

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Daniela PRAŠNIKAR

**Mikropropagacija previsne sanvitalije
(*Sanvitalia procumbens* [Ruiz in Pav.]**)

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Daniela PRAŠNIKAR

MIKROPROPAGACIJA PREVISNE SANVITALIJE
(*Sanvitalia procumbens* [Ruiz in Pav.])

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij

MICROPROPAGATION OF SANVITALIA PROCUMBENS
(*Sanvitalia procumbens* [Ruiz in Pav.])

GRADUATION THESIS
Higher Professional Studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek visokošolskega strokovnega študija agronomije in hortikulture. Poskus je bil opravljen na Katedri za genetiko, biotehnologijo in žlahtnenje rastlin na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Boruta BOHANCA.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Ivan KREFT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

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

Datum zagovora:

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

Daniela Prašnikar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMATIKA

- ŠD Vs
DK UDK 631.532:57.086.83:635.9(043.2)
KG mikropropagacija/previsna sanvitalija/tkivne kulture/gojišče/poganjki
KK AGRIS F02/F30
AV PRAŠNIKAR, Daniela
SA BOHANEK, Borut (mentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za Agronomijo
LI 2007
IN MIKROPROPAGACIJA PREVISNE SANVITALIJE (*Sanvitalia procumbens* [Ruiz and Pav.])
TD Diplomsko delo (visokošolski strokovni študij)
OP IX, 31 str., 10 pregl., 4 sl., 15 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Previsna sanvitalija (*Sanvitalia procumbens* [Ruiz in Pav.]) je enoletna okrasna rastlina. S tehniko tkivnih kultur smo poskušali vzpostaviti uspešen sistem mikropropagacije previsne sanvitalije, ki bi bila uporabna v okrasnem vrtnarstvu za hitrejšo in enostavnejšo razmnoževanje rastlin. V poskus smo vključili odprte in zaprte cvetove kot izhodiščni material za gojenje v *in vitro* razmerah. Rastlinski material smo površinsko sterilizirali z raztopino dinatrijeve dikloroizocianurne kisline (DIA), z dvema različnima koncentracijama (2% in 1,66% DIA). Ne glede na koncentracijo DIA je bilo 46% odprtih cvetov okuženih. Pri zaprtih cvetovih ni bil okužen noben cvet, sterilnost je bila 100%. Odločili smo se, da bomo v drugem poskusu na gojišča nastavljali le zaprte cvetove z 1,66% DIA. Po končani sterilizaciji smo cvetove inokulirali na šest različnih indukcijskih gojišč. Osnovna MS (Murashige in Skoog, 1962) gojišča so se med seboj razlikovala po vrsti in koncentraciji rastnega hormona in vsebnosti sladkorja. Na gojišču #1, ki je vsebovalo 1,0 mg/l BAP in 10 g/l saharoze, je tvorilo skupno poganjke 72% cvetov, na gojišču #3, z dodatkom 0,15 mg/l BAP in 10 g/l saharoze je tvorilo poganjke skupno 39% cvetov in na gojišču #2, katero je vsebovalo 1,0 mg/l BAP in 40 g/l saharoze, je tvorilo skupno poganjke 14% cvetov. Po 30-ih dneh smo regenerante subkultivirali na razmnoževalno MS gojišče #7, z dodanima hormonoma 0,5 mg/l IBA in 0,3 mg/l BAP. Na gojišču #7 je skupno nastalo 922 poganjkov. Na gojišču za koreninjenje #8, kateremu smo dodali le 1,0 mg/l IBA, smo predstavili 100 poganjkov, na njem je uspešno koreninilo 70% poganjkov, kateri postopek aklimatizacija je preživel. V nalogi smo torej uspešno obvladali vse faze mikropropagacije proučevane vrste in ugotovili, da so nezreli cvetovi sanvitalije odziven donorski material.

KEY WORD DOCUMENTATION

- DN Vn
DC UDC 631.532:57.086.83:635.9(043.2)
CX micropropagation/sanvitalia procumbens/tissue culture/culture media/shoots
CC AGRIS F02/F30
AU PRAŠNIKAR, Daniela
AA BOHANEC, Borut (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
PY 2007
TI MICROPROPAGATION OF SANVITALIA PROCUMBENS (*Sanvitalia procumbens* [Ruiz and Pav.])
DT Graduation thesis (higher professional studies)
NO IX, 31 p., 10 tab., 4 fig., 15 ref.
LA sl
AL sl/en
AB *Sanvitalia procumbens* Ruiz & Pav is an annual plant species at present propagated through seeds. Establishment of micropropagation protocol, the topic of this thesis, would enable clonal propagation of selected genotypes. Donor plant material were mature or immature flowers of *Sanvitalia procumbens* cv. 'Aztekengold'. Flowers was sterilized in dichloroisocyanuric acid (DIA) using two different concentrations (2% and 1,66% DIA) for 15 minutes. Regardless of DIA concentration, 46% of mature flowers were infected. No flower was infected at immature flowers, sterility was 100%. We decided, that in second experiment we will be adjusting only immature flowers with 1,66% DIA on culture media. Sterilized flowers were inoculated onto six different culture media based on MS culture macro and micro elements with alternation of hormone and sucrose contents. On medium # 1 which contained 1.0 mg/l BAP and 10 g/l sucrose 72% of flowers formed shoots. On medium # 3 which contained 0.15 mg/l BAP and 10 g/l sucrose and on medium # 2 which contained 1.0 mg/l BAP and 40 g/l sucrose shoot formation was 39% and 14% respectively. Shoots were subcultured on MS medium with 0.5 mg/l IBA and 0.3 mg/l BAP. At the end of subculture 922 shoots were formed. Rooting was achieved on MS medium containing 1.0 mg/l IBA. On this medium 70% of shoots formed roots. Rooted shoots were successfully acclimatized in the greenhouse. In conclusion micropropagation protocol initiated form immature flower buds of *Sanvitalia procumbens* was efficiently established.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacija	II
Key word documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VI
Kazalo slik	VII
Simboli in okrajšave	VIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	1
1.2 CILJI NALOGE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 RAZVOJ OKRASNIH RASTLIN	2
2.2 RAZDELITEV OKRASNIH RASTLIN	2
2.2.1 Enoletne rastline	2
2.2.2 Binarna nomenklatura ali dvojno poimenovanje	3
2.3 MORFOLOGIJA PREVISNE SANVITALIJE	3
2.3.1 Lastnosti tal in podnebje	4
2.3.2 Izvor in razširjenost	4
2.3.3 Značilnost družine nebinovk (<i>Asteraceae</i>)	4
2.3.4 Košasto socvetje (košek)	5
2.3.5 Generativno razmnoževanje	5
2.4 RAZMNOŽEVANJE V IN VITRO	6
2.4.1 Mikropropagacija	6
3 MATERIAL IN METODE DE LA	7
3.1 METODE DE LA	7
3.1.1. Sestava gojišč	7
3.1.2 Rastlinski hormoni	9
3.1.3 Priprava gojišč	10
3.1.4 Sterilizacija cvetov	10
3.1.5 Inokulacija zaprtih in odprtih cvetov	11
3.1.6. Subkultivacija cvetov	11
3.1.7 Rastne razmere	11
3.1.8 Bonitiranje in obdelava podatkov	11
4 REZULTATI	12
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	25
5.1 RAZPRAVA	25
5.1.1 Sterilizacija odprtih in zaprtih cvetov	25
5.1.2 Hormonska sestava gojišč	25
5.2 SKLEPI	26
6 POVZETEK	28
7 VIRI	30
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava Murashige in Skoog gojišča (Bohanec, 1992)	8
Preglednica 2: Sestava indukcijskih gojišč	8
Preglednica 3: Sestava razmnoževalnega gojišča in gojišča za koreninjenje	8
Preglednica 4: Uporabljeni rastlinski hormoni in način raztapljanja	9
Preglednica 5: Število inokuliranih cvetov v prvem poskusu, koncentracija razkužila in čas razkuževanja	12
Preglednica 6: Število okuženih cvetov in vrsta okužbe prvega poskusa šest dni po inokulaciji	13
Preglednica 7: Število inokuliranih cvetov v drugem poskusu	13
Preglednica 8: Pregled prvega in drugega poskusa po približno 30-tih dneh od inokulacije cvetov (popkov) na gojišča	15
Preglednica 9: Število in velikost poganjkov, po prestavitvi regenerantov na razmnoževalno gojišče #7	18
Preglednica 10: Število nastavljenih in koreninjenih poganjkov ter velikost korenin na gojišču #8	21

KAZALO SLIK

Slika 1: Previsna sanvitalija (<i>Sanvitalia procumbens</i> [Ruiz in Pav.]) v polnem cvetenju (Missouri..., 2007)	3
Slika 2: Osenčeni predeli na sliki predstavljajo potencialna rastišča za previsno Sanvitalijo (<i>Sanvitalia procumbens</i>)	4
Slika 3: Zgradba cvetov in socvetja pri nebinovkah	5
Slika 4: Potemneli cvetovi na gojiščih #4, #5 in #6, ki so propadli ter regenerirani cvetovi na gojiščih #1, #2 in #3.	18

SIMBOLI IN OKRAJŠAVE

°C - stopinj Celzija, enota za merjenje temperature po skali, pri kateri je vrelišče vode pri 100 °C

BAP - 6-benzilamino purin; naravni citokinin

IBA - indol maslena kislina; sintetični avksin

2,4 D - 2,4-diklorofenoksiocetna kislina; sintetični avksin

pH - negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov

DIA - dikloroizocianurna kislina

#1, #2, #3, #4, #5, #6, #7, #8 - oznak gojišč

∅ - premer

Σ - grška črka eta, znak za končni seštevek

1 UVOD

Previsna sanvitalija (*Sanvitalia procumbens* [Ruiz in Pav.]) iz družine nebinovk (Asteraceae) je enoletna okrasna rastlina. S svojimi rumenimi ali oranžnimi cvetovi s temno rjavo sredino postaja priljubljena pokrovna ali previsna rastlina. Uporabljamo jo za skupinske zasaditve v parkih, za zasajevanje gred, za prekrivanje tal, v okrasnih koritih, vse pogosteje se uporablja kot balkonsko cvetje.

Sanvitalija se zelo bogato obrašča, s svojim značilnim načinom rasti daje bujen izgled in v dolžino doseže do 40 cm. Cveti od junija do oktobra s cvetovi, ki so enostavni ali polnjeni, lahko so v razrastih ali na koncu poganjkov. Na steblih so ovalni, srednje zeleni ciniji podobni lističi, zaradi česar so jo nekateri poimenovali tudi plazeča cinija. Uspeva v suhih do srednje mokrih predelih na soncu (Mackey, 2007).

