

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Nataša ČERANIČ

**MORFOLOŠKA ANALIZA PLODU FIŽOLA
(*Phaseolus vulgaris* L.) OKUŽENEGA Z GLIVO
Colletotrichum lindemuthianum (Sacc. & Magnus)
Briosi & Cavara**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Nataša ČERANIČ

**MORFOLOŠKA ANALIZA PLODU FIŽOLA (*Phaseolus vulgaris* L.)
OKUŽENEGA Z GLIVO *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. &
Magnus) Briosi & Cavara**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF *Phaseolus vulgaris* L. BEAN
INFECTED BY *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi
& Cavara**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje kmetijstvo agronomija, smer hortikultura. Delo je bilo opravljeno na Katedri za zoologijo, Oddelka za biologijo, Katedri za sadjarstvo, Oddelka za agronomijo in Kmetijskem inštitutu Republike Slovenije.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Damjano DROBNE in kot somentorja prof. dr. Francija ŠTAMPARJA.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Zlata Luthar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Damjana Drobne
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Franci Štampar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Franci Aco Celar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

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

Nataša Čeranič

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	635. 652: 581. 4: 632. 4: 57. 086. 16 (043. 2)
KG	fižol/ bolezni rastlin/ fižolov ožig/ glive/ <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> / morfološka analiza/ histološke tehnike/ barvanje/ histološka barvila
AV	ČERANIČ, Nataša
SA	DROBNE, Damjana (mentor)/ ŠTAMPAR, Franci (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI	2015
IN	MORFOLOŠKA ANALIZA PLODU FIŽOLA (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) OKUŽENEGA Z GLIVO <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP	IV, 44 str., 3 pregl., 17 sl., 47 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Razlika med rastlinsko in glivno celično steno je predvsem v sestavi ogljikovih hidratov. Rastlinska celična stena je večinoma iz celuloze. Poleg celuloze, v rastlinski celični steni prevladujejo tudi drugi številni polisaharidi kot so pektini in hemiceluloza. Glivna celična stena je kompleksna struktura hitina, glukana in drugih polimerov. Zaradi njune različne sestave pride do različne obarvanosti opazovanega tkiva. S histološko metodo smo ugotavljali razliko v obarvanosti celične stene neokuženega in z glivo okuženega plodnega lista fižola. Na vzorcih okuženega in neokuženega plodnega lista fižola smo uporabili tri histološka barvila, Toulidin modro, Hematoksilin-eozin in Polak. Jasno lokalizacijo rastlinske in glivne celične stene smo dosegli z barvanjem okuženih vzorcev s Toluidin modro. Raziskavo smo podkrepili z barvanjem izolata glive <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> s Toluidin modro. Pri tem načinu barvanja so se glivne hife enako izrazito diferencialno obarvale kot v vzorcih okuženega plodnega lista fižola.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2

DC 635. 652: 581. 4: 632. 4: 57. 086. 16 (043. 2)

CX bean/ *Phaseolus vulgaris*/ fungi/ fungal diseases/ *Colletotrichum lindemuthianum*/ morphological analysis/ histological techniques/ histological staining/

AU ČERANIČ, Nataša

AA DROBNE, Damjana (supervisor)/ ŠTAMPAR, Franci (co-adviser)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy

PY 2015

TY MORPHOLOGICAL ANALYSIS OF *Phaseolus vulgaris* L. BEAN INFECTED BY *Colletotrichum lindemuthianum* (Macc. & Magnus) Briosi & Cavara

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)

NO IV, 44 p., 3 tab., 17 fig., 47 ref.

LA sl

Al sl/en

AB The difference between plant and fungal cell wall is mainly in the composition of carbohydrates. The most characteristic component found in all plant cell wall is cellulose. In addition to cellulose, plant cell wall contains several matrix polysaccharides that are grouped into two general categories: the pectic polysaccharides and hemicellulose. While fungal cell wall is a complex structure composed of chitin, glucans and other polymers. Due to their different structure also occur various coloration in observed tissue. This study was performed to reveal at the histological level the difference in staining plant and fungal cell wall. Three different procedures of histological staining with Toluidine blue O, Hematoxylin-eosin and Pollack were evaluated on uninfected and infected *P. vulgaris* specimens. The best differential staining of plant and fungal cell wall was obtained with Toluidine blue O solution. The research was corroborated by staining fungal isolates with Toluidine blue O. Fungal hyphae were same highly differentiated dyed as specimens of infected fruit beans.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	V
KEY WORDS DOCUMENTATION	VI
KAZALO VSEBINE	VII
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO SLIK	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
1 UVOD	1
1.1 HIPOTEZA	1
1.2 NAMEN IN IZHODIŠČA	1
1.3 PRIČAKOVANI REZULTATI	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 DRUŽINA Fabaceae – METULJNICE	3
2.2 BOTANIČNA KLASIFIKACIJA FIŽOLA (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	3
2.3 STRUKTURA PLODNEGA LISTA FIŽOLA	4
2.4 RASTLINSKA CELIČNA STENA	6
2.4.1 Zgradba rastlinske celične stene	6
2.4.1.1 Celuloza	8
2.4.1.2 Lignin	8
2.5 GLIVNA CELIČNA STENA	8
2.5.1 Zgradba glivne celične stene	8
2.6 OPIS IN BOTANIČNA KLASIFIKACIJA GLIVE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	9
2.7 RAZVOJNI KROG GLIVE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	10
2.8 INTERAKCIJA MED GLIVO <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> in PLODOM FIŽOLA	11
3 MATERIAL IN METODE	13
3.1 PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA IN INOKULUMA GLIVE	13
3.2 TRETIRANJE RASTLINSKEGA MATERIALA – PRELIMINARNI POSKUS	13
3.2.1 Vbodni test	13
3.2.2 Direktni nanos s kapanjem	14
3.2.3 Direktni nanos s škropljenjem	14

3.3	TRETIRANJE RASTLINSKEGA MATERIALA S ŠKROPLJENJEM IN PRIPRAVA VZORCEV ZA HISTOLOŠKA PREUČEVANJA	15
3.4	PRIPRAVA SVEŽIH PREPARATOV	15
3.4.1	Barvanje plastidov v rastlinskih celicah z jodovico	15
3.5	PRIPRAVA TRAJNIH PREPARATOV	16
3.5.1	Fiksacija rastlinskega in glivnega materiala	16
3.5.2	Priprava rezin	17
3.5.2.1	Dehidracija vzorcev	17
3.5.2.2	Vklapljanje v parafin	17
3.5.2.3	Rezanje na mikrotomu	17
3.5.3	Barvanje preparatov s histološkimi barvili	18
3.5.3.1	Barvanje celične stene neokuženega in okuženega rastlinskega tkiva z Weigertovim železovim hematoksinom in eozinom	18
3.5.3.2	Barvanje celične stene neokuženega in okuženega rastlinskega tkiva in izolatov glive s Toluidin modro	20
3.5.3.3	Barvanje celične stene neokuženega in okuženega rastlinskega tkiva po Polaku	20
3.5.4	Preučevanje preparatov rastlinskega tkiva s svetlobnim mikroskopom	21
4	REZULTATI	22
4.1	PRIKAZ SIMPTOMOV BOLEZNI NA PLODNEM LISTU FIŽOLA PO NANOSU GLIVE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	22
4.2	BARVANJE NEOKUŽENIH IN OKUŽENIH CELIC PLODNEGA LISTA FIŽOLA S HISTOLOŠKIMI BARVILI	23
4.2.1	Barvanje neokuženih in okuženih epidermalnih celic plodnega lista fižola	23
4.2.2	Barvanje neokuženih in okuženih subepidermalnih celic plodnega lista fižola	24
4.2.3	Barvanje neokuženih in okuženih mezofilnih celic plodnega lista fižola	25
4.2.4	Barvanje neokuženih in okuženih prevajalnih celic plodnega lista fižola	26
4.2.5	Barvanje neokuženih in okuženih celic z jedri v plodnem listu fižola	27
4.2.6	Barvanje okuženih epidermalnih celic plodnega lista fižola z glivnimi trošišči in konidiji	28
4.2.7	Barvanje plastidov v neokuženih mezofilnih in okuženih subepidermalnih celicah plodnega lista fižola	29
4.3	BARVANJE OKUŽENEGA PLODNEGA LISTA FIŽOLA S TOLUIDIN MODRO	30
4.4	BARVANJE IZOLATOV GLIVE S TOLUIDIN MODRO	31

5	RAZPRAVA	32
5.1	BARVANJE NEOKUŽENIH CELIČNIH STEN PLODNEGA LISTA FIŽOLA S HISTOLOŠKIMI BARVILI	32
5.2	BARVANJE NEOKUŽENIH CELIC Z JEDRI IN PLASTIDI S HISTOLOŠKIMI BARVILI	33
5.3	RAZVOJ GLIVE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> V PLODNEM LISTU FIŽOLA IN OBARVANOST OKUŽENIH CELIČNIH STEN	34
5.4	BARVANJE GLIVE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> S TOLUIDIN MODRO	36
6	SKLEPI	37
7	POVZETEK	38
8	VIRI	40
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Botanična klasifikacija fižola, latinsko in slovensko ime	3
Preglednica 2: Botanična klasifikacija glive, latinsko ime	10
Preglednica 3: Simptomi okužbe na plodnih listih fižola spranem z dH ₂ O in tretiranem s škropljenjem z glivo <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	22

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Sveži preparat prečnega prereza plodnega lista fižola pod stereolupo.	4
Slika 2: Trajni preparat, debeline 8 µm, prečnega prereza plodnega lista fižola barvanega s TM, pod svetlobnim mikroskopom.	5
Slika 3: Sveži preparat prečnega prereza plodnega lista fižola s kloroplasti in škrobom v celicah mezokarpa (A) in trajni preparat prevajalnih celic obarvanih s TM (B) pod svetlobnim mikroskopom	6
Slika 4: Primarna (A) in sekundarna (B) rastlinska celična stena pri lesnatih rastlinah	7
Slika 5: Glivna celična stena	9
Slika 6: Razvoj glive <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> po okužbi rastlinskega tkiva	11
Slika 7: S škropljenjem okuženi plodovi fižola (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) v sterilni plastični posodi z mrežnim podstavkom	14
Slika 8: Priprava plodnega lista fižola za fiksiranje	16
Slika 9: Morfološka analiza epidermalnih celic plodnega lista fižola s histološkimi barvili	23
Slika 10: Morfološka analiza subepidermalnih celic plodnega lista fižola s histološkimi barvili	24
Slika 11: Morfološka analiza mezofilnih celic plodnega lista fižola s histološkimi barvili	25
Slika 12: Morfološka analiza prevajalnih celic plodnega lista fižola s histološkimi barvili	26
Slika 13: Morfološka analiza celic z jedri v plodnem listu fižola s histološkimi barvili	27
Slika 14: Morfološka analiza epidermalnih celic plodnega lista fižola z glivnimi plodišči in konidiji obarvani s histološkimi barvili	28

Slika 15: Morfološka analiza mezofilnih in subepidermalnih celic plodnega lista fižola s plastidi obarvani s histološkimi barvili	30
Slika 16: Morfološka analiza plodnega lista fižola okuženega z glivo <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> in barvanega s Toluidin modro	30
Slika 17: Barvanje glive <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	31

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Ex	eksokarp
Sep	subepidermalna plast
Pa	parenhim
Xl	ksilem
Ph	floem
Pr. t.	prevajalna tkiva
Me	mezokarp
Hr. š.	hrbtni šiv
Tr. š.	trebušni šiv
En	endokarp
Tr	trihomi ali laski
Ph	penetracijska hifa
Iv	infekcijski vezikel
Ac	acervul
°C	stopinja Celzija, enota za merjenje po skali, pri kateri je vrelišče vode pri 100 °C
PDA	krompirjev dekstrozni agar
HCl	klorovodikova kislina
dH ₂ O	destilirana voda
cm	centimeter
µm	mikrometer
µl	mikroliter

1 UVOD

Fižol je pomembno živilo današnjega časa. Pri pridelovanju fižola je eden izmed omejujočih dejavnikov fižolov ožig, ki ga povzroča gliva *Colletotrichum lindemuthianum*. Patogen okužuje nadzemne dele rastline, največ škode pa povzroči na plodovih. Hife glive prodirajo v notranjost rastlinskega tkiva preko kutikule in epidermalnih celic do mezofilnih celic. Ob močnejši okužbi lahko gliva prodre v celično steno v kateri se širi do propada celice, v njej pa se lahko ohranja tudi po propadu. Po okužbi nastanejo na plodu uleknjene in podolgovate temno rjave pege, v katerih se razvijejo oranžna trosišča glive oziroma acervuli. Morfološke analize na rastlinskem tkivu plodnega lista fižola so razmeroma redke, čeprav bi nam pomembno prispevale k razumevanju in omejevanju te okužbe.

