin razlikuje od tistih vzgojenih s stebelnimi potaknjenci, čeprav je bil izhodiščni material enak. Eden od razlogov za razlike je lahko rast kalusa in regeneracija iz teh celic, kar lahko v nekaterih primerih vodi do razlik v velikosti genoma, kar so pri hmelju opazili že Škof in sodelavci (2007). Druga možnost pa je različna velikost genoma različnih poganjkov znotraj iste rastline. Pri analizi smo si označili rastline v rastlinjaku, iz katerih smo nato vzpostavili tkivne kulture, vendar nismo uporabili istih poganjkov. Analizo bi bilo potrebno ponoviti z večjim številom vzorcev, tako znotraj rastline, kot tudi med rastlinami. Pomembno bi bilo tudi izmeriti velikost genoma na izvornem poganjku pred vzpostavitvijo tkivne kulture in kasneje mikropropagiranim klonom ter rezultate primerjati.

### 5.1.4 Primerjava vsebnosti eteričnih olj

S parno destilacijo posušenih listov poprove mete smo pridobili eterično olje. Volumni eteričnih olj pri posamezni ponovitvi znotraj skupine so bili zelo različni, vendar med povprečji skupin ni bilo velikih razlik. Glede na dobljene rezultate lahko rečemo, da način razmnoževanja, ter čas presajanja na zunanje razmere, ne vplivata na vsebnost eteričnih olj.

Rezultati tudi kažejo, da smo rastline poželi v pravem času, ko so vsebovale največ eteričnega olja. Posamezne skupine so imele na kg rezane droge od 21,5 do 33,5 ml eteričnega olja. Glede na zahteve iz Ph. Eur. (2004), kjer je zapisano, da mora rezana droga vsebovati vsaj 9 ml eteričnega olja na kg droge, lahko zaključimo, da je bila naša droga kvalitetna.

### 5.1.5 Tankoplastna kromatografija

Poskusne rastline smo razdelili v štiri skupine (opis v poglavju materiali in metode, TLC) in za vsako skupino naredili štiri ponovitve (skupno 16 vzorcev eteričnih olj in 16 vzorcev ekstraktov). Na vsako ploščo s silikagelom smo nanesli eno vrsto ponovitev eteričnih olj in izvlečkov (vsak vzorec v eni ponovitvi) in štiri standarde. Če ne bi bilo zapletov, bi to pomenilo na koncu eksperimenta štiri plošče za vsak reagent (skupno 8), ki bi jih primerjali med sabo in na podlagi rezultatov določili razlike v sestavi eteričnih olj. Ker pa smo imeli težave z iskanjem ustreznih standardov in njihovih razredčitev, smo pripravili 17 plošč in posledično pridobili še več ponovitev vzorcev.

Najprej smo naredili 12 plošč, ki smo jih obarvali s fosfomolibdenskim reagentom. Ker se na večini plošč niso videli vsi standardi in ker so bile določene snovi (npr. mentol) v vzorcih z vsako narejeno ploščo manj vidni, smo predvidevali, da je nekaj narobe s standardi in vzorci. Mislili smo, da so standardi pri hranjenju izgubili svojo aktivnost in da so vzorci raztopljeni v toluenu po parih dneh razpadli. Zato smo poskusili pripraviti sveže vzorce in standarde pred vsakim nanosom na ploščo, vendar mentola in mentil acetata kljub temu nismo zaznali.

Nato smo pripravili nove plošče z enakimi razporeditvami vzorcev in jih obarvali z anisaldehidnim reagentom. V literaturi (Wagner in Bladt, 1996) opozarjajo, da reagent po določenem času ni več uporaben, zato smo za vsako ploščo pripravili svežega in ga po uporabi zavrgli. Tokrat so bili vidni vsi reagenti ter tudi vse snovi v vzorcih.

Razlog za težave pri analizi s fosfomolibdenskim reagentom torej niso bili stari vzorci in standardi, ampak reagent sam. Sicer se nikjer v literaturi ne pojavlja informacija o času uporabnosti reagenta, vendar je očitno čas omejen.

Kljub uporabi dveh reagentov pa so bili rezultati enaki. Razen snovi, ki se je obarvala oranžno pri skupini 4, drugih razlik ni bilo. Snov, ki se je obarvala oranžno, ni opisana v literaturi, zato ne vemo kaj je. Zanimivo je tudi, da se je pojavila le pri 4. skupini, vendar skupina v ostalih opazovanih lastnostih ni izstopala. Poleg tega je bila snov opazna le pri obarvanju z anisaldehidnim reagentom. Razlog za to, da te snovi nismo opazili že pri obarvanju s fosfomolibdenskim reagentom, je verjetno enobarven izgled vseh snovi.