Previsno sanvitalijo običajno razmnožujemo s semenom (generativno) zgodaj spomladi. Za hitrejše in enostavnejše razmnoževanje rastlin v okrasnem vrtnarstvu uporabljamo tehnike tkivnih kultur. Najpreprostejša in učinkovita metoda, ki se največkrat uporablja je mikropropagacija.

Mikropropagacija je temeljna tehnika tkivnih kultur in je tudi osnova vseh ostalih tehnik (Bohanec, 1992). Proces mikropropagacije v splošnem razdelimo na več faz: gojitev in priprava matičnih rastlin, inicijacija kulture, indukcija in regeneracija, razmnoževanje poganjkov, koreninjenje in aklimatizacija. Vsaka faza ima svoje specifične zahteve dela.

1.1 NAMEN NALOGE

Namen našega dela je bil razviti tehnike tkivnih kultur, ki bi omogočile rast in razvoj previsne sanvitalije v *in vitro* razmerah. Pogoje rasti v tkivni kulturi smo želeli v nadaljevanju optimizirati tako, da bi omogočali mikropropagacijo previsne sanvitalije, s čimer bi lahko nadomestili zamudno razmnoževanje rastlin iz semena.

1.2 CILJI NALOGE

Osnovni cilj je bil vzpostaviti sistem mikropropagacije previsne sanvitalije, ki bi bila uporabna v okrasnem vrtnarstvu za hitrejše in enostavnejše razmnoževanje rastlin. V tkivni kulturi smo poskušali vzgojiti čim večje število poganjkov, kateri bi bili po končani aklimatizaciji primerni za sajenje v *in vivo* razmerah.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RAZVOJ OKRASNIH RASTLIN

Pridelovanje okrasnih rastlin je stara dejavnost, ki spremlja človeka skozi zgodovinski razvoj. Že stari Egipčani in Grki so poznali celo vrsto cvetočih in listnatih okrasnih rastlin. Razvoj okrasnih rastlin, ki je sledil, je bil v tesni povezavi s kulturnim razvojem posameznih narodov. V evropskih deželah je okrasna dejavnost močno napredovala po letu 1948. Nastajali so parki, vrtovi in javni nasadi, v vseh večjih evropskih mestih. Kakor hitro se je širila proizvodnja okrasnih rastlin, tako se je vzporedno pričela razvijati trgovina z okrasnimi rastlinami. Trg je bil povzročitelj konkurence med posamezniki in pridelovalci, kar je pripeljalo da vrtnarskega poklica. Vrtnarji so z zanimanjem in potrpežljivostjo, ter strogo natančnostjo raziskovali in odkrivali neznane rastline. Pojavili so se prvi žlahtnitelji rastlin. Iskali in odkrivali so vedno več rastlin in naravnih rastišč vseh celin. Z različnimi žlahtniteljskimi postopki so pridobili mnogo novih vrst, sort oz. kultivarjev. Nove kultivarje so prilagodili različnim podnebnim in talnim razmeram. Odkrivanje in žlahtnjenje novih rastlin še danes ni končano. Veliko je strokovnjakov, ki žlahtnijo in s svojim delom bogatijo sorte okrasnih rastlin. Danes so okrasne rastline razširjene po celem svetu (Sojar, 1972).

2.2 RAZDELITEV OKRASNIH RASTLIN

Okrasne rastline glede na čas trajanja, razdelimo na; (Krajncič, 2001)

- ENOLETNICE – monociklične ali **annuelles**
- DVOLETNICE – diciklične ali **biennes**
- TRAJNICE – policiklične ali **pluriennes**.

2.2.1 Enoletne rastline

So rastline, ki spomladi vzkaliijo, preko poletja cvetijo in plodijo, jeseni pa odmrejo. Enoletnice delimo na poletne in zimske enoletnice. Poletne enoletnice so vse enoletnice, katere spomladi vzklijejo, poleti cvetijo in jeseni odmrejo (Sinkovič, 2000), mednje štejemo tudi previsno sanvitalijo.

2.2.2 Binarna nomenklatura ali dvojno poimenovanje

Pri znanstvenem razvrščanju dobi vsaka vrsta dvočlensko ime, ki ga obravnavamo po pravilih latinščine. Prvi člen imena je ime rodu in ga zapišemo z veliko začetnico. Temu sledi drugi člen, imenovan vrstni pridevek. Previsna sanvitalija na primer spada v rod *Sanvitalia* in je v vrsti *Sanvitalia procumbens*. Ime vrste obsega oba člena in ne le drugega. Dvojno poimenovanje rastlin je uvedel švedski naravoslovec Carl von Linné (njegovo ime se v naravoslovju navadno zapiše kot Carolus Linnaeus oz. pri vrstah, ki jih je poimenoval v obliki kratice L.) in ga zato ponekod imenujejo »poimenovanje po Linneju«.

Linne je bil začetnik in postavitelj rastlinskega debla. Rastline je poimenoval v latinskem jeziku in sicer z dvema imenoma, ki vključujeta rod in vrsto. Rod nam poda splošen opis rastline, vrsta opiše rastlino podrobneje (Vrsta..., 2007).

2.3 MORFOLOGIJA PREVISNE SANVITALIJE

Previsna sanvitalija je rastlina enoletnica in spada v družino nebinovk (Asteraceae). Pogosta imena, ki se še uporabljajo za previsno sanvitalijo so plazeča sanvitalia ali plazeča cinija (The compleat..., 2004).

Cvetovi so zlato-rumeni, s temnimi rjavimi centri, tako da izgleda kot majhna sončnica. Cvetovi niso veliki, ampak so obilni, tako da skoraj prekrijejo zelenje. Listi so jajčasto podolgovati, 3 do 6 cm dolgi, z zašiljenim vrhom in vidnimi žilami. Steblo ni samostojno, sestavljeno je iz mnogo t.i. vejic. Vsaka posamezna vejica zraste do 5 cm v dolžino. Stebelca so polegla, temno zelene barve in obraščena z dlačicami. Koreninski sistem je šopasto razraščan, kar pomeni da so vse korenine približno enake velikosti. Korenine so krhke in lomljive (Cornell..., 2006).



Slika 1: Previsna sanvitalija (*Sanvitalia procumbens* [Ruiz in Pav.]) v polnem cvetenju (Missouri..., 2007)

2.3.1 Lastnosti tal in podnebje

Previsna sanvitalia dobro uspeva na sončnih legah. Rada ima polno sonce, z manj cvetovi se prilagodi tudi na bolj senčne lege. Rastlina dobro prenaša sušo, uspeva na peščeno-humoznih tleh, katera imajo dober pretok. Tla, ki so po večini vlažna ne prenašajo dobro (Cornell..., 2006).

2.3.2 Izvor in razširjenost

Previsna sanvitalija (*Sanvitalia procumbens*) je enoletna okrasna rastlina, ki izvira iz južne Amerike, natančneje Mehike (Gilman in Howe, 1999).



Slika 2: Osenčeni predeli na sliki predstavljajo potencialna rastišča za previsno sanvitalijo (*Sanvitalia procumbens*) (Gilman in Howe, 1999)

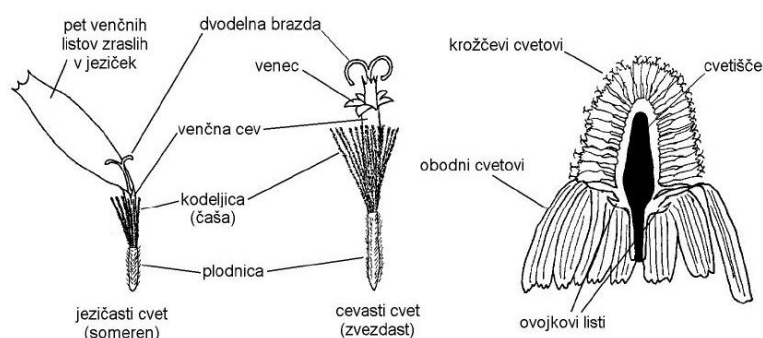
2.3.3 Značilnost družine nebinovk (Asteraceae)

Nebinovke so pomembni gradniki vegetacije v že omenjenih negozdnih, največkrat sušnih območjih (nesklenjeni sklerofilni gozdovi in njihove degradacijske stopnje, različni tipi travnišč, polpuščave, grmišča itd.). Predstavljajo izredno obsežno skupino dvokaličnic. Rod zelnatih trajnic in listopadnih ali vednozelenih polgrmov s košastimi socvetji (koški), ki se razcvetajo vse poletje in jesen. Pravih dreves ni, prav tako tudi ni epifitov. So izrazito kozmopolitska družina, razširjena po vsej zemeljski obli, vendar je bogastvo vrst največje v Sredozemlju, Srednji Ameriki in Mehiki, Kapski provinci Južne Afrike, v sušnih predelih osrednje Azije, pa tudi v gorskih in arktičnih tundrah. Veliko vrst porašča gojene travnike

oz. rastejo kot pleveli na obdelovalnih površinah. Prevladujejo med dvokaličnicami v negozdnih tipih vegetacije. Listi so nameščeni spiralasto, redkeje dekusirano, so brez prilistov, celi ali deljeni, redko sestavljeni, pogosto močno porasli s trihomi in velikokrat bodeči. Za družino nebinovk je značilna odsotnost mlečka, ki je značilna za radičevke. Kot rezervno snov vsebujejo namesto škroba inulin, značilno snov za vse košarice.

2.3.4 Košasto socvetje (košek)

Glavičasto socvetje pri košaricah imenujemo košek. Košek obdajajo ovršni listi, imenovani ovojek, katerega listi so zelo različno oblikovani (Petauer in sod., 1998). Cvetišče je lahko golo, ali pa pokrito s ščetinastimi ali luskastimi braktejami, v zalistju katerih se razvijejo posamezni cvetovi. Cvetovi so zelo majhni. V košku nebinovk lahko razlikujemo obodne jezičaste cvetove, ki so somerni (zigomorfni) in na cvetišču nameščene krožčeve cvetove, ki so cevasti, bolj ali manj zvezdasti (aktinomorfni), ponavadi petštevni. Koški nebinovk so ali iz obeh tipov cvetov (npr. *Helianthus* – sončnica, *Bellis* – marjetica) ali pa so v košku samo cevasti krožčevi cvetovi (npr. *Sanvitalia*, *Centaurea*, *Homogyne*, *Tanacetum*, *Carlina* itd.), ki so na obodu lahko večji. Čaša je petštevna, močno reducirana v ščetinasto ali luskasto kodeljico ali povsem manjka. Venec je zrasel iz 5 listov in različno oblikovan glede na tip cvetov (obrobni, krožčevi cvetovi). Prašnikov je pet, z zraslimi prašnicami, ki obdajajo vrat pestiča. Pestič s podraslo plodnico je zgrajen iz dveh karpelov, a le z eno semensko zasnovo. Cvetovi so praviloma dvospolni, redkeje enospolni, še bolj redke so dvodomne rastline (Batič in sod., 2004).