Za razumevanje razvoja (okužbe) škodljivega organizma po rastlinskem tkivu je nujno potrebno poznavanje tako patogena kot gostitelja. Pomembno je poznavanje genetskih, biokemijskih, fizioloških in histoloških procesov v dani rastlini pred in po okužbi z določenim patogenim mikroorganizmom, pomembna je tudi zanesljiva identifikacija vrste povzročitelja in prepoznavanje populacij znotraj posameznih vrst (Munda in Gerič-Stare, 2011).

Histološke raziskave so namenjene slikovitemu pregledu živega in neživega organizma. Pomagajo nam pri odkrivanju sprememb v tkivih in organih ter posameznih celicah na celotnem biotehnološkem področju (Yeung, 1999).

1.1 HIPOTEZA

Delovna hipoteza naloge je:

- svetlobna mikroskopija nam bo, z uporabo različnih histoloških barvil, omogočila razlikovanje med rastlinsko in glivno celično steno v okuženem plodnem listu fižola.

1.2 NAMEN IN IZHODIŠČA

Namen naloge je:

- ugotoviti primeren način okuževanja rastlinskega materiala za namene histoloških raziskav;
- ugotoviti primernost izbranih metod barvanja rastlinskih in glivnih celičnih sten pred in po nanosu glivne suspenzije na plodne liste fižola za namen svetlobne mikroskopije;

- ugotoviti katere so tiste strukturne spremembe rastlinskega tkiva, ki so posledica okužbe z glivo *Colletotrichum lindemuthianum*.

1.3 PRIČAKOVANI REZULTATI

Pričakovali smo, da nam bo svetlobna mikroskopija pripomogla k razumevanju odnosov med glivo in rastlino ter možnost obvladovanja okužb.

2 PREGLED OBJAV

2.1 DRUŽINA Fabaceae - METULJNICE

Gojenje stročnic sega v prazgodovinski čas. Razširjene so tako v zmernem in hladnem podnebju kot v subtropskih in tropskih območjih. V red stročnic sodi družina metuljnic (Fabaceae). Ocenjujejo, da družino metuljnic sestavlja približno 730 rodov z več kot 19400 vrstami (Reš, 2007).

Sprva je fižol veljal za meso revnih, danes pa je zaradi bogate prehranske vrednosti nenadomestljiva prehrabeno živilo. Je najcenejši vir beljakovin, pomemben vir vitaminov (iz skupine B) in vsebuje malo maščob (Reš, 2007).

Fižol ima spiralasto nameščene liste, ki so lahko enostavni ali sestavljeni, pernat ali dlanasti. Na bazi listov se pogosto pojavljata dva prilista. Cvetovi so dvospolni, večinoma somerni, z dvojnim cvetnim odevalom. Čaša cveta je večinoma cevasta, dvoustna ali s petimi zobci. Venčnih listov je pet. V cvetu je lahko do deset prašnikov, ki so zrasli v cev, lahko pa je deseti prašnik prost. Nadrasel pestič je iz enega karpela. Plod pri metuljnicah je strok (Turk, 2002).

2.2 BOTANIČNA KLASIFIKACIJA FIŽOLA (*Phaseolus vulgaris* var. *communis* L.)

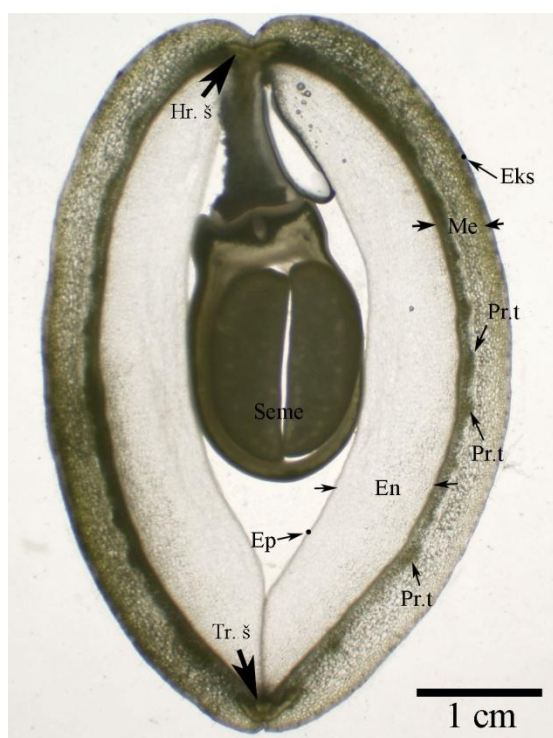
V preglednici 1 je predstavljena botanična razdelitev fižola (*Phaseolus vulgaris* L.).

Preglednica 1: Botanična klasifikacija fižola, latinsko in slovensko ime

Klasifikacija	Latinsko ime	Slovensko ime
KRALJESTVO	Eukaryota – Plantae	prave rastline
ODDELEK	Spermatophyta	semenovke
PODODDELEK	Angiospermae	kritosemenke
RAZRED	Dicotyledonae	dvokaličnice
RED	Fabales	stročnice
DRUŽINA	Fabaceae	metuljnice
ROD	<i>Phaseolus</i>	fižol
VRSTA	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	navadni fižol
RAZLIČICE	<i>Nanus/ Communis</i>	Visok/ Nizek

2.3 STRUKTURA PLODNEGA LISTA FIŽOLA

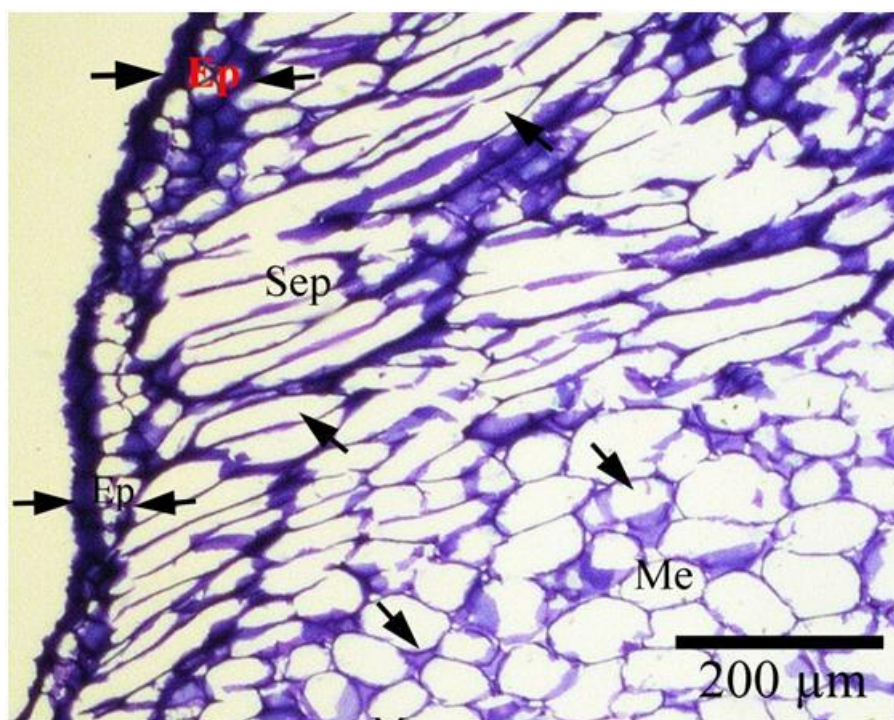
Plod fižola je strok, ki nastane iz enega karpela in se odpira po trebušnem in hrbtnem šivu ali osrednji žili karpela (Slika 1). Perikarp se sestoji iz treh plasti, eksokarpa, mezokarpa in endokarpa (Dermastia, 2010). Eksokarp sestavljajo epidermalne celice, ki imajo odebeljeno zunanjo plast s kutikulo, notranja plast je parenhimska, in 1-2 plasti podolgovatih, izodiametričnih, subepidermalnih, kolenhimskih celic. Celice povrhnjice so brez medceličnih prostorov (Sinkovič, 2010). Za celotno plast eksokarpa je značilno, da z zrelostjo otrdi.



Eks – eksokarp (zunanji epiderm) in 1-2 plasti subepidermalnih celic; Me – mezokarp; En – endokarp; Pr.t. – prevajalna tkiva; Ep – notranji epiderm; Hr. š – hrbtni šiv; Tr. š – trebušni šiv; seme (foto: Turk B., Čeranič N., 2013)

Slika 1: Sveži preparat prečnega prereza plodnega lista fižola pod stereolupo.

Mezokarp sestavljajo parenhimske in prevajalne celice, v katerih se nahajajo plastidi (Slika 1, 2 in 3-A, B). Prevajalna tkiva se nahajajo na notranjem robu mezokarpa in oskrbujejo plod s hranilnimi snovmi (Kranjčič, 2001).



Ep – epidermalne celice; Sep – 1-2 plasti subepidermalnih celic; Me – mezofilne celice (foto: Čeranič N., 2012)

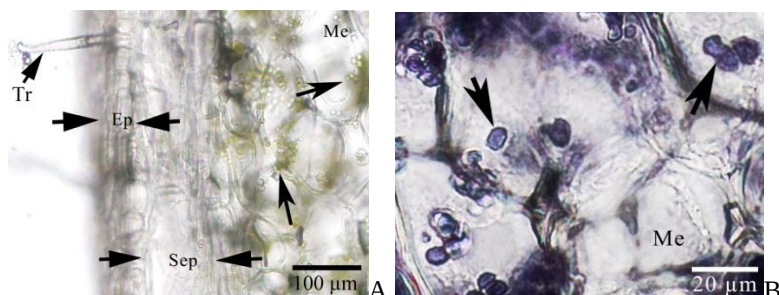
Slika 2: Trajni preparat, debeline 8 μm, prečnega prereza plodnega lista fižola barvanega s TM, pod svetlobnim mikroskopom.

Vsaka žila oziroma prevajalno tkivo sestoji iz dveh delov: leptoma ali floema in hadrona ali ksilema. Sitasti del žile ali floem se nahaja na spodnji strani plodnega lista. Celice sitastega dela žile oziroma floema so relativno tanke in vsebujejo sklerenhimatski ovoj (likova vlakna) ter parenhimatske celice. Te celice so ponavadi sestavljene iz primarne celične stene. Vodovodni del žile ali ksilem se nahaja na zgornji strani plodnega lista. Celice ksilema vsebujejo sklerenhimatski ovoj (lesna vlakna ali libriform), z olesenelimi celičnimi stenami. Pri rastlinah služi kot mehanska opora. Te celice so ponavadi sestavljene iz sekundarne celične stene (Kranjčič, 2001).

Najbolj notranja plast perikarpa je endokarp (Batič in sod., 2011). Endokarp sestavljajo izodiametrične parenhimatske celice s tankimi celičnimi stenami (Nassar in sod., 2010). Površinska plast endokarpa, na notranji strani plodnice, je epiderm ali povrhnjica (Batič in sod., 2011).

