



Univerza v Mariboru

Fakulteta za naravoslovje
in matematiko

Laboratorijski priročnik za delo z rastlinskimi tkivnimi kulturami, s poudarkom na mikropropagaciji

Laboratorij za fiziologijo rastlin



Avtorica:

dr. Jana Ambrožič-Dolinšek



Univerzitetna založba
Univerze v Mariboru



Laboratorijski priročnik za delo z rastlinskimi tkivnimi kulturami, spoudarkom na mikropropagaciji

Laboratorij za fiziologijo rastlin

Avtorica:

dr. Jana Ambrožič-Dolinšek

Avgust 2017

- Naslov:** Laboratorijski priročnik za delo z rastlinskimi tkivnimi kulturami, s poudarkom na mikropropagaciji
- Podnaslov:** Laboratorij za fiziologijo rastlin
- Avtorica:** doc. dr. Jana Amrožič-Dolinšek (Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko)
- Strokovna recenzija:** izr. prof. dr. Metka Šiško (Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede)
doc. dr. Andreja Urbanek Krajnc (Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede)
- Jezikovna recenzija:** Mojca Garantini, univ. prof. slov. j. in knjiž.
- Oblikovanje ovitka:** Jan Perša, mag. inž. prom. (Univerzitetna založba Univerze v Mariboru)
- Prelom in oblikovanje:** doc. dr. Jana Amrožič-Dolinšek (Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko)
- Avtorica fotografij:** asist. dr. Terezija Ciringer (Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko)
- Avtorica slik:** doc. dr. Jana Amrožič-Dolinšek (Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko)

Izdajateljica:

Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko
Koroška cesta 160, 2000 Maribor, Slovenija
tel. +386 2 320 90 00, faks +386 2 616 11 58
<http://www.fkbv.um.si>, fkbv@um.si

Založnik:

Univerzitetna založba Univerze v Mariboru
Slomškov trg 15, 2000 Maribor, Slovenija
tel. +386 2 229 38 44, faks +386 2 251 81 80
<http://press.um.si>, zalozba@um.si

Naklada: 50

Tisk: Tiskarna Saje d. o. o.

Izid: Avgust 2017

© Univerzitetna založba Univerze v Mariboru

Vse pravice pridržane. Brez pisnega dovoljenja založnika je prepovedano reproduciranje, distribuiranje, predelava ali druga uporaba tega dela ali njegovih delov v kakršnemkoli obsegu ali postopku, vključno s fotokopiranjem, tiskanjem ali shranjevanjem v elektronski obliki.

CIP - Kataložni zapis o publikaciji
Univerzitetna knjižnica Maribor

ISBN: 978-961-286-072-1

DOI: <https://doi.org/10.18690/978-961-286-072-1>

Cena: 10,00 €

Odgovorna oseba založnika: prof. dr. Igor Tičar, rektor Univerze v Mariboru

Laboratorijski priročnik za delo z rastlinskimi tkivnimi kulturami, s poudarkom na mikropropagaciji / Laboratorij za fiziologijo rastlin /

Povzetek:

Laboratorijski priročnik je namenjen tistim, ki vstopajo v svet rastlinskih tkivnih kultur in delujejo na področju rastlinske biotehnologije. Nastal je za potrebe študijskega procesa in predmetov, povezanih z rastlinskimi tkivnimi kulturami in mikropropagacijo. Odgovoril bo na vprašanja: »Kaj je tkivna kultura? Kako poteka pri rastlinah? Ali je mikropropagacija nekaj, kar zmorem in znam narediti? In kako naj se tega lotim?«. Predstavljene so osnovne tehnike s primeri. Priložen je terminološki slovar z definicijami izrazov uporabljenih v besedilu.

Ključne besede: laboratorijski priročnik, rastline, tkivne kulture, mikropropagacija

Laboratory manual for plant tissue culture, with an emphasis on micropropagation / Laboratory for plant physiology /

Abstract:

The laboratory manual was prepared for those who are entering the world of plant tissue culture and starting to work in this field of plant biotechnology. It is devoted to the study process and subjects associated with plant tissue culture and micropropagation. It will answer the following questions: "What is tissue culture? How it is connected with plants? Is micropropagation something I can do and that I know how to do? How do I deal with this?" The basic techniques are introduced, along with examples. It includes a terminology glossary with definitions of the terms used in the text.

Key words: laboratory manual, plant, tissue culture, micropropagation

KAZALO VSEBINE

SPREMNA BESEDA	iii
1 PREDSTAVITEV TEHNIKE TKIVNE KULTURE IN MIKROPROPAGACIJE	1
1.1 Pregled in značilnosti tehnike tkivnih kultur in gojenja <i>in vitro</i>	2
1.1.1 Dejavniki gojenja rastlin v tkivni kulturi	2
1.1.2 Zgoraj naštetih dejavnikov morajo omogočati morfogogenetske procese:.....	3
1.1.3 Celična totipotentnost in regeneracija rastlin.....	3
1.1.4 Ko je vcepek v tkivni kulturi, sledi organizirana ali neorganizirana rast.....	4
1.1.5 Uravnavanje organogeneze.....	4
1.2 Sistemi mikropropagacije	6
1.2.1 Tkivne kulture lahko imenujemo glede na to, kateri izseček uporabimo kot vcepek	8
1.3 Stopnje mikropropagacije	12
1.3.1 Selekcija – izbor in priprava matičnih rastlin (Stopnja 0)	12
1.3.2 Inicijacija - vzpostavljanje sterilne kulture (Stopnja 1).....	12
1.3.3 Multiplikacija - razmnoževanje rastlin do zelenega števila (Stopnja 2)	13
1.3.4 Elongacija - podaljševanje brstov v poganjke, ukoreninjanje, priprava za prenos v naravne <i>ex vivo</i> razmere (Stopnja 3).....	13
1.3.5 Aklimatizacija - prenos rastlin v zemljo, v nesterilne naravne razmere in postopno prilagajanje na manjšo vlažnost (Stopnja 4).....	13
2 SPLOŠNA METODOLOGIJA.....	14
2.1 Laboratorij: načrtovanje, pripomočki, oskrba	14
2.2 Aseptična tehnika dela	15
2.2.1 Parni sterilizator	15
2.2.2 Brezprašna komora - laminarij	19
2.2.3 Vzdrževanje čistoče	20
2.2.4 Sterilizacija orodja	20
2.2.5 Sterilizacija gojišč.....	21
2.2.6 Sterilizacija rastlinskega materiala (glejte tudi poglavje 2.3 Priprava gojišč).....	21
2.2.7 Rastna komora.....	22
2.2.8 Po koncu kulture.....	23
2.2.9 Omejitve pri delu.....	23
2.3 Priprava gojišč	24
2.3.1 Priprava koncentriranih osnovni raztopin (OR).....	24
2.3.2 Priprava gojišč - splošni postopek	30
2.3.3 Protokol za pripravo gojišča za tkivno kulturo	32

2.4	Splošni napotki za vzpostavljanje (iniciacija) kulture, prestavljanje (subkultivacija) in prenos v zemljo (aklimatizacija)	33
2.4.1	Splošni postopek za varno delo v brezprašni komori	33
2.4.2	Splošni postopek za vzpostavljanje - iniciacijo kulture.....	34
2.4.3	Prenos rastlin <i>ex vitro</i> - aklimatizacija	34
3	Protokoli za mikropropagacijo nekaterih rastlinskih vrst.....	36
4	Splošna literatura:	41
5	Priloge.....	42
6	Terminološki slovar TKIVNE KULTURE	47
	KAZALO SLIK.....	52
	KAZALO PREGLEDNIC.....	53

SPREMNA BESEDA

Priročnik smo pripravili za tiste, ki šele vstopajo v svet rastlinskih tkivnih kultur (TK) in začenjajo delovati na tem zanimivem in vsestransko uporabnem področju rastlinske biotehnologije. Nastal je za potrebe študijskega procesa in predmetov, povezanih z rastlinskimi tkivnimi kulturami in mikropropagacijo. Zanimiv bo za vse tiste, ki jih zanimajo tale vprašanja: »Kaj je tkivna kultura? Ali je mikropropagacija nekaj, kar zmorem in znam narediti? In kako naj se je lotim?«. Za kaj več pa bo treba poseči po drugih virih, ki so navedeni na koncu tega priročnika. Priložen je tudi terminološki slovar z definicijami izrazov, uporabljenih v besedilu.

Sama tehnika tkivne kulture se v zadnjih 20 letih ni veliko spreminjala. V osnovi temelji na sterilnem delu, definiranih gojiščih in definiranih pogojih kulture rastlin in njihovih delov. Je osnovna tehnika za hitro razmnoževanje rastlin in zato komercialno pomembna, po drugi strani pa omogoča raziskovalno delo, saj je osnovna tehnika za številne novejši biotehnološke prakse, med drugim tudi gensko spreminjanje organizmov.

Dopolnilo temu priročniku je priročnik za delo v laboratoriju (Pipenbaher in Ambrožič-Dolinšek, 2014), ki je prosto dostopen na spletni strani Oddelka za biologijo. Študentka ali študent (v nadaljevanju: študent) biologije in/ali ekologije z naravovarstvom mora biti pred pričetkom del v laboratoriju seznanjen z vsebino tega priročnika in ga mora med laboratorijsko prakso dosledno upoštevati. Tudi zato, ker z ustreznim ravnanjem s kemikalijami in z laboratorijsko opremo varuje sebe in druge pred poškodbami in drugimi zdravstvenimi tveganji. Neupoštevanje teh pravil pomeni neodgovorno početje, ki lahko ogrozi zdravje in celo življenje vseh prisotnih v laboratoriju ali povzroči znatno materialno škodo. Laboratorija za fiziologijo rastlin sta dva: v prostorih 0/58, 0/54 in 0/53.

Vsem udeležencem laboratorijskega dela želim uspešno in varno delo z rastlinskim materialom!

Avtorica

1 PREDSTAVITEV TEHNIKE TKIVNE KULTURE IN MIKROPROPAGACIJE

Rastlinske tkivne kulture so mnogostranske tehnike, kar pomeni, da omogočajo zelo široko uporabo, ta pa sega od razmnoževanja rastlin v improviziranem laboratoriju domače kuhinje do zahtevnega znanstvenega dela v posebej za to prirejenih laboratorijih. Zanimive so za ljubiteljske posameznike, ki v prostem času razmnožujejo orhideje, za milijonsko industrijsko proizvodnjo sobnih, okrasnih, kmetijsko in gozdarsko pomembnih rastlin, ter za raziskovalno delo, saj omogoča fiziološke, anatomske, morfološke in druge študije. So torej komercialno in znanstveno zanimive. V komercialnem pomenu se največkrat uporabljajo za hitro, vegetativno razmnoževanje rastlin, ki ga imenujemo »mikropropagacija« in je tema večjega dela tega priročnika.

Izraz rastlinske tkivne kulture vključuje vse od razmnoževanja celih rastlin do njihovih izoliranih delov, tkiv in posameznih celic. Po širši definiciji so tkivne kulture tehnike gojenja celih rastlin, organov, tkiv ali posameznih celic na definiranih trdih ali tekočih gojiščih v laboratorijskih, sterilnih razmerah – *in vitro* (Georg 1993). Lahko pa so definirane kot tehnike gojenja celih rastlin, organov, tkiv ali celic v sterilnih, laboratorijskih, prehransko in okoljsko definiranih razmerah, kjer hranila in dejavniki okolja zagotavljajo optimalne pogoje za rast in razvoj rastlin *in vitro* (Bui-Van, 2009). V ožjem pomenu je edini tip rastlinske tkivne kulture kultura kalusa. Kalus je nediferencirano tkivo. Proizvodi, nastali s tkivnimi kulturami, so kloni matične rastline, kar pomeni, da imajo enak genotip kot matična rastlina (razen če tekom kulture na ta genotip ne delujejo mutacije).

Tkivne kulture vedno vključujejo sterilno (aseptično) delo, zato so kulture praviloma neokužene (aseptične) in proste mikroorganizmov in škodljivcev, ki lahko povzročijo bolezenske spremembe. Rastline rastejo na definiranih gojiščih in v kontroliranih razmerah, kjer temperatura, vlažnost, čas osvetlitve (fotoperioda), intenziteta in kakovost svetlobe in hranila v gojiščih zagotavljajo idealno okolje za rast in razvoj rastlin.

Tehnike tkivnih kultur niso nekaj novega. Komercialno so jih prvič uporabili 1950 za simbiotsko kalitev in rast orhidej, svoj največji razmah pa so dosegle v šestdesetih letih z razvojem hranilnega gojišča MS (Murashige in Skoog, 1962) in drugih. Danes jih uporabljamo za: hitro vegetativno razmnoževanje rastlin ali mikropropagacijo, hrambo ali ohranjanje zbirk rastlinskega materiala, odstranjevanje oziroma eliminacijo virusov in drugih patogenov, izboljševanje lastnosti rastlin (žlahtnjenje rastlin) s križanjem in umetnim izborom, kulturo pelodnih zrn (anter) in semenskih zasnov, haploidnih rastlin, izolacijo protoplastov, kulturo embrijev, proizvodnjo sekundarnih metabolitov, selekcijo celic, mutagenezo, temeljne raziskave rastlinske anatomije, fiziologije, rasti, razvoja, mineralne prehrane,

somatsko embriogenezo, proizvodnjo sintetičnih semen, kalusno kulturo in kulturo cveta, ter gensko spreminjanje organizmov.

1.1 Pregled in značilnosti tehnike tkivnih kultur in gojenja *in vitro*

1.1.1 Dejavniki gojenja rastlin v tkivni kulturi

Zelo na splošno so dejavniki, ki vplivajo na izid gojenja v tkivni kulturi, naslednji: izbran rastlinski material, sterilni pogoji dela, ustrezno sestavljeno gojišče (heterotrofni ali miksotrofni metabolizem) in definirani pogoji gojenja.

1.1.1.1 Ustrezno tkivo (*izseček, explant*)

Ustrezno izbran rastlinski material je najpomembnejši dejavnik. Pomembni so njegov izvor, starost, pogoji njegovega predhodnega gojenja, nastanek in tip izsečka, lega na rastlini in še nekateri drugi vidiki, pomembni za vegetativno razmnoževanje rastlinski material. Tkivno kulturo lahko začnete s številnimi zelo različnimi vcepki, najpogosteje z zalistnimi brsti in meristemi.

Izseček (*explant*): Rastlinske celice, tkivo ali organ, ki ga izolirate z matične rastline. Izseček lahko nato uporabite za začetek *in vitro* kulture. V tkivni kulturi najpogosteje uporabljamo zalistne brste in meristeme.

Vcepek (*inokulum*): Rastlinske celice, tkivo ali organ, ki ga prenesete v gojišče. Vcepek je tisti izseček, ki ga uporabite za začetek *in vitro* kulture.

1.1.1.2 Sterilnost (*aseptičnost*)

Izseček sterilizirate zato, da onemogočite okužbe z mikroorganizmi. Sterilizacija običajno poteka s kemijsko površinsko sterilizacijo s kemikalijami, kot so natrijev hipoklorit (NaOCl), vodikov peroksid (H₂O₂) in drugi. Pri tem morate izbrati čas trajanja sterilizacije in koncentracijo sterilizanta, ki uniči ali odstrani patogene, zato da vcepek preživi in ohrani sposobnost rasti in diferenciacije.

1.1.1.3 Ustrezno kompleksno sestavljeno gojišče, ki omogoča heterotrofni (ali miksotrofni) metabolizem

Ko je izseček izoliran, ni več zmožen sprejemati hranil ali hormonov iz rastlin, zato jih mora zagotoviti gojišče, ki nato omogoči rast *in vitro*. Izseček zato vcepate na ali v gojišče. Ko je na ali v gojišču, ga imenujemo vcepek. Vcepki za rast potrebujejo kompleksno sestavljena gojišča in že sintetizirane organske snovi, ki imajo različne vloge v rastlini. Sestavine hranilnih gojišč so večinoma podobne, čeprav se posamezne komponente in količine razlikujejo glede na različne vrste in namen kulture. Ob

tem mora kultura omogočati izločanje odpadnih proizvodov celičnega metabolizma. Zagotavljanje svežih sestavin in izločanje odpadnih proizvodov dosežemo s periodičnim menjavanjem gojišča. Najpogosteje uporabljeno gojišče sta formulirala Murashige in Skoog, in sicer davnega 1962. leta. Gojišča vsebujejo mineralne snovi, dodane v obliki soli, organske vire ogljika in vitaminov, rastne regulatorje rasti (RRR) rastlin in druge organske dodatke. Umerite mu pH, ki določa številne pomembne vidike sestave in delovanja bioloških makromolekul. Optimalni pH je umerjen med 5 in 6, najpogosteje na 5,7, in se praviloma zniža po avtoklaviranju in tekom rasti.

1.1.1.4 Definirani pogoji gojenja v TK oziroma natančno kontrolirani zunanji dejavniki

Tkivne kulture gojite v rastnih komorah z natančno definiranimi pogoji zunanjih, okoljskih dejavnikov svetlobe, fotoperiode in vlage.