Slika 3: Zgradba cvetov in socvetja pri nebinovkah (Batič in sod., 2004)

2.3.5 Generativno razmnoževanje

Z generativnim načinom razmnožujemo vse tiste vrste, pri katerih je tovrstni način razmnoževanja enostavnejši, oz. tiste, katere tvorijo veliko semena. Previsno sanvitalijo običajno razmnožujemo generativno s setvijo zgodaj spomladi. Semena posejemo na

prosto, ko je minila nevarnost pozebe in ko se je zemlja že otoplila. Za zgodnje cvetenje rastline posejemo 4 do 6 tednov prej, v notranjosti (npr. rastlinjak), kar pa ni preveč priporočljivo, saj rastlina kasnejše presajanje na prosto težko prenaša. Semena vzklijejo v 10 do 15-tih dneh na temperaturi 21 °C (Missouri..., 2007).

2.4 RAZMNOŽEVANJE V *IN VITRO*

Rastlinska tkivna kultura v širšem pomenu besede je tehnika pri kateri gojimo rastline, njihove organe, tkiva ali posamezne celice na znanih trdnih ali tekočih gojiščih ali hranilnih podlagah v laboratorijskih, sterilnih razmerah (George, 1993).

Pri vegetativnem razmnoževanju *in vitro* iz izsečka rastline v sterilnih pogojih vzgojimo na posebej pripravljenem gojišču novo rastlino. Meristemske rastlinske celice imajo veliko sposobnost regeneracije in diferenciacije. Temu pojavu rečemo totipotentnost, ko iz ene celice lahko nastane cela nova rastlina (Bohanec, 1992). Za tovrstno razmnoževanje se uporabljajo različne tehnike tkivnih kultur, med katere spada tudi mikropropagacija.

2.4.1 Mikropropagacija

Mikropropagacija je temeljna tehnika tkivnih kultur in je tudi osnova vsm ostalim tehnikam (Bohanec, 1992).

Rastlinske tkivne kulture so postale neobhodne pri fizioloških raziskavah in genskem inžiniringu. Z njihovo pomočjo lahko manipuliramo z deli rastlinskih organov ali celo s posameznimi celicami. Svojo večjo aplikativno vrednost so našle v gojenju zdravilnih rastlin v pridobivanju naravnih substanc in hitrem razmnoževanju rastlin *in vitro* (Ravnikar, 1996).

Vegetativno, hitro razmnoževanje rastlin je z uporabo tkivnih kultur postala močna gospodarska veja. Spremlja jo lahko vrsta nezaželenih pojavov, kot so notranje okužbe, hiperhidracija, izločanje fenolnih substanc, periodična rast in pojav genskih sprememb. Zaradi tega je potrebna pri komercialnem izkoriščanju mikropropagacije stalna kontrola (Bohanec, 1992).

Poznavanje in obvladovanje vseh dejavnikov v tkivni kulturi nam omogoča usmerjanje razvoja rastlin in diferenciacijo organov ali celih rastlin iz posameznih izoliranih rastlinskih celic. Del rastline, ki ga inokuliramo na gojišče je izseček ali eksplantat. Rastline razmnožujemo *in vitro*, kadar želimo skrajšati čas razmnoževanja in vzgojiti veliko število rastlin na majhnem prostoru.

3 MATERIAL IN METODE DELA

Sorto previsne sanvitalije (*Sanvitalia procumbens*) 'Aztekengold', smo gojili v rastlinjaku do cvetenja. Rastlinski material smo nabirali meseca julija 2005. Na voljo smo imeli 10 rastlin. V poskusu mikropropagacije, smo uporabili kot izhodiščni material zaprte in odprte cvetove, ki so bili v dveh različnih fazah cvetenja. Pri prvem poskusu smo nabrali 120 odprtih cvetov in 24 zaprtih cvetov, ki so bili v začetni fazi cvetenja. Pri drugem poskusu smo nabrali 330 zaprtih cvetov v začetni fazi cvetenja in 120 cvetov, ki so bili v polni fazi cvetenja. Rastline v polni fazi cvetenja (poskus 0602, 0603, 0604, 0605) so imele močno rumene cvetove, rastline v začetni fazi cvetenja (poskus 0601, 0602, 0603, 0604, 0605) pa blede rumene. Odprte in zaprte cvetove smo predhodno oprali z vodo. Očiščene cvetove smo površinsko sterilizirali v raztopini dinatrijeve dikloroizocianurne kisline (20 in 16,6 g/l) s tremi kapljicami močila Tween 20. Cvetove smo pustili v raztopini 15 minut ter raztopino stalno mešali na električnem mešalu. Po treh spiranjih z destilirano sterilno vodo smo cvetove razdelili na šest različnih gojišč. Osnovna MS (Murashige in Skoog, 1962) gojišča so se med seboj razlikovala po vsebnosti sladkorja ter vrsti in koncentraciji rastnega hormona. Kot strjevalec gojišča smo uporabili polovično koncentracijo agarja, pH pa smo umerili na 5,8 (preglednica 1, 2 in 3).

3.1 METODE DELA

Poskus mikropropagacije je potekal v laboratoriju za aseptično delo, kjer smo lahko ves čas ohranjali aseptično kulturo nezrelih socvetji in regenerantov ter sproti opazovali spremembe.

3.1.1. Sestava gojišč

Gojišča za indukcijo previsne sanvitalije so vsebovala polovično koncentracijo makro- in mikroelementov, organskih sestavin MS (Murashige in Skoog, 1962) gojišča. Razdeljena so bila v šest različnih kombinacij in so se razlikovala glede količine saharoze, kot tudi v količini in sestavi hormonov (preglednica 2). Med hormoni smo uporabili 6-benzilamino purin (BAP) in diklorofenoksiocetno kislino (2,4-D) (preglednica 2).

Gojišče za razmnoževanje #7 je vsebovalo osnovno MS gojišče, z dodanim citokininom 0,3 mg/l 6-benzilamino purin (BAP), avksinom 0,5 mg/l indol očetne kisline (IBA) in sladkorjem saharozo 40 g/l (preglednica 1 in 3).

Gojišče za koreninjenje #8 je poleg osnovnega MS gojišča vsebovalo 0,5 mg/l IBA, kot vir ogljikovih hidratov je bil dodan sladkor saharoza 30 g/l (preglednica 3).

Preglednica 1: Sestava Murashige in Skoog gojišča (Bohanec, 1992)

SESTAVINE	KONCENTRACIJE MS GOJIŠČA
Makro elementi (mg/l)	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440
MgSO ₄ x 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Mikro elementi (mg/l)	
H ₃ BO ₃	6,2
MnSO ₄ x 4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,6
KJ	0,83
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25
Na ₂ Fe ₄ - EDTA	37,2
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8
Organske snovi, vitamini (mg/l)	
Inozitol	100
Tiamin	0,1
Nikotin	0,5
Piridoksin	2
Glicin	0,5
Strjevalec (g/l) in pH vrednost	
Agar	3,75
pH	5,8

Preglednica 2: Sestava indukcijskih gojišč

GOJIŠČE	½ MS (mg)	SLADKOR saharoza (g/l)	HORMONI (mg/l)
#1	2202,59	10	BAP: 1,0
#2	2202,59	40	BAP: 1,0
#3	2202,59	10	BAP: 0,15
#4	2202,59	40	BAP: 0,15
#5	2202,59	10	BAP: 0,15 + 2,4-D: 1,0
#6	2202,59	40	BAP: 0,15 + 2,4-D: 1,0

Preglednica 3: Sestava razmnoževalnega gojišča in gojišča za koreninjenje

GOJIŠČE	MS (mg)	SLADKOR saharoza (g/l)	HORMONI (mg/l)
#7	4405,2	40	IBA: 0,5 BAP: 0,3
#8	4405,2	30	IBA: 0,5

Za vitamine (piridoksin, tiamin, nikotinska kislina) in inozitol smo pripravili založne raztopine. To smo storili tako, da smo zatehtali 10-krat večjo količino, kot je potrebna za liter gojišča, jo raztopili v destilirani vodi in jo razredčili na 100 ml. Dobili smo raztopino s

100-kratno koncentracijo, ki smo jo odpipetirali po potrebi. Založne raztopine smo do uporabe hranili v hladilniku.

3.1.2 Rastlinski hormoni

Rastlinski hormoni oz. fitoregulatorji so najvažnejša skupina snovi, ki omogočajo razvoj metod tkivnih kultur (Bohanec, 1992). Rastlinski hormoni, naravni ali sintetični vplivajo na fiziološke procese v rastlini, razvoj in rast. Ločimo več skupin rastlinskih hormonov, za tkivne kulture sta najpomembnejši skupini: avksini in citokinini.

Rastlinske hormone smo raztapljali sproti ali pa smo jih kot založne raztopine krajši čas hranili v hladilniku.

Preglednica 4: Uporabljeni rastlinski hormoni in način raztapljanja

HORMON	TOPILO	KONCENTRACIJA ZALOŽNE RAZTOPINE
BAP	1N HCl (Duchefa)	50 mg/50 ml
2,4-D	1N KOH (Duchefa)	100 mg/1000 ml
IBA	1N KOH (Duchefa)	10 mg/100 ml

pH gojišče smo pred dodajanjem agarja uravnavali s KOH oz. HCl.