Seme je sestavljeno iz dveh kličnih listov in je s perikarpom povezano preko funikla pritrjenega na trebušnem šivu stroka. Na površju ploda so laski ali trihomi (Slika 1 in slika 3-A).

Plastidi v celicah mezokarpa so kloroplasti in škrob (Slika 2-A, B). So zeleni fotosintetsko aktivni plastidi in se nahajajo v tkivih rastlin neposredno izpostavljenih sončni svetlobi (Sinkovič, 2010).



3-A: Tr – Trihomi ali lasi; Ep-epidermalne celice; Sep-1-2 plasti subepidermalnih celic; Me- mezofilne celice z zelenimi kloroplasti (črne puščice); 3-B: Vijolično obarvana škrobna zrna v mezofilnih celicah (Me); Ep-epidermalne celice, Sep-subepidermalne celice, Me- mezokarp (foto: Turk B., Čeranič N., 2013)

Slika 3: Sveži preparat prečnega prereza plodnega lista fižola s kloroplasti in škrobom v celicah mezokarpa (A) in trajni preparat prevajalnih celic obarvanih s TM (B) pod svetlobnim mikroskopom

2.4 RASTLINSKA CELIČNA STENA

Celična stena rastlin nastane že v pelodnem zrnju, t.j. po oploditvi jajčne celice. Gradniki celične stene, večinoma polisaharidi, se sintetizirajo v golgijevem aparatu, del pa tudi v endoplazmatskem retikulumu (Dermastia, 2010). Za nastanek celične stene je primerno kislo okolje (pH okrog 5,5), za katerega skrbi protonska črpalka in avksini. Najprej nastane primordijalna, s celično membrano povezana celična stena, ki se kasneje razvije v osrednjo lamelo. Primordijalna stena raste najprej površinsko (intususcepcija), nato pa se začne debeliti (apozicija), nanjo se nalagajo primarna, sekundarna in terciarna celična stena, ki tvorijo celotno odebeljeno celično steno (Sinkovič, 2010).

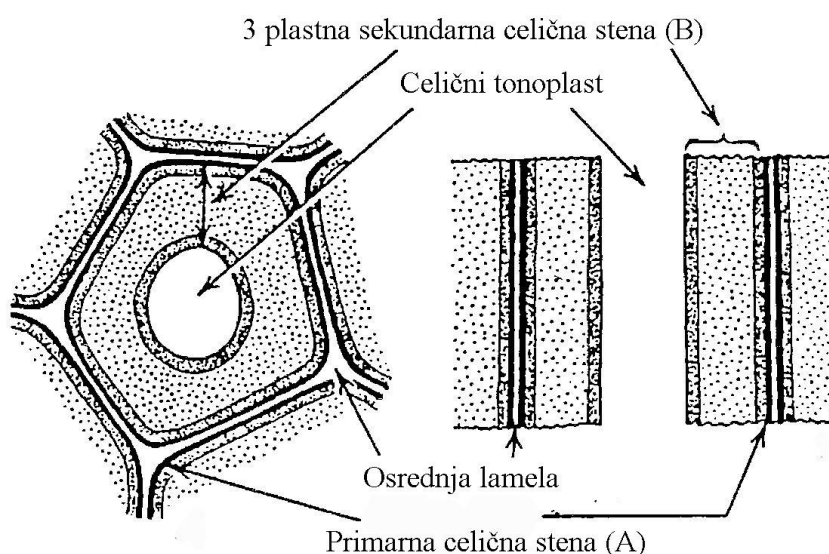
2.4.1 Zgradba rastlinske celične stene

Primordijalno celično steno tvori diktiosom. Mlada primordijalna celična stena je tanka in povezana s celično membrano (Batič, 2004). V nadaljnjem razvoju se primordijalna celična stena razvije v osrednjo lamelo. Primordijalna celična stena (osrednja lamela) je zgrajena iz majhnega dela beljakovin in protopektinov, celuloze še ni (Keegstra, 2010). Molekule D-galakturonske kisline so povezane na mestih 1-4 α galaktozidno vezjo v verige, imenovane poligalakturonske (pektinske) kisline. Je najbolj zunanja plast stene s katero se sosednje celice 'lepijo' med seboj. S površinsko rastjo tvorijo močno omrežje, ki daje obliko vakuolam in protoplastu (Cosgrove, 2005).

Z notranje strani osrednje lamele se začne nalagati druga komponenta celične stene, t.j. primarna celična stena. Sedaj začne celica z rastjo v debelino, še vedno pa raste tudi površinsko. Znano je, da je sestavljena iz 90 % polisaharidov, od tega je 10-20 % celuloze, prevladujejo pektini, hemiceluloza in 10 % beljakovin (predvsem glikoproteidi bogati z aminokislino hidroksiprolin) in fenolne snovi (Dermastia, 2010). V primarni steni je večje število celuloznih molekul združenih v mikrofibrile, ki so v primarni steni razporejene brez določenega reda (Sinkovič, 2010).

Sekundarna celična stena nastane z apozicijo in je večplastna in pri rastlinah poteka pri tvorbi mehanskih tkiv in ksilema (Sinkovič, 2010). Značilna je predvsem za lesnate rastline. Sekundarna celična stena se začne nalagati po končani primarni površinski rasti (Slika 4-A). Večinoma je triplastna in precej debelejša od primarne stene. Rast v debelino (nalaganje ali apozicija) sekundarne celične stene poteka tako, da se v citoplazmi nastale molekule celuloze in hemiceluloz od znotraj nalagajo na že obstoječo osrednjo lamelo in primarno celično steno (Leban, 2007).

Sekundarna stena vsebuje lignin (20-25 %), zato je bolj toga kot primarna stena in deluje predvsem kot oporna struktura. Lignin se začne nalagati tako, da pektinsko bogate primarne celične stene zamenja sinteza sekundarne celične stene, ki sestoji pretežno iz celuloznih (80-90 %) in hemiceluloznih slojev, ki se v naslednji fazi lignificirajo (Slika 4-B). Lignifikacija vedno sledi odlaganju polisaharidov in poteka v treh različnih stopnjah. Najprej se začne v vogalih in združeni osrednji lameli, po tem ko se oblikuje S1 sloj sekundarne stene. Med oblikovanjem S2 sloja sekundarne stene poteka proces lignifikacije počasneje. Po končani rasti sloja S2 se začne nalagati sloj S3. Glavnina lignina se odloži po sintezi polisaharidov v sloju S3 (Bloomsteadt, 2007).



Slika 4: Primarna (A) in sekundarna (B) rastlinska celična stena pri lesnatih rastlinah (Three most ..., 2014)

2.4.1.1. Celuloza

Celuloza ima v rastlinah predvsem oporno vlogo. Kemično je precej neobčutljiva in ne reagira z večino razredčenih kislin in baz. Sestavljajo jo β -D-glukopiranozne monomerne enote, ki so med seboj povezane z β (1-4)-glikozidnimi vezmi. Dve glukozni enoti, povezani z β (1-4)-glikozidno vezjo, predstavljata osnovni gradnik celulozne verige, celobiozo (Eaton in Hale, 1993).

2.4.1.2. Lignin

Kemične zgradbe lignina ni možno natančno določiti, ker molekule lignina nimajo enotne strukture niti določljive molekulske mase. Lignini nastanejo z naključno polimerizacijo treh monomerev fenilpropanskih enot: kumarilalkohola, koniferilalkohola in sinapilalkohola. Za razliko od celuloznih molekul, so lignini mrežasto prepleteni. Delno je topen v alkoholu in v nekaterih organskih kislinah (Leban, 2007). Lignin služi kot mehanska opora rastlini in obramba pred patogenimi mikroorganizmi.

2.5 GLIVNA CELIČNA STENA

2.5.1 Zgradba glivne celične stene

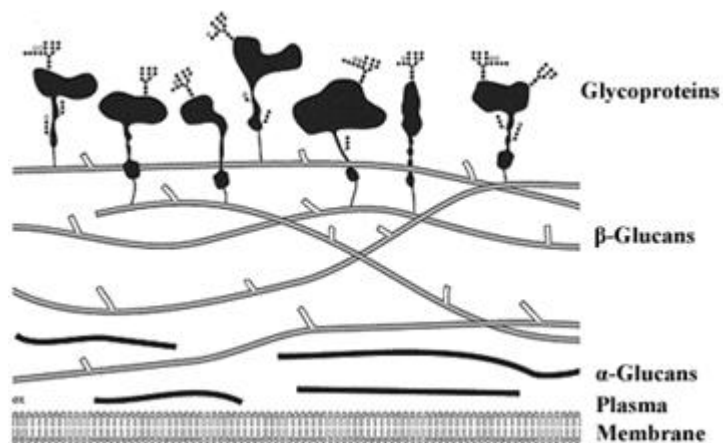
Celična stena je ključnega pomena za preživetje gliv. Celico ščiti pred osmotskim tlakom, stresu iz okolja in določa njeno obliko. Na eni strani je opisana kot rigidna struktura glikoproteinov in polisaharidov, na drugi pa kot dinamična struktura, ki je dovolj fleksibilna, da se prilagaja rasti celice (Grun, 2003).

Glavne komponente celične stene so hitin in glikoproteini, (1,3)- α -glukan, (1,6)- β -glukan in (1,3)- β -glukan (glukan je polimer glukoze).

Hitin je linearen, nerazvejan polimer iz β (1,4)-N-acetilglukozaminskih ostankov in tvori mikrofibrile, ki so stabilizirani z vodikovimi vezmi. V celičnih stenah gliv je delež hitina izredno variabilen, ker je njegovo nalaganje v celični steni časovno in prostorsko uravnano (Bulawa, 1993). Zmožnost prilagajanja celične stene spremembam okolja jo uvršča med idealno tarčo za razvoj novih fungicidnih sredstev.

Najbolj zunanji del celične stene je iz glikoproteinov, kjer je na polipeptidno ogrodje pripet polisaharid, ponavadi iz manoze, galaktoze in ksiloze. Tako nastali glikoproteini so manoproteini, peptidogalaktomanini in ksilomanoproteini (Ross, 2001). Glikoproteini imajo pomembno vlogo pri zadrževanju vode, virulenci in adheziji.

V celični steni ima pri prečnih povezavah celičnih komponent klučno vlogo (1,6)- β -glukanski polimer. S pomočjo (1,6)- β -glukanov so (1,3)- β -glukanski polimeri in hitin povezani z manoproteini in tako formirajo kompaktno celično steno (Kollar in sod., 1997).



Slika 5: Glivna celična stena (Grun, 2003: 11)

Sloj α -glukana je fibrilaren in ima strukturno vlogo. V primeru, da je prisoten, leži tesno ob plazemski membrani in tako naredi osnovni sloj celične stene tog. Sloj α -glukana je iz α -1,3-glukanskih polimerov, α -1,4-glikozidi pa so redkeje prisotni. β -glukani so v celični steni gliv prisotni v dveh oblikah, in sicer v (1,3)- β -glukanov ter v (1,6)- β -glukanov. (1,3)- β -glukani so prisotni v celičnih stenah večine gliv, izjema so celične stene hif gliv Zygomycota (Barreto-Bertger in Gorin, 1983). Veriga (1,3)- β -glukana ima vzmeti podobno strukturo, ki celični steni zagotavlja elastičnost in raztežno trdnost. (1,3)- β -glukani so med seboj povezani z (1,6)- β -vezjo. Na druge komponente celične stene so vezani kovalentno, in sicer z nereducirajočim koncem je (1,3)- β -glukan prečno vezan na reducirajoče konce verig hitina z 1-4 vezjo (Klis in sod., 2002; Kollar in sod., 1997).