1.1.2 Zgoraj naštetih dejavnikov morajo omogočati morfogeneze procese:

- razvoj meristemov na vcepkih,
- organogenezo, formiranje listov in korenin,
- somatsko embriogenezo, nespolni razvoj embrijev,
- dediferenciacijo in formiranje nediferenciranega tkiva, imenovanega kalus.

1.1.3 Celična totipotentnost in regeneracija rastlin

Za delo *in vitro* in morfogenezo so pomembne naslednje značilnosti rastlin:

Totipotentnost, to je potencial posamezne celice (ali skupine celic), da se razvije v celo rastlino, se dediferencira ali rejuvenira. Ta lastnost je povezana z enovito genetsko informacijo teh celic. Genski material je v jedru, mitohondrijih in kloroplastih. Za razliko od večine živalskih celic lahko rastlinske celice, tudi tiste, ki so močno zrele in diferencirane, ohranijo zmožnost formiranja v kako drugo tkivo ali organe, npr. v meristematske celice, ki se diferencirajo v celo rastlino. Za celice v tkivni kulturi je pomembno, da ohranijo kompetence za diferenciacijo v celo rastlino oziroma organizem.

Razvoj od zigote do cele rastline omogočajo trije procesi: **delitev, rast in diferenciacija**. Omogočajo usmerjanje razvoja rastlin in diferenciacijo organov ali celih rastlin iz posameznih izoliranih rastlinskih celic v TK. Selektivna celična delitev in diferencirana celična rast pogojujeta morfogenezo v celo rastlino. Na morfogenezo vplivajo notranji dejavniki, kot so rastlinski rastni regulatorji (RRR) in zunanji dejavniki, kot so svetloba, temperatura in vlaga.

Rast → količinsko nepovratno povečevanje mase, velikosti organizma ali njegovih delov z delitvijo in večanjem celic, povečevanje velikosti.

Razvoj → kakovostno spreminjanje celic, tkiv, organov, organizmov, pri katerem ti prehajajo iz prejšnje v novo obliko, funkcijo; vključuje razvoj embrija iz zigote, kalitev semen, nastanek odraslega tkiva iz somatskih embrijev, formiranje rastlinskih organov cvetov, plodov, semen.

Regeneracija → obnovitev tkiv, organov iz na novo nastalega meristema po poškodbi ali izgubi organa; v rastlinskih tkivnih kulturah je to morfogogenetski odgovor na dražljaj, ki sproži nastanek organov, zarodkov ali cele rastline.

Diferenciacija → kakovostna sprememba posamezne celice, ki iz prejšnje oblike, funkcije prehaja v drugo obliko, funkcijo, tako da je možen nastanek različnih tipov tkiv in organov; nanaša se na proces, pri katerem iz določenega tipa prekuzorskih celic nastanejo različni tipi celic.

Organogeneza → nastanek in razvoj organov iz kalusnega tkiva, posameznih celičnih skupkov ali celic.

Morfogeneza → formiranje organizma v procesu rasti celic in diferenciacije celic, tkiv in organov do svoje dokončne oblike.

1.1.4 Ko je vcepek v tkivni kulturi, sledi organizirana ali neorganizirana rast

- Organizirana rast - del rastline nadaljuje s svojim razvojem, sledi razvoj organov na novo - *de novo*:

- razvoj organov (= organogeneza),
- razvoj embrijev (= embriogeneza),
- razvoj celih rastlin.

- Neorganizirana rast - ne tvorijo se znani organi in strukture rastline, diferencira pa se le omejeno število celic:

- rast kalusa (= nediferencirano tkivo na trdem gojišču),
- rast celic v suspenziji (= nediferencirano tkivo v tekočem gojišču).

Oba tipa rasti se lahko tudi prepletata. Celice iz izoliranih organov se lahko dediferencirajo, delijo in tvorijo neorganizirane skupke celic - kalus, kasneje pa se ponovno diferencirajo v organe, kot so korenine ali poganjki.

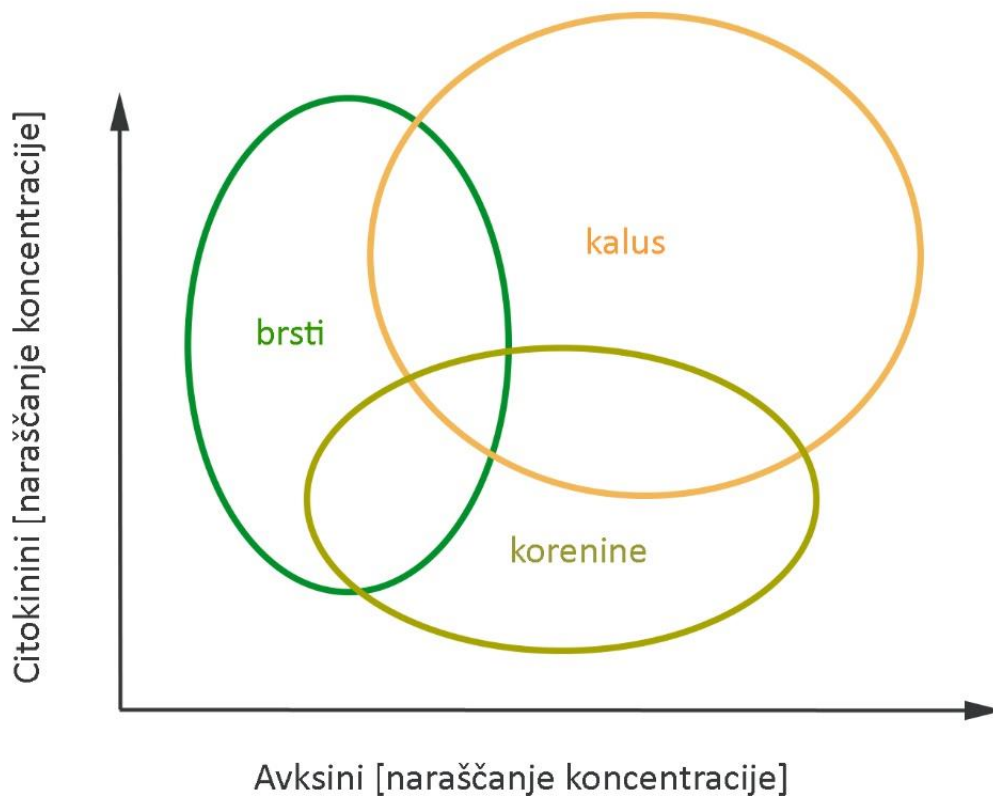
1.1.5 Uravnavanje organogeneze

Organogenezo uravnavate z ustrezno izbranimi sestavinami gojišča. Gojišče za določen tip tkivne kulture izberete s skrbnim načrtovanjem, preizkušanjem in analiziranjem različnih sestavin, preizkušanjem različnih postopkov za vsako rastlinsko vrsto in vcepek posebej. Osnova vseh poskusov za različne vrste in vcepke so torej različna gojišča, različni protokoli in veliko predhodnih izkušenj.

Leta 1957 sta raziskovalca Skoog in Miller demonstrirala, da sta v rastlinsko diferenciacijo vključeni vsaj dve skupini RRR, in sicer avksini (A) in citokinini (C). Za uravnavanje organogeneze se zato največkrat spreminja razmerje med obema RRR, pri čemer A stimulirajo razvoj korenin, C pa stimulirajo razvoj poganjkov, približno enako razmerje pa razvoj kalusa, kar poenostavljeno prikažemo s sliko 1.

Na splošno velja, da razmerje med obema določa razvoj rastlin:

- \uparrow avksin, \downarrow citokinin = \uparrow A, \downarrow C \rightarrow razvoj korenin
- \uparrow citokinin, \downarrow avksin = \uparrow C, \downarrow A \rightarrow razvoj poganjkov
- \uparrow avksin, \uparrow citokinin = \uparrow C, \uparrow A \rightarrow razvoj kalusa



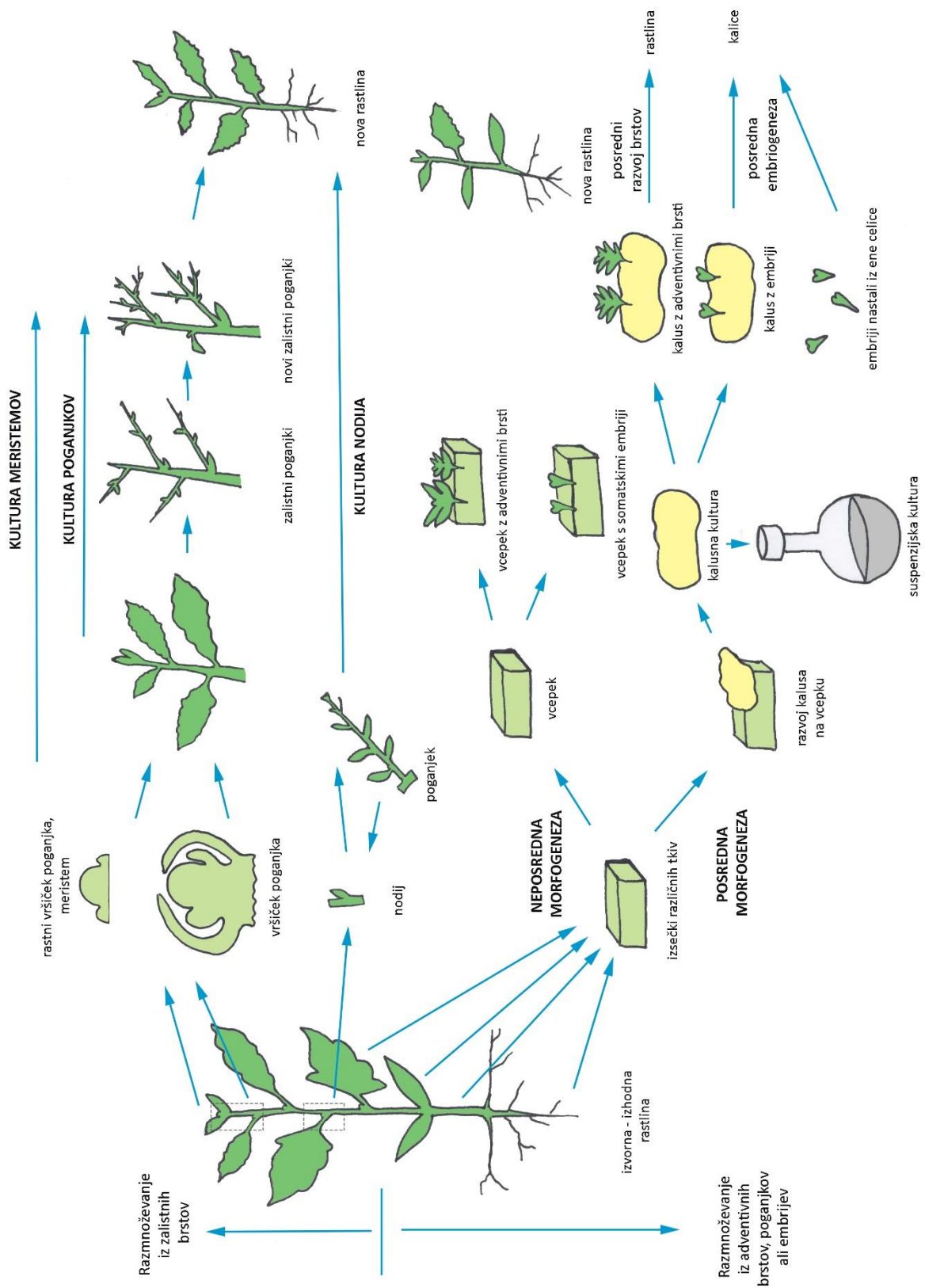
Slika 1: Morfogenetski procesi, ki vodijo do regeneracije rastlin. Vpliv rastlinskih ravnih regulatorjev (RRR) na morfo-genetski odgovor vcepkov.

1.2 Sistemi mikropropagacije

Kot smo že omenili v prejšnjih poglavjih, se rastlinske tkivne kulture v komercialnem pomenu največkrat uporabljajo za hitro razmnoževanje rastlin, ki ga imenujemo »mikropropagacija«. Gre za vegetativno razmnoževanje rastlin, tako nastale rastline so klone matične rastline, kar pomeni, da imajo enak genotip kot matične rastline (razen če tekom kulture na ta genotip ne delujejo mutacije). To je prednost takrat, ko želimo dobiti gensko identične potomce. Druga prednost takega razmnoževanja je, da poteka neodvisno od letnega časa in zahteva zelo malo prostora.

Potek mikropropagacije rastlin je odvisen od vegetativnega rastlinskega materiala in uporabljenega izsečka in je najbolje prikazan na sliki 2. Mikropropagacija je najenostavnejša, kadar je začetni izseček nodij z brstom. Na obstoječem nodiju iz brstov spodbudite razvoj novih brstov. Brsti se nato podaljšajo v poganjek. Mikropropagacijo lahko začnete tudi iz izoliranega meristema. Meristemsko tkivo izolirate z več ali manj listnimi zasnovami (primordiji), pri čemer se novi brsti razvijejo iz listnih primordijev (**kultura meristema**). Ta način mikropropagacije uporabite, kadar želite iz izoliranega tkiva odstraniti viruse.

Novi brsti nastajajo iz aksilarnih brstov, adventivno ali mešano. Na meristemu nastajajo adventivni brsti, temu sledi **organogeneza**. Organogeneza je lahko neposredna ali posredna. Pri **neposredni organogenezi** novi poganjki nastajajo neposredno na tkivu, ki smo ga vcepili v ustrezno gojišče. Pri **posredni organogenezi** se na tkivu, ki smo ga vcepili v gojišče, najprej tvori nediferencirano tkivo, **kalus**, na katerem se kasneje razvijejo rastlinski organi. Včasih se namesto rastlinskih organov tvorijo novi zarodki ali embriji, ki jih imenujemo **somatski embriji**, saj se ne razvijejo iz zigote (zigotski embriji). Tudi somatski embriji lahko nastanejo neposredno in posredno, v tem primeru pa govorimo o **neposredni ali posredni somatski embriogenezi**. Stopnji, v kateri so se tvorili brsti, poganjki ali embriji, vedno sledi zakoreninjenje ali (v primeru embriogeneze) kalitev embrijev.



Slika 2: Različne možne poti morfogeneze (razmnoževanja) pri rastlinah *in vitro*. Prirejeno po Geoge EF (2008) Plant propagation by tissue culture 3rd Ed. Springer publisher.

1.2.1 Tkivne kulture lahko imenujemo glede na to, kateri izseček uporabimo kot vcepek

- Kultura semen
- Kulturo poganjkov ali brstov (lateralni, aksilarni, adventivni)
- Meristemska kultura
- Kultura korenin
- Kultura anter (→ androgeni haploidi)
- Kultura ovula (→ ginogeni haploidi)
- Kultura endosperma itd.

1.2.1.1 Kultura semen

Ta tip tkivne kulture je pomemben za razmnoževanje kukavičevk (Orchidaceae). V naravi je kalitev semen odvisna od simbiotske povezave z glivnim partnerjem. V tkivni kulturi se glivnemu partnerju lahko izognete, saj njegovo vlogo nadomesti ustrezno hranilno gojišče. Tako kalitev imenujemo asimbiotska kalitev. Kloniranje *in vivo* v naravi poteka zelo počasi, zato je kultura semen *in vitro* eden od glavnih načinov za razmnoževanje orhidej. V tem primeru gre za spolno in ne za vegetativno razmnoževanje.

1.2.1.2 Kultura brstov in poganjkov

Brsti so glede na to, s katerega dela rastline jih izoliramo, apikalni ali aksilarni (zalistni). Z rastline jih izolirate skupaj z delom tkiva oziroma cel nodij z brstom. V tkivni kulturi jih enostavno podaljšate v poganjke in nato zakoreninite. Včasih z RRR spodbudite nastajanje novih brstov, ki so po izvoru zalistni in/ali adventivni. Z njihovo nadaljnjo kulturo lahko na brstih znova in znova inducirate nove brste, iz njih pa množico novih rastlin.

Če naše rastline za normalni razvoj zahtevajo določeno obdobje počitka (dormanca), izsečke za krajše obdobje izpostavite nizki temperaturi (0–5 °C), kratkemu (8 h) ali dolgemu dnevu (16 h), giberelinom in/ali citokininom. Nato jih prenesete na sobno temperaturo 20–25 °C. Brsti na nodijih se podaljšajo v poganjke in tako dobimo primarne izsečke za iniciacijo kulture.

Lesne rastline, ki so dosegle odraslost in že cvetijo, so težavnejše za mikropropagacijo. Zato jih morate posebej tretirati, tako da jih pomladimo oziroma rejuveniramo.

Za indukcijo novih aksilarnih in/ali adventivnih brstov uporabite citokinine. Od vrste je odvisno, katere citokinine uporabite, v kakšni koncentraciji in kombinaciji z drugimi RRR. Po daljšem času trajanja kulture in več prestavljanj na sveže gojišče, se v nekaterih primerih lahko potrebe po citokininih zmanjšajo. To naj bi bila posledica habituacije (prilagoditve) rastlin na razmere v TK in rejuvenacije

tkiva. Za indukcijo brstov morate včasih v gojišče dodajati tudi avksine, pri čemer je približno razmerje citokinin/avksini 5–10 : 1.