BAP = 6-benzilamino purin

- naravni citokinin, stabilen v tkivni kulturi
- sterilizacija z avtoklaviranjem
- delovanje: vzpodbuja delitev celic, rast in razraščanje poganjkov

2,4-D = 2,4-diklorofenoksiocetna kislina

- sintetični avksin
- sterilizacija z avtoklaviranjem
- delovanje: vzpodbuja rast korenin, potreben je samo v začetni fazi

IBA = indol maslena kislina

- sintetični avksin
- sterilizacija z avtoklavom
- delovanje: vpliva na formiranje poganjkov v kombinaciji s citokininom oz. na formiranje korenin

3.1.3 Priprava gojišč

Gojišča smo pripravili tako, da smo v čašo zatehtali makro- in mikroelemente, saharozo in ostale organske sestavine in jih prelili z destilirano vodo. Sestavine smo raztopili z mešanjem s pomočjo teflonskega magneta na elektronskem mešalu (1500 obr./min.). Nato smo odpipetirali in dodali še sestavine iz založnih raztopin (vitamine in hormone). Končni volumen gojišč smo določili v merilni bučki, ter prelili nazaj v čašo in umerili pH na 5,8. Po umerjanju pH smo dodali agar vsebino dobro premešali in zlili v Shoot-ove steklenice, ki so primerne za avtoklaviranje. Steklenice smo označili glede na vsebnost sladkorja ter vrsti in koncentraciji hormona s številkami od 1 do 6. Pokrove steklenic nismo popolnoma zatesnili, da je bila mogoča izmenjava pare.

Gojišča smo naložili v mrežaste kovinske košare avtoklava in jih avtoklavirali pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar, 20 minut. Ko se je gojišče nekoliko ohladilo (40-50 °C), smo ga premešali in v brezprašni komori nalili v sterilna petrijevke premera 90 mm, ki smo jih predhodno označili. Gojišča smo iz posamezne čaše nalili do polovice vsake petrijevke, jo pokrili s pokrovom in počakali da so se gojišča strdila.

3.1.4 Sterilizacija cvetov

Odpрте in zaprte cvetove smo površinsko sterilizirali v brezprašni komori s postopkom 1, 2 in 3. Uporabili smo dve različni koncentraciji razkužila: 1,66 in 2% dinatrijeva dikloroizocianurno kislino (DIA). To je 16,6 in 20 g/l. V našem primeru 0,83 in 1 g na 50 ml vode. Pri postopku 1 smo uporabili 2% dinatrijeva dikloroizocianurno kislino, pri postopkih 2 in 3 pa smo uporabili 1,66% dinatrijevo dikloroizocianurno kislino. Razkužilo smo pripravili tako, da smo v 100 ml erlenmajerico nalili 50 ml bidestilirane vode, jo pokrili z alufolijo in avtoklavirali. Zatehtali smo potrebno količino dinatrijeva dikloroizocianurne kisline in jo raztopili v pripravljeno vodi. Dodali smo 3 kapljice detergenta Tween 20 za boljšo omočljivost in oprijem. Pri prvem poskusu smo s 1. in 2. postopkom v pripravljeno razkužilo dali odprte cvetove, v 3. postopku pa zaprte cvetove (popke). Pri drugem poskusu smo razkuževali le zaprte cvetove (popke) s postopkom 3. Med razkuževanjem smo material večkrat ročno premešali z vrtenjem erlenmajeric. Po 15 minutah razkuževanja, smo cvetove zlili iz erlenmajerice na sterilno cedilo. Cvetove smo spirali z avtoklavirano bidestilirano vodo. Postopek spiranja smo ponovili trikrat, da smo čim bolj odstranili ostanke razkužila. Sterilizirane cvetove smo zračno sušili na odprti sterilni petrijevki in jih inokulirali na gojišče za zasnovo kulture oz. indukcijsko gojišče.

3.1.5 Inokulacija zaprtih in odprtih cvetov

Na sterilno indukcijsko gojišče ene petrijevke \varnothing 90x15mm smo inokulirali povprečno 5 površinsko steriliziranih cvetov. Petrijevke v katerih je bila kultura smo pred morebitno sekundarno okužbo in izhlapevanjem zaščitili s parafilmom.

3.1.6. Subkultivacija cvetov

Zaprte cvetove (popke) smo po indukciji na začetku regeneracije po približno 30 dnevih inokulacije subkultivirali na razmnoževalno gojišče v petrijevke, odvisno od datuma nastavitve posameznega poskusa. Po 40 dneh inokulacije so nastali poganjki, katere smo odrezali pri bazi in jih subkultivirali na sveže diferenciacisko gojišče v steklene kozarce s polipropilenskim pokrovom \varnothing 55x72 mm in steklene epruvete s pokrovi.

3.1.7 Rastne razmere

Cvetove in regenerante smo gojili v rastni komori pri temperaturi 24 °C in fotoperiodi, 16 ur svetloba in 8 ur tema.

3.1.8 Bonitiranje in obdelava podatkov

Bonitiranje smo opravili pri vsaki subkultivaciji po približno 30-ih dneh tako, da smo popisali okuženost materiala, število nastalih regenerantov, število propadlih regenerantov in število koreninjenih regenerantov. Zbrane podatke smo uredili tabelarično in grafično ter prikazali z opisno statistiko.

4 REZULTATI

V prvem poskusu smo inokulirali na šest različnih gojišč odprte in zaprte cvetove. Koncentracije, s katerimi so bili cvetovi razkuženi so se razlikovale, kot je prikazano v preglednici 5.

Preglednica 5: Število inokuliranih cvetov v prvem poskusu, koncentracija razkužila in čas razkuževanja

Poskus 0601 (2. 6. 2005) odprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin (razkuženo z 2% DIA, 15 min)		
številka gojišča	število petrijevok	število cvetov
#1	2	10 (5 cvetov v eni petrijevki)
#2	2	10 (5 cvetov v eni petrijevki)
#3	2	10 (5 cvetov v eni petrijevki)
#4	2	10 (5 cvetov v eni petrijevki)
#5	2	10 (5 cvetov v eni petrijevki)
#6	2	10 (5 cvetov v eni petrijevki)
Poskus 0601 (2. 6. 2005) odprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin (razkuženo z 1,66% DIA, 15 min)		
številka gojišča	število petrijevok	število cvetov
#1	2	10 (5 cvetov v eni petrijevki)
#2	2	10 (5 cvetov v eni petrijevki)
#3	2	10 (5 cvetov v eni petrijevki)
#4	2	10 (5 cvetov v eni petrijevki)
#5	2	10 (5 cvetov v eni petrijevki)
#6	2	10 (5 cvetov v eni petrijevki)
Poskus 0601 (2. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin (razkuženo z 1,66% DIA, 15 min)		
številka gojišča	število petrijevok	število cvetov
#1	1	4
#2	1	4
#3	1	4
#4	1	4
#5	1	4
#6	1	4

Po šestih dneh indukcije smo ugotovili, da so bili odprti cvetovi, kljub temu da smo jih razkužili, močno okuženi s plesnimi in bakterijami. Okuženih je bilo 46% odprtih cvetov. Zaprti cvetovi so bili razkuženi z istim razkužilom, po enakem postopku, kot odprti cvetovi, vendar pri njih ni bilo opaziti nobene okužbe. Sterilnost zaprtih cvetov v prvem poskusu je bila 100%.

Preglednica 6: Število okuženih cvetov in vrsta okužbe prvega poskusa šest dni po inokulaciji

Poskus 0601 (8. 6. 2005) odprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin (razkuženo z 2% DIA, 15 min)		
oznaka gojišča	število okuženih cvetov	vrsta okužbe
#1	10 cvetov od 10ih	plesen
#2	4 cvetovi od 10ih	bakterija
#3	5 cvetov od 10ih	plesen, bakterija
#4	5 cvetov od 10ih	plesen, bakterija
#5	5 cvetov od 10ih	plesen, bakterija
#6	6 cvetov od 10ih	plesen
Poskus 0601 (8. 6. 2005) odprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin (razkuženo z 1,66% DIA, 15 min)		
oznaka gojišča	število okuženih cvetov	vrsta okužbe
#1	1 cvet od 10ih	bakterija
#2	6 cvetov od 10ih	bakterija, plesen
#3	3 cvetovi od 10ih	plesen
#4	5 cvetov od 10ih	plesen
#5	2 cvetova od 10ih	bakterija
#6	3 cvetovi od 10ih	plesen, bakterija
Poskus 0601 (8. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin (razkuženo z 1,66% DIA, 15 min)		
oznaka gojišča	število okuženih cvetov	vrsta okužbe
#1	0 od 4ih	/
#2	0 od 4ih	/
#3	0 od 4ih	/
#4	0 od 4ih	/
#5	0 od 4ih	/
#6	0 od 4ih	/

Na podlagi tega smo se odločili, da bomo na gojišča nastavljali le zaprte cvetove (popke), saj je bilo tveganje z okužbo manjše, glede na to, da so se okužbe pojavljale na odprtih cvetovih. Petrijevke z odprtimi cvetovi smo zavrgli, obdržali smo le tiste z zaprtimi cvetovi.

V drugem poskusu, kateri so si sledili datumsko, smo na gojišče za indukcijo inokulirali le zaprte cvetove. Vse zaprte cvetove smo razkužili z enako 1,66% koncentracijo razkužila (0,83 g/50 ml destilirane avtoklavirane vode), za 15 minut po enakem postopku. Poskus smo razdelili glede na fazo cvetenja. Ene cvetne popke smo pobirali z rastlin, ki so bile v začetku cvetenja, druge z rastlin v polnem cvetenju.