2.6 OPIS IN BOTANIČNA KLASIFIKACIJA GLIVE *Colletotrichum lindemuthianum*

Gliva napada vse nadzemne dele fižola. Naprej se temno rjave pege pojavijo na kličnih listih, nato se prenesejo na stebelca in listne peclje. Tu se oblikujejo drobne, podolgovato oblikovane, rjave pegice, iz katerih se kasneje oblikujejo vdrte pege. Na starejših steblih so te lahko tudi do 7 mm dolge. Bolezenska znamenja se pojavijo tudi na listih in ob listnih žilah. Sprva so pege rdečkaste, s časom pa postanejo temno rjave do črne. Največ škode povzročijo bolezenska znamenja na strokih, kjer se tvorijo rjave pege z rdečkastim, rahlo dvignjenim robom, v sredini pa se razvijejo vdrte razjede. Tu se tudi v največji meri tvorijo konidiji, kar lahko opazimo kot svetel popr. Pege, nepravilno okroglastih oblik, izgledajo, kot da bi bile vžgane v tkivo (FITO-INFO, 2014).

V preglednici 2 je predstavljena botanična razdelitev glive *Colletotrichum lindemuthianum*.

Preglednica 2: Botanična klasifikacija glive in latinsko ime

Klasifikacija	Latinsko ime
KRALJESTVO	Fungi
DEBLO	Ascomycota
RAZRED	Sordariomycetes
RED	Glomerellales
DRUŽINA	Glomerellaceae
ROD	<i>Colletotrichum</i>
VRSTA	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>

Gliva *Colletotrichum lindemuthianum* je neobligatni parazit, ki okužuje vse nadzemne dele rastlin. Prezimi v latentni obliki v okuženem semenu, okuži lahko že kalčke, največ škode pa povzroči na strokih (Celar, 2011). Iz semena požene micelij v rastočo rastlinico, kjer se že zgodaj spomladi pojavijo prva bolezenska znamenja. V vdratih pegah oblikuje plodišča, kjer se tvorijo enocelični konidiji, s katerimi se gliva širi po in med rastlinami. V ugodnih pogojih lahko konidiji kalijo v 6 do 9 urah po naselitvi na zdravo rastlinsko tkivo. V fiziološki zrelosti semena ali plodovi ne kažejo začetnih znamenj okužbe (FITO-INFO, 2014). Prva bolezenska znamenja se lahko pojavijo, ko postane plod užitno zrel (Prusky in Plumbey, 1992; Prusky, 1996). Hife nato prodrejo skozi povrhnjico ali epidermis globlje v rastlinsko tkivo. Po nekaj dneh pride do encimskega razkroja celičnih sten. Poškodba se kaže v obliki vodenih peg, ki kasneje potemniijo. V pegah se nakopiči micelij iz katerega se oblikujejo acervuli z novimi konidiji.

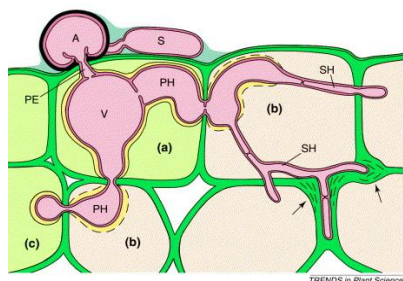
2.7 RAZVOJNI KROG GLIVE *Colletotrichum lindemuthianum*

Gliva prezimi v okuženem semenu. Zgodaj spomladi se, ob ugodnih vremenskih razmerah, micelij glive razraste v kalečo rastlinico. Na kličnih listih se vidijo prvi znaki okužbe, ki se kažejo kot uleknjene in podolgovate temno rjave pege. Na uleknjenih pegah gliva zelo hitro oblikuje ležišča trosov (acervule) in v njih veliko enoceličnih trosov (konidijev). Ob veliki vlažnosti in ugodnih vremenskih razmerah se trosi širijo na dele zdravih rastlin kot so listi, stebila in stroki. Pri zgodnji okužbi stroka preraste micelij v zrno, v katerem prezimi z vidnimi rjavimi pegami ali brez njih (Maček, 1991).

Bolezen najhuje razsaja v vlažnem vremenu in na nizkih sortah fižola. Za kalitev trosov je temperaturno območje trosov zelo široko (od 4 do 34 °C, z optimumom od 22 do 23 °C) (Maček, 1991).

2.8 INTERAKCIJA MED GLIVO *Colletotrichum lindemuthianum* IN PLODOM FIŽOLA

Konidije glive raznaša veter ob vlažnem vremenu. Na rastlino se ujamejo s pomočjo rastlinskih laskov ali trihomov. Konidiji imajo na svojem površju maščobne kapljice ali sluznato snov iz glikoproteinov, polisaharidov in encimov. Maščobne kapljice omogočajo konidijem, da se pritrdijo na rastlinsko tkivo, hkrati pa jih ščitijo pred izsušitvijo, UV žarki in (toksičnimi) izločki rastline (fenoli) (Bailey in sod., 1992; Leite in Nicholson, 1992). V tem času potekajo med glivo in rastlino prepoznavne reakcije. Če v gostitelju pride do začetnega prepoznavnega signala, kar pomeni, da ne pride do obrambne reakcije s strani rastline, se bolezen lahko razvije. Narava zgodnjih dogodkov še ni popolnoma jasna. Na prepoznavanje lahko vpliva ena izmed biokemičnih spojin, struktur ali poti.



S – konidij; A – apresorij; PE – penetracijska hifa; V – infekcijski vezikel; PH – primarna hifa; SH – sekundarna hifa; (a) – biotrofična faza; (b) in (c) – nekrotrofična faza; črne puščice – lignifikacija celičnih sten (Mendgen in Hann, 2002)

Slika 6: Razvoj glive *Colletotrichum lindemuthianum* po okužbi rastlinskega tkiva

Po naselitvi na rastlinsko tkivo iz trosa požene klična hifa, s katero se gliva pritrdi na površje gostitelja. Iz klične hife se nato razvije apresorij (A). Apresorij je nabrekla konica hife ali klične hife, ki olajšuje pritrditev in vdor glive v gostitelja. Običajno je mehurčast ali cevast s plosko površino na stiku z gostiteljsko površino. Iz apresorija se razvije penetracijska hifa (PE) oziroma prodorni klin. S penetracijsko hifo gliva prodre celice epidermisa in v njih tvori infekcijski vezikel (V) (Agrios, 2005). Raziskave kažejo (Lopez, 2001), da lahko klična hifa glive *C. gleosporoides* neposredno prodre skozi kutikulo in celično steno povrhnjice med 3-48 ur po nanosu suspenzije trosov na rastlinsko tkivo. Do vdora glive v gostitelja lahko pride tudi 48-96 ur (Moraes in sod., 2013) ali 9-72 ur po tretiranju (Ogle in sod., 1990).

Gliva vdre v gostitelja z mehansko silo in encimskim mehčanjem snovi v celični steni. Po vdoru v celice povrhnjice oziroma epidermalne celice pride do prvega fizičnega stika med patogenom in gostiteljem. Iz infekcijskega vezikla se nato razvije primarna hifa (PH) iz nje pa sekundarna hifa (SH), ki izloča encime za razgradnjo celične stene, lahko pa se na njej oblikujejo trosi. Razgradni encimi povzročajo krhkost celic in omogočajo prenos spor v

hranilno bogate dele rastlinskih celic. Glavna spojina, ki potuje iz gostiteljske v glivno celico je saharoza (Agrios, 2005).

Po razvoju sekundarne hife se na plodu fižola ponavadi pojavijo svetlo rjavi madeži, ki se koncentrično širijo in razjedajo površje plodu oziroma rastlinsko tkivo. Nekateri avtorji navajajo (Silva in sod., 2006), da lahko pride pri okužbi z glivo *C. kahawae* do nekroze rastlinskega tkiva 48-72 ur po nanosu, po navedbi drugih avtorjev (Bolwell in sod., 2001) je do okužbe z glivo *C. lindemuthianum* prišlo šele po 5-7 dneh po nanosu glivne suspenzije na plodove fižola. Hitrost pojava bolezenskih znamenj je odvisna predvsem od agresivnosti izolata glive *C. kahawae* (Varzea in sod., 1999). Bolezenska znamenja, ki jih povzroča gliva *C. lindemuthianum*, imenujemo antraknoza in se kažejo kot uleknjene, bolj ali manj okrogle temne pege, na katerih se razvijejo trosišča (acervuli) in oranžni skupki trosov (konidijev) (Celar, 2011).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 PRIPRAVA RASTLINSKEGA MATERIALA IN INOKULOMA GLIVE

Semena fižola občutljive sorte 'Top crop' smo 29.3.2012 posejali v setvene plošče na Biotehniški fakulteti Oddelka za agronomijo in ga do 3.5.2012 gojili v rastlinjaku. Semena so bila izpostavljena 8/16 urni fotoperiodi (16 ur svetlo, 8 ur tema) in temperaturi v rastlinjaku, ki je bila enaka temperaturi ozračja (med 25 °C in 30 °C). Rastline smo v začetni fazi cvetenja presadili in jih do tretiranja z glivo *Colletotrichum lindemuthianum* gojili na prostem. Na vsakem grebenu smo posadili dve vrsti po 5 sadik skupaj. Namakanje je potekalo pod folijo tako, da je imela vsaka vrsta grmičkov svojo cev. Gnojili nismo. Ko so nastali prvi plodovi, smo izvedli laboratorijsko okužbo. Pred tem smo inokulum glive, na Kmetijskem inštitutu Oddelka za varstvo rastlin *in vitro* namnožili tako, da smo na krompirjev dekstrozni agar (PDA) prenesli kulture glive *C. lindemuthianum*. Te smo prelili s sterilno destilirano vodo in jih pustili 10 dni v hladilniku, da so se namnožile.

3.2 TRETIRANJE RASTLINSKEGA MATERIALA – PRELIMINARNI POSKUS

Zaradi nepoznavanja dinamike okužbe z glivo *Colletotrichum lindemuthianum* smo, 11.6.2012, na Kmetijskem inštitutu Oddelka za varstvo rastlin v prvi fazi poskusa opravili preliminarni poskus. Namen poskusa je bilo ugotoviti primerno metodo okužbe in količino nanešene/vnešene glivne suspenzije na/v plod fižola in spremljati pojav in razvoj okužbe.

Plodove (stroke) fižola smo razdelili v 3 skupine po 6, od katerih je bilo 5 tretiranih in en netretiran - kontrola. Pred vsakim načinom tretiranja smo plodove površinsko razkužili s 70 % etanolom jih sprali s sterilno destilirano vodo in obrisali s sterilno papirnato brisačo. Iz deset dni starih kultur glive *C. lindemuthianum* smo pod stereolupo s skalpelom postrgali trose in jih prenesli v čašo s 50 ml sterilne destilirane H₂O. S hemicitometrom smo določili število trosov v suspenziji in ga uravnali na 10⁵ trosov/ml. Nato smo na tri načine nanesli suspenzijo trosov na plodove fižola.

3.2.1 Vbodni test

S sterilnim nastavkom mikropipete smo na enem mestu ranili tkivo plodu ter na poškodovano mesto s pomočjo pipete nanesli 7 µl suspenzije trosov s koncentracijo 10⁵ trosov/ml.

3.2.2 Direktni nanos s kapanjem

Plodove smo tretirali tako, da smo s pipeto nanesli suspenzijo trosov neposredno na površje ploda. Uporabili smo 10 in 20 μ l suspenzije.

3.2.3 Direktni nanos s škropljenjem

Iz čaše smo glivno suspenzijo prelili v pršilko, katero smo predhodno razkužili s 70 % etanolom in plodove poškropili z vseh strani iz razdalje 15 cm.