1.2.1.3 Kultura meristemov

Ta tip tkivne kulture je pomemben za pridobivanje rastlinskega materiala, ki je brez virusov in drugih bolezni. Celice meristema se hitro delijo in so brez žilnih povezav, zato je v tem delu rastline koncentracija virusov in drugih povzročiteljev bolezni najmanjša. Z njihovo izolacijo lahko pridobite povsem zdrave rastline, ki so nato izvorni material za nadaljnje razmnoževanje. Včasih morate ob izolaciji meristeme še posebej obdelati z visokimi temperaturami ali jih zamrzniti. Pri izolaciji meristemov si morate pomagati s stereo mikroskopom. Na splošno kultura meristema zahteva nekoliko spremenjena gojišča v primerjavi s tistimi za kulturo brstov - največkrat gre za zmanjšanje in redkeje za zvišanje RRR.

1.2.1.4 Kultura drugih organov in tkiv

Neposredna organogeneza in embriogeneza

Včasih se brsti, primarni vcepki ne odzivajo na pogoje kulture tako, kot bi si želeli, zato morate sprožiti razvoj adventivnih brstov ali embrioidov na drugih delih rastlinskega materiala. Gre za metodo, na katero vplivajo še drugi dejavniki, kot na primer genotip, fiziološko stanje, starost izvirne rastline (juvenilnost), letni čas, nivo endogenih hormonov itd. Tak način razmnoževanja spremlja pogostejše pojavljanje različnih oblik somaklonskih variacij, ki se samo občasno ponavljajo pri razvoju meristemov na primarnih vcepkih.

Pri nastajanju adventivnih brstov in poganjkov obstaja velika heterogenost potreb za RRR, tako med različnimi vrstami kot med genotipi iste vrste. Večina rastlin potrebuje citokinine (C), medtem ko avksini (A) dopolnjujejo njihov vpliv na nastajanje novih poganjkov. Obstajajo številni zapisi primerov, kjer dodani eksogeni A ne samo, da ne inhibirajo formiranja adventivnih brstov, ampak so celo nujno potrebni za procese morfogeneze. Ko se pokažejo učinki uporabljenih koncentracij C, je priporočeno poganjke prenesti v medij, ki ima nižje koncentracije RRR, in s tem stimulirati nadaljnjo rast in razvoj. V času adventivne regeneracije se morate izogibati uporabi giberelinov (GA) in abscizinske kisline (ABA).

Morfogeneza adventivnih brstov je praviloma omejena na površinske dele vcepkov. Pri tem je pomembno tudi to, kako so vcepki razporejeni v/na gojišču. Vcepke, dele listne ploskve, ponavadi položite s hrbtno stranjo oziroma zgornjo povrhnjico navzdol, v neposrednem stiku z gojiščem. Listne peclje (petiole), segmente internodijev, hipokotile polagate na gojišče horizontalno.

Neposredna embriogeneza je pogostejša, kadar je tkivo juvenilno (mlado) ali embrionalno, kot so gametofiti, nuceliji, embriji, hipokotili ali kotiledoni (klični listi). V začetnih vcepkih, ki niso juvenilni ali embrionalni, je neposredna embriogeneza manj pogosta kot posredna. V takem tkivu je nujno najprej sprožiti (inducirati) nastanek proembriogenih celic, ki jih lahko sprožijo visoke koncentracije A, ki tudi pospešijo razvoj kalusnega tkiva.

Posredna organogeneza in embriogeneza. Kultura kalusa.

Kalus je nediferencirano tkivo, ki nastane z dediferenciacijo, ima genotip izvorne rastline in občasno ohrani sposobnost diferenciacije.

S pravo sestavo gojišča ali tudi spontano se iz kalusa lahko diferencirajo organi (posredna organogeneza) ali somatski embriji (posredna embriogeneza). Kalus se lahko prenese v tekoče gojišče, kjer kalusne celice ali celični skupki razpadejo na manjše celične skupke ali posamezne celice. Iz njih lahko nastane nova masa kalusa, ki je lahko organogen in/ali embrioidi.

S celotnim *in vitro* postopkom se lahko občasno pojavljajo genske spremembe, ki se nato prenašajo v iz roda v rod. Take spremembe genotipa se imenujejo **somaklonske variacije**. Tekom vegetativnega razmnoževanja lahko nastajajo tudi epigenetske spremembe. Epigenetske spremembe se prenašajo samo nekaj generacij, kar določeni avtorji še vedno uvrščajo v koncept somaklonskih variacij. Ta pojem se je uveljavil z uporabo mikropropagacije, s tehniko pridobivanja klonov (v principu genetsko identičnih potomcev). Genotip rastlin določenega tipa in različni dejavniki gojenja *in vitro* lahko vplivajo na videz različnih variacij **somaklonov**. Uporaba večjih koncentracij RRR, ki je nujna za induciranje kalusa, povečuje verjetnost nastanka somaklonov (to so rastline, ki vsebujejo somaklonske variacije).

Somaklonske variacije se pogosto morfološko ne izrazijo in jih zato *in vivo* sploh ne opazimo. Odkrivamo jih z dodatnimi raziskavami, ki vključujejo citogenetske in molekularne metode.

Ker prvotni izseček vsebuje same diferencirane celice, iz katerih nastane kalus, se morajo te celice najprej dediferencirati. Tak izseček lahko še vedno vsebuje celice, ki imajo zmožnost delitve in iz katerih se lahko začne organogena kultura. V principu lahko za indukcijo kalusa uporabite katerokoli tkivo ali organ. Lažje je, če uporabite mlada tkiva (rastline ali embrije) ali meristeme. Kalus se pogosto tvori na robnih ali ranjenih površinah. V splošnem je za indukcijo kalusa potrebna visoka koncentracija A, ali pa je potrebno visoko razmerje A proti C (10—100 : 1). Izjemoma je indukcijo kalusa mogoče doseči tudi z uporabo samega C. Potreba rastlin po dodanih rastnih regulatorjih je odvisna od tipa RRR, uporabljenih koncentracij, genotipa in endogenih regulatorjev v izsečku.

Po indukciji nastajajoči kalus prestavimo v novo gojišče, da se celice naprej razmnožujejo. Koncentracije RRR v teh gojiščih so običajno nižje kot v indukcijskem mediju in jih tekom več

prestavljanj (subkultivacij) lahko znižujemo ali celo povsem odstranimo. Kalus lahko uporabite za indukcijo **suspenzijske kulture** tako, da ga prestavimo v tekoče gojišče. Za sprožitev suspenzijske kulture se pogosto uporablja rahel kalus iz drobljivih celičnih agregatov. Rast celic v tekočem gojišču je v primerjavi s trdim gojiščem zelo hitra, saj ga od vseh strani obliva tekoče gojišče, stresanje omogoči dobro izmenjavo plinov. Suspenzijske kulture se pogosto uporabljajo za proizvodnjo sekundarnih metabolitov in kulturo protoplastov.

Za indukcijo adventivnih brstov na kalusnem tkivu moramo ponavadi v gojišče dodati visoko razmerje C proti A (10—100 : 1). V določenih primerih zadostuje že, da iz gojišča odstranimo A.

Pri indukciji embrioidov iz delov tkiva, ki ne vsebuje proembriogenih celic, se v gojišče na začetku kulture dodajamo visoko začetno koncentracijo A, ki jo kasneje, po vzpostavitvi razvoja embrioidov, zmanjšate ali povsem odstranite. Primanjkljaj C je lahko navidez zelo protisloven za embriogenezo. Medtem ko GA inhibirajo indukcijo embriogeneze, favorizirajo kalitev embrioidov. Vnos amonijevih ionov v indukcijska in razvojna gojišča pospeši embriogenezo. Možnosti za pridobivanje embrioidov povečuje uporaba kalusov, ki izvirajo iz juvenilnih rastlin. Po drugi strani pa se zmožnost regeneracije kalusov sčasoma zmanjšuje ali celo popolnoma izgine.

1.3 Stopnje mikropropagacije

Mikropropagacija lahko poteka v več stopnjah, ki so na splošno vedno enake:

Stopnja 0: Selekcija – izbor in priprava matičnih rastlin.

Stopnja 1: Inicijacija - vzpostavitev kulture - vzpostavljanje sterilne kulture, tako da material steriliziramo.

Stopnja 2: Multiplikacija - razmnoževanje rastlin do želenega števila.

Stopnja 3: Elongacija - podaljševanje brstov v poganjke, ukoreninjanje, priprava za prenos v naravne *ex vivo* razmere.

Stopnja 4: Aklimatizacija - prenos rastlin v zemljo, v nesterilne naravne razmere in postopno prilagajanje na manjšo vlažnost.

1.3.1 Selekcija – izbor in priprava matičnih rastlin (Stopnja 0)

To je predhodna stopnja in poteka pred začetkom inicijacije *in vitro* kulture. Pomembno je, da je rastlinski material za začetek kulture v dobrem fiziološkem stanju, da je zdrav, da gre za genotip z izbranimi lastnostmi. Ni vseeno, ali izvirne rastline rastejo na prostem ali v rastlinjaku, oziroma ali je bilo seme pridelano pred kratkim ali pred več leti in podobno. Zelo pomembne so tudi rastne razmere: osvetlitev, vodni režim... Izsečke jemljemo iz različnih tkiv in organov. Pri izbiri izsečka želimo dobiti čim bolj sterilni delček rastline, ki vsebuje del meristemskega tkiva. Nasploh velja pravilo, da so najbolj primerna aktivna, mlada, juvenilna tkiva. Pri rastlinah, gojenih v rastlinjaku, skrbite, da jih vedno zalivate le spodaj in jih ne rositate; pazite tudi, da jih ne napadejo uši ali okužijo glivične bolezni.

1.3.2 Inicijacija - vzpostavljanje sterilne kulture (Stopnja 1)

Odbira ali izrez primerne tkiva ter predhodno in/ali naknadno razkuževanje je začetni postopek mikropropagacije. Rastlinski material je lahko okužen z bakterijami ali glivami površinsko ali notranje; temu so prilagojeni tudi ukrepi za razkuževanje. Na učinkovitost razkuževanja vplivata koncentracija in čas tretiranja. Uspešno kombinacijo je potrebno določiti za vsak rastlinski material posebej. Notranje okužbe ni možno odstraniti z naštetimi postopki. V gojišča dodajajte rastlinske rastne regulatorje.

1.3.3 Multiplikacija - razmnoževanje rastlin do zelenega števila (Stopnja 2)

Bistvo te stopnje je sprožanje nastanka aksilarnih poganjkov iz osnovnega poganjka ter ponavljanje postopka v rednih intervalih. To je stopnja, ko vcepek zraste in začne oblikovati nove poganjke. V 4 tednih dosežemo 3–8 kratno stopnjo razmnožitve. Postopek je uspešen, če nastane čim večje število normalno raslih poganjkov v čim krajšem času. V tej fazi dodamo gojiščem ponavadi C, A pa izpustimo ali dodamo le v majhnih koncentracijah. Način, kako poganjke razmnožujete in predstavljate na sveže gojišče (subkultiviramo), je močno odvisen od vrste rastlin in njenega načina rasti v *in vitro* razmerah.

1.3.4 Elongacija - podaljševanje brstov v poganjke, ukoreninjanje, priprava za prenos v naravne *ex vivo* razmere (Stopnja 3)

V tej stopnji želite skupke poganjkov, nastalih v stopnji 2, pripraviti za prenos v substrat. Lahko jih ukoreninite *in vivo* ali *in vitro*. Največkrat je zato potrebno: podaljševanje poganjkov pred koreninjenjem, koreninjenje posamičnih poganjkov, prekinitvev dormance, utrditev poganjkov za uspešen prenos v *in vivo* pogoje ter dodajanje rastnih regulatorjev, največkrat avksinov.

1.3.5 Aklimatizacija - prenos rastlin v zemljo, v nesterilne naravne razmere in postopno prilagajanje na manjšo vlažnost (Stopnja 4)

V to stopnjo prihajajo poganjki iz stopnje 2 (ki niso ukoreninjeni) ali ukoreninjene sadike iz stopnje 3. Obe vrsti poganjkov posadite v primeren cvetlični substrat, ki ni bogat z gnojili. Bistveno je zagotavljanje vlage – s prekrivanjem, z oroševanjem ali meglenjem. Mnogokrat morate kulturo senčiti. Aklimatizacija traja od 3 dni do 6 tednov, odvisno od vrste. Za nekatere vrste je to lahko najtežavnejša faza. Največkrat liste iz tkivne kulture nadomestijo novi listi, ki imajo funkcionalne listne reže in lahko normalno izmenjujejo pline pomembne za fotosintezo in transpiracijo.

2 SPLOŠNA METODOLOGIJA

2.1 Laboratorij: načrtovanje, pripomočki, oskrba

Načrtovanje laboratorija je odvisno od namena, omejitev in virov, ki jih imamo na voljo. Pred načrtovanjem moramo vedeti, kakšne bodo obremenitve, namen in cilji, pa tudi, katere rastlinske vrste bomo v njem razmnoževali, oziroma kaj bomo raziskovali. Lahko gre za majhen in poceni, improviziran laboratorij, ki bo primeren za osebne ali lokalne interese, lahko pa gre za velik profesionalni laboratorij, v katerem bo potekala proizvodnja za trg oziroma raziskovanje. Njegovo načrtovanje vključuje prostore za pripravo gojišč, prestavljanje kultur in gojitev v rastnih komorah, lahko tudi druge.

Prostor za pripravo gojišč je nekakšna kuhinja, v kateri pripravljamo gojišča, zato je opremljen s pulti, vodo in odtoki, tehtnico, avtoklavom (sliki 3 in 4), mikrovalovno pečico, pH metrom, magnetnim mešalom, hladilnikom, zamrzovalnikom, pomivalnim strojem, sistemom za čisto vodo in še s čim. Splošna navodila za delo v laboratoriju (večinoma) najdete v »Priročniku za delo v laboratoriju, s poudarkom na varnosti: laboratorij za fiziologijo rastlin in laboratorij za molekularno biologijo« (Pipenbaher in Ambrožič-Dolinšek, 2014).

Prostor za prestavljanje mora biti opremljen z brezprašnimi komorami (slika 5) za prestavljanje rastlinskega materiala in s pulti ter naj bo klimatiziran.

Rastna komora je klimatiziran prostor ali omara (slika 6) z osvetljenimi policami, s kontrolirano temperaturo, vlažnostjo in definirano kakovostjo in količin svetlobe.

Več o načrtovanju laboratorija boste našli v drugih virih, naštetih na koncu tega priročnika.

2.2 Aseptična tehnika dela

Glavna značilnost dela v laboratoriju za tkivne kulture je, da delo poteka v aseptičnih sterilnih pogojih in da se sterilnost (aseptičnost) ohranja med celotnim procesom dela z rastlinskim materialom. Rastline rastejo v sterilnih gojitvenih posodah, ne da bi jih ogrozili drugi organizmi. To pomeni, da se skušate izogniti kontaminaciji gojišč, rastlinskega materiala in orodja, s katerim delate. Prostore za tkivne kulture zato ohranjate maksimalno čiste, vanje pa imajo dostop samo pooblašene osebe.

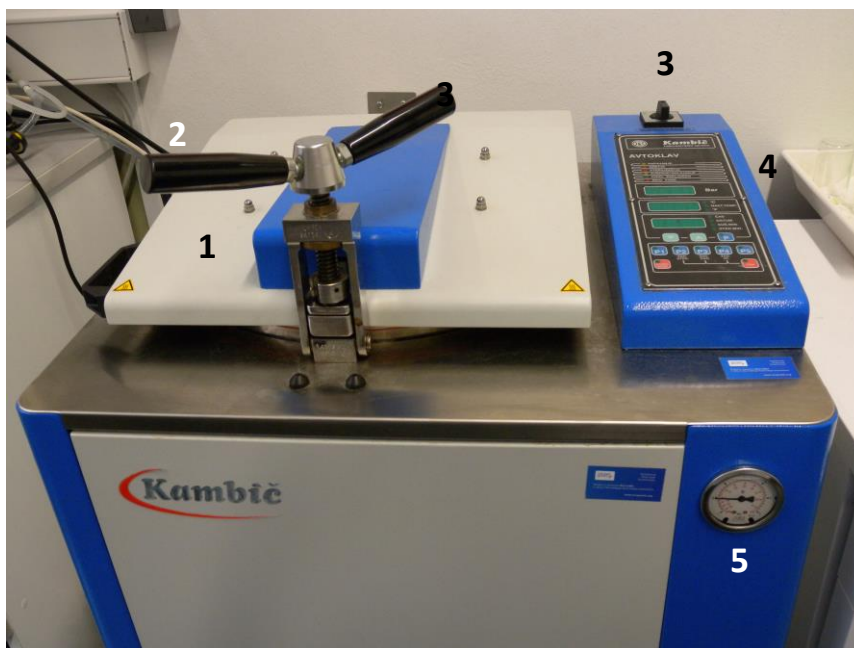
Obstaja pet možnih poti, ki omogočajo okužbo z mikroorganizmi in prekinitve aseptičnosti: z rastlino, hranilnim gojiščem, orodjem in instrumenti, operaterjem in zrakom.