Preglednica 7: Število inokuliranih cvetov v drugem poskusu

Poskus 0602 (14. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin			
gojišče	št. petrijevk	št. cvetov na petrijevko	št. vseh cvetov
#1	2	5	10
#2	2	5	10
#3	2	5	10
#4	2	5	10
#5	2	5	10
#6	2	5	10
	Σ 12		Σ 60

se nadaljuje

nadaljevanje

Poskus 0602 (14. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin			
gojišče	št. petrijevk	št. cvetov na petrijevko	št. vseh cvetov
#1	1	5	5
#2	1	5	5
#3	1	5	5
#4	1	5	5
#5	1	5	5
#6	1	5	5
	Σ 6		Σ 30
Poskus 0603 (21. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin			
gojišče	št. petrijevk	št. cvetov na petrijevko	št. vseh cvetov
#1	3	5	15
#2	3	5	15
#3	3	5	15
#4	3	5	15
#5	3	5	15
#6	3	5	15
	Σ 18		Σ 90
Poskus 0603 (21. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin			
gojišče	št. petrijevk	št. cvetov na petrijevko	št. vseh cvetov
#1	1	5	5
#2	1	5	5
#3	1	5	5
#4	1	5	5
#5	1	5	5
#6	1	5	5
	Σ 6		Σ 30
Poskus 0604 (24. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin			
gojišče	št. petrijevk	št. cvetov na petrijevko	št. vseh cvetov
#1	4	5	20
#2	4	5	20
#3	4	5	20
#4	4	5	20
#5	4	5	20
#6	4	5	20
	Σ 24		Σ 120
Poskus 0604 (24. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin			
gojišče	št. petrijevk	št. cvetov na petrijevko	št. vseh cvetov
#1	1	5	5
#2	1	5	5
#3	1	5	5
#4	1	5	5
#5	1	5	5
#6	1	5	5
	Σ 6		Σ 30

se nadaljuje

nadaljevanje

Poskus 0605 (28. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin			
gojišče	št. petrijevk	št. cvetov na petrijevko	št. vseh cvetov
#1	2	5	10
#2	2	5	10
#3	2	5	10
#4	2	5	10
#5	2	5	10
#6	2	5	10
	Σ 12		Σ 60
Poskus 0605 (28. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin			
gojišče	št. petrijevk	št. cvetov na petrijevko	št. vseh cvetov
#1	1	5	5
#2	1	5	5
#3	1	5	5
#4	1	5	5
#5	1	5	5
#6	1	5	5

Preglednica 8: Število regeneriranih cvetov po približno 30-ih dneh od inokulacije cvetnih popkov

Poskus 0601 (8 .6.2005) zaprti cvetovi v fazi začetnega cvetenja rastlin, bonitirano 42 dni po inokulaciji			
št. gojišča	št. regeneriranih cvetov	Subkultivacija cvetov iz indukcijskih na razmnoževalno gojišče	št. petrijevk po regeneraciji
#1	3 cvetovi iz 1 p	#1⇒#7	2 p
#2	2 cvetova iz 1 p	#2⇒#7	1 p
#3	1 cvet iz 1 p	#3⇒#7	1 p
#4	cvetovi potemneli	#4⇒#7	/
#5	cvetovi potemneli	#5⇒#7	/
#6	cvetovi potemneli	#6⇒#7	/
	Σ 6		Σ 4 p
Poskus 0602 (14. 6.2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin , bonitirano 36 dni po inokulaciji			
št. gojišča	št. regeneriranih cvetov	Subkultivacija cvetov iz indukcijskih na razmnoževalno gojišče	št. petrijevk po regeneraciji
#1	7 cvetov iz 2 p	#1⇒#7	4 p
#2	cvetovi potemneli	#2⇒#7	/
#3	4 cvetovi iz 1 p	#3⇒#7	1 p
#4	cvetovi potemneli	#4⇒#7	/
#5	cvetovi potemneli	#5⇒#7	/
#6	cvetovi potemneli	#6⇒#7	/
	Σ 11		Σ 5 p

se nadaljuje

nadaljevanje

Poskus 0602 (14. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin, bonitirano 36 dni po inokulaciji			
št. gojišča	št. regeneriranih cvetov	Subkultivacija cvetov iz indukcijskih na razmnoževalno gojišče	št. petrijevk po regeneraciji
#1	4 cvetovi iz 1 p	#1⇒#7	1 p
#2	1 cvet iz 1 p	#2⇒#7	1 p
#3	cvetovi potemneli	#3⇒#7	/
#4	cvetovi potemneli	#4⇒#7	/
#5	cvetovi potemneli	#5⇒#7	/
#6	cvetovi potemneli	#6⇒#7	/
	Σ 5		Σ 2 p
Poskus 0603 (21. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin, bonitirano 29 dni po inokulaciji			
št. gojišča	št. regeneriranih cvetov	Subkultivacija cvetov iz indukcijskih na razmnoževalno gojišče	št. petrijevk po regeneraciji
#1	15 cvetov iz 3 p	#1⇒#7	8 p
#2	4 cvetovi iz 2 p	#2⇒#7	1 p
#3	13 cvetov iz 3 p	#3⇒#7	3 p
#4	1 cvet iz 1 p	#4⇒#7	/ okužba
#5	cvetovi potemneli	#5⇒#7	/
#6	cvetovi potemneli	#6⇒#7	/
	Σ 33		Σ 12 p
Poskus 0603 (21. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin, bonitirano 29 dni po inokulaciji			
št. gojišča	št. regeneriranih cvetov	Subkultivacija cvetov iz indukcijskih na razmnoževalno gojišče	št. petrijevk po regeneraciji
#1	4 cvetovi iz 1 p	#1⇒#7	3 p
#2	cvetovi potemneli	#2⇒#7	/
#3	1 cvet iz 1 p	#3⇒#7	/
#4	cvetovi potemneli	#4⇒#7	/
#5	cvetovi potemneli	#5⇒#7	/
#6	cvetovi potemneli	#6⇒#7	/
	Σ 5		Σ 3 p
Poskus 0604 (24. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin, bonitirano 26 dni po inokulaciji			
št. gojišča	št. regeneriranih cvetov	Subkultivacija cvetov iz indukcijskih na razmnoževalno gojišče	št. petrijevk po regeneraciji
#1	13 cvetov iz 4 p	#1⇒#7	4 p
#2	cvetovi potemneli	#2⇒#7	/
#3	3 cvetovi iz 1 p	#3⇒#7	1 p
#4	cvetovi potemneli	#4⇒#7	/
#5	cvetovi potemneli	#5⇒#7	/
#6	cvetovi potemneli	#6⇒#7	/
	Σ 16		Σ 5 p

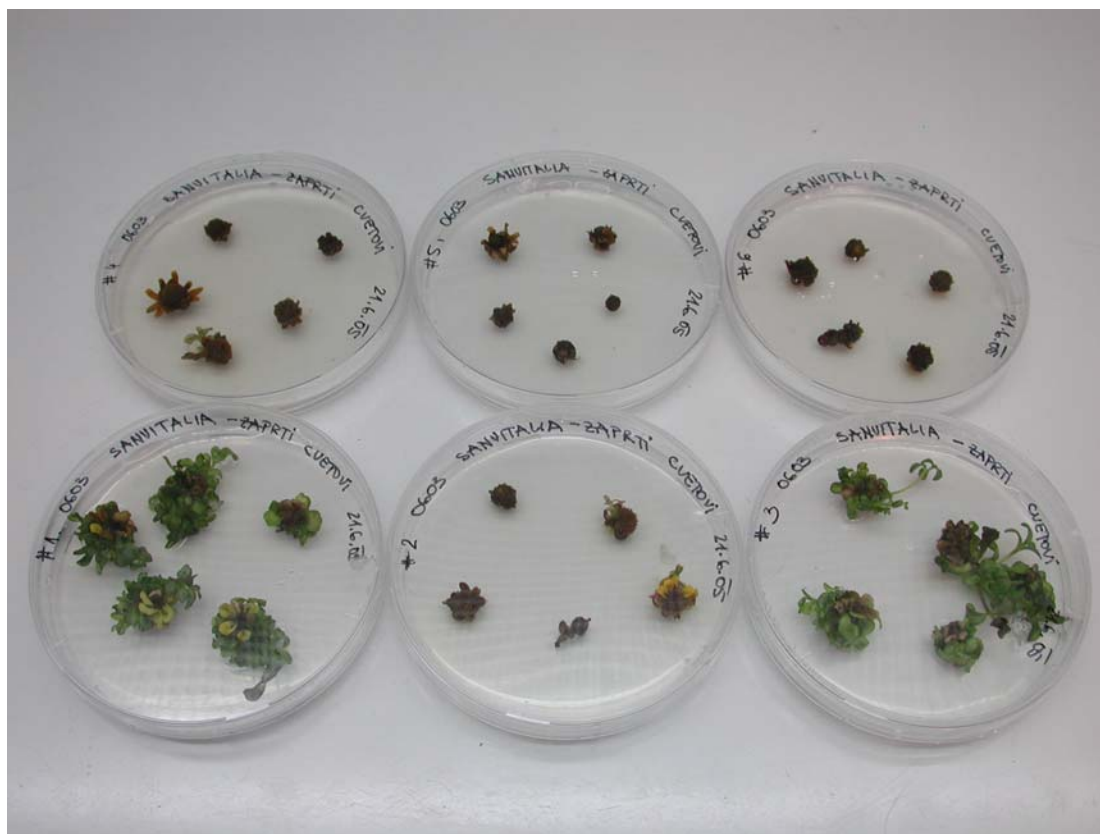
se nadaljuje

nadaljevanje

Poskus 0604 (24. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin, bonitirano 26 dni po inokulaciji			
št. gojišča	št. regeneriranih cvetov	Subkultivacija cvetov iz indukcijskih na razmnoževalno gojišče	št. petrijevk po regeneraciji
#1	1 cvet iz 1 p	#1⇒#7	1 p
#2	cvetovi požgani	#2⇒#7	/
#3	1 cvet iz 1 p	#3⇒#7	1 p
#4	cvetovi potemneli	#4⇒#7	/
#5	cvetovi potemneli	#5⇒#7	/
#6	cvetovi potemneli	#6⇒#7	/
	Σ 2		Σ 2p
Poskus 0605 (28. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin, bonitiranje 22 dni po inokulaciji			
št. gojišča	št. regeneriranih cvetov	Subkultivacija cvetov iz indukcijskih na razmnoževalno gojišče	št. petrijevk po regeneraciji
#1	6 cvetov iz 2 p	#1⇒#7	2 p
#2	1 cvet iz 1 p	#2⇒#7	1 p
#3	5 cvetov iz 2 p	#3⇒#7	1 p
#4	cvetovi potemneli	#4⇒#7	/
#5	bakterija in cvetovi potemneli	#5⇒#7	/
#6	cvetovi potemneli	#6⇒#7	/
	Σ 12		Σ 3 p
Poskus 0605 (28. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin, bonitirano 22 dni po inokulaciji			
št. gojišča	št. regeneriranih cvetov	Subkultivacija cvetov iz indukcijskih na razmnoževalno gojišče	št. petrijevk po regeneraciji
#1	4 cvetovi iz 1 p	#1⇒#7	1 p
#2	3 cvetovi iz 1 p	#2⇒#7	1 p
#3	3 cvetovi iz 1 p	#3⇒#7	1 p
#4	cvetovi potemneli	#4⇒#7	/
#5	cvetovi potemneli	#5⇒#7	/
#6	cvetovi potemneli	#6⇒#7	/
	Σ 10		Σ 3 p

Na gojišču za indukcijo, se je po približno 30-ih dneh od inokulacije, iz 474 nastavljenih zaprtih cvetov regeneriralo 100 regenerantov. 374 popkov je propadlo. Propadli popki so se razvili (odprli) v cvetove, vendar so bili potemneli in neuporabni.