Na podlagi vseh pridobljenih rezultatov lahko trdimo, da način razmnoževanja in čas gojenja ne vplivata na sestavo eteričnega olja poprove mete.

## 5.2 SKLEPI

- gojišče 2 (gojišče z MS makro in mikroelementi z dodatkom B5 vitaminov, 30 g/l saharoze, 1mg/l BAP, 1 mg/l niacina, 1 mg/l piridoksina, 10 mg/l tiamina ter 100 mg/l inozitola) se je izkazalo za optimalno za gojenje poprove mete v *in vitro* razmerah,
- skupine preiskovanih rastlin se v večini lastnosti niso statistično značilno razlikovale,
- rastline iz skupine 1, ki so bile na polje posajene jeseni, so imele daljše in širše liste ter širše glavno steblo,
- rastline razmnožene z mikropropagacijo (skupini 3 in 4) so imele trikrat več poganjkov,
- velikost genoma mikropropagiranih rastlin se je razlikovala od tistih vzgojenih s stebelnimi potaknjenci, čeprav je bil izhodiščni material enak,
- način razmnoževanja, ter čas presajanja na zunanje razmere, ne vplivata na vsebnost in sestavo eteričnih olj.

## 6 POVZETEK

Poprova meta, ki spada v družino ustnatic (Lamiaceae), se uporablja v različne namene. Pomembna je v živilski in farmacevtski industriji, že več stoletij pa se uporablja kot učinkovito domače zdravilo proti različnim želodčnim težavam. Poznamo več različnih kultivarjev, ki se v osnovi delijo na svetlozelene in temnozelene vrste. Za naš poskus smo izbrali temnozeleni kultivar Priluskaja I, ki izvira iz Rusije.

Zaradi visoke uporabnosti se vedno iščejo načini za čim večji in kvalitetnejši pridelek. V diplomi smo želeli ugotoviti, če način razmnoževanja vpliva na končne lastnosti droge (listov) in vsebnost oziroma kakovost eteričnega olja. Izbrali smo tradicionalno razmnoževanje s stebelnimi potaknjenci ter *in vitro* razmnoževanje z mikropropagacijo. Predvidevali smo, da se bodo različno razmnožene rastline med seboj razlikovale, vendar razlik ni bilo.

Pridobljen material (vir: Terezija Nikolčič) smo razdelili na dva dela. Iz prvega dela smo naredili stebelne potaknjence, ki smo jih posadili v substrat primeren za rast potaknjencev. Drug del pa smo razmnožili z mikropropagacijo v sterilnih pogojih. Za mikropropagacijo smo uporabili štiri različna gojišča in optimalnega uporabljali do konca poskusa. Material smo razmnožili do visokega števila rastlin ter ga v različnih terminih posadili na polje. Skupino 1 smo razmnožili s potaknjenci in jo jeseni 2010 posadili na polje, skupino 2 smo prav tako razmnožili s potaknjenci in jo presadili na polje spomladi 2011, skupini 3 in 4 sta bili razmnoženi z mikropropagacijo in aklimatizirani od septembra 2010 do januarja 2011 ter od februarja 2011 do aprila 2011 in presajeni na polje istočasno kot skupina 2.

Rastlinam smo večkrat med rastjo izmerili velikost genoma z metodo pretočne citometrije. Ker je bila to samo posredna metoda za ugotavljanje razlik med rastlinami v tkivnih kulturah, smo jo naredili na majhnem številu vzorcev in zato rezultate težko komentiramo. Ugotovili smo, da se že med izhodiščnim materialom pojavljajo razlike v velikosti genoma in da so v nekaterih primerih različne velikosti genoma med izhodiščno rastlino in njenimi kloni, ki rastejo v tkivni kulti. Za boljše rezultate bi morali analizo ponoviti in vključiti večje število vzorcev v več ponovitvah.

Pred sezono cvetenja (začetek poletja 2011) smo vse rastline poželi, jim izmerili in opisali različne lastnosti ter jih posušili. Pridobljene meritve lastnosti smo nato statistično analizirali. Statistična analiza z enosmerno ANOVO je pokazala, da se skupine statistično značilno razlikujejo v štirih lastnostih. Ugotovili smo da ima 1. skupina daljše in širše liste, ter širše glavno steblo. Rezultat je popolnoma pričakovani, saj je bila ta skupina na njivi dalj časa in je imela več prostora za rast. Poleg tega je analiza pokazala tudi, da sta imeli skupini razmnoženi z mikropropagacijo večje število poganjkov, kar je prav tako pričakovano, saj so te rastline rastle na gojišču z dodanim citokininom BAP, ki spodbuja rast stranskih poganjkov.