2.2.1 Parni sterilizator

Parni sterilizator (avtoklav) omogoča sterilizacijo s paro pod tlakom. S sterilizacijo uničujemo žive celice, predvsem mikrobe in njihove trose. Avtoklavirate lahko različne tekočine in druge materiale, ki jih želite sterilizirati.

2.2.1.1 Parni sterilizator Kambič, tip A-65 V

Osnova parnega sterilizatorja proizvajalca **Kambič, tip A-65 V** (slika 3) sta močna jeklena tlačna posoda (komora) za sterilizacijo in pokrov, ki zdržita določen nadtlak (princip je enak kot pri ekonom loncu). Sestavni deli avtoklava so še grelci za uparjanje vode in grelci za segrevanje med sušenjem, varnostni ventil za preprečevanje previsokega tlaka in krmilna plošča (operacijski panel). Najvišja delovna temperatura je 138 °C in največji tlak 2,8 bara. Volumen komore je 65 L.



Slika 3: Osnovni deli parnega sterilizatorja (avtoklava) proizvajalca Kambič, tip A-65 V: 1 Pokrov, 2 ročka za privijanje pokrova, 3 vklop/izklop, 4 krmilna plošča in 5 manometer (do 5 barov).

Sestavni deli krmilne plošče so gumbi za izbiro programov, nastavitve za manjšanje/večanje vrednosti parametrov in za začetek/konec avtoklaviranja, nad njimi je ura, ki med obratovanjem prikazuje preostali čas do izteka tekoče faze obratovanja, nad njo sta prikazovalnik temperature in prikazovalnik tlaka v delovni komori, na vrhu so lučke, ki prikazujejo vklopljeno napajanje, gretje, sterilizacijo, sušenje/ohlajanje, zaključek posamezne faze (cikel) ter zadostnost nivoja vode.

Splošni napotki za delo s parnim sterilizatorjem:

- **Parni sterilizator lahko sami napolnite, vklopite pa samo ob prisotnosti mentorja ali tehničnega osebja.**
- Ročko pokrova pred delovanjem dobro privijete.
- Manometer mora biti pred odpiranjem pokrova na ničli (v avtoklavu ni nadtlaka).

- Čisto steklovino ovijete v aluminijasto folijo in označite z avtoklavabilnim lepilnim trakom. Bele črte na traku se po uspešnem avtoklaviranju obarvajo rjavo.
- Pri avtoklaviranju raztopin v steklenih posodah te ne smejo biti nepredušno zaprte. Posode napolnite največ do 2/3 volumna.

2.2.1.2 Parni sterilizatorj Kambič A-21V

Osnova parnega sterilizatorja proizvajalca **Kambič, tip A-21V** (slika 4) sta močna jeklena tlačna posoda (komora) za sterilizacijo in pokrov, ki zdrži določen nadtlak (princip je enak kot pri ekonom loncu). Sestavni deli avtoklava so še grelci za uparjanje vode, varnostni ventil za preprečevanje previsokega tlaka in krmilna plošča (operacijski panel), Najvišja delovna temperatura je 138 °C in največji tlak 2,8 bara. Volumen komore je 21 L.



Slika 4: Osnovni deli parnega sterilizatorja (avtoklava) proizvajalca Kambič, tip A-21 V: 1 Pokrov, 2 ročka za privijanje pokrova, 3 glavno stikalo vklop/izklop, 4 polnjenje vode, bel gumb, 5 vklop sterilizacije – rdeč gumb, 6 manometer (do 5 barov), 7 potek sterilizacije, LED diode kažejo potek sterilizacije: vklop, gretje, sterilizacija, sušenje, konec, program tekočine, nastavitve parametrov, 8 temperatura, 9 čas sterilizacije.

Napotki za delo s parnim sterilizatorjem:

- **Parni sterilizator lahko sami napolnite, vklopite pa samo ob prisotnosti mentorja ali tehničnega osebja!**
- Vključite glavno stikalo - zelena tipka.
- Odprite pokrov sterilizatorja in pritisnete na belo stikalo za polnjenje vode. Držite ga neprekinjeno vsaj 6 sekund, oziroma tako dolgo, dokler voda iz rezervoarja ne pokrije dna odprtine v pokrovu na dnu komore, ki pokriva grelce.
- Izberete željen program (slika 4, preglednica 1):

Preglednica 1: Izbira programov na parnem sterilizatorju tipa A-21 V (Kambič)

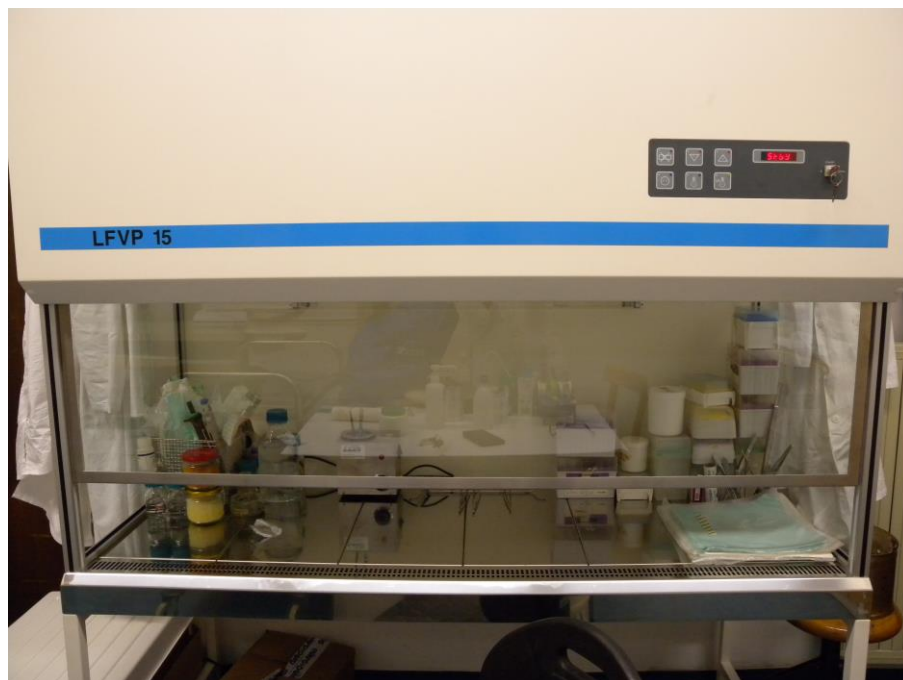
Program	Material	Trajanje sterilizacije	Sušenje po avtoklaviranju	Hitrost ohlajanja počasi - hitro (1 – 20)	
P1	steklovina orodje	20 min	DA	20	T=121 °C Tlak do 1,5 bara
P2	tekočine steklovina orodje	15 min	NE	5	T=121 °C Tlak do 1,5 bara
P3	tekočine steklovina orodje OKUŽEN MATERIAL!	20 min	NE	1	T=121 °C Tlak do 1,5 bara

- Pritisnete tipko START – rdeče stikalo!
- Takoj po aktiviranju tipke START zaprete pokrov sterilizatorja in ga dobro - vendar ne na vso silo - privijete z zapornim mehanizmom,
- Vrata avtoklava lahko odprete šele, ko pade tlak v komori na 0 bar → takrat je konec sterilizacije,
- Izključite glavno stikalo - zelena tipka!

2.2.2 Brezprašna komora - laminarij

Glede okužbe preko zraka je pomembno, da delo poteka v brezprašni laminarni komori (slika 5), ki zelo zmanjša nevarnost prenosa okužbe. Te komore omogočajo vpihavanje filtriranega in zato sterilnega zraka, brez turbolenc in prašnih delcev. Filtri z velikostjo por 0,22 μm odstranijo tudi tako majhne delce, kot so bakterije in spore. Zato moramo redno preverjati delovanje komore in filtracijo zraka. Če je mogoče, se izognite pretiranemu kroženju zraka okoli komore, ker to vpliva na spremembe dotoka zraka. Če teh pogojev ne morete zagotoviti, je dodatni način ohranjanja asepticnosti UV svetloba, ki zavira aktivnost mikroorganizmov. Ko je prižgana UV luči, je priporočljivo umakniti plastične predmete in gojišča. UV naj bo vklopljena samo takrat, ko je laboratorij prazen. Običajno jo prižgete 15 minut pred in po koncu dela. Žal UV svetloba ne zagotavlja popolne asepticnosti.

Brezprašne laminarne komore nudijo zaščito rastlinskega materiala, lahko tudi operaterja. Med sterilizacijo ali prenosom rastlinskega materiala na sveže gojišče sterilnost zagotovite z aseptičnim delom. Material prenesite na površino (papir) in s sterilnim orodjem pripravite izsečke. Prenesite ga na izbrano gojišče in posode sterilno zaprite. Delo poteka na sterilni delovni površini z orodjem, skalpeli in pincetami, ki jih sprti sterilizirate v sterilizatorju na steklene kroglice ali ob alkoholnem gorilniku. Posode z vcepki nato prenesite v rastno komoro. Gre za tiste zunanje okoljske dejavnike, ki so primerni za večino zelnatih rastlin zmerno toplega podnebne pasu. Po končanem delu površine očistite in prebršite s 70-% etanolom.



Slika 5: Brezprašna laminarna komora – laminarij.

2.2.3 Vzdrževanje čistoče

Vzdrževanje čistoče je naslednji pomemben dejavnik za uspešno tkivno kulturo. Število ljudi, ki stopajo v laboratorij, naj bo zmanjšano na najmanjšo možno mero. Operaterji, ki lahko s sabo prinašajo vire okužbe, naj bodo primerno zaščiteni. Čistočo ohranjate tudi tako, da ste oblečeni v delovna oblačila (laboratorijske halje). Pomembno je vzdrževati čistočo rok. Pred delom odstranite uro in nakit in si z milom temeljito umijte roke, nato jih splaknite s 70-% etanolom ali drugimi dezinfekcijskimi sredstvi. Čistoča laboratorija in pazljivost pri delu zmanjšata možnost neuspeha tkivne kulture in zmanjšata možnost nesreče.

2.2.4 Sterilizacija orodja

Naprave za sterilizacijo steklovine so: suhi sterilizator, avtoklav, sterilizator na steklene kroglice, gorilniki, visokotemperaturni grelci.

Orodje sprti sterilizirate v predhodno ogretem (250 °C) sterilizatorju s steklenimi kroglicami (slika 6). Sterilizator na steklene kroglice uporabljate tako, da orodje potisnete za 25 sekund v vroče kroglice. Orodje lahko sterilizirate tudi tako, da ga pomočite v 70-% etanol in obžgete ob plamenu alkoholnega gorilnika (96-% etanol). Ogreto orodje odlagate na posebne sterilne nosilce, da se ohladi, in šele nato uporabite. Orodje ali steklovino, zavito v papir ali aluminijasto folijo, lahko predhodno sterilizirate tudi v suhem sterilizatorju na temperaturi 160 °C za 1–2 uri.



Slika 6: Sterilizator s steklenimi kroglicami. Orodje sterilizirate tako, da ga potisnete za 25 sekund v steklene kroglice, ogrete na 250 °C.

2.2.5 Sterilizacija gojišč

Naprave za sterilizacijo gojišč so: avtoklav, priprave za filtrsko sterilizacijo gojišč.

Avtoklav je nujen del laboratorija. Uporablja se za steriliziranje steklovine, papirja za razrez, spravljenega v vrečke za avtoklaviranje, in tekočin kot sta voda in gojišča, največkrat predhodno razdeljena v posode za gojenje. Upoštevati morate vsa navodila za delo, zlasti vse varnostne ukrepe. Gojišče in steklovino ali posode za gojenje avtoklavirate pri temperaturi 121 °C pri 103,4 kPa 15–20 minut (poglavje 2.2.1). Trajanje avtoklaviranja prilagodite volumnu avtoklaviranih tekočin. Navodilo za delo z avtoklavom najdete v poglavju 2.2.1 tega priročnika ali v »Priročniku za delo v laboratoriju s poudarkom na varnosti: laboratorij za fiziologijo rastlin in laboratorij za molekularno biologijo« (Pipenbaher in Ambrožič-Dolinšek, 2014).

2.2.6 Sterilizacija rastlinskega materiala (glejte tudi poglavje 2.3 Priprava gojišč)

Rastlinski material sterilizirajte ob iniciaciji kulture. Najprej ga dlje časa spirajte pod tekočo vodo. Sterilizacija nponavadi poteka s kemijsko površinsko sterilizacijo izsečkov s kemikalijami, kot so 70-% alkohol, natrijev hipoklorit (NaOCl), vodikov peroksid (H₂O₂) in druge. Pri tem je treba izbrati tako trajanje kot koncentracijo sterilizanta, ki uniči ali odstrani patogene, zato da površinsko steriliziran vcepek preživi.

Potek sterilizacije:

- Avtoklavirajte tri elenmajerice ali steklenice z deionizirano vodo. Pazite, da so med avtoklaviranjem deloma odprte, da se med avtoklaviranjem izenačujejo tlaki.
- Pripravite 70-% etanol.
- Pripravite ustrezno koncentracijo raztopine Na-hipoklorita (NaOCl) z drobno kapljo detergenta (10 µL) Tween 80. Sterilizacijskega sredstva naj bo vsaj 10-krat več kot rastlinskega materiala.

Orientacijske vrednost koncentracij:

- Zelo nežen material: 0,5-% NaOCl, 10–15 minut,
- Steblo, listi, korenine: 1-% NaOCl, 10 ali več minut,
- Steblo, korenine, semena: ≥ 1-% NaOCl, 10 ali več minut.
- Pod tekočo vodo dobro sperite rastlinski material in ga nato vsaj uro ali več spirajte pod tekočo vodo.
- Rastlinski material najprej za minuto ali več pomočite v 70-% etanol, odvisno od robustnosti materiala.

- Prenesite ga v raztopino Na-hipoklorita. Dodajte magnetno mešalo, s folijo zaprite posodo in sterilizirajte z mešanjem na magnetnem mešalu.
- Posodo z rastlinskim materialom prenesite v brezprašno komoro in 3-krat po 10 minut spirajte s sterilno deionizirano vodo.
- Pripravite izsečke in jih vcepite na ustrezno gojišče, nato pa prenesite v rastno komoro.

2.2.7 Rastna komora

Rastna komora je klimatiziran prostor ali posebni inkubator (slika 7) z natančno kontroliranimi dejavniki okolja kot so: definirana kakovost in količina svetlobe, dolžina osvetljevanja, temperatura in vlažnost. Primarna rastna komora je prostor s policami, kjer rastejo rastlinske kulture steriljno zaprte v času od stopnje 1 do 3. Sekundarna rastna komora je manj čista in namenjena za stopnjo 4. Obstaja več načinov osvetljevanja rastnih komor. Idealno naj bi se osvetlitev čim bolj približala spektru fotosintetsko aktivnega sevanja (PAR), ki vključuje svetlobno valovanje z valovnimi dolžinami 400–700 nm. Rastne komore najpogosteje osvetlujejo s fluorescentnimi žarnicami, ki jih v zadnjem času zamenjuje LED žarnice. Gostota fotonskega toka v rastni komori na sliki 7 znaša 35–50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, fotoperioda znaša 16 h svetlobe in 8 h teme, pri 50-% zračni vlagi in dnevno/nočni temperaturi 23/21 °C.



Slika 7: Rastna komora je posebni inkubator z natančno kontroliranimi dejavniki okolja kot so kakovost in količina svetlobe, dolžina osvetljevanja, temperatura in vlažnost.

2.2.8 Po koncu kulture

Tkivna kultura vključuje neprestano uporabo steklovine, posod, orodja in nekaterih drugi pripomočkov, ki jih vedno znova ponovno upotrabljam, kar zahteva stalno temeljito čiščenje in pomivanje. Umazano steklovino, posode, orodje in druge pripomočke temeljito sperete »na roke« ali s pomočjo laboratorijskih pomivalnih strojev, takoj po in porabi še isti dan.

Opis postopkov čiščenja in pomivanja posode:

1. **POMEMBNO – Okužena kultura, rastlinski material in gojišča predstavljajo veliko grožnjo za razširjanje okužbe na druge kulture. Zelo majhna je verjetnost, da gre za človeške patogene, čeprav tveganje obstaja. Najvarnejši način da se izognemo vsakršnemu tveganju je, da vso okuženo posodo vedno avtoklaviramo preden jo odpiramo ali/in zavržemo!**
2. Kozarce in steklovino z okuženim rastlinskim materialom ali gojiščem nikoli ne odpirajte, ampak še zaprto najprej avtoklavirajte (Glej poglavje 3.2.1.) ter nato vključite v običajne postopke pomivanja posode.
3. Iz steklovine najprej odstranite agar in rastlinski material, nato ga vključite v postopke pomivanja, pomivalni stroj ali »ročno pranje«: namakanje v mlačni vodi, nato v detergentu in na koncu spiranje s tekočo vodo.
4. Plastične pokrove za kozarce najprej namočite v mlačni vodi, nato v detergentu in na koncu sperite s tekočo vodo.
5. Nastavke za pipetiranje namočite v mlačni vodi, nato v detergentu in na koncu sperite s tekočo vodo.