Ugotovili smo da je bila indukcija zaprtih cvetov najbolj uspešna na gojišču #1 in #3, medtem ko so bila gojišča #4, #5 in #6 neuporabna oz. se na njih cvetovi niso uspešno regenerirali.



Slika 4: Potemneli cvetovi na gojiščih #4, #5 in #6, ki so propadli ter regenerirani cvetovi na gojiščih #1, #2 in #3

Po 30-ih dneh smo regenerirane cvetove iz posameznih indukcijskih gojišč prestavili na skupno razmnoževalno gojišče z oznako #7 v petrijevke.

Preglednica 9: Število in velikost poganjkov, po prestavitvi regenerantov na razmnoževalno gojišče #7

Poskus 0601 (8. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin					
#1 ⇒ #7 (2 petrijevki)					
št. skupkov	št. poganjkov	št. poganjkov			
		velikost 0-1 cm	Velikost < 1-2 cm	Velikost < 2-3 cm	Velikost <3 cm
7	55	14	32	3	6
5	26	6	13	5	2
Σ 12	Σ 81	Σ 20	Σ 45	Σ 8	Σ 8
Poskus 0601 (8. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin					
#2 ⇒ #7 (1 petrijevka)					
št. skupkov	št. poganjkov	št. poganjkov			
		velikost 0-1 cm	velikost <1-2 cm	Velikost < 2-3 cm	velikost <3 cm
Σ 5	Σ 16	Σ 6	Σ 4	Σ 3	Σ 3

se nadaljuje

nadaljevanje

Poskus 0601 (8. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin					
#3 ⇒ #7 (1 petrijevka)					
št. skupkov	št. poganjkov	št. poganjkov			
		velikost 0-1 cm	velikost <1-2 cm	velikost <2-3 cm	Velikost < 3 cm
Σ 5	Σ 17	Σ 8	Σ 6	Σ 1	Σ 2
Poskus 0602 (14. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin					
#1 ⇒ #7 (4 petrijevke)					
št. skupkov	št. poganjkov	št. poganjkov			
		velikost 0-1 cm	velikost <1-2 cm	velikost <2-3 cm	velikost <3 cm
7	28	12	12	4	0
5	20	4	6	9	1
5	23	4	8	7	4
6	34	12	11	9	2
Σ 23	Σ 105	Σ 32	Σ 37	Σ 29	Σ 7
Poskus 0602 (14. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin					
#3 ⇒ #7 (1 petrijevka)					
št. skupkov	št. poganjkov	št. poganjkov			
		velikost 0-1 cm	velikost <1-2 cm	Velikost < 2-3 cm	velikost < 3 cm
Σ 5	Σ 25	Σ 7	Σ 9	Σ 6	Σ 3
Poskus 0602 (14. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin					
#1 ⇒ #7 (1 petrijevka)					
št. skupkov	št. poganjkov	št. poganjkov			
		velikost 0-1 cm	velikost <1-2 cm	velikost <2-3 cm	velikost <3 cm
Σ 6	Σ 34	Σ 6	Σ 10	Σ 9	Σ 9
Poskus 0602 (14. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin					
#2 ⇒ #7 (1 petrijevka)					
št. skupkov	št. poganjkov	št. poganjkov			
		velikost 0-1 cm	velikost <1-2 cm	velikost <2-3 cm	velikost <3 cm
Σ 1	Σ 9	Σ 4	Σ 2	Σ 2	Σ 1
Poskus 0603 (21. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin					
#1 ⇒ #7 (8 petrijevke)					
št. skupkov	št. poganjkov	št. poganjkov			
		velikost 0-1 cm	velikost <1-2 cm	velikost <2-3 cm	velikost <3 cm
4	21	13	7	1	0
3	22	9	7	3	3
5	33	13	16	3	1
4	29	11	5	7	6
6	37	20	12	5	0
5	34	12	14	7	1
4	24	14	9	1	0
3	32	11	10	9	2
Σ 34	Σ 232	Σ 103	Σ 80	Σ 36	Σ 13
Poskus 0603 (21. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin					
#2 ⇒ #7 (1 petrijevka)					
št. skupkov	št. poganjkov	št. poganjkov			
		velikost 0-1 cm	velikost <1-2 cm	velikost <2-3 cm	velikost <3 cm
Σ 3	Σ 30	Σ 10	Σ 10	Σ 8	Σ 2

se nadaljuje

nadaljevanje

Poskus 0603 (21. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin					
#3 ⇒ #7 (3 petrijevke)					
št. skupkov	št. poganjkov	št. poganjkov			
		velikost 0-1 cm	velikost <1-2 cm	velikost <2-3 cm	velikost <3 cm
5	39	13	15	9	2
5	34	14	8	9	3
3	20	7	3	7	3
Σ 13	Σ 93	Σ 34	Σ 26	Σ 25	Σ 8
Poskus 0603 (21. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin					
#1 ⇒ #7 (3 petrijevke)					
št. skupkov	št. poganjkov	št. poganjkov			
		velikost 0-1 cm	velikost <1-2 cm	velikost <2-3 cm	velikost <3 cm
5	36	13	13	7	3
5	35	13	14	5	3
5	18	9	8	1	0
Σ 15	Σ 89	Σ 35	Σ 35	Σ 13	Σ 6
Poskus 0604 (24. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin					
#1 ⇒ #7 (3 petrijevke)					
št. skupkov	št. poganjkov	št. poganjkov			
		velikost 0-1 cm	velikost <1-2 cm	velikost <2-3 cm	velikost <3 cm
5	9	4	0	4	1
5	29	12	11	6	0
6	21	10	9	2	0
Σ 16	Σ 59	Σ 26	Σ 20	Σ 12	Σ 1
Poskus 0604 (24. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin					
#3 ⇒ #7 (1 petrijevka)					
št. skupkov	št. poganjkov	št. poganjkov			
		velikost 0-1 cm	velikost <1-2 cm	velikost <2-3 cm	velikost <3 cm
Σ 5	Σ 35	Σ 14	Σ 10	Σ 7	Σ 4
Poskus 0604 (24. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin					
#1 ⇒ #7 (1 petrijevka)					
št. skupkov	št. poganjkov	št. poganjkov			
		velikost 0-1 cm	velikost <1-2 cm	velikost <2-3 cm	velikost <3 cm
Σ 2	Σ 17	Σ 12	Σ 2	Σ 2	Σ 1
Poskus 0605 (28. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin					
#1 ⇒ #7 (2 petrijevki)					
št. skupkov	št. poganjkov	št. poganjkov			
		velikost 0-1 cm	Velikost <1-2 cm	velikost <2-3 cm	velikost <3 cm
4	23	11	8	3	1
2	11	4	3	4	0
Σ 6	Σ 34	Σ 15	Σ 11	Σ 7	Σ 1
Poskus 0605 (28. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin					
#2 ⇒ #7 (1 petrijevka)					
št. skupkov	št. poganjkov	št. poganjkov			
		velikost 0-1 cm	velikost <1-2 cm	velikost <2-3 cm	velikost <3 cm
Σ 3	Σ 17	Σ 10	Σ 2	Σ 4	Σ 1

se nadaljuje

nadaljevanje

Poskus 0605 (28. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin					
#1 ⇒ #7 (1 petrijevka)					
št. skupkov	št. poganjkov	št. poganjkov			
		velikost 0-1 cm	velikost <1-2 cm	velikost <2-3 cm	velikost <3 cm
Σ 5	Σ 18	Σ 10	Σ 6	Σ 2	Σ 0
Poskus 0605 (28. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin					
#2 ⇒ #7 (1 petrijevka)					
št. skupkov	št. poganjkov	št. poganjkov			
		velikost 0-1 cm	velikost <1-2 cm	velikost <2-3 cm	velikost <3 cm
Σ 3	Σ 15	Σ 6	Σ 3	Σ 6	Σ 0
Poskus 0605 (28. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin					
#3 ⇒ #7 (1 petrijevka)					
št. skupkov	št. poganjkov	št. poganjkov			
		velikost 0-1 cm	velikost <1-2 cm	velikost <2-3 cm	velikost <3 cm
Σ 3	Σ 16	Σ 7	Σ 6	Σ 3	Σ 0

Po 45-ih dneh se je na razmnoževalnih gojiščih (0601, 0602, 0603, 0604, 0605) pri poskusu zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin iz 130-ih skupkov razvilo 724 poganjkov, pri poskusu (0602, 0603, 0604, 0605) zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin pa se je razvilo iz nastalih 35-ih skupkov, 198 poganjkov.

Regeneriralo se je veliko število poganjkov, odločili smo se, da bomo na gojišče #8 za koreninjenje nastavili tiste poganjke, ki so bili največji in niso bili hiperhidrirani. Po bonitiranju na gojišču #7, smo poganjke prestavili na gojišče #8 za koreninjenje. Pri poskusu zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin smo na vsako gojišče nastavili po tri poganjke iz vsakega gojišča. Poganjke smo prestavili iz petrijevk v steklene kozarčke. Pri poskusu zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin pa smo zaradi manjšega števila poganjkov, le te prestavili iz posameznega gojišča v en kozarček in epruveto. Vse prestavitve so potekale v brezprašni komori, da ne bi prišlo do sekundarnih okužb.