Ko so se rastline posušile, smo iz listov s pomočjo parne destilacije pridobili eterična olja. Za vsako skupino smo naredili štiri ponovitve. Količina eteričnih olj se je sicer razlikovala med ponovitvami, vendar pa so bile povprečne vrednosti med skupinami podobne.

Kljub temu, da smo pričakovali razlike v vsebnosti eteričnih olj, v njihovi sestavi, ter v zunanjem izgledu rastlin, so pridobljeni rezultati pokazali nasprotno.

## 7 VIRI

- Adam M., Dobiaš P., Pavlikova P., Ventura K. 2009. Comparison of solid-phase and single-drop microextractions for headspace analysis of herbal essential oils. Central European Journal of Chemistry, 7,3: 303-311
- Adamović D. 2000. The most important results on selection of medicinal and aromatic plants in Yugoslavia. First conference on medicinal and aromatic plants of southeast european countries & VI meeting »days of medicinal plants«, Arandjelovac, 29. 5. – 3. 6. 2000  
[http://www.amapseec.org/cmapseec.1/papers/pap\\_p017.htm](http://www.amapseec.org/cmapseec.1/papers/pap_p017.htm)
- Anderluh G., Maček P., Sepčič K., Turk T. 2009. Eksperimentalne metode v biokemiji. Ljubljana, Študentska založba: 137 str.
- Baričevič D. 1996a. Priročnik za ciklus predavanj pridelovanje zdravilnih rastlin. I. del. 1. izdaja. Ljubljana, samozaložba: 117 str.
- Baričevič D. 1996b. Rastlinske droge in njihovi sekundarni metaboliti – surovina rastlinskih zdravilnih pripravkov. 1. izdaja. Ljubljana, samozaložba: 81 str.
- Bohanec B. 1992. Tehnike rastlinskih tkivnih kultur. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 168 str.
- Bohanec B. 2003. Ploidy determination using flow citometry. V: Doubled haploid production in crop plants. Maluszynski M in sod. (ur.), Netherlands, IAEA: 397-403
- Croteau R. B., Davis E. M., Ringer K. L., Wildung M. R. 2005. (-)- menthol biosynthesis and molecular genetics. Naturwissenschaften, 92: 562-577
- Doležel J., Bartoš J. 2005. Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. Annals of Botany, 95: 99-110
- European pharmacopoeia. 2004. 5. izdaja. Strasbourg, Council of Europe: 2737 str.
- Farrell K. T. 1985. Spices and condiments and seasonings. New york, Van nostrend reinhold company: 415 str.
- Faure O., Diemer F., Moja D., Jullien F. 1998. Mannitol and thidiazuron improve *in vitro* shoot regeneration from spearmint and peppermint leaf disks. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 52: 209-212
- Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50: 151-158

- Gaspar T., Kevers C., Penel C., Greppin H., Reid D. M., Thorpe T. A. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, 32: 272-289
- Ghanti K., Kaviraj C. P., Venugopal R. B., Jabeen F. T. Z., Rao S. 2004. Rapid regeneration of *Mentha piperita* L. from shoot tip and nodal explants. Indian Journal of Biotechnology, 3: 594-598
- Golebiowski M., Ostrowski B., Paszkiewicz M., Czerwica M., Kumirska J., Halinski L., Malinski E., Stepnowski P. 2008. Chemical composition of commercially available essential oils from blackcurrant, ginger and peppermint. Chemistry of Natural Compounds, 44, 6: 794-796
- Ignatowitz E. 1996. Kemijnska tehnika. Ljubljana, Jutro: 455 str.
- Ismail B., Nielsen S. S. 2010. Basic principles of chromatography. V: Food analysis. 4. Izdaja. Nielsen S. S. (ur.). New York, Springer: 473-498
- Jackson D. E. 1939. Experimental pharmacology and materia medica. St. Louis, The C. V. Mosby Company: 906 str.
- Kromar J. 1992. Zdravilne rastline tisoč in en izbran recept. Ljubljana, Grad: 289 str.
- Lloyd G., McCown B. 1980. Comercially feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Combined Proceedings - International Plant Propagator`s Society, 30: 421-427
- Mucciarelli M., Camusso W., Maffei M, Panicco P., Bicchi C. 2007. Volatile terpenoids of endophyte-free and infected peppermint (*Mentha piperita* L.): chemical partitioning of a symbiosis. Microbial Ecology, 54: 685-696
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497
- Olszewska M. J., Osiecka R. 1984. Relationship between 2C DNA content, systematic position & level of DNA endoreplication during differentiation of root parenchyma in dicot shrubs & trees-comparison with herbaceous sp. Biochemie und Physiologie der Pflanzen, 179: 641-657
- Prijatelj N. 2006. Farmakognozija. Delovanje in uporaba rastlinskih drog. Center RS za poklicno izobraževanje.  
<http://www.cpi.si/files/cpi/userfiles/Strokovna%20podro%C6%92ja/zdravstvo/Farmakognozija/index2.html> (8.sept.2011)