2.2.9 Omejitve pri delu

Pri delu je potrebna previdnost pri ravnanju z vnetljivimi tekočinami, Na-hipokloritom (NaOCl), UV svetlobo. Etanol je lahko vnetljiv, zato bodite previdni. Hlapi Na-hipoklorita lahko dražijo naša dihala, zato se skušajte izogniti njihovem vdihavanju. Pri dezinfekciji z UV se izogibajte gledanju v UV svetlobo, da si ne poškodujete oči. Kadar je vklopljena UV luč, ne uporabljajte Na-hipoklorita, saj UV pospeši sproščanje klorovih plinov.

Bodite natančni pri meritvah in izračunavanju koncentracij. Da dobite ponovljive rezultate, uporabite vedno ista gojišča in kemikalije ter upoštevajte varnostne oznake na posodah. Pri delu v laboratoriju morate upoštevati napotke, povezane z uporabo kemikalij, prav tako tudi fizikalne dejavnike, ki lahko toksično in negativno vplivajo na uspeh tkivne kulture. Več o varnosti najdete v »Priročniku za delo v laboratoriju, s poudarkom na varnosti: laboratorij za fiziologijo rastlin in laboratorij za molekularno biologijo« (Pipenbahr in Ambrožič-Dolinšek, 2014).

2.3 Priprava gojišč

Gojišča so lahko trdna in tekoča. Za pripravo trdnih gojišč dodajate hranilnim raztopinam strjevalce, kot so agar (Difco ali drugi), agaroz ali Gellan-gum (Gerlite, Duchefa ali Phytigel, Sigma). Strjevalce v gojiščih lahko nadomeščajo tako imenovani papirni mostički, zvit filter papir, ki je spodaj namočen v gojišče, sam vcepek pa je na zgornjem ovlaženem delu zunaj tekočine. Novejša metoda je uporaba posebne tkanine, ki plava na vrhu gojišča, ali pa je vgrajena v poseben podstavek in opravlja isto funkcijo. Možna je uporaba kamene volne, gaze, koščkov plastične gobe in drugih sredstev. Tekoča gojišča največkrat zračite na stresalniku z okrog 50 obrati na minuto. V tkivnih kulturah imajo rastline na voljo dva vira ogljika: ogljik iz zraka (CO₂) in organsko vezanega v ogljikove hidrate, kot je saharoza, ki ga absorbirajo iz gojišča in porabijo za rast biomase ali dihanje. Gojiščem umerite pH na vrednost 5,7 do 5,8, lahko tudi manj, če gre za rastline kislih rastišč.

2.3.1 Priprava koncentriranih osnovnih raztopin (OR)

Hranilna gojišča za gojenje *in vitro* pripravite z uporabo vnaprej pripravljenih koncentriranih osnovnih raztopin (OR), ki vsebujejo vse potrebne hranljive kemijske snovi. Da bi poenostavili njihovo pripravo in preprečili podvajanje, naj jih vedno pripravijo odgovorne zaposlene osebe. Pripravite jih več skupaj, in sicer koncentrirane v takih kombinacijah in koncentracijah, da sta njihova priprava in dodajanje čim bolj enostavna. Na splošno gre za naslednje osnovne raztopine (stock solutions): makroelemente in mioinozitol (OR 1), makroelemente (OR 2 in OR 3), železo (OR 4) in organske dodatke, kot so vitamini (OR 5). Sestavine in recepti so zajete v preglednici 2 in 3 in v preglednicah 4–8. Na podoben način pripravljate tudi koncentrirane raztopine rastlinskih rastnih regulatorjev (preglednici 8 in 9).

Za pripravo osnovnih raztopin (OR) glejte preglednice 3–7: Pripravljate jih v manjšem volumnu bidestilirane vode tako, da vsako sestavino najprej raztopite, nato dodate naslednjo, in nato dopolnite do željenega volumna. Osnovne raztopine zlijte v primerne posode za shranjevanje. OR 1 hranite v zamrzovalniku, OR 2–5 v hladilniku. Na vsako od posod napišite, kaj vsebuje, datum priprave in ime osebe, ki jo je pripravila.

Priprava raztopin rastnih regulatorjev (RRR): Ponavadi so pripravljene kot 1 mM raztopina. Pripravite jih tako, da stehate RRR, dodate približno 2 ml vode ter po kapljicah topilo kislino, bazo ali DMSO (preglednica 8). Ves čas mešajte, dokler se RRR ne raztopi, nato dopolnite do 100 ml. Na steklenico zapišite, kaj vsebuje, datum priprave in ime osebe, ki jo je pripravila (preglednice 3–9 in 11–13).

Raztapljanje A (avksinov): Stehtajte ustrezno količino, dodajajte nekaj kapljic (3-4) NaOH (1M), pomešajte in po malem dodajajte bidestilirano vodo do željenega volumna (preglednice 8, 9, 12).

Raztapljanje C (citokininov): Stehate ustrezno količino, dodajte nekaj kapljic (3-4) NaOH (1M) ali HCl (1M) pomešajte in po malem dodajajte bidestilirano vodo do željenega volumna (preglednice 8, 9, 11).

Nekaj splošnih napotkov:

- Za tehtanje uporabljajte ustrezno analitsko tehtnico.
- Koncentrirane raztopine hranite v hladilniku (5 °C) ali drugače (preglednica 7).
- Po uporabi vse OR takoj vrnite v hladilnik.
- Osnovne raztopine rastnih regulatorjev so po pripravi uporabne vsaj tri mesece, nato jih morate pripraviti sveže.
- Kadar osnovne raztopine hranite v zamrzovalniku, so uporabne vsaj pol leta.

Preglednica 2: Sestava MS gojišča (Murashige in Skoog, 1962) z dodanim organskim virom C (saharozo) in strjevalcem gojišča

Raztopina	Sestavina	Končna molarna koncentracija
Makroelementi [mM]	KNO ₃	18,79
	NH ₄ NO ₃	20,61
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	2,99
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,50
	KH ₂ PO ₄	1,25
Mikroelementi [μM]	MnSO ₄ · H ₂ O* ¹	100,00
	H ₃ BO ₃	100,00
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	30,00
	KJ	5,00
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1,03
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,10
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,10
	NaFeEDTA* ²	136,00
Organske sestavine [μM]	mio-inozitol	555,00
	glicin	26,64
	nikotinska kislina	4,06
	piridoksin HCl	2,43
	tiamin HCl	0,30
Organski vir C in strjevalec gojišča [M] ali [%]	saharosa	87,6 mM (3 %)
	agar (Difco-Bacto)	0,8 %

*¹ ali 100,00 μM MnSO₄ · 4H₂O

*² v originalnem receptu je dodana mešanica Na₂EDTA (37,25 mg L⁻¹) in FeSO₄ · 7H₂O (27,85 mg L⁻¹)

Preglednica 3: Sestava MS gojišča; koncentracije, izražene v mg L⁻¹ ali v odstotkih (Murashige in Skoog, 1962)

Raztopina	Sestavina	Končna koncentracija [mg L ⁻¹]	Količina v mg za pripravo 1 l koncentrirane raztopine OR* [mg L ⁻¹]	Količina v mg za pripravo 100 ml koncentrirane raztopine OR*	Volumen koncentrirane raztopine OR za pripravo 1 L gojišča končne koncentracije
Makroelementi	KNO ₃	1900	19000	1900	OR1 (10 × koncentrirano) za 1 L gojišča dodajamo 100 ml OR 1
	NH ₄ NO ₃	1650	16500	1650	
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	3700	370	
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	4400	440	
	KH ₂ PO ₄	170	1700	170	
	mio-inozitol	100	1000	100	
Mikroelementi	MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3	2230	223	OR2 (100 × koncentrirano) za 1 L gojišča dodajamo 10 ml OR2
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6	860	86	
	H ₃ BO ₃	6,2	620	62	
	KJ	0,830	830	83	OR3 (1000 × koncentrirano) za 1 L gojišča dodajamo 1 ml OR3
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,250	250	25	
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	25	2,5	
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	25	2,5	
	NaFeEDTA	50	5000	500	OR4 (100 × koncentrirano) za 1 L gojišča dodajamo 10 ml OR4
Organske sestavine	glicin	2	2000	200	OR5 (1000 × koncentrirano) za 1 L gojišča dodajamo 1 ml OR5
	nikotinska kislina	0,5	500	50	
	piridoksin HCl	0,5	500	50	
	tiamin HCl	0,1	100	10	
Organski vir C in agar	saharoza	30000			
	agar (Difco-Bacto)	8000			

* Gre za pripravo osnovnih raztopin (OR1–5), s katerimi pripravljamo gojišča.

Preglednica 4: Priprava osnovne raztopine OR 1; koncentracije so izražene v g L⁻¹ ali v mg L⁻¹

Raztopina	Sestavina	Količina v mg za pripravo 1 L 10 × koncentrirane raztopine OR 1	Koncentrirana raztopina za pripravo 1 L gojišča
OR 1	KNO ₃	19000	OR1 (10 × koncentrirano) za 1 l gojišča dodajamo 100 ml OR 1
	NH ₄ NO ₃	16500	
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	3700	
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	4400	
	KH ₂ PO ₄	1700	
Makroelementi	mio-inozitol	1000	

Preglednica 5: Priprava osnovne raztopine OR 2-3; koncentracije so izražene v g L⁻¹ ali v mg L⁻¹

Raztopina	Sestavina	Količina v mg za pripravo 100 ml 100 × koncentrirane raztopine OR2	Koncentrirana raztopina za pripravo 1 L gojišča
OR 2	MnSO ₄ · 4H ₂ O	223	OR2 (100 × koncentrirano) za 1 l gojišča dodajamo 10 ml OR2
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	86	
Mikroelementi	H ₃ BO ₃	62	

Raztopina	Sestavina	Količina v mg za pripravo 100 ml 1000 × koncentrirane raztopine OR3	Koncentrirana raztopina za pripravo 1 L gojišča
OR 3	KJ	83	OR3 (1000 × koncentrirano) za 1 l gojišča dodajamo 1 ml OR3
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	25	
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	2,5	
Mikroelementi	CoCl ₂ · 6H ₂ O	2,5	

Preglednica 6: Priprava osnovne raztopine OR 4; koncentracije so izražene v g L⁻¹ ali v mg L⁻¹

Raztopina	Sestavina	Količine v mg za pripravo 100 ml 100 × koncentrirane raztopine OR4	Koncentrirana raztopina za pripravo 1 L gojišča
OR 4	NaFeEDTA	500	OR4 (100 × koncentrirano) za 1 L gojišča dodajamo 10 ml OR4
Železo			

Preglednica 7: Priprava osnovne raztopine OR1; koncentracije so izražene v g L⁻¹ ali v mg L⁻¹

OR 5	Sestavina	Količina v mg za pripravo 100 ml 1000 × koncentrirane raztopine OR5	Koncentrirana raztopina za pripravo 1 L gojišča
Organske sestavine	glicin	200	OR5 (1000 × koncentrirano) za 1 L gojišča dodajamo 1 ml OR5
	nikotinska kislina	50	
	piridoksin HCl	50	
	tiamin HCl	10	

Ko so OR pripravljene jih je potrebno primerno označiti in se izogniti napačni rabi in predolgi hrambi.

OR 1	← Tip osnovne raztopine (OR)
MS	← Tip gojišča
Uporabi 100 ml/L gojišča	← Navodila
2017-03-29	← Datum priprave
Janez K.	← Oseba, ki jo je pripravila

Preglednica 8: Priprava osnovnih raztopin, najpogosteje uporabljenih RRR

Ime RRR Avksini		Molska masa	μM za 1 mg L^{-1}	Topilo	Redčilo	Hramba v prahu	Hramba v raztop.	Sterilizac.	Delovna koncentracija [mg L^{-1}]
2,4-diklorofenoksi ocet. k.	2,4-D	221,0	4,53	EtOH/ 1M NaOH	voda	RT	2-8 °C	CA	0,01-6,0
Indol-3-ocetna kislina	IAA	175,2	5,71	EtOH/1M NaOH	voda	-0 °C	-0 °C	CA/F	0,01-3,0
Indol-3-butanojska kislina	IBA	203,2	4,90	EtOH/1M NaOH	voda	2-8 °C	-0 °C	CA/F	0,1-10,0
Naftalen oacetna kislina	NAA	186,2	5,37	1M NaOH	voda	RT	2-8 °C	CA	0,1-10,0
Pikloram	Pic	241,5	4,14	DMSO	—	RT	2-8 °C	CA	0,01-10,0
Citokinini									
6-benzilamino purin	BAP	225,3	4,44	1M NaOH	voda	RT	2-8 °C	CA/F	0,1-5,0
6-dimetilalil amino purin	ZiP	203,2	4,92	1M NaOH	voda	-0 °C	-0 °C	CA/F	1,0-30,0
Kinetin	Kin	215,2	4,65	1M NaOH	voda	-0 °C	-0 °C	CA/F	0,1-5,0
Zeatin	Zea	219,2	4,56	1M NaOH	voda	-0 °C	-0 °C	CA/F	0,01-5,0
Tidiazuron	TDZ	220,3	4,54	DMSO	-	RT	2-8 °C	CA/F	0,001-0,05
Drugi RRR									
Abscizinska kislina	ABA	264,3	3,78	1M NaOH	voda	-0 °C	-0 °C	CA/F	0,1-10,0
Giberelinska kislina	GA3	346,4	2,89	EtOH	—	RT	2-8 °C	CA/F	0,01-5,0
Jasmonska kislina	JA	210,3	4,76	EtOH	—	2-8 °C	-0 °C	F	0,01-100,0

RT = sobna temperatura

CA = koavtoklavabilno z drugimi sestavinami gojišč,

F = filterska sterilizacija,

CA/F = koavtoklavabilno z drugimi sestavinami gojišč (CA), vendar z delno izgubo aktivnosti, kar lahko kompenziramo z dodatkom večje koncentracije. Sestavino bi lahko filtersko sterilizirali (F)

Preglednica 9: Določanje utežne koncentracije (mg L^{-1}) iz znane molarne koncentracije (μM) in določanje molarne koncentracije (μM) iz znane utežne koncentracije (mg L^{-1})

Ime RRR	Kratice	Molska masa	Določanje utežne koncentracije (mg L^{-1}) iz znane molarne koncentracije (μM)				Določanje molarne koncentracije (μM) iz znane utežne koncentracije (mg L^{-1})			
			0,1 μM	1,0 μM	10,0 μM	100,0 μM	0,1 mg L^{-1}	0,5 mg L^{-1}	1,0 mg L^{-1}	10,0 mg L^{-1}
Avksini		g mol^{-1}	mg L^{-1}				μM			
2,4-diklorofenoksi očetna kislina	2,4-D	221,0	0,0221	0,221	2,21	22,1	0,45	2,27	4,53	45,3
Indol-3-očetna kislina	IAA	175,2	0,0175	0,175	1,75	17,5	0,57	2,86	5,71	57,1
Indol-3-butanojska kislina	IBA	203,2	0,0203	0,203	2,03	20,3	0,49	2,45	4,90	49,0
Naftalen očetna kislina	NAA	186,2	0,0186	0,186	1,86	18,6	0,54	2,69	5,37	53,7
Pikloram	Pic	241,5	0,0242	0,242	2,42	24,2	0,41	2,07	4,14	41,4
Citokinini										
6-benzilamino purin	BAP	225,3	0,0225	0,225	2,25	22,5	0,44	2,22	4,44	44,4
6-dimetilalil amino purin	2iP	203,2	0,0203	0,203	2,03	20,3	0,49	2,46	4,92	49,2
Kinetin	Kin	215,2	0,0215	0,215	2,15	21,5	0,47	2,33	4,65	46,5
Zeatin	Zea	219,2	0,0219	0,219	2,19	21,9	0,46	2,28	4,56	45,6
Tidiazuron	TDZ	220,3	0,0220	0,220	2,20	22,0	0,45	2,27	4,54	45,4
Drugi RRR										
Abscizinska kislina	ABA	264,3	0,0264	0,264	2,64	26,4	0,38	1,89	3,78	37,8
Giberelinska kislina	GA3	346,4	0,0346	0,346	3,46	34,6	0,29	1,45	2,89	28,9
Jasmonska kislina	JA	210,3	0,0210	0,210	2,10	21,0	0,48	2,38	4,76	47,6

2.3.2 Priprava gojišč - splošni postopek

1. Priprava protokola za pripravo gojišč – načrtovanje, teorija, izračuni:

- Določite in izračunajte vse sestavine ter pripravite protokol dela (preglednice 8–10).
- Preverite in pripravite rastlinski material.
- Preverite, ali je na voljo dovolj OR, steklovine, vode.
- Načrtujte delo v brezprašni komori in se vpišite na koledar za načrtovanje dela.