Preglednica 10: Število nastavljenih in koreninjenih poganjkov ter velikost korenin na gojišču #8

Poskus 0601 (8. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin						
#1 ⇒ #7 ⇒ #8						
št. poganjkov		št. korenin	št. korenin velikosti			
nastavljeni	s koreninami		0-1 cm	<1-2 cm	<2-3 cm	<3 cm
3	3	10	2	3	2	3
3	2	7	1	3	3	0
Σ 6	Σ 5	Σ 17	Σ 3	Σ 6	Σ 5	Σ 3
Poskus 0601 (8. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin						
#2 ⇒ #7 ⇒ #8						
št. poganjkov		št. korenin	št. korenin velikosti			
nastavljeni	s koreninami		0-1 cm	<1-2 cm	<2-3 cm	<3 cm
3	3	13	5	4	4	0
3	2	6	2	3	1	0
Σ 6	Σ 5	Σ 19	Σ 7	Σ 7	Σ 5	Σ 0

se nadaljuje

nadaljevanje

Poskus 0601 (8. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin						
(#3⇒#7)⇒#8						
št. poganjkov		št. korenin	št. korenin velikosti			
nastavljeni	s koreninami		0-1 cm	<1-2 cm	<2-3 cm	<3 cm
3	3	11	2	4	3	2
3	2	7	3	1	2	1
Σ 6	Σ 5	Σ 18	Σ 5	Σ 5	Σ 5	Σ 3
Poskus 0602 (14. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin						
(#1⇒#7)⇒#8						
št. poganjkov		št. korenin	št. korenin velikosti			
nastavljeni	s koreninami		0-1 cm	<1-2 cm	<2-3 cm	<3 cm
3	3	21	7	11	3	0
3	3	21	6	6	7	2
Σ 6	Σ 6	Σ 42	Σ 13	Σ 17	Σ 10	Σ 2
Poskus 0602 (14. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin						
(#3⇒#7)⇒#8						
št. poganjkov		št. korenin	št. korenin velikosti			
nastavljeni	s koreninami		0-1 cm	<1-2 cm	<2-3 cm	<3 cm
3	3	10	1	5	4	0
3	1	4	1	3	0	0
Σ 6	Σ 4	Σ 14	Σ 2	Σ 8	Σ 4	Σ 0
Poskus 0602 (14. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin						
(#1⇒#7)⇒#8						
št. poganjkov		št. korenin	št. korenin velikosti			
nastavljeni	s koreninami		0-1 cm	<1-2 cm	<2-3 cm	<3 cm
3	3	9	2	3	4	0
1	0	0	0	0	0	0
Σ 4	Σ 3	Σ 9	Σ 2	Σ 3	Σ 4	Σ 0
Poskus 0602 (14. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin						
(#2⇒#7)⇒#8						
št. poganjkov		št. korenin	št. korenin velikosti			
nastavljeni	s koreninami		0-1 cm	<1-2 cm	<2-3 cm	<3 cm
3	3	10	3	3	3	1
1	1	4	1	0	3	0
Σ 4	Σ 4	Σ 14	Σ 4	Σ 3	Σ 6	Σ 1
Poskus 0603 (21. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin						
(#1⇒#7)⇒#8						
št. poganjkov		št. korenin	št. korenin velikosti			
nastavljeni	s koreninami		0-1 cm	<1-2 cm	<2-3 cm	<3 cm
3		15	9	4	2	0
0		0	0	0	0	0
Σ 3		Σ 15	Σ 9	Σ 4	Σ 2	Σ 0
Poskus 0603 (21. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin						
(#2⇒#7)⇒#8						
št. poganjkov		št. korenin	št. korenin velikosti			
nastavljeni	s koreninami		0-1 cm	<1-2 cm	<2-3 cm	<3 cm
3	3	8	4	1	3	0
3	0	0	0	0	0	0
Σ 6	Σ 3	Σ 8	Σ 4	Σ 1	Σ 3	Σ 0

se nadaljuje

nadaljevanje

Poskus 0603 (21. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin						
(#3⇒#7)⇒#8						
št. poganjkov		št. korenin	št. korenin velikosti			
nastavljeni	s koreninami		0-1 cm	<1-2 cm	<2-3 cm	<3 cm
3	2	7	2	2	3	0
3	0	0	0	0	0	0
Σ 6	Σ 2	Σ 7	Σ 2	Σ 2	Σ 3	Σ 0
Poskus 0603 (21. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin						
(#1⇒#7)⇒#8						
št. poganjkov		št. korenin	št. korenin velikosti			
nastavljeni	s koreninami		0-1 cm	<1-2 cm	<2-3 cm	<3 cm
3	3	8	2	6	0	0
1	1	6	1	5	0	0
Σ 4	Σ 4	Σ 14	Σ 3	Σ 11	Σ 0	Σ 0
Poskus 0604 (24. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin						
(#1⇒#7)⇒#8						
št. poganjkov		št. korenin	št. korenin velikosti			
nastavljeni	s koreninami		0-1 cm	<1-2 cm	<2-3 cm	<3 cm
3	3	7	5	0	2	0
3	2	8	3	5	0	0
Σ 6	Σ 5	Σ 15	Σ 8	Σ 5	Σ 2	Σ 0
Poskus 0604 (24. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin						
(#3⇒#7)⇒#8						
št. poganjkov		št. korenin	št. korenin velikosti			
nastavljeni	s koreninami		0-1 cm	<1-2 cm	<2-3 cm	<3 cm
3	3	11	3	5	3	0
3	2	5	1	2	2	0
Σ 6	Σ 5	Σ 16	Σ 4	Σ 7	Σ 5	Σ 0
Poskus 0604 (24. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin						
(#1⇒#7)⇒#8						
št. poganjkov		št. korenin	št. korenin velikosti			
nastavljeni	s koreninami		0-1 cm	<1-2 cm	<2-3 cm	<3 cm
3	2	7	1	3	3	0
1	0	0	0	0	0	0
Σ 4	Σ 2	Σ 7	Σ 1	Σ 3	Σ 3	Σ 0
Poskus 0605 (28. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin						
(#1⇒#7)⇒#8						
št. poganjkov		št. korenin	št. korenin velikosti			
nastavljeni	s koreninami		0-1 cm	<1-2 cm	<2-3 cm	<3 cm
3	3	12	3	4	5	0
3	3	10	1	4	3	2
Σ 6	Σ 6	Σ 22	Σ 4	Σ 8	Σ 8	Σ 2
Poskus 0605 (28. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin						
(#2⇒#7)⇒#8						
št. poganjkov		št. korenin	št. korenin velikosti			
nastavljeni	s koreninami		0-1 cm	<1-2 cm	<2-3 cm	<3 cm
3	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0
Σ 4	Σ 0	Σ 0	Σ 0	Σ 0	Σ 0	Σ 0

se nadaljuje

nadaljevanje

Poskus 0605 (28. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin						
(#1⇒#7)⇒#8						
št. poganjkov		št. korenin	št. korenin velikosti			
nastavljeni	s koreninami		0-1 cm	<1-2 cm	<2-3 cm	<3 cm
3	3	15	0	5	4	6
1	0	0	0	0	0	0
Σ 4	Σ 3	Σ 15	Σ 0	Σ 5	Σ 4	Σ 6
Poskus 0605 (28. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin						
(#2⇒#7)⇒#8						
št. poganjkov		št. korenin	št. korenin velikosti			
nastavljeni	s koreninami		0-1 cm	<1-2 cm	<2-3 cm	<3 cm
3	2	11	0	3	4	4
1	0	0	0	0	0	0
Σ 4	Σ 2	Σ 11	Σ 0	Σ 3	Σ 4	Σ 4
Poskus 0605 (28. 6. 2005) zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin						
(#3⇒#7)⇒#8						
št. poganjkov		št. korenin	št. korenin velikosti			
nastavljeni	s koreninami		0-1 cm	<1-2 cm	<2-3 cm	<3 cm
3	2	10	10	0	0	0
1	1	3	1	0	0	2
Σ 4	Σ 3	Σ 13	Σ 11	Σ 0	Σ 0	Σ 2

Po 30-ih dneh od prestavitve iz razmnoževalnega gojišča #7 na gojišče #8 za koreninjenje je pri poskusu zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin (0601, 0602, 0603, 0604, 0605) od skupno 72-ih poganjkov koreninilo 49 poganjkov, pri poskusu zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin (0602, 0603, 0604, 0605) pa je od skupno 28-ih koreninilo 21 poganjkov.

Po 45-ih dneh od prestavitve regenerantov na gojišče #8, smo koreninjene poganjke predstavili v mini rastlinjak na aklimatizacijo.

Po 21-ih dneh smo rastline predstavili iz mini rastlinjakov v lončke. Pri poskusu zaprti cvetovi v fazi začetka cvetenja rastlin (0601, 0602, 0603, 0604, 0605) je propadlo 9 rastlin, pri poskusu zaprti cvetovi v fazi polnega cvetenja rastlin (0602, 0603, 0604, 0605) so propadle 4 rastline.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V poskusu mikropropagacije smo sprva vključili zaprte in odprte cvetove v fazi začetka cvetenja rastlin. Po končanem inokuliranem prvem poskusu, pa smo na gojišče za indukcijo inokulirali le zaprte cvetove, katere smo razdelili glede na cvetenje v fazo začetka cvetenja rastlin in fazo polnega cvetenja rastlin. Rastlinski material smo poleti 2005 nabirali v rastlinjaku Biotehniške fakultete. V laboratoriju smo v prvem poskusu, cvetove površinsko sterilizirali z dvema (1,66% in 2% DIA) različnima koncentracijama razkužila s postopki 1, 2 in 3. V vseh naslednjih poskusih smo na gojišče inokulirali le zaprte cvetove, katera smo razkužili s postopkom 3 (vedno in za vse enaka koncentracija razkužila). Po razkuževanju smo cvetove, odvisno od nastavitve posameznega poskusa, za 30 dni inokulirali na indukcijsko gojišče. Vse rastline smo po 45-ih dneh subkultivirali na razmnoževalno gojišče.

5.1.1 Sterilizacija odprtih in zaprtih cvetov

V prvem poskusu smo sterilizacijo odprtih in zaprtih cvetov, ki so bili pobrani v začetni fazi cvetenja rastlin, opravili s postopkom 1, 2 in 3. V postopku 1 smo odprte cvetove razkuževali 15 minut z 2% dinatrijevo dikloroizocianurno kislino (DIA), v postopku 2 smo prav tako razkuževali odprte cvetove 15 minut, vendar smo uporabili 1,66% DIA. V postopku 3 smo zaprte cvetove razkuževali 15 minut z 1,66% dinatrijevo dikloroizocianurno kislino. Pri drugem poskusu smo sterilizirali zaprte cvetove, ki so bili v začetni in polni fazi cvetenja s postopkom 3 (1,66% DIA, 15 minut).

5.1.2 Hormonska sestava gojišč

Za indukcijo smo uporabili šest različnih gojišč, na vsako gojišče smo skupno inokulirali 59 zaprtih cvetov rastlin, ki so bile v fazi začetka cvetenja in 20 zaprtih cvetov rastlin, ki so bili v fazi polnega cvetenja rastlin. Izkazalo se je, da je izmed šestih različnih gojišč za indukcijo, najboljše gojišče #1 z dodatkom 1,0 mg/l BAP in 10 g/l saharoze. Na njem je zraslo največ poganjkov iz cvetov, pa tudi regeneracija cvetov je bila visoka. V fazi začetka cvetenja rastlin je bila 75%, v fazi polnega cvetenja pa 65%.

Na gojišču #3 z dodatkom 0,15 mg/l BAP in 10 g/l saharoze je bila regeneracija cvetov nekoliko slabša, poganjke je tvorilo v fazi začetka cvetenja 44% cvetov, v polnem cvetenju pa 25% cvetov. Na gojišču #2, kjer je bil dodan 1,0 g/l BAP in 40 g saharoze, je poganjke tvorilo v začetku cvetenja 12% cvetov, v fazi polnega cvetenja pa 20% cvetov.