Po tretiranju smo plodove prenesli v površinsko razkužene plastične posode. Na dno vsake plastične posode smo položili navlaženo, sterilno papirnato brisačo, da je bila zagotovljena 100 % zračna vlaga. Neposreden stik fižola in mokre brisače smo preprečili z mrežnim podstavkom (Slika 7). Posodo smo pokrili s površinsko razkuženim plastičnim pokrovom. Plodove smo inkubirali v rastni komori na temperaturi 23 °C, 10/14 urni fotoperiodi (10 ur tema in 14 ur svetlo) ter 100 % zračni vlagi. Pri teh pogojih naj bi gliva najbolje sporulirala. Potek okužbe smo spremljali od 13.6.2012 do 15.6.2012 na 24 ur.



Slika 7: S škropljenjem okuženi plodovi fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) v sterilni plastični posodi z mrežnim podstavkom

Na podlagi dobljenih rezultatov se je izkazala kot najboljša metoda okuževanja, direktno tretiranje plodov s škropljenjem, zato smo jo uporabili kot osnovo za histološko spremljanje poteka bolezni.

3.3 TRETIRANJE RASTLINSKEGA MATERIALA S ŠKROPLJENJEM IN PRIPRAVA VZORCEV ZA HISTOLOŠKA PREUČEVANJA

Tretiranje plodov smo izvedli po istem postopku kot je opisano v preliminarjem poskusu v točki 3.2 s to razliko, da je bilo v poskus vključenih 15 plodov. Od teh smo tretirali 13 plodov in 2 ploda sta bila netretirana oz. kontrola. Opazovanje razvoja bolezni smo začeli naslednji dan po tretiranju plodov in je trajalo 4 dni. Vsak dan oziroma na 24 ur smo izbrali en neokužen plod oz. kontrolo in dva ploda z najmanj poškodbe. Pri kontrolah oz. netretiranih plodovih smo pripravili sveže in trajne preparate za histološke raziskave. Pri tretiranem tkivu pa samo trajne preparate. Prvi dan spremljanja smo pod stereolupo izbrali dva ploda z najmanj vidnim delom okužbe, prav tako smo to storili pri nadaljnjih spremljanjih okužbe plodov. Fiksiranje in histološko spremljanje pojava in razvoja bolezni smo opravili na Oddelkih za agronomijo in biologijo.

3.4 PRIPRAVA SVEŽIH PREPARATOV

Zaradi identifikacije tkiv v svežih in trajnih preparatih, smo na Oddelku za agronomijo, na Katedri za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko, naredili sveže preparate netretiranih plodov oziroma kontrol, ki so nam omogočili vpogled v celotni prečni prerez plodu fižola. Plod smo z britvico prečno prerezali na tanke rezine. Rastlinsko tkivo smo položili na objektno steklo z vodo, ga pokrili s krovnim stekelcem in opazovali strukturo plodu pod stereolupo. Posamezna tkiva in celice smo opazovali pri različnih povečavah pod svetlobnim mikroskopom.

3.4.1 Barvanje plastidov (škrobnih zrn) v rastlinskih celicah z jodovico

Metodo barvanja z jodovico smo uporabili za ugotavljanje prisotnosti škrobnih zrn v celicah rastlinskega tkiva. Jod obarva amilozo temno vijolično do črno tako, da se veže na vijačnico amiloze, zaradi česar se absorbcija svetlobe spremeni (Sinkovič, 2010). S tem smo določili celice, ki sintetizirajo in shranjujejo škrob.

3.5 PRIPRAVA TRAJNIH PREPARATOV

Fiksacija je postopek, s katerim celice usmrtimo in pri tem poskušamo ohraniti celične in tkivne strukture čim bolj podobne živemu stanju. Fiksacija prepreči avtolizo in spremeni fizikalne lastnosti kemijskih snovi v tej meri, da jih nadaljnji postopki iz celice ne odstranijo.

3.5.1 Fiksacija rastlinskega in glivnega materiala

Fiksacija rastlinskega materiala

Okužene plodove fižola smo z britvico narezali na koščke velikosti cca 5 mm širine x 2-5 mm globine x 1-2 cm dolžine (slika 2). Tkivo smo izbrali na podlagi vidnih znamenj okužbe. Koščke smo nato prenesli v 20 ml stekleničke in jih prelili s Carnoyevim B fiksativom (mešanica absolutnega etanola, kloroforma in očetne kisline (abs. etanol:kloroform:ocetna kislina; 60:30:10); fiksativ je sestavljen tako, da so učinki na tkivo uravnoteženi. Fiksirani material smo hranili v hladilniku na 4 °C. S fiksiranjem smo začeli prvi dan po tretiranju in nadaljevali še trikrat v 24 urnih intervalih.



Slika 8: Priprava plodnega lista fižola za fiksiranje

Fiksacija glivnega materiala

Izolate glive *Colletotrichum lindemuthianum* smo izrezali z agarne gojišča na koščke velikosti približno 5 mm širine x 2-5 mm globine x 1-2 cm dolžine. Koščke smo nato prenesli v 20 ml stekleničke in jih prelili s Carnoyevim B fiksativom. Fiksiran material smo hranili v hladilniku pri 4 °C.

3.5.2 Priprava rezin

Priprava rezin za mikroskopiranje je sestavljena iz dehidracije fiksiranega materiala, vklapljanja v parafin in rezanja na mikrotomu.

3.5.2.1 Dehidracija vzorcev

Za dehidracijo fiksiranega materiala smo si v digestoriju pripravili tri čaše. V eno smo nalili absolutni etanol, v drugo raztopino absolutnega etanola in ksilena (1:1) ter v tretjo samo ksilen. Dehidracija je potekala pri sobni temperaturi. Carnoyev B reagent, s katerim smo fiksirali vzorce in jih hranili na 4 °C, smo v digestoriju odpipetirali s kapalko in vzorce prelili s 96 % etanolom. Po 30 minutah smo etanol odpipetirali in vzorce prelili s svežim 96 % etanolom in postopek še dva-krat ponovili. Po 90 minutah smo postopek spiranja nadaljevali z raztopino absolutnega etanola in ksilena (1:1) dvakrat po 15 minut. Tretje spiranje smo opravili samo enkrat s ksilenom za 15 minut.

3.5.2.2 Vklapljanje v parafin

Po dehidraciji tkiva je sledilo vklapljanje v parafin. Naredili smo si kadičke iz aluminijaste folije, jih označili in položili v stekleno posodo s paraplastom, ki je bila predhodno hranjena v pečici na 60 °C, in jo zaradi lažjega dela prenesli v vodno kopel na 60 °C, da se paraplast ni strdil. Nato smo dehidrirane vzorce tkiva prenesli v aluminijaste banjice in potopili v paraplast, da je oblił vzorce in vse skupaj prenesli v pečico na 60°C ter pustili 7 dni, da se je tkivo dobro prepojilo s paraplastom. V nasprotnem primeru lahko nastanejo pri rezanju na mikrotomu težave, ker se v tkivu pojavijo zračni mehurčki.

3.5.2.3 Rezanje na mikrotomu

Aluminijaste kadičke z vzorci potopljenimi v paraplast smo vzeli iz pečice in jih tri dni zračno sušili. Nato smo iz vzorcev odstranili aluminijasto folijo in jih pritrdili na lesene nosilčke. Tako so bili pripravljeni za rezanje na mikrotomu.

Mikroskopske rezine smo pripravili na Reichert – Jung mikrotomu. Pred rezanjem smo si zapisali ime vzorca, datum rezanja, izmerili smo mu dolžino ter narisali njegov izgled. Parafinski blok smo trapezoidno oblikovali okrog vzorca, tako da sta bili vzporedni stranici bloka vzporedni z rezilom. Ob rezanju se je oblikoval trak, ki smo ga razrezali na majhne skupine rezin debeline 8 µm. Na eno objektno steklo smo s kapalko kanili vodo in jo razmazali ter na njo položili 4-5 rezin dolžine 1-1,5 cm. Voda je omogočila rezinam, da so se raztegnile po površini objektnega stekla. Objektna stekla smo na termo plošči za približno 30 sekund izpostavili temperaturi 54 °C, da so se rezine raztegnile (ne predolgo, da se vosek ne raztopi). Odvečno vodo smo popivnali s filtrskim papirjem. Nato smo

objektna stekla z rezinami položili na ukrivljene steklene nosilce na termo plošči, da so se sušila in prilepila (približno 24 ur).

3.5.3 Barvanje preparatov s histološkimi barvili

Histokemijske metode nam omogočajo predvsem kvalitativno ugotavljanje posameznih kemijskih sestavin v celicah in zunajceličnem prostoru tkiva ter določanje njihovega mesta v histološkem preparatu. Osnova vseh histokemijskih reakcij je specifična vezava barvila na določeno kemijsko substanco v preparatu. Ta substanca je lahko fiziološka sestavina celice ali pa nastane v prvem delu reakcije molekul, ki so v celici prisotne.

3.5.3.1 Barvanje celične stene neokuženega in okuženega rastlinskega tkiva z Weigertovim železovim hematoksilinom in eozinom

Hematoksilin je bazično barvilo in obarva kisle strukture, torej jedra, vijolično. Eozin je kislja spojina in se veže na bazične dele celičnih struktur, torej predvsem na strukture v citoplazmi, in jih obarva rdeče (Kiernan, 1990).

V digestoriju smo pri sobni temperaturi iz rezin z dvakratnim pomakanjem za 3 minute v ksilen odstranili najprej parafin (deparafiniranje). Sledila je rehidracija z dvakratnim pomakanjem po 3 minute v 96 % propanolu, nato v 96 % etanolu in 70 % etanolu ter spiranje z vodo. Barvilo Weigertov železov hematoksilin smo na objektna stekla z vzorci nanесли s kapalko in ga pustili 10 minut. Nato smo pod mikroskopom ocenili ali je potrebno barvilo dodati oziroma ga odstraniti. Pribitek barvila iz tkiva smo odstranili s solno kisljim alkoholom, ki smo ga pustili delovati 30 do 60 sekund, odvečno barvo na objektnih steklih pa smo sprali z vodo. V primeru, če je bilo odstranjeno preveč barvila iz tkiva, smo ponovno dodali hematoksilin. Eozin smo na objektna stekla z rezinami nanесли s kapalko in ga pustili delovati 3 minute. Sledila je dehidracija v obratnem vrstnem redu, kot rehidracija. Dvakratno spiranje po 3 minute v 70 % etanolu, nato v 96 % etanolu in 96 % propanolu ter ksilen. Nato smo preparate pokrili s krovnim sredstvom, umetno smolo Pertex, za pripravo trajnih preparatov, ter pokrili s krovnim stekelcem.

Weigertov železov hematoksilin

A. Komponenta A:

- 2,5 g $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$
- 4,5 g $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
- 2 ml konc. HCl
- 298 ml dH_2O

B. * Komponenta B:

- 1 g Weigortevega Fe hematoksilina
- 100 ml 96 % etanola

*Raztopina mora biti vsaj tri tedne stara

Eozin

C. Komponenta

- 0,5 g eozin
- 500 ml 70 % etanol
- 2,5 ml očetne kisline

Solno kisli alkohol

D. Komponenta

- 99 ml 70 % alkohola
- 1 ml konc. HCl

Kisla voda

E. Komponenta

- 50 ml dH_2O + 0,1 ml LED očetne kisline

3.5.3.2 Barvanje celične stene neokuženega in okuženega plodnega lista fižola in izolatov glive s Toluidin modro

Toluidin modro je bazično polikromatsko barvilo, ki se uporablja kot metoda za barvanje tako svežih kot trajnih preparatov. V rastlinskem svetu ga botaniki uporabljajo kot sredstvo za določanje celičnih sten rastlinskih celic, predvsem za identifikacijo med lignificiranimi in nelignificiranimi celicami (Khalil in sod., 2009) ter pri barvanju jeder in citoplazme rastlinskega tkiva (O'Brien in sod., 1964). Primarne celične stene naj bi se od sekundarnih celičnih sten izrazito diferencialno obarvale svetleje modro od sekundarnih celičnih sten. Jedra naj bi se po tej metodi barvanja vzorcev obarvala svetlo modro in citoplazma rdeče (Kiernan, 1990).