2. Priprava gojišč:

- Iz zamrzovalnika vzemite OR1 in počakajte, da se odtali.
- Pripravite potrebno steklovino in jo označite tako, da na nalepke s svinčnikom zapišete datum, gojišče, koncentracije RRR in svoje ime.
- Vključite pH-meter.
- V stekleno čašo za pripravljanje gojišča nalijte ustrezno količino deionizirane vode in z alkoholnim flumastrom označite nivo tekočine (spodnji del konkavno ukrivljenega površja (meniskus)).
- V tej čaši pustite 2/3 deionizirane vode, ostanek prelijte v manjšo posodo.
- Čašo postavite na kuhalnik (zunanost naj bo suha, sicer lahko čaša počí) in zagrejte deionizirano vodo.
- Tik pred vretjem dodajte agar in med mešanjem počakajte, da se agar povsem raztopi. Agar je raztopljen, ko se raztopina povsem zbistri.
- Dodajte saharozo in med mešanjem počakajte, da se raztopi.
- Dodajte vse OR 1-5.
- Dodajte RRR.
- Dolijte deionizirano vodo do označenega meniskusa.
- Ko temperatura pade na 50 °C, umerite pH na vrednost med 5,7 in 5,8.
- Prelijte v kozarčke in nato avtoklavirajte.
- Pripravite gojitvene epruvete ali kozarce in jih opremite z nalepkami, na katerih je zapisano gojišče, datum in ime operaterja.
- Gojišče razlijte v epruvete ali kozarce (slika 8) :
 - v epruvete po 10 ml,
 - v majhe kozarce (frutke) po 20 ml,
 - v 350 ml kozarce po 30 ml.

- Kozarce pokrijte s polipropilenskimi pokrovi ali z aluminijasto folijo.
- Prekrijte ali zavijte jih v papir.
- Avtoklavirajte pri temperaturi 121 °C pri tlaku 103,4 kPa za 15–20 minut.



Slika 8: V 350 ml kozarce razlijte 30 ml gojišča, v 100 ml ali 175 ml kozarce razlijte 20 ml gojišča.

3. Priprava materiala:

- Pripravite papir za podlogo za delo v brezprašni komori.
- Po potrebi pripravite bidestilirano vodo za sterilizacijo materiala za iniciacijo kulture (glej poglavje 2.3.5).
- Pripravite orodje za delo v brezprašni komori: skalpele in ustrezne pincete, lancete, palčke ...

4. Gojišča lahko avtoklavirate tudi v steklenicah, preden jih prelijete v gojitvene posode:

- Steklenice z gojiščem naj bodo napolnjene do 2/3 volumna in samo delno zaprte.
- Po avtoklavanju počakajte, da se nekoliko ohladijo.
- V brezprašni komori gojišča prelijte v sterilne petrijevke, in sicer:
 - v 9 cm petrijevke po 25 ml in
 - v 6 cm petrijevke po 10 ml gojišča.

2.3.3 Protokol za pripravo gojišča za tkivno kulturo

Datum: _____

Rastlinski material: _____

Gojišče: _____

Rastlinska vrsta: _____

Uporabljen izseček: _____

Pogoji kulture: _____

Preglednica 10: Priprava gojišča

SESTAVINE IN PRIPRAVA GOJIŠČA	Vzgleđ za 1000 ml	VOLUMEN izbranega gojišča:
nalij deionizirano vodo	1000 ml	
označi menisk in odlij 1/3 vode	670 ml	
agar 8 g L ⁻¹ (0,8 %)	8 g	
saharoza 30 g L ⁻¹ (3 %)	30 g	
OR 1	100 ml	
OR 2	10 ml	
OR 3	1 ml	
OR 4	10 ml	
OR 5	1 ml	
RRR:		
RRR:		
dopolni do meniska	1000 ml	
Začetni pH*:		
Končni pH*:		

*Umerjanje pH: z 0,1 M HCl in 0,1 M NaOH umerite pH gojišča na vrednost 5,7–5,8.

Pripravljalec gojišča: _____

2.4 Splošni napotki za vzpostavljanje (iniciacija) kulture, prestavljanje (subkultivacija) in prenos v zemljo (aklimatizacija)

Iniciacija kulture, prestavljanje in zakoreninjanje so stopnje, kjer delo z rastlinskim materialom poteka v brezprašni laminarni komori, ki mora neprestano zagotavljati sterilnost celotnega postopka in komore.

Splošno shemo, ki povzema eksperimente v tkivni kulturi za vzpostavljanje (iniciacija) kulture, prestavljanje (subkultivacija) in prenos v zemljo (aklimatizacija) ter uporabo RRR prikazuje slika 7.

2.4.1 Splošni postopek za varno delo v brezprašni komori

1. Pred vsakim delom za 10–15 minut prižgite UV luč in površine pobrišite s 70-% etanolom.
2. V brezprašno laninarno komoro prenesite vse, kar potrebujete za delo (lupe, mikroskop, orodje...), in pripomočke obrišete s 70-% etanolom.
3. Z milom si temeljito umijte roke in jih splaknite s 70-% etanolom ali drugim dezinfekcijskim sredstvom, saj so roke glavni vir okužbe.
4. Pripravite orodje in ga sterilizirajte z ožiganjem ob gorilniku ali v sterilizatorju na sterilne kroglice.
5. Negujte delovne površine. Periodično sterilizirajte inštrumente, in sicer vsakič, ko začnete delati z vcepki iz nove posode.
6. Sledi manipulacija materiala iz gojitvenih posod, ki ga vzamete sterilno ven, in po navodilih manipulirajte na sterilnem papirju ali v sterilnih petrijevkah, ki jih sproti menjavate.
7. Dobljene izsečke vcepate v gojitvene posode.
8. Robove gojitvenih posod po potrebi ožgite ob alkoholnem gorilniku in zaprite s sterilnimi pokrovi.
9. Po koncu dela površine znova obrišite s 70-% etanolom in za 10–15 minut osvetlite z UV svetlobo.

2.4.2 Splošni postopek za vzpostavljanje - iniciacijo kulture

Pri procesu iniciacije je pomembna vrsta uporabljenega izsečka oziroma vcepka. Primer je iniciacija kulture meristema. Sterilizirate večji rastlinski del z meristemom in odstranite odvečne dele. Poškodovane in odmrle dele redno odstranjujte. V primeru, ko je vcepek nodij, pred sterilizacijo odstranite najbolj zunanje dele poškodovanega tkiva. Vcepek položite na gojišče:

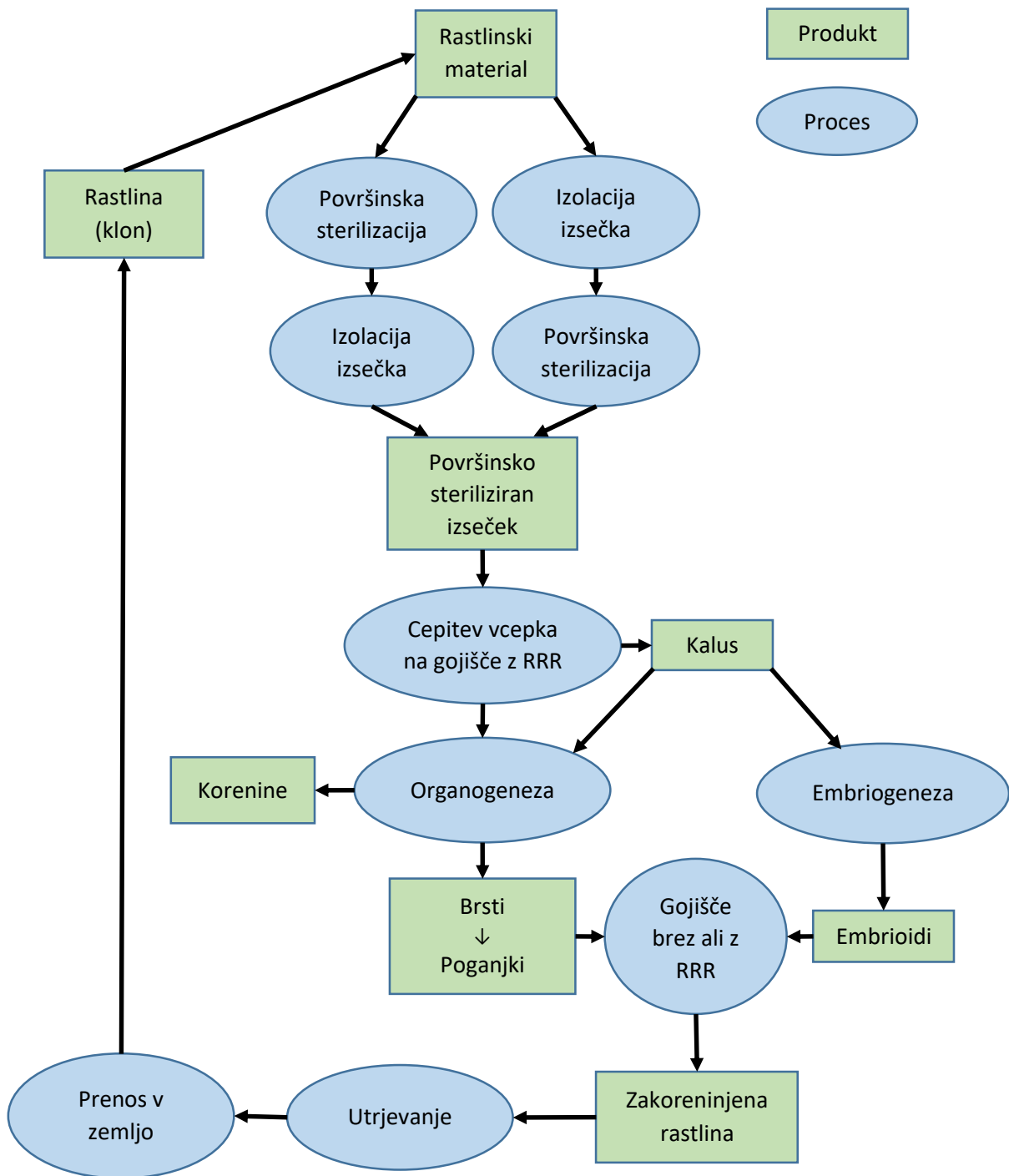
- Vertikalno (navpično) z distalnim (bližje poganjku) delom v stiku z gojiščem (nodiji),
- vertikalno (navpično) z najbolj proksimalnim (bolj stran od poganjka) koncem v stiku z gojiščem,
- horizontalno (vodoravno),
- horizontalno v gojišče z ranjenim delom v stiku z gojiščem,
- horizontalno v gojišče z zgornjo povrhnjico lista v stiku z gojiščem.

Nove strukture (brste, nodije ali drugo) ločujete iz matične rastline ali med seboj in jih prenašajte na sveže gojišče vsakih 4–8 tednov, odvisno od kulture. Vedno uporabljajte samo vitalni rastlinski material, odmrle dele odrežite in zavržite.

Kulturo v naslednjih tednih redno pregledujte in spremljajte razvoj novih struktur, razvoj rast in diferenciacijo. Posebej pomemben je pregled po enem tednu, ko se izrazi večina okužb. Rast gliv ali bakterij nakazuje okužbo. Okužen material avtoklavirajte in nato zavržite. Rezultatov, dobljenih z opazovanjem okuženih vcepkov, ne upoštevajte!

2.4.3 Prenos rastlin *ex vitro* - aklimatizacija

Ukoreninjene poganjke vzamite iz gojitvenih posod in s korenin s tekočo vodo previdno sperite agar, da preprečite razvoj gliv in bakterij, za katere je agar še posebej hranljiv. Posadite jih v substrat, ki je največkrat mešanica vrtnarske zemlje in vermikulita. Posajene poganjke lahko poškopite s fungicidom, lahko z dodatkom detergenta Tween 80 (0,1 ml na l vode), ki bo omogočil boljšo omočljivost. Škropljenje ponovite tri dni do teden dni po vsaditvi poganjkov. Lončke z rastlinami postavite v komore, pokrite s prozornimi plastičnimi pokrovi z loputami za zračenje, ki jih postopno odpirajte. Po mesecu dni pokrove v celoti odstranite. Rastline po potrebi zalivajte z vodo ali z ½ MS tekočim gojiščem (prvih 14 dni) in občasno škropijte z vodo.



Slika 9: Splošna shema, ki povzema eksperimente v tkivni kulturi; RRR, rastlinski rastni regulatorji.

3 Protokoli za mikropropagacijo nekaterih rastlinskih vrst

***Hladnikia pastinacifolia*, Apiaceae**

Rebrinčevolista hladnikovka (*Hladnikia pastinacifolia* Rchb.) je endemična in potencialno ogrožena rastlinska vrsta, ki raste samo na območju Slovenije. Varovana je *in situ*, in *ex situ*. Tkivna kultura in mikropropagacija sta eden od možnih načinov *ex situ* varovanja in ohranjanja te zanimive vrste, ki hkrati omogočata hitro razmnoževanje v primeru degradacije ali izgube naravnega rastišča.

Izseček: kalice iz semen.

Obravnav: Kalice sperite pod tekočo vodo. Izsečke za 30 sekund potopite v 70 % etanol in sterilizirajte v 1-% NaOCl od 15 do 20 minut. Nato 3-krat sperite s sterilno vodo. Posode z vcepki nato gojite v rastni komori pri temperaturi 23 ± 2 °C, fotoperiodi 16 ur svetlobe in 8 ur teme.

Gojišče: Gre za klasično mikropropagacijo iz vcepkov zalistnih – aksilarnih brstov. V Stopnji I in II v MS gojišče dodajte 5 μ M BAP in 3 μ M IBA, v Stopnji III pa v MS gojišče dodajte 2 μ M IAA. Zakoreninjene poganjke prenesite v substrat s pH 7,5 do 8,5, sestavljen iz apnenčastega peska, substrata za presajanje rastlin in vermikulita, v razmerju 10 : 2 : 2.

Literatura:

Ambrožič-Dolinšek J., Ciringer T., Kaligarič M. (2016): Micropropagation of the narrow endemic *Hladnikia pastinacifolia* (Apiaceae). Acta Botanica Croatica, DOI: 10.1515/botcro-2016-0028.

Naloga: Predstavite čim učinkovitejši protokol za mikropropagacijo rebrinčevolistne hladnikovke (*Hladnikia pastinacifolia* Rchb.). Načrtujte postopek tako, da natančno opišite in predstavite, kaj bi naredili v posamezni fazi mikropropagacije: izseček, vcepek, obravnav, gojišča, rastni regulatorji in drugo.

Stopnja 0: Selekcija: _____

Stopnja 1: Inicijacija: _____

Stopnja 2: Multiplikacija: _____

Stopnja 3: Elongacija: _____

Stopnja 4: Aklimatizacija: _____

***Chrysanthemum*, Asteraceae**

Krizanteme so ena od 10 najpopularnejših vrtnih rastlin in rastlin, ki jih gojimo za rezano cvetje. Relativno enostavno jo je razmnoževati s stebeljnimi poganjki ali z delitvijo. Na podoben način kot ta krizantema se obnašajo še druge družine: *Anthemis*, *Argyranthemum*, *Calendula*, *Leucanthemum*, *Matricaria* in *Tanacetum*.

Izseček: mladi rastni vršički ali neodprti cvetni popki.

Obravnava: Steblo sperite pod tekočo vodo. Izsečke za 30 sekund potopite v 70 % etanol in sterilizirajte v 1-% NaOCl od 10 do 15 minut. Nato 3-krat sperite s sterilno vodo. Posode z vcepki nato gojite v rastni komori pri temperaturi 23 ± 2 °C, fotoperiodi 16 ur svetlobe in 8 ur teme.

Gojišče: Gre za preprosto mikropropagacijo z različnimi vcepki in recepturami za gojišča. V Stopnji I in II v MS gojišče dodajte 6 μ M BAP in 3 μ M IAA, v Fazi III pa v MS gojišče dodajte 0,5 μ M IAA. Lahko jo preskočimo. Poganjke, velike 1–2 cm, enostavno potaknete v substrat za zakoreninjenje. To so kratkodnevne rastline.

Literatura:

Rout, G.R., Das, P. 1997. Recent trends in the biotechnology of *Chrysanthemum*: a critical Review. *Scientia Horticulturae*. 69, 239-257.

Naloga: Predstavite čim učinkovitejši protokol za mikropropagacijo krizanteme (*Chrysanthemum*; *Dendranthema grandiflora*). Načrtujte postopek tako, da natančno opišite in predstavite, kaj bi naredili v posamezni fazi mikropropagacije: izseček, vcepek, obravnava, gojišča, rastni regulatorji in drugo.

Stopnja 0: Selekcija: _____

Stopnja 1: Inicijacija: _____

Stopnja 2: Multiplikacija: _____

Stopnja 3: Elongacija: _____

Stopnja 4: Aklimatizacija: _____

***Miscanthus sinensis*, Poaceae**

Kitajska srebrna trava je široko razširjena trava, ki jo nekateri gojijo kot okrasno rastlino, kot energetska rastlino, ki se uporablja kot kurivo, ali za proizvodnjo bioetanola. Zraste do 2 m v višino in v zemlji tvori rizome.

Izseček: zalistni brsti izolirani z rizomov

Obravnava: Izolirajte nodije z brstom, odstranite vse liste in sterilizirajte, tako da nodij potopite v 95-% etanol za eno minuto, potem pa v 1-% Na hipoklorit z drobcem Tweena 80 za 10 do 20 minut. Trikrat sperite s sterilno vodo. Posode z vcepki nato gojite v rastni komori pri temperaturi 23 ± 2 °C in fotoperiodi 16 ur svetlobe in 8 ur teme.