Gojišče #4, kateremu smo dodali 0,15 mg/l BAP in 40 g/l saharoze, se je odzvalo precej slabo. Cvetovi so bili vitrificirani in uničeni.

Na gojiščih #5 in #6, kjer sta bila uporabljena v kombinaciji BAP (0,15 mg/l) in 2,4-D (1,0 mg/l) z različnimi koncentracijami saharoze, ni bilo prisotne regeneracije cvetov. Cvetovi so bili potemneli.

Regenerirane cvetove iz gojišč #1, #2 in #3 smo predstavili na razmnoževalno gojišče #7, kateremu smo dodali hormona BAP in IBA (preglednica 3). Tovrstna kombinacija citokinina in avksina se je izkazala za zelo dobro, saj se je na gojišču razvilo skupno 922 poganjkov.

Poganjke smo predstavili na gojišče #8, kateremu smo dodali le IBA in saharozo (preglednica 3). Po 30-ih dneh od predstavitve poganjkov smo ugotovili, da je uspešno koreninilo 70 poganjkov, 30 jih je propadlo. Uspešno koreninjene vitalne poganjke smo aklimatizirali v mini rastlinjakih.

5.2 SKLEPI

Po razkuževanju odprtih cvetov v prvem poskusu s postopkom 1 (15 minut z 2% DIA) in postopkom 2 (15 minut z 1,66% DIA) je bilo uspešno razkuženih le 46% cvetov. Zaradi hitre širitve in velike prisotnosti okužb s plesnijo in bakterijami, smo se odločili, da odprti cvetovi niso primerni za nadaljevanje poskusa.

Pri razkuževanju zaprtih cvetov smo v prvem poskusu s postopkom 3 (15 minut z 1,66% DIA) dobili očitno boljše rezultate, saj je bila sterilnost 100%. Na podlagi tega, smo se odločili, da bomo v nadaljevanju v drugem poskusa na gojišče inokulirali le zaprte cvetove, katere smo razkuževali s postopkom 3.

V drugem poskusu, so na indukcijskih gojiščih #1, #2 in #3 samo nekateri cvetovi potemneli, medtem ko okuženih ni bilo. Prav tako, ni bilo nobenih okužb na gojiščih #4, #5 in #6, vendar so skoraj vsi cvetovi potemneli.

Na gojišču #1 (1,0 mg/l BAP, 10 g/l saharoze) je po 30-ih dneh od inokulacije, v fazi začetka cvetenja rastlin tvorilo poganjke 75% cvetov, v fazi polnega cvetenja pa 65% cvetov. Na gojišču #3 (0,15 mg/l BAP, 10 g/l saharoze) je tvorilo poganjke v fazi začetka cvetenja rastlin 44% cvetov, v fazi polnega cvetenja rastlin pa 25% cvetov. Na gojišču #2 (1,0 mg/l BAP, 40 g/l saharoze) je tvorilo poganjke v fazi začetka cvetenja 12% cvetov, v

fazi polnega cvetenja rastlin je tvorilo poganjke 20% cvetov. Na gojišču #4 (0,15 mg/l BAP, 10 g/l saharoze) je tvoril poganjke 1,69% cvetov.

Na gojišču #5 (0,15 mg/l BAP, 1,0 mg/l 2,4-D 10 g/l saharoze) in #6 (0,15 mg/l BAP, 1,0 mg/l 2,4-D, 40 g/l saharoze), po 30-tih dneh ni tvoril poganjke noben cvet.

Na razmnoževalnem gojišču #7 (0,3 mg/l BAP, 0,5 mg/l IBA in 40 g/l saharoze), je bilo prestavljenih 165 skupkov, iz teh je po 45-ih dneh nastalo 922 poganjkov.

Na gojišču za koreninjenje #8 smo nastavili le tiste poganjke, ki niso bili hiperhidrirani in so bili največji. Tako je od 100-ih poganjkov (0,5 mg/l IBA, 40 g/l saharoze) po 30-ih dneh razvilo korenine 70% poganjkov.

6 POVZETEK

Previsna sanvitalija je rastlina enoletnica, katero običajno razmnožujemo generativno s semeni. Namen naloge je bil s pomočjo tkivne kulture - mikropropagacije, vzpostaviti sistem, ki bi bil uporaben v okrasnem vrtnarstvu za hitrejše in enostavnejše razmnoževanje rastlin. Rastlinski material je lahko okužen z glivami in bakterijami, zato je uspešen način razkuževanja zelo pomemben, da mikropropagacija uspe. Vsi postopki dela so potekali v komori za aseptično delo. Cilj naše naloge je bil tudi pridobiti aseptično kulturo cvetov in vzgojiti vitalne poganjke, ki bi bili primerni za koreninjenje in aklimatizacijo.

V poskus mikropropagacije smo vključili odprte in zaprte cvetove previsne sanvitalije, sorte 'Aztekengold'. Cvetove smo nabirali v rastlinjaku Biotehniške fakultete v Ljubljani in jih nato v laboratoriju pripravili za mikropropagacijo.

Cvetove in regenerante smo gojili v rastni komori pri temperaturi 24°C in fotoperiodi 16/8 ur (svetloba/tema).

V prvem poskusu s postopkoma 1 in 2 (2% in 1,66% dinatrijeva dikloroizocianurna kislina, 15 minut) smo pri odprtih cvetovih dosegli 54% sterilizacijo, vendar smo vse petrijevke z odprtimi cvetovi zavrgli. Pri zaprtih cvetovih s postopkom 3 (1,66% diklorocianurna kislina, 15 min) je bila sterilizacija cvetov zelo uspešna, saj je bila 100%. V 2. poskusu s postopkom 3 (1,66% dinatrijeva dikloroizocianurna kislina, 15 min) smo pri zaprtih cvetovih dosegli 21% sterilizacijo.

V prvem poskusu je bilo na indukcijsko gojišče inokuliranih 120 odprtih cvetov in 24 zaprtih cvetov (popkov). Po šestih dneh je propadlo kar 55 odprtih cvetov. Cvetovi so bili okuženi s plesnimi, bakterijami ali pa v kombinaciji obeh hkrati. Pri zaprtih cvetovih je bila sterilizacija 100%, kar pomeni, da ni propadel noben cvet.

V drugem poskusu smo rastline razdelili glede na fazo cvetenja na rastline, ki so bile v začetni fazi cvetenja in rastline, ki so bile v polnem cvetenju. Na indukcijsko gojišče smo inokuliranih skupno 450 zaprtih cvetov, 330 zaprtih cvetov rastlin v začetni fazi cvetenja in 120 zaprtih cvetov rastlin v polni fazi cvetenja.

Kljub temu, da je propadlo veliko število cvetov je bila regeneracija na gojišču za razmnoževanje, kjer smo uporabili hormona IBA in BAP (preglednica 3) visoka, skupno se je iz cvetov tvorilo 922 poganjkov. Na gojišču #8 za koreninjenje smo uporabili hormon IBA (preglednica 3), koreninilo je 70% poganjkov, ostali so bili uničeni zaradi hiperhidracije.

Po 45-ih dneh od predstavitve na gojišče za koreninjenje, smo poganjke pripravili na aklimatizacijo v mini rastlinjakih. Aklimatizacija je potekala brez zapletov, tako da je bil namen naloge, pri kateri smo poskušali vzgojiti čim večje število poganjkov, kateri bi bili po končani aklimatizaciji primerni za sajenje v *in vivo* razmerah dosežen.

7 VIRI

- Batič F., Šircelj H., Turk B. 2004. Pregled rastlinskega sistema. Ljubljana, Skripta: 118 str.
http://bf.uni-lj.si/ag/botanika/gradiva/AGR_ZOO_VET_Pregled%20sistema_Skripta.pdf (27. jul. 2007)
- Bohanec B. 1992. Tehnike rastlinskih tkivnih kultur. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Center za rastlinsko biotehnologijo in žlahtnenje rastlin: 168 str.
- Cornell University. 2006. Growing guide.
<http://www.gardening.cornell.edu/homegardening/scene39b9.html> (16. jul. 2007)
- George E. F. G. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. The Tehnology, Exegetics Limited: 574 str.
- Gilman E. F., Howe T. 1999. *Sanvitalia procumbens* University of Florida, Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences.
<http://hort.ifas.ufl.edu/shrubs/SANPROA.PDF> (23. maj 2007)
- Krajncič B. 2001. Botanika, razvojna in funkcionalna morfologija z anotonijo. Maribor, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo: 452 str.
- Mackey B.B. *Sanvitalia*, Creeping Zinnia. 1998 – 2007.
<http://home.howstuffworks.com/define-sanvitalia-creeping-zinnia.htm> (16. jul. 2007)
- Missouri botanical garden 2001-2007. Kemper center for home gardening.
<http://www.mobot.org/gardeninghelp/plantfinder/Plant.asp?code=A607>
(16. jul. 2007)
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologie Plantarum* 15: 473-497
- Petauer T., Ravnik V., Šuštar F. 1998. Mali leksikon botanike. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 151 str.

Ravnikar M. 1996. Rastlinske tkivne kulture. V: Biotehnologija. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 71-86

Sinkovič T. 2000. Uvod v botaniko. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 148 str.

Sojar M. 1972. Vrtne enoletnice. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 134 str.

The compleat botanica. 2004. *Sanvitalia procumbens* "Mandarin orange".
<http://www.crescentbloom.com/plants/Specimen/SA/Sanvitalia%20procumbens%20Mandarin%20Orange.htm> (16. jul. 2007)

Vrsta (biologija) iz wikipedije, proste enciklopedije.
[http://sl.wikipedia.org/wiki/Vrsta_\(biologija\)](http://sl.wikipedia.org/wiki/Vrsta_(biologija)) (27. jul. 2007)

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Borutu Bohancu za pridobljeno znanje in pomoč pri izdelavi diplomske naloge in dr. Manji Tini Bastar za pomoč pri izvedbi poskusa.

Iskreno se zahvaljujem tudi članici komisije izr. prof. dr. Zlati Luthar in predsedniku komisije Akademiku prof. dr. Ivanu Kreftu, za pregled in popravilo diplomskega dela.

Zahvaljujem se vsem, ki so mi kakorkoli pomagali med samim študijem na fakulteti in mi bili v pomoč pri pisanju diplomskega dela.