Odstranitev parafina iz rezin in rehidracija sta bili opravljeni po postopku, ki je opisan v točki 3.5.3.1. Nato je sledilo 3 minutno barvanje s Toluidin modrim barvilom v 40 mL Coplinovih kozarcih. Objektna stekla s preparati stojijo pokončno v raztopini in del stekla z oznako ni potopljen in ostane suh. Nevezano barvilo smo 3 krat sprali z vodo in preparate za nekaj sekund dehidrirali v 95 % etanolu, nato v absolutnem alkoholu in ksileni. Nato smo preparate pokrili s krovnim sredstvom, umetno smolo Pertex, za pripravo trajnih preparatov ter pokrili s krovnim stekelcem.

3.5.3.3 Barvanje celične stene neokuženega in okuženega plodnega lista fižola po Polaku

Metodo barvanja po Polaku smo uporabili za določanje prisotnosti glive v rastlinskem tkivu. Parafinske rezine na objektnih steklih smo barvali po Polaku tako, da smo najprej z rezin odstranili parafin s ksilenom in nato opravili rehidracijo vzorcev enako kot je opisano v točki 3.5.3.1. Postopek barvanja smo začeli z Weigertovim železovim hematoksilinom 10 minut. Pribitek barvila iz tkiva smo odstranili s solno kislino alkoholom, ki smo ga pustili delovati 30 do 60 sekund, odvečno barvo na objektnih steklih pa smo sprali z vodo. Barvanje smo nadaljevali s trikromatskim barvilom Polak 7 minut. Pribitek barvila s preparata smo odstranili s kislno vodo (30 sekund oziroma 1 min) in nato sprali z vodo. Sledilo je dehidriranje in priprava trajnih preparatov, kot je opisano v točki 3.5.3.1.

Polak

- kisli fuksin 0,5 g
- poncean 1,0 g
- svetlo zeleno 0,45 g
- oranžno G 0,75 g
- fosfotungična kislina 1,5 g
- fosfomolibdenska kislina 1,5 g
- LED očetna kislina 3 ml

- 50 % etilni alkohol do 300 ml

3.5.5 Preučevanje rastlinskega tkiva s svetlobnim mikroskopom

Preparate smo pregledali s svetlobnim mikroskopom Nikon Axioskop W7 pri 10, 100 in 200 kratni povečavi.

4 REZULTATI

V nalogi smo ugotavljali morfološke spremembe plodnega lista fižola po okužbi z glivo *C. lindemuthianum*. Najprej smo se osredotočili na metodo okuževanja in potek okužbe spremljali s stereolupo in prostim očesom (Preglednica 3). Nato smo iz okuženega dela rastline pripravili trajne histološke preparate. Potek okužbe na trajnih histoloških preparatih smo spremljali tako, da smo prečno rezane vzorce fotografirali pod svetlobnim mikroskopom od povrhnjice proti mezofilnim celicam (Slike 9-16). Slika 17 prikazuje barvanje izolatov glive *Colletotrichum lindemuthianum*.

4.1 PRIKAZ SIMPTOMOV BOLEZNI NA PLODNEM LISTU FIŽOLA PO NANOSU GLIVE *Colletotrichum lindemuthianum*

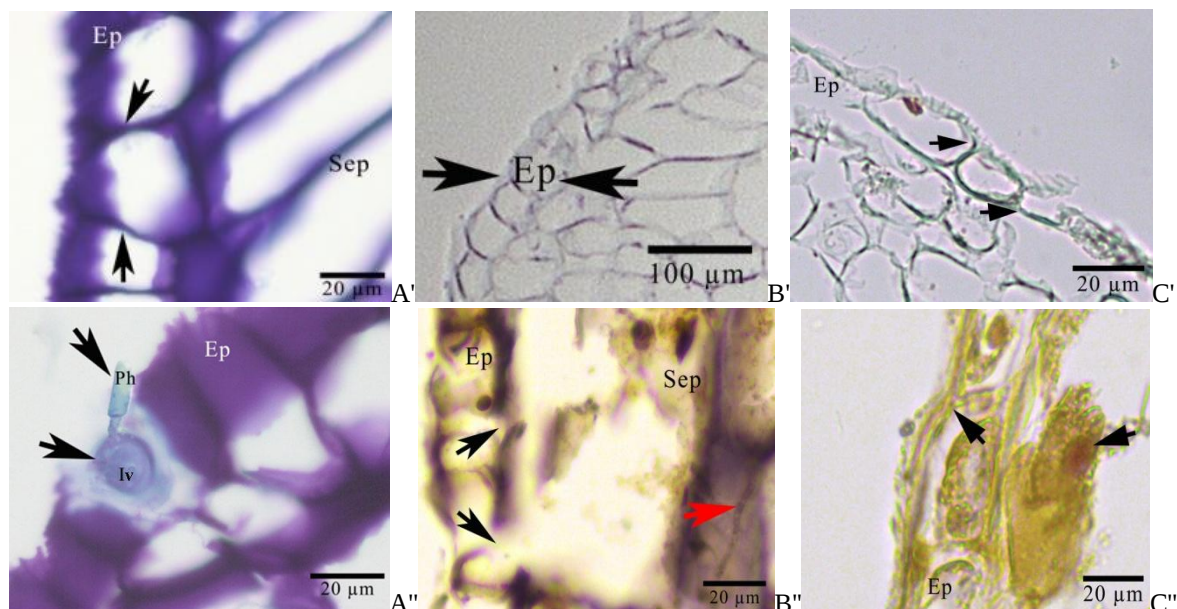
Preglednica 3: Simptomi okužbe na plodnih listih fižola spranem z dH₂O in tretiranem s škropljenjem z glivo *Colletotrichum lindemuthianum*

Dan	Dnevi po tretiranju			
	Tretiranje	1.	2.	3.
Izgled				
Simptomi po tretiranju	Nanos glivne suspenzije na plodove fižola.	Po dveh dneh pojav svetlo rjavih peg.	Pojav vdratih temno rjavih peg. Na površju so trosišča z rožnatimi skupki trosov.	Vdrte, temno rjave (nekrotične) pege. Okužba se širi radialno.

Prvi dan smo nanесли glivno suspenzijo na plodne liste fižola. 24 ur po tretiranju so se pojavile sluznate prevleke in rjavi madeži. Drugi dan so svetlo rjave pege močno potemnele. Na površju so nastala trosišča z rožnatimi skupki trosov. Tretji dan po tretiranju so nastale vdrte, temno rjave pege z rdečkastim, rahlo dvignjenim robom. Pege so bile okroglaste oziroma nepravilnih oblik in so se širile radialno po celotni površini plodov.

4.2. BARVANJE NEOKUŽENIH IN OKUŽENIH CELIC PLODNEGA LISTA FIŽOLA S HISTOLOŠKIMI BARVILI

4.2.1 Barvanje neokuženih in okuženih epidermalnih celic plodnega lista fižola

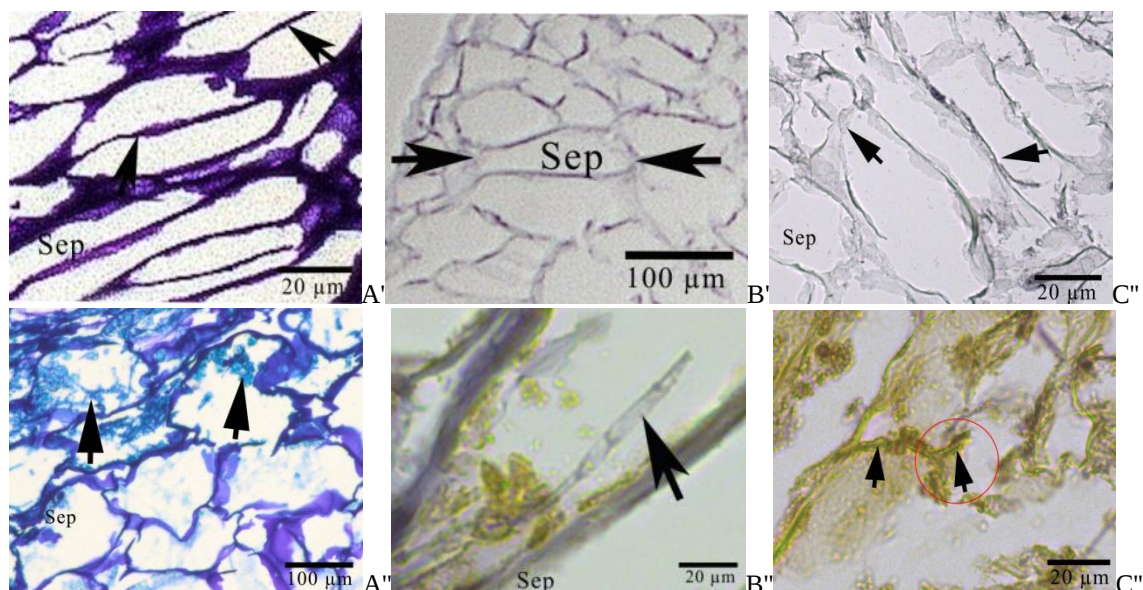


A'A'' – Barvanje s Toulidin modro. B'B'' – Barvanje s Polakom. C'C'' – Barvanje s H&E. A'B'C' – Neokuženi preparati epidermalnih celic plodnega lista fižola so se diferencialno obarvale pri barvanju s TM in s Polakom. Pri barvanju preparatov s H&E je prišlo do rahlega obarvanja. Celice so pravilnih, izodiametričnih oblik. A''B''C'' – Okuženi preparati epidermalnih celice plodnega lista fižola in glivne celične stene so se diferencialno obarvale pri barvanju s TM. A'': Preparat s penetracijsko hifo, infekcijskim veziklom (svetlo modro obarvana) in epidermalnimi celicami (vijolično obarvane). B'' – Okuženi preparati z epidermalnimi celicami (črni puščici, rjavo obarvane) in primarno glivno hifo v spodnji plasti epidermalnih celic (rdeča puščica, rjavo do brezbarvno obarvana). C'' – Okuženi preparati z epidermalnimi in subepidermalnimi celicami z jedrom (črna puščica, rumeno do rjavo obarvano) in gliva (rumeno zeleno obarvana) so se podobno obarvali. Ep-epidermalne celice, Sep-subepidermalne celice, Ph-penetracijska hifa, Iv-infekcijski vezikel.

Slika 9: Morfološka analiza epidermalnih celic plodnega lista fižola s histološkimi barvili

Slika 9 prikazuje preparate neokuženih in okuženih epidermalnih celic plodnega lista fižola. Na sliki 9-A' so s Toluidin modro temno vijolično obarvane neokužene epidermalne celice (Ep). Celice so pravilnih, izodiametričnih oblik in med njimi ni medceličnih prostorov. Slika 9-A'' prikazuje preparat s svetlo modro obarvano penetracijsko hifo (Ph) in mehurčast infekcijski vezikel (Iv). Sliki 9-B'B'' prikazujeta po Polaku obarvan preparat z epidermalnimi celicami. Neokuženi preparati z rastlinskimi celičnimi stenami so se obarvali vijolično. Na sliki 9-B'' so vidne okužene epidermalne celice v rjavi barvi. Sliki 9-C'C'' prikazujeta obarvane epidermalne celice s H&E. Celice so strukturno slabše ohranjene. Slika 9-C'' prikazuje z glivo okužene preparate in epidermalne celice ter rastlinsko jedro v rumeno zeleni barvi.