Gojišče: Stopnji I in II gojite na MS gojišču s 5 μM BAP in 2 μM NAA, s strjevalcem, ki je lahko gellan gum ali 8 g L⁻¹ agar. Sstopnja III poteka v tekočem MS gojišču z 3 μM NAA.

Literatura:

Glowacka, K., Jezowski, S., Kaczmarek Z. 2010. Impact of colchicine application during callus induction and shoot regeneration on micropropagation and polyploidisation rates in two *Miscanthus* species. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant* 46,161-171.

Glowacka, K., Jezowski, S., Kaczmarek Z. 2010. The effects of genotype, inflorescence developmental stage and induction medium on callus induction and plant regeneration in two *Miscanthus* species. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 102, 79-86.

Gubisova M, Gubis J, Zofajova A, Mihalik D, Kraic J. 2013. Enhanced *in vitro* propagation of *Miscanthus × giganteus*. *Ind Crop Prod.* 41, 279–282.

Naloga: Predstavite čim učinkovitejši protokol za mikropropagacijo afriške kitajske srebrne trave (*Miscanthus sinensis*). Načrtujte postopek tako, da natančno opišite in predstavite, kaj bi naredili v posamezni fazi mikropropagacije: izseček, vcepek, obravnava, gojišča, rastni regulatorji in drugo.

Stopnja 0: Selekcija: _____

Stopnja 1: Inicijacija: _____

Stopnja 2: Multiplikacija: _____

Stopnja 3: Elongacija: _____

Stopnja 4: Aklimatizacija: _____

***Platyserium bifurcatum*, Polypodiaceae**

Platyserium bifurcatum je praprotnica iz družine sladičevk (*Polypodiaceae*), ki se kot epifitska rastlina v aravi pojavlja v tropskih in subtropskih območjih, medtem ko je kultivirana povsod po svetu. Je praprotnica z veliko zmožnostjo regeneracije. O tem pričajo raziskave organogeneze na listih (Camloh in sod. 1994, Camloh in Ambrožič-Dolinšek, 2011), luskah (Ambrožič-Dolinšek in Camloh, 1997). Pri tem poteka regeneracija brez prisotnosti kakršnegakoli rastnega regulatorja v gojišču, zato je zelo primerna za različne razvojne in fiziološke študije.

Izseček: juvenilni listi, lahko z ranjeno povrhnjico.

Obravnavanje: S sterilnim skalpelom in s pomočjo pincet pripravite 6 vcepkov – posamezne ločene liste (cele, ranjene, segmentirane) in jih s spodnjo stranjo navzdol položite na površino MS gojišča. Vcepke rahlo potisnite z ranjenim spodnjim delom v površino na gojišču. Posode z vcepki nato gojimo v rastni komori pri temperaturi 23 ± 2 °C in fotoperiodi 16 ur svetlobe in 8 ur teme.

Gojišče: Stopnje I, II, in III gojimo na MS trdem gojišču.

Literatura:

- Ambrožič-Dolinšek J., Camloh M. 1997. Gametophytic and sporophytic regeneration from bud scales of the fern *Platyserium bifurcatum* (Cav.) C. Chr. *in vitro*. *Annals of Botany*. 80, 23–28.
- Camloh M., Ambrožič-Dolinšek J. 2011. *In vitro* regeneration systems of *Platyserium*. *Working with ferns: Issues and Applications*. First edition, 111-125.
- Camloh, M., Gogala N. 1992. *In vitro* culture of *Platyserium bifurcatum* gametophytes. *Scientia Horticulturae* (Amsterdam). 51,343–346.
- Camloh, M., Gogala N., Rode J. 1994. Plant regeneration from leaf explants of the fern *Platyserium bifurcatum in vitro*. *Scientia Horticulturae*. 56, 257–266.

Naloga: Predstavite čim učinkovitejši protokol za mikropropagacijo vrste *Platyserium bifurcatum*. Načrtujte postopek tako, da natančno opišite in predstavite, kaj bi naredili v posamezni fazi mikropropagacije: izseček, vcepki, obravnavanje, gojišča, rastni regulatorji in drugo.

Stopnja 0: Selekcija: _____

Stopnja 1: Inicijacija: _____

Stopnja 2: Multiplikacija: _____

Stopnja 3: Elongacija: _____

Stopnja 4: Aklimatizacija: _____

***Saintpaulia ionantha*, Gesneriaceae**

Afriška vijolica (*Saintpaulia ionantha*) je zelo priljubljena sobna rastlina. Danes je na trgu veliko hibridov in himer te vrste. Tradicionalno se zelo lahko razmnožuje, zato je nezahtevna tudi v tkivni kulturi.

Izsečki: 1 cm² veliki deli lista z zgornjo povrhnjico navzdol, 1 cm dolgi listni peclji.

Obravnav: Liste s pecljem za nekaj sekund potopite v 70-% etanol. Nato jih za 15 minut potopite v 1-% NaOCl, ki ste ji dodali drobec tween 80. Vsako minuto pomešajte. Liste nato 3-krat po 5 minut spirajte v sterilni deionizirani vodi. Iz le-te jih položite na sterilno petrijevko in s sterilnim skalpelom iz vsakega izrežite po 6 kvadratov s stranico 1 cm. Po tri vcepke položite na površino posameznega gojišča, obrnjene z zgornjo stranjo navzdol. Posode z vcepki nato gojite v rastni komori pri temperaturi 23 ±2 °C in fotoperiodi 16 ur svetlobe in 8 ur teme.

Gojišče: Stopnje I, II, in III gojimo na MS gojišču z 2 μM BAP in 3 μM NAA, 6-8 tednov. Adventivni brsti in korenine se bodo tvorili, tudi če v gojišču ne bo rastnih regulatorjev.

Literatura:

Bilkey, P. C., Cocking E. C. 1981. Increased plant vigor by *in vitro* propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl., from sub-epidermal tissue. HortScience. 16, 643-644.

Grout, B. W. W. 1990. African Violet. In: Handbook of Plant Cell Culture . Vol.5. (Eds.): Ammirato, P. V., Evans, D. A., Sharp W .R. and Bajaj Y.P. S.. McGraw-Hill, Inc. pp. 181-205.

Khan, S., Naseeb, S., Ali, K. 2007. Callus induction, plant regeneration and acclimatization of african violet (*Saintpaulia ionantha*) using leaves as explants Pak. J .Bot. 39, 1263-1268.

Naloga: Predstavite čim učinkovitejši protokol za mikropropagacijo afriške vijolice (*Saintpaulia ionantha*). Načrtujte postopek tako, da natančno opišite in predstavite, kaj bi naredili v posamezni fazi mikropropagacije: izseček, vcepki, obravnav, gojišča, rastni regulatorji in drugo.

Stopnja 0: Selekcija: _____

Stopnja 1: Inicijacija: _____

Stopnja 2: Multiplikacija: _____

Stopnja 3: Elongacija: _____

Stopnja 4: Aklimatizacija: _____

4 Splošna literatura:

- Batič, F., Košmrlj-Levačič, B., Martinčič, A., Cimerman, A., Turk, B., Gogala, N., Seliškar, A., Šercelj, A. 2013. Botanični terminološki slovar [Elektronski vir]. Ur.: Batič, F., Košmrlj-Levačič, B.. Založba ZRC, ZRC SAZU, Ljubljana. URL: <http://isifr.zrc-sazu.si/sl/terminologisce/slovarji/botanicni/iskalnik#v>
- Batič, F., Košmrlj-Levačič, B., Martinčič, A., Cimerman, A., Turk, B., Gogala, N., Seliškar, A., Šercelj, A. 2011. Botanični terminološki slovar. Ur.: Batič, F., Košmrlj-Levačič, B. Založba ZRC, ZRC SAZU, Ljubljana.
- Bohanec, B., 1992. Tehnike rastlinskih tkivnih kultur. Biotehniška fakulteta, Ljubljana.
- Chawla, H.S., 2003. Plant biotechnology: practical approach. Science Publishers, Enfield.
- George, E. F.; Sherrington, P.D. 1984. Plant propagation by tissue culture. Reading, Edington.
- George, E.F., Puttock, D.J.M., George, H.J. 1987. Plant Culture Media, Volume 1, Formulations and Uses, Exegetics Ltd, Edington
- George, E.F., Puttock, D.J.M., George, H.J. 1989. Plant Culture Media, Volume 2, Commentary and Analysis, Exegetics Ltd Edington
- George, E.F., 1993. Plant propagation by tissue culture; Part 2: in practice, 2nd eds. Exegetics, Edington.
- George, E.F., Hall, E.F., De Klerk, M.A., Jan, G. 2008. Plant propagation by tissue culture Vol 1, the background Dordrecht, Springer.
- Kumar, A, Imani, J., Neumann, K.H. 2009. Plant cell and tissue culture - a tool in biotechnology: basics and application Berlin, Heidelberg, Springer.
- Kyte, L., Kleyn, J., Scoggins, H., Bridgen, M. 2013. Plants from Test Tubes: An Introduction to Micropropagation, 4th Portland, Timber Press
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- Pierik, R.L.M., 1997. *In vitro* culture of higher plants. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- Pipenbaher, N., Ambrožič-Dolinšek, J. 2014. Priročnik za delo v laboratoriju s poudarkom na varnosti : laboratorij za fiziologijo rastlin [in] laboratorij za molekularno biologijo. Maribor: Fakulteta za naravoslovje in matematiko. URL: http://biologija.fnm.uni-mb.si/index.php?option=com_content&view=article&id=27&Itemid=25&lang=sl
- Prakash, J., Pierik, R.L.M., 1991. Horticulture - New Technologies and Applications, Kluwer Academic
- Raspor, P. 1996. Biotehnologija, Osnovna znanja. BIA, Ljubljana.
- Saran, B.S., Kumar, P.D. 2013. Plant tissue culture: an introductory text. New Delhi Springer
- Smith, R.H. 2013 Plant tissue culture: techniques and experiments / Amsterdam, Academic Press.
- Thomas, B., 2003. Encyclopedia of applied plant sciences. Elsevier, Academic press, Amsterdam.
- Trigiano, R.N., Gray, D.J. 2010 Plant tissue culture, development and biotechnology Boca Raton, CRC Press.
- Vasil, I.K., Thorpe, T.A. 1994. Plant Cell and Tissue Culture. DA Information Services Whitehorse Road.

5 Priloge

Izračun dodane količine RRR:

$$V_p = \frac{C_m \cdot V_m}{C_p}$$

V_p = iskani volumen RRR, ki ga želimo dodati v gojišče

V_m = volumen gojišča

C_m = želena koncentracija RRR v gojišču

C_p = koncentracija pripravljene raztopine RRR (običajno 1 mM)

Primer :

$V_m = 500 \text{ ml}$

$C_m = 3 \text{ } \mu\text{M}$

$C_p = 1 \text{ mM}$

$$V_p = \frac{3 \text{ } \mu\text{M} \cdot 500 \text{ ml}}{1000 \text{ } \mu\text{M}} = 1,5 \text{ ml}$$

Izbrane osnove kemijske stehiometrije

Odstotna koncentracija:

Razlikujemo masne in volumske odstotke. Če v besedilu ni navedeno, za katere gre, so mišljeni masni odstotki. Koncentracija v masnih odstotkih je izražena v gramih topljenca na 100 g raztopine. Koncentracija v volumskih odstotkih je izražena v volumskih delih snovi v 100 volumskih delih raztopine.

Molarna koncentracija:

Koncentracija je izražena s številom molov raztopljene snovi v 1000 ml (1 L) raztopine (mol L^{-1}). Maso v gramih (g) izračunamo iz relativnih molskih mas, M_r (g/mol), posameznih elementov. Najdemo jih v priročnikih, napisane pa so tudi na embalaži vseh izvorno pakiranih kemikalij. V uporabi so tudi drugi simboli za izražanje molarosti ($\text{mol L}^{-1} = \text{M}$) in milimolarosti ($\text{mmol L}^{-1} = \text{mM}$) in mikromolarosti ($\mu\text{mol L}^{-1} = \mu\text{M}$).

Molska masa snovi M je masa enega mola delcev, ki to snov sestavljajo. Enota za molsko maso je g/mol. Molsko maso elementa določimo tako, da njegovi relativni atomski masi pripišemo enoto g/mol. Molsko maso spojine izračunamo tako, da seštejemo molske mase vseh elementov, iz katerih je sestavljena. Pri tem moramo upoštevati tudi število atomov elementov v spojini. Mol snovi vsebuje Avogadrovo število delcev, to je $6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$.

Masna koncentracija:

Koncentracija je izražena z maso raztopljene snovi v določenem volumnu raztopine, kot na primer v miligramih na liter (mg/L).

Pretvorbe enot:

$$1 \text{ mm}^3 = 1 \mu\text{l} = 1000 \text{ nl} = 10^6 \text{ pl}$$

$$1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ ml} = 10^3 \mu\text{l} = 1000 \mu\text{l}$$

$$1 \mu\text{m}^3 = 10^{-9} \text{ mm}^3 = 10^{-9} \mu\text{l} = 10^{-6} \text{ nl} = 10^{-3} \text{ pl}$$

Preračunavanje iz molarne koncentracije [mol L^{-1}] v masno koncentracijo v [g L^{-1}]:

BA; $M_r = 225 \text{ g/mol}$

$$1 \text{ M} = 10^{-3} \text{ mM} = 10^{-6} \mu\text{M} = 1.000.000 \mu\text{mol L}^{-1} \underline{\hspace{2cm}} 225 \text{ g L}^{-1} \text{BA}$$

$$10 \mu\text{M} = 10 \mu\text{mol L}^{-1} \underline{\hspace{2cm}} x =$$

$$x = \frac{10 \mu\text{M} \cdot 225 \text{ g/L}}{1.000.000 \mu\text{M}} = 0,00225 \text{ g/L} = 2,25 \text{ mg/L}$$

Preglednica 11: Rastlinski rastni regulatorji CITOKININI pretvorbe koncentracije [mg L^{-1}] / molarost [μM]

Rastni regulator Regulator	Kinetin, K	Zeatin, Z	Benziladenin BAP ali BA	Tidiazuron, TDZ	2iP
Molska masa, Mr [g mol^{-1}]	215,2	219,2	225,3	220,2	203,2
0,1 mg L^{-1}	0,46	0,46	0,44	0,45	0,49
0,2	0,93	0,91	0,88	0,91	0,98
0,3	1,39	1,36	1,33	1,36	1,48
0,4	1,88	1,82	1,78	1,82	1,97
0,5	2,32	2,28	2,22	2,27	2,46
0,6	2,79	2,73	2,66	2,72	2,95
0,7	3,25	3,19	3,11	3,18	3,44
0,8	3,72	3,65	3,55	3,63	3,94
0,9	4,18	4,11	3,99	4,09	4,43
1,0	4,65	4,56	4,44	4,54	4,92
2,0	9,29	9,12	8,87	9,08	9,84
5,0	23,23	22,81	22,19	22,71	24,61
10,0	46,47	45,62	44,38	45,41	49,21
20,0	92,94	91,24	89,77	90,82	78,38
Toplo	1M NaOH	1M NaOH	1M NaOH	DMSO	1M NaOH
Redčilo	voda	voda	voda	voda	voda
Hramba v prahu	-0 °C	-0 °C	RT	RT	-0 °C
Hramba v vodni raztopini	-0 °C	-0 °C	0–5 °C	0–5 °C	-0 °C
Sterilizacija	CA/F	CA/F	CA/F	CA/F	CA/F
Delovna koncentracija [mg L^{-1}]	0,1–5,0	0,01–5,0	0,1–5,0	0,001–0,05	1,0–30,0

CA = koavtoklavabilno z drugimi sestavinami gojišč

F = filterska sterilizacija

CA/F = koavtoklavabilno z drugimi sestavinami gojišč (CA), vendar z delno izgubo aktivnosti, kar lahko kompenziramo z dodatkom večje koncentracije. Sestavino bi lahko filtersko sterilizirali (F)

Preglednica 12: Rastlinski rastni regulatorji AVKSINI pretvorbe koncentracije [mg L⁻¹] / molarost [μM]

Rastlinski rastni regulator, RRR	Indolbutanojska kislina, IBA	Indol očetna kislina, IAA	Naftalen očetna kislina, NAA	2, 4-D
Molska masa, Mr [g mol ⁻¹]	203,2	175,2	186,2	221,0
0,1 mg L ⁻¹	0,49	0,57	0,54	0,45
0,2	0,98	1,14	1,07	0,90
0,3	1,48	1,71	1,61	1,36
0,4	1,97	2,28	2,15	1,81
0,5	2,46	2,85	2,69	2,26
0,6	2,95	3,42	3,22	2,72
0,7	3,44	3,99	3,76	3,17
0,8	3,94	4,57	4,3	3,62
0,9	4,43	5,14	4,83	4,07
1,0	4,90	5,71	5,37	4,52
2,0	9,80	11,42	10,74	9,05
5,0	24,60	28,54	26,85	22,62
10,0	49,00	57,08	53,71	45,25
20,0	98,00	114,16	107,41	90,50
Topilo	EtOH/ 1M NaOH	EtOH/1M NaOH	1M NaOH	EtOH/ 1M NaOH
Redčilo	voda	voda	voda	voda
Hramba v prahu	0–5 °C	-0 °C	RT	RT
Hramba v vodni raztopini	-0 °C	-0 °C	0–5 °C	0–5 °C
Sterilizacija	CA/F	CA/F	CA	CA
Delovna koncentracija [mg L ⁻¹]	0,1–10,0	0,01–3,0	0,1–10,0	0,01–5,0