Prošek M., Pukl M. 1991. Kvantitativna planarna kromatografija. Ljubljana, Zavod republike Slovenije za šolstvo in šport: 184 str.

R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/> (11. 9. 2011)

Ravnikar M. 1996. Rastlinske tkivne kulture. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspored. P. (ur.). Ljubljana, Bia: 149-164

Rech E. L., Pires M. J. P. 1985. Tissue culture propagation of *Mentha* spp. by the use of axillary buds. Plant Cell Reports, 5: 17-18

Robbers J. E., Tyler V. E. 2000. Tyler's herbs of choice, the therapeutic use of phytomedicinals. New York, The Haworth Herbal Press: 287 str.

Rode J. 2001. Zeliščni vrt: domača lekarna. Ljubljana, Založba Kmečki glas: 231 str.

Sarwar S., Zia M., Rehman R., Fatima Z., Sial R. A., Chaudhary M. F. 2009. In vitro direct regeneration in mint from different explants on half strength MS medium. African Journal of Biotechnology, 8, 18: 4667-4671

Scavroni J., Boaro C. S. F., Marques M. O. M., Ferreira L. C. 2005. Yield and composition of the essential oil of *Mentha piperita* L. (*Lamiaceae*) grown with biosolid. Brazilian Journal of Plant Physiology, 17, 4: 345-352

Sherma J. 2000. Thin-layer chromatography in food and agricultural analysis. Journal of chromatography A, 880: 129-147

Škof S., Bohanec B., Kastelec D., Luthar Z. 2007. Spontaneous induction of tetraploidy in hop using adventitious shoot regeneration method. Plant Breeding, 126: 416-421

Voirin B., Bayet C., Faure O., Jullien F. 1999. Free flavonoid aglycones as markers of parentage in *Mentha aquatica*, *M. citrata*, *M. spicata* and *M. x piperita*. Phytochemistry, 50: 1189-1193

Wagner H., Bladt S. 1996. Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. Berlin, Springer: 384 str.

Wagner T. 1980. Pridelovanje zdravilnih rastlin. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 169 str.

Wang X., Gao Z., Wang Y., Bressan R. A., Weller S. C., Li X. 2009. Highly efficient *in vitro* adventitious shoot regeneration of peppermint (*Mentha x piperita* L.) using internodal explants. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, 45: 435-440

## ZAHVALA

Za navdih pri izbiri teme diplomske naloge in obilo pomoči pri delu se iskreno zahvaljujem mentorici prof. dr. Dei Baričevič.

Prav tako se najlepše zahvaljujem somentorju prof. dr. Borutu Bohancu.

Najlepša hvala prof. dr. Zlati Luthar za hiter in temeljit pregled diplomske naloge.

Posebna zahvala gre Nataši Hren za vse zabavne skupne dni preživete v laboratoriju, Viki Dolenc za pomoč v rastlinjaku ter Petri Ratajc za pomoč vedno in povsod. Poleg tega se zahvaljujem vsem ostalim zaposlenim Katedre za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko ter zaposlenim Katedre za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin. Zahvaljujem se tudi dr. Jani Murovec za spodbudo pri dokončanju diplomskega dela.

Anita, brez tebe in tvojih sposobnosti lova, bi mi polži in voluharji pojedli ves pridelek, Jasmina, brez tebe pa bi prevečkrat izgubila živce zaradi nepomembnih malenkosti.

Največja zahvala pa gre staršema ter Goranu in Petru, ker so mi v »težkih« trenutkih pomagali pleti njivo in mi skozi celoten študij stali ob strani. Za podporo se zahvaljujem tudi starim staršem.