4.2.2 Barvanje neokuženih in okuženih subepidermalnih celic plodnega lista fižola

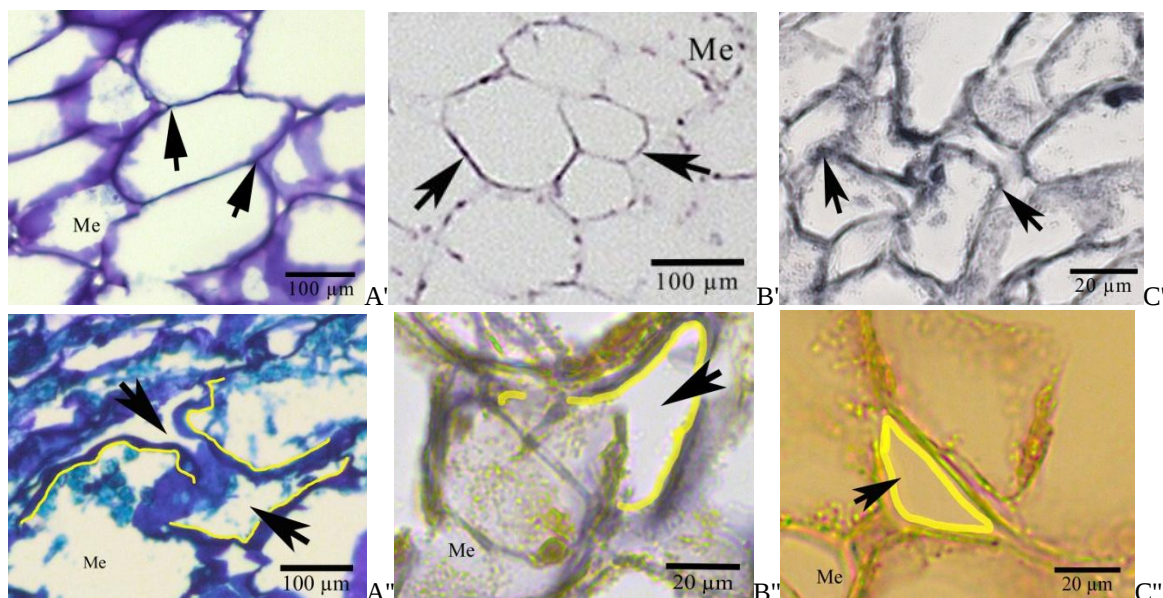


A'A'' – Barvanje s Toulidin modro. B'B'' – Barvanje s Polakom. C'C'' – Barvanje s H&E. A'B'C' – Neokuženi preparati subepidermalnih celic plodnega lista fižola so se najbolj izrazito vijolično obarvali pri barvanju s TM nato pri barvanju po Polaku. Do blede vijoličnega obarvanja je prišlo pri barvanju s H&E. Celice so pravilnih, izodiametričnih oblik. A''B''C'' – Okuženi preparati subepidermalnih celic plodnega lista fižola. In glivne celične stene so se diferencialno obarvale pri okuženem in neokuženem tkivu pri barvanju s TM in Polakom. A'' – Okuženi preparati subepidermalnih celic: sekundarne glivne hife (črna puščica, svetlo modro obarvane) v nekrotičnih subepidermalnih celicah (temno modro obarvane). B'' – Okuženi preparati subepidermalnih celic (vijolično obarvane) z glivnimi hifami (črna puščica, sive do brezbarvne). C'' – Okuženi preparati subepidermalnih celic (zeleno rumene) s primarnimi (črna puščica, rumeno do rjavo obarvane) in sekundarnimi glivnimi hifami (rdeče obkroženo, črna puščica, rumeno do rjavo obarvane) so se podobno obarvale. Ep-epidermalne celice, Sep-subepidermalne celice.

Slika 10: Morfološka analiza subepidermalnih celic plodnega lista fižola s histološkimi barvili

Slika 10 prikazuje preparate s subepidermalnimi celicami plodnega lista fižola. Celice so neenakomerno odebeljene in med njimi ni medceličnih prostorov (črne puščice). Slike 10-A''B''C'' prikazujejo okužene preparate subepidermalnih celic. Pri barvanju s Toluidin modro so se celične stene plodnega lista fižola obarvale rahlo vijolično do temno modro, celične stene gliv so se obarvale svetlo modro (črne puščice). Pri barvanju po Polaku so se okužene celične stene plodnega lista fižola obarvale rahlo modro, celične stene gliv so bile brezbarvne do sive. Pri barvanju s H&E smo težko razlikovali med obarvanostjo celične stene plodnega lista fižola in celično steno glive.

4.2.3 Barvanje neokuženih in okuženih mezofilnih celic plodnega lista fižola

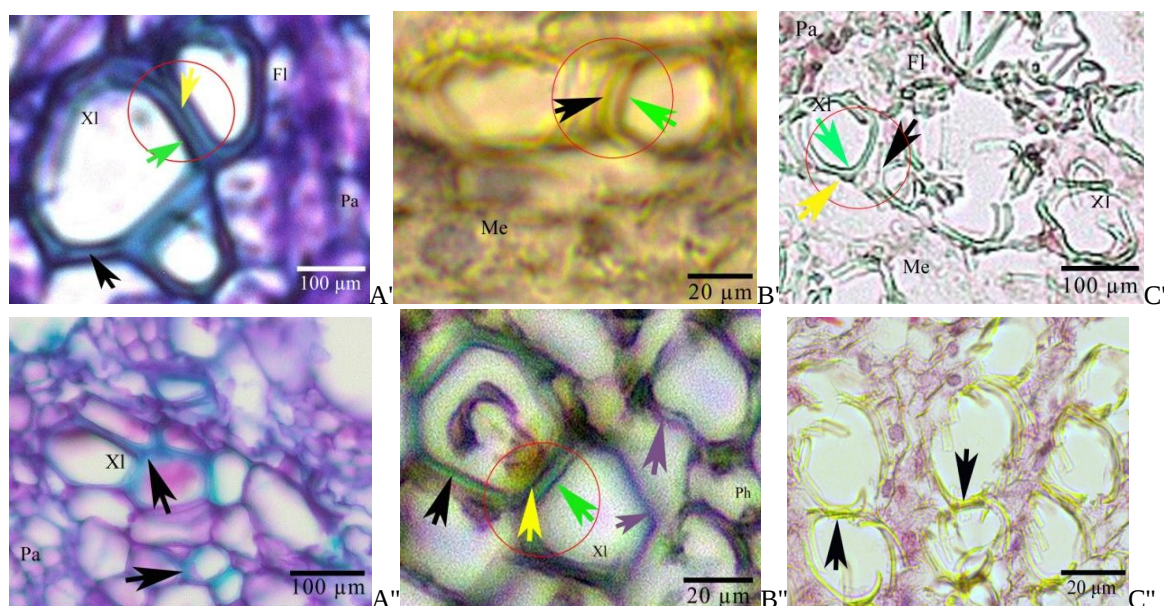


A'A'' – Barvanje s Toulidin modro. B'B'' – Barvanje s Polakom. C'C'' – Barvanje s H&E. A'B'C' – Neokužene preparati mezofilnih celic plodnega lista fižola so pravilnih, izodiametričnih oblik, brez medceličnih prostorov. Pri barvanju s H&E so se te celice zanemarljivo obarvale. A''B''C'' – Okuženi preparati mezofilnih celic plodnega lista fižola z medceličnim prostorom (črne puščice, rumeno obrobljeno), ki je najbolj viden pri A'' in B''. Me – mezofilne celice.

Slika 11: Morfološka analiza mezofilnih celic plodnega lista fižola s histološkimi barvili

Slika 11-A'B'C' prikazuje neokužene preparate mezofilnih celic plodnega lista fižola. Celice so pravilnih izodiametričnih oblik, brez medceličnih prostorov. Celice so se izrazito obarvale pri vseh treh načinih barvanja. Slika-A''B''C'' prikazuje z glivo okužene preparate mezofilnih celic z medceličnim prostorom (rumeno obrobljeno). Do izrazite diferencirane obarvanosti je prišlo pri barvanju s Toluidin modro, kjer so se celične stene plodnega lista fižola obarvale temno modro, celične stene glive pa svetlo modro (črne puščice). Izrazito diferencirano obarvanost med celičnimi stenami plodnega lista fižola in glivo lahko vidimo na sliki 11-B'', kjer so se preparati neokuženih rastlinskih celičnih sten obarvali vijolično in preparati okuženih rastlinskih celičnih sten rjavo. Pri barvanju s H&E so se okužene celične stene plodnega lista fižola in glive obarvale rjavo rumeno.

4.2.4 Barvanje neokuženih in okuženih prevajalnih celic plodnega lista fižola



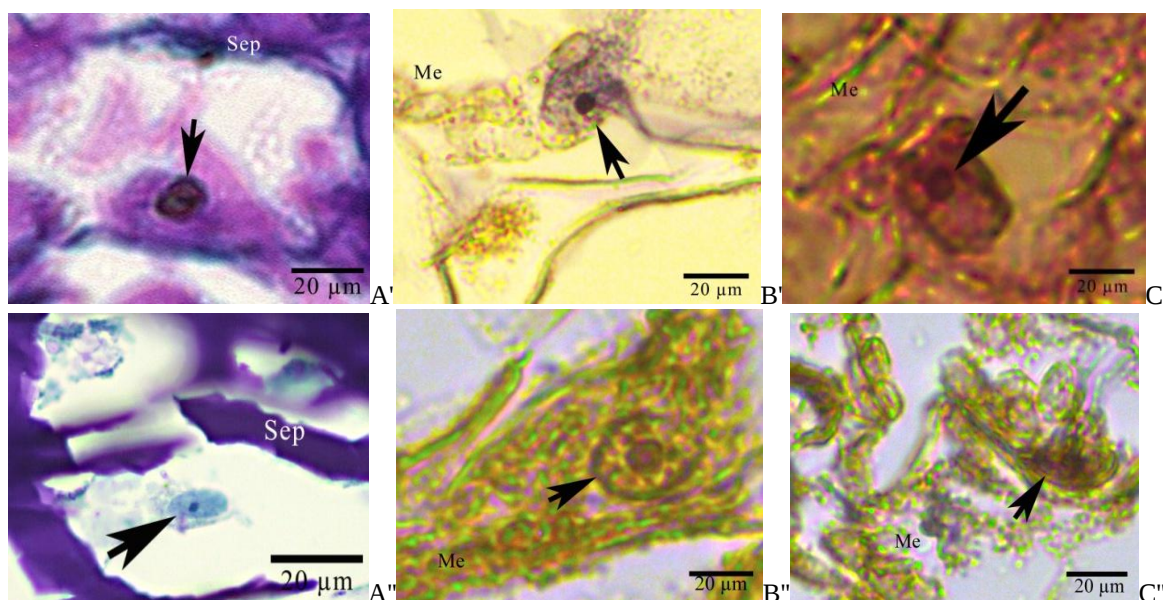
A'A'' – Barvanje s Toulidin modro. B'B'' – Barvanje s Polakom. C'C'' – Barvanje s H&E. A'B'C' – Neokuženi preparati mezofilnih celic plodnega lista fižola z osrednjo lamelo, primarno in sekundarno celično steno. A''B''C'' – Okuženi preparati prevajalnih celic plodnega lista fižola. Prevajalne celice plodnega lista fižola so se diferencialno obarvale pri okuženem in neokuženem tkivu pri vseh treh različicah barvanja. Pri barvanju s H&E je bilo tkivo strukturno slabše ohranjeno. A' – Neokuženi preparati prevajalnih celic: sekundarne celice ksilema (rdeče obkrožene rumena in zelena puščica ter črna puščica, modro obarvane). Celicam ksilema so se obarvale osrednja lamela (rumena puščica, temno modro), primarna celična stena (črna puščica, modro), sekundarna celična stena (zelena puščica, temno modro), primarne celice parenhima (Pa) in floema (Ph) (vijolično obarvane). A'' – Okuženi preparati prevajalnih celic: sekundarne celice ksilema (Xl) (črni puščici, svetlo modro obarvane), primarne celice parenhima (Pa) (vijolično obarvane). B' – Neokuženi preparati prevajalnih celic ksilema s primarno (črna puščica, svetlo sivo obarvane) in sekundarno (zelena puščica, temno sivo obarvane) celično steno. B'' – Okuženi preparati prevajalnih celic: sekundarne celice ksilema (rumena, črna in zelena puščica, zeleno obarvane). Celicam ksilema so se obarvale osrednja lamela (rumena puščica, temno zeleno), primarna celična stena (črna puščica, svetlo zeleno), sekundarna celična stena (zelena puščica, temno zeleno), primarne celice parenhima in floema (vijolične puščice, vijolično do rjavo obarvane). C' – Neokuženi preparati prevajalnih celic ksilema s primarno (črna puščica, svetlo sivo obarvane) in sekundarno (zelena puščica, temno sivo obarvane) celično steno. C'' – Okuženi preparati prevajalnih celic ksilema (črna puščica, zeleno rumeno obarvane). Me – mezofilne celice.