CA = koavtoklavabilno z drugimi sestavinami gojišč

F = filterska sterilizacija

CA/F = koavtoklavabilno z drugimi sestavinami gojišč (CA), vendar z delno izgubo aktivnosti, kar lahko kompenziramo z dodatkom večje koncentracije. Sestavino bi lahko filtersko sterilizirali (F)

Preglednica 13: Drugi rastlinski rastni regulatorji koncentracije/molarnost [μM] pretvorbe in kemijske analize

Rastlinski rastni regulator, RRR	Giberilini: GA ₃	Jasmonati: JA	Abscizinska kislina: ABA
Molska masa, Mr [g mol ⁻¹]	346,4	210,3	264,3
0,1 mg L ⁻¹	0,29	0,48	0,38
0,2	0,58	0,95	0,76
0,3	0,87	1,43	1,14
0,4	1,15	1,90	1,51
0,5	1,44	2,38	1,89
0,6	1,73	2,85	2,27
0,7	2,02	3,33	2,65
0,8	2,31	3,80	3,03
0,9	2,60	4,28	3,41
1,0	2,89	4,76	3,78
2,0	5,77	9,51	7,57
5,0	14,43	23,78	18,92
10,0	28,89	47,55	37,84
20,0	57,74	95,10	75,67
Topilo	EtOH	EtOH	1M NaOH
Redčilo	voda	NA	voda
Hramba v prahu	RT	0-5 °C	-0 °C
Hramba v vodni raztopini	0-5 °C	-0 °C	-0 °C
Sterilizacija	CA/F	F	CA/F
Delovna koncentracija [mg L ⁻¹]	0,01-5,0	0,01-100,0	0,1-10,0

CA = koavtoklavabilno z drugimi sestavinami gojišč

F = filterska sterilizacija

CA/F = koavtoklavabilno z drugimi sestavinami gojišč (CA), vendar z delno izgubo aktivnosti, kar lahko kompenziramo z dodatkom večje koncentracije. Sestavino bi lahko filtersko sterilizirali (F)

6 Terminološki slovar TKIVNE KULTURE

V velikem delu je povzet po Botaničnem terminološkem slovarju (Batič in Košmrlj–Levačič, 2013), dostopnem na Terminologišču Znanstvenoraziskovalnega centra Slovenske akademije znanosti in umetnosti (ZRC SAZU), ki ga najdete na spletni strani

<http://isjfr.zrc-sazu.si/sl/terminologisce/slovarji/botanicni/iskalnik#v> .

Adventivni brst → brst, ki se razvije na neobičajnem mestu, kot je brst ali zarodek; iz korenine, iz kalusa, lista, listne žile zaradi posebnih hormonskih vplivov ali okoljskih razmer

Aksilarni brst → zalistni brst, nastal iz zasnove za brst

Agar → zmes kompleksnih polisaharidov pridobljenih iz alg, ki se uporablja za strjevanje in učvrstitev tekočih gojišč, Agar se običajno uporablja v koncentracijah med 6–12 g L⁻¹

Anatomija → veda o zgradbi in organizacij organizmov ali njihovih delov

Aseptično → sterilno, brez mikroorganizmov in njihovih trosov

Aseptična tehnika → postopki, ki se uporabljajo za preprečevanje vnosa gliv, bakterij, virusov, mikroplazem ali drugi mikroorganizmov v kulturah

Avksin → ime za široko skupino heterocikličnih spojin, derivatov indola, ki po strukturi spominjajo na endogeni avksin, indol-3-octna kislino (IAA), Rastlinski rastni regulator, ki nastaja v rastnih vršičkih poganjka in se prenaša po rastlini navzdol, pospešuje celično rast v dolžino, celične delitve, inducira nastanek nadomestnih in stranskih korenin, zavira odpadanje listov in plodov, sodeluje pri fototropizmu in gravitropizmu

Avtoklav → naprava za sterilizacijo mokrih ali suhih predmetov s paro in povišanim tlakom

Avtotrof → organizem, ki je zmožen sintetizirati hranljive organske substance iz anorganskih virov, ogljika in dušika, s fotosintezo (kot vir energije uporablja sevanje Sonca) ali kemiosinteze (uporablja energijo, sproščeno pri oksidaciji anorganskih snovi - pretvorba kemijske energije)

Brst → zasnova za poganjek, ki vsebuje meristem in zasnove za liste; mirujoči rastni vršiček poganjka, obdan z dničnimi listi, značilen za brstnice

Citokinin → ime za substituirani derivat adenina, ki spominja na endogeni citokinin, zeatin (zeatin ribozid), Pospešuje celično delitev, sintezo RNA, proteinov, zavira njihovo razgradnjo, staranje, inducira razvoj, nastanek brstov, sodeluje pri regulaciji apikalne dominanc

Diferenciacija → kvalitativna sprememba posamezne celice, pri kateri iz prejšnje oblike, funkcije prehaja v drugo obliko, funkcijo, v nastanek različnih tipov tkiv in organov

Embriogeneza → razvoj, pri katerem iz zigote ali somatske celice nastane večcelični embrio (zarodek)

Embrioid → somatski, nezigotski embrio

Epigentika → nanaša se na zunanje modifikacije DNA, ki aktivirajo ali inaktivirajo gene, Te modifikacije ne spreminjajo zapisa DNA, ampak vplivajo na to, kako se geni prepisujejo

Ex vitro → zunaj stekla (Lat.); zunaj nadzorovanega, umetnega okolja, nesterilno

Ex situ → zunaj mesta (Lat.): dejavnosti zunaj mesta uspevanja rastline; gojitev, rast, razmnoževanje v okolju drugačnem kot je naravno rastišče (zbirke semen ali rastlin v botaničnih vrtovih)

Heterotrof → organizem, ki izkorišča organske snovi kot snovni in energijski vir za biosintezo lastnih visokomolekularnih snovi, Organske snovi dobi od drugih organizmov,

Habitucija → proces prilagajanja na neke razmere, mesto, okoliščino

Kalus → skupek delečih se nediferenciranih in neorganiziranih celic, ki nastanejo na poškodovanih mestih, masa dediferenciranih rastlinskih celic

Klon → vsi gensko enaki osebki, ki nastanejo nespolno (vegetativno) iz istega osebka

Kloniranje → klonsko, vegetativno, nespolno razmnoževanje, v katerem nastanejo genetsko identični osebki

Kontaminacija → proces, ki vodi v onesnaženje, zastrupljanje, okužbo; vodi v škodljive posledice za organizme: zastrupitev, okužbo z mikroorganizmi, kot so bakterije ali glive

Kavlogeneza → tip organogeneze, nastanek in razvoj poganjkov v tkivni kulturi, kot na primer nastanek adventivnih brstov iz kalusa

Internodij → del stebela med zaporednima nodijema, na katerem ni listov in stranskih poganjkov

In vitro → v steklu (Lat.); gojitev, rast, razmnoževanje v nadzorovanem laboratorijskem okolju, navadno sterilnih razmerah v plastičnih, steklenih posodah

In vivo → v živem (Lat.): v živem organizmu; gojitev, rast, razmnoževanje v naravnem ali naravnemu podobnem okolju

In situ → na mestu (Lat.): dejavnosti na mestu rastišča rastline; uspevanje v naravnem okolju

Inokulacija → vnos celic, vcepkov, mikroorganizmov ali inficiranega materiala na/v gojišče *in vitro*

Inokulacija → vstop, vdor povzročitelja bolezni v celico gostitelja

Iniciacija → začetek določenega procesa

Juvenilnost pri rastlinah → vegetativna, reproduktivno nekompetentna faza razvoja rastlin, ki jo pogosto spremljajo drugačne morfološke in fiziološke značilnosti, kot tiste pri odraslih rastlinah, Juvenilne rastline na primer ne tvorijo razmnoževalnih struktur, kot so cvetovi – nimajo zmožnosti cvetenja

Listni pecelj → petiol; zoženi in po prečnem prerezu ponavadi okrogel del lista, ki povezuje listno dno z listno ploskvijo, značilen za liste mnogih rastlin

Morfogeneza → je formiranje organizma v procesu rasti celic in diferenciacije celic, tkiv in organov

Medium → gojišče (ed.)

Media → gojišča (mn.)

Meristem → skupina celic, ki imajo trajno sposobnost za mitotske delitve in iz katerega se razvijejo rastlinski organi: steblo, koreninski poganjki, cvetovi

Meristemoid → meristemsko tkivo, nastalo iz nediferenciranih celic, ki se pojavijo v kalusu, iz celic povrhnjice in vodi v razvoj rastlinskih organov

Mikropropagacija → vegetativno razmnoževanje rastlin v tkivni kulturi v sterilnih pogojih *in vitro*

Miksotrof → organizem, ki se lahko prehranjuje avtotrofno ali heterotrofno

Morfologija → veda o zgradbi in obliki organizmov; morfologija organizmov je posledica anatomske zgradbe organizmov

Nodij → del rastlinskega stebela, iz katerega se razvijejo listi, stebela ali cvetovi
Nediferencirano → brez določenih funkcij

Organogeneza → nastanek in razvoj organov iz kalusnega tkiva, posameznih celičnih skupkov ali celic

Patogen → organizem, ki povzroča bolezni

Patogeneza → proces, zmožnost povzročanja bolezni

Prekurzor → predhodnik

Prekurzorska celica → predhodno nediferencirana celica

Primordij → zasnova; najzgodnejše stanje v razvoju

Protoplasti → celice brez celične stene; celoten živi del celice, ki vključuje citoplazmo, organele, membranske strukture, nima pa celične stene, ergastičnih tvorbo

Poganjek → brst se podaljša v poganjek; del stebela z listi, ki zraste v določenem obdobju rasti iz brsta

Rastlinski rastni regulatorj → organska spojina, ki vpliva na morfogenezo rastlin in je po aktivnosti podobna naravnim rastlinskim hormonom

Rastlinski hormoni → organske molekule, hormoni, ki nastajajo v rastlinskem tkivu, se tvorijo na enem mestu in prenašajo na druga mesta, kjer povzročajo morfogenetski odziv

Rastni vršiček → vršni del stebela ali korenine, zgrajen iz meristemskih celic, iz katerega nastajajo primarna tkiva poganjka, korenine; meristem; je lahko aktivni ali dormantni, rastni vršiček poganjka ali korenine

Rastni vršiček poganjka → vršni del poganjka, zgrajen iz vršnega meristema in listnih zasnov, iz katerega nastajajo primarna tkiva stebela in listov

Rast → količinsko nepovratno povečevanje mase, velikosti organizma ali njegovih delov z delitvijo in večanjem celic, povečevanje velikosti

Razvoj → kvalitativno spreminjanje celic, tkiv, organov, organizmov, pri katerem ti prehajajo iz prejšnje oblike, funkcije v novo obliko, funkcijo

Regeneracija → obnovitev tkiv, organov iz novonastalega meristema po poškodbi ali izgubi organa; v rastlinskih tkivnih kulturah je to morfogenetski odgovor na dražljaj, ki sproži nastanek organov, zarodkov ali cele rastline

Rizogeneza → nastanek in razvoj korenin pri normalni ontogenezi ali v tkivni kulturi

Somaklonska sprememba → fenotipska sprememba, bodisi genetskega bodisi epigenetskega izvora

Somaklon → rastlina, pridobljena iz tkivne kulture, ki vključuje uporabo somatskih rastlinskih celic

Sterilnost → brez življenja; nezmožnost organizma za spolno razmnoževanje; kultura, ki je brez živih mikroorganizmov ali njihovih trosov

Subkultura → nadaljna delitev kulture, ki ji sledi prenos na sveže gojišče; postopek, s katerim tkiva, organe, rastline razdelimo na manjše enote in prenesemo v/na sveže gojišče

Suspenzijska kultura → kultura posameznih celic ali skupkov celic v tekočem gojišču

Termolabilnost → temperaturna neobstojeost

Tkivna kultura → rast ali vzdrževanje celic, tkiv, organov ali celih organizmov *in vitro*; izraz se uporablja za vse tipe aseptičnih rastlinskih in živalskih kultur

Totipotentnost → potencial posamezne celice (ali skupine celic), da se razvije v celo rastlino, se dediferencira ali rejuvenira; značilnost celic, da imajo potencial za tvorbo vseh tipov celic v organizmu

Vegetativno razmnoževanje → nespolno razmnoževanje, pri katerem se razvijejo novi osebki z odcepljenjem večceličnih delov matične rastline, npr, zarodnih brstičev

Vršiček poganjka → vršni del poganjka, zgrajen iz vršnega meristema, listnih zasnov in nekaj razvijajočih listov, iz katerega nastajajo primarna tkiva stebela in listov

KAZALO SLIK

Slika 1: Morfogenetski procesi, ki vodijo do regeneracije rastlin. Vpliv rastlinskih rastnih regulatorjev (RRR) na morfogenetski odgovor vcepkov.	5
Slika 2: Različne možne poti morfogeneze (razmnoževanja) pri rastlinah <i>in vitro</i> . Prirejeno po Geoge EF (2008) Plant propagation by tissue culture 3rd Ed. Springer publisher.	7
Slika 3: Osnovni deli parnega sterilizatorja (avtoklava) proizvajalca Kambič, tip A-65 V: 1 Pokrov, 2 ročka za privijanje pokrova, 3 vklop/izklop, 4 krmilna plošča in 5 manometer (do 5 barov).	16
Slika 4: Osnovni deli parnega sterilizatorja (avtoklava) proizvajalca Kambič, tip A-21 V: 1 Pokrov, 2 ročka za privijanje pokrova, 3 glavno stikalo vklop/izklop, 4 polnjenje vode, bel gumb, 5, vklop sterilizacije – rdeč gumb 6 manometer (do 5 barov), 7, potek sterilizacije, LED diode kažejo potek sterilizacije: vklop, gretje, sterilizacija, sušenje, konec, program tekočine, nastavitve parametrov, 8, temperatura, 9, čas sterilizacije.	17
Slika 5: Brezprašna laminarna komora – laminarij.	19
Slika 6: Sterilizator s steklenimi kroglicami. Orodje sterilizirate tako, da ga potisnete za 25 sekund v steklene kroglice, ogrete na 250 °C.	20
Slika 7: Rastna komora je posebni inkubator z natančno kontroliranimi dejavniki okolja kot so kakovost in količina svetlobe, dolžina osvetljevanja, temperatura in vlažnost.	22
Slika 8: V 350 ml kozarce razlijte 30 ml gojišča, v 100 ml ali 175 ml kozarce razlijte 20 ml gojišča.	31
Slika 9: Splošna shema, ki povzema eksperimente v tkivni kulturi; RRR, rastlinski rastni regulatorji...	35

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Izbira programov na parnem sterilizatorju tipa A-21 V (Kambič).....	18
Preglednica 2: Sestava MS gojišča (Murashige in Skoog, 1962) z dodanim organskim virom C (saharozo) in strjevalcem gojišča	25
Preglednica 3: Sestava MS gojišča; koncentracije, izražene v mg L ⁻¹ ali v odstotkih (Murashige in Skoog, 1962).....	26
Preglednica 4: Priprava osnovne raztopine OR 1; koncentracije so izražene v g L ⁻¹ ali v mg L ⁻¹	27
Preglednica 5: Priprava osnovne raztopine OR 2-3; koncentracije so izražene v g L ⁻¹ ali v mg L ⁻¹	27
Preglednica 6: Priprava osnovne raztopine OR 4; koncentracije so izražene v g L ⁻¹ ali v mg L ⁻¹	27
Preglednica 7: Priprava osnovne raztopine OR1; koncentracije so izražene v g L ⁻¹ ali v mg L ⁻¹	27
Preglednica 8: Priprava osnovnih raztopin, najpogosteje uporabljenih RRR.....	28
Preglednica 9: Določanje utežne koncentracije (mg L ⁻¹) iz znane molarne koncentracije (μM) in določanje molarne koncentracije (μM) iz znane utežne koncentracije (mg L ⁻¹)	29
Preglednica 10: Priprava gojišča.....	32
Preglednica 11: Rastlinski rastni regulatorji CITOKININI pretvorbe koncentracije [mg L ⁻¹] / molarnost [μM].....	44
Preglednica 12: Rastlinski rastni regulatorji AVKSINI pretvorbe koncentracije [mg L ⁻¹] / molarnost [μM].....	45
Preglednica 13: Drugi rastlinski rastni regulatorji koncentracije/molarnost [μM] pretvorbe in kemijske analize	46

ISBN 978-961-286-072-1



Univerza v Mariboru

Fakulteta za naravoslovje
in matematiko