Slika 12: Morfološka analiza prevajalnih celic plodnega lista fižola s histološkimi barvili

Slika 12 prikazuje preparat z mezokarpom in prevajalnimi celicami plodnega lista fižola. Pri barvanju s Toluidine modro so se prevajalne celice obarvale vijolično in modro. Vijolično so se obarvale celice floema (Ph) in parenhima (Pa) ter citoplazma. Modro so se obarvale celice ksilema (Xl). Slika 12-A' nam prikazuje mejo med sosednjimi celicami ksilema (rdeče obkroženo). Primordialne celice osrednje lamele so se obarvale temno modro (rumena puščica). Primarna stena ksilemskih celic se je obarvala svetlo modro (črna puščica), sekundarna celična stena ksilemskih celic pa se je obarvala temno modro (zelena

puščica). Citoplazma se v ksilemskih celicah ni obarvala. Prevajalne celice so se pri barvanju po Polaku obarvale vijolično modro in sivo. Vijolično modro so se obarvale celice floema in parenhima ter citoplazma. Sivo so se obarvale celične stene prevajalnega tkiva ksilema. Celicam ksilema smo določili primarno in sekundarno celično steno. Primarna celična stena se je obarvala svetlo sivo, sekundarna celična stena se je obarvala temno sivo. Citoplazma se v ksilemskih celicah ni obarvala. Prevajalne celice so se pri barvanju s H&E obarvale rdeče in brezbarvno do sivo. Na sliki je vidna tudi meja med sosednjimi celicami ksilema (rdeče obkroženo). Primordialne celice osrednje lamele so se obarvale temno sivo (rumena puščica) primarna celična stena ksilemskih celic se je obarvala svetlo sivo (črna puščica), sekundarna celična stena ksilema pa se je obarvala temno sivo (zelena puščica). Citoplazma se v ksilemskih celicah ni obarvala.

4.2.5 Barvanje neokuženih in okuženih celic z jedri v plodnem listu fižola



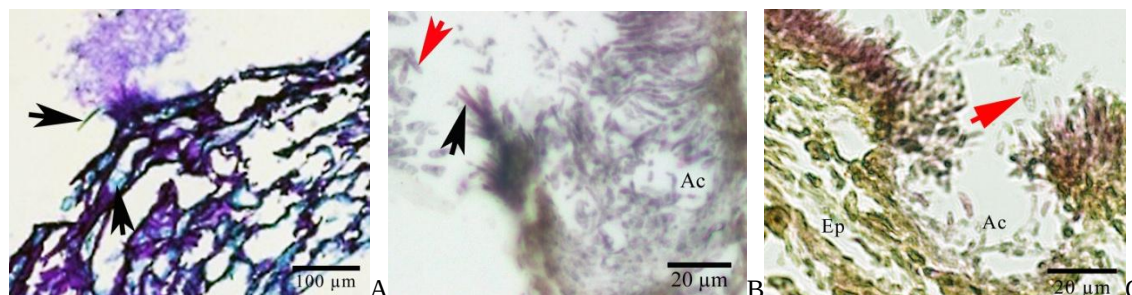
A'A'' – Barvanje s Toulidin modro. B'B'' – Barvanje s Polakom. C'C'' – Barvanje s H&E. A'B'C' – Preparat z neokuženimi celicami in z jedri plodnega lista so se diferencirano obarvala pri barvanju po Polaku in H&E. A''B''C'' – Preparat z okuženimi celicami in z jedri plodnega lista fižola (črne puščice) so se diferencirano obarvala pri barvanju s TM. Me – mezofilne celice, Sep – subepidermalne celice.

Slika 13: Morfološka analiza celic z jedri v plodnem listu fižola s histološkimi barvili

Slika 13 prikazuje preparat na katerem so celice z jedri (črne puščice) v mezofilnih celicah plodnega lista fižola. Z barvilom Toluidin modro so se preparati neokuženih celic z jedri obarvali temno rdeče do vijolično in citoplazma vijolično. Pri okuženih preparatih so se celice z jedri obarvale svetlo modro. Pri barvanju po Polaku so se celice z jedri v neokuženih preparatih obarvale vijolično. Pri okuženih preparatih plodnega lista fižola so se celice z jedri obarvale rjavo. Pri barvanju s H&E so se preparati neokuženih celic z jedri

obarvali rdeče in temno vijolično. Pri barvanju preparatov okuženih celic z jedri plodnega lista fižola so se le-te obarvale rjavo.

4.2.6 Barvanje okuženih epidermalnih celic plodnega lista fižola z glivnimi trosišči in konidiji



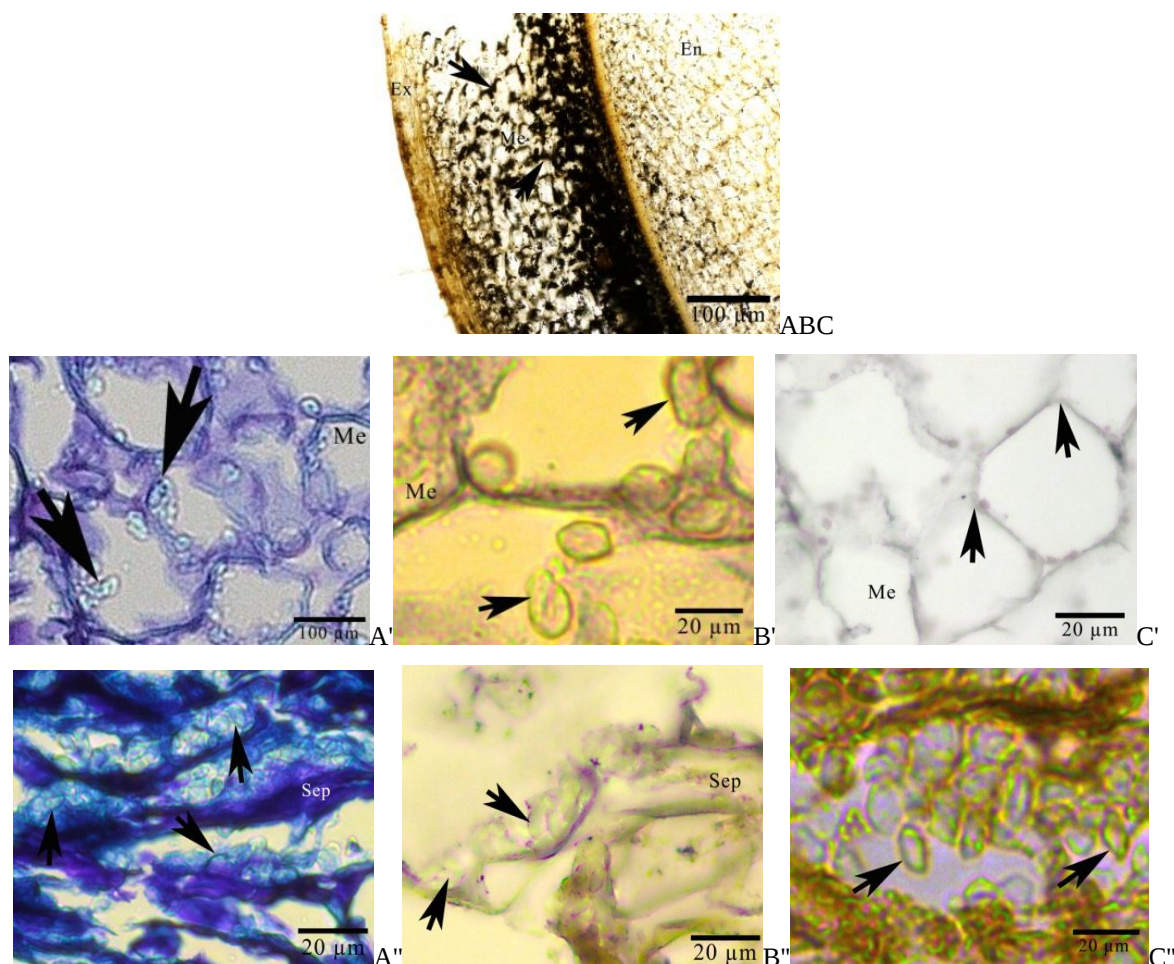
A – Barvanje s Toulidin modro. B – Barvanje po Polaku. C – Barvanje s H&E. A – Okuženi preparati epidermalnih celic: konec reproduktivne faze – trosišča glive ali acervuli z vijoličnimi konidiji in izraščajočimi zeleno obarvanimi setami (črna puščica). B – Okuženi preparati epidermalnih celic s trosišči glive (acervuli) s temno vijolično obarvanimi konidiji (rdeča puščica) in temno vijolično obarvanimi setami (črna puščica). C – Okuženi preparati epidermalnih celic s temno rdečimi trosišči glive ali acervuli s sivimi do brezbarvnimi konidiji (rdeča puščica). Ep – epidermalne celice, Ac – acervul.

Slika 14: Morfološka analiza epidermalnih celic plodnega lista fižola z glivnimi plodišči in konidiji s histološkimi barvili

Slika 14 prikazuje okužene preparate epidermalnih celic z glivnimi trosišči. Na sliki 14-A' so nespolna trosišča glive obarvana temno vijolično, konidiji svetlo vijolično in sete zeleno (črna puščica). Na sliki 14-A'' so nespolna trosišča glive obarvana rjavo, konidiji temno rdeče (rdeča puščica) in sete rjavordeče (črna puščica). Na sliki 14-A''' so nespolna trosišča glive obarvana rjavo in temno rdeče, konidiji svetlo rdeče do brezbarvno (rdeča puščica), set pri tej sliki nismo zasledili.

4.2.7 Barvanje plastidov v neokuženih mezofilnih in okuženih subepidermalnih celicah plodnega lista fižola

Slika 15 prikazuje plastide oziroma škrob v neokuženih svežih in trajnih preparatih plodnega lista fižola ter v okuženih trajnih preparatih plodnega lista fižola. Slika 15-ABC prikazuje sveži preparat neokuženega plodnega lista fižola. V eksokarpu z barvanjem z jodovico nismo zasledili škroba, v endokarpu je bilo škroba malo. Največ škroba se nahaja v mezokarpu plodnega lista fižola. Plastidi so se pri barvanju s Toluidin modro in po Polaku izrazito diferencialno obarvali na sliki 15-A'B', in sicer v svetlo modri (Slika 15-A') in fluorescentno zeleni barvi (Slika 15-B'). Pri barvanju s H&E pri neokuženih vzorcih nismo zasledili plastidov. Pri barvanju okuženih trajnih preparatov smo zasledili plastide pri vseh treh načinih barvanja. Najbolj izrazito so se plastidi obarvali pri barvanju po Polaku in s H&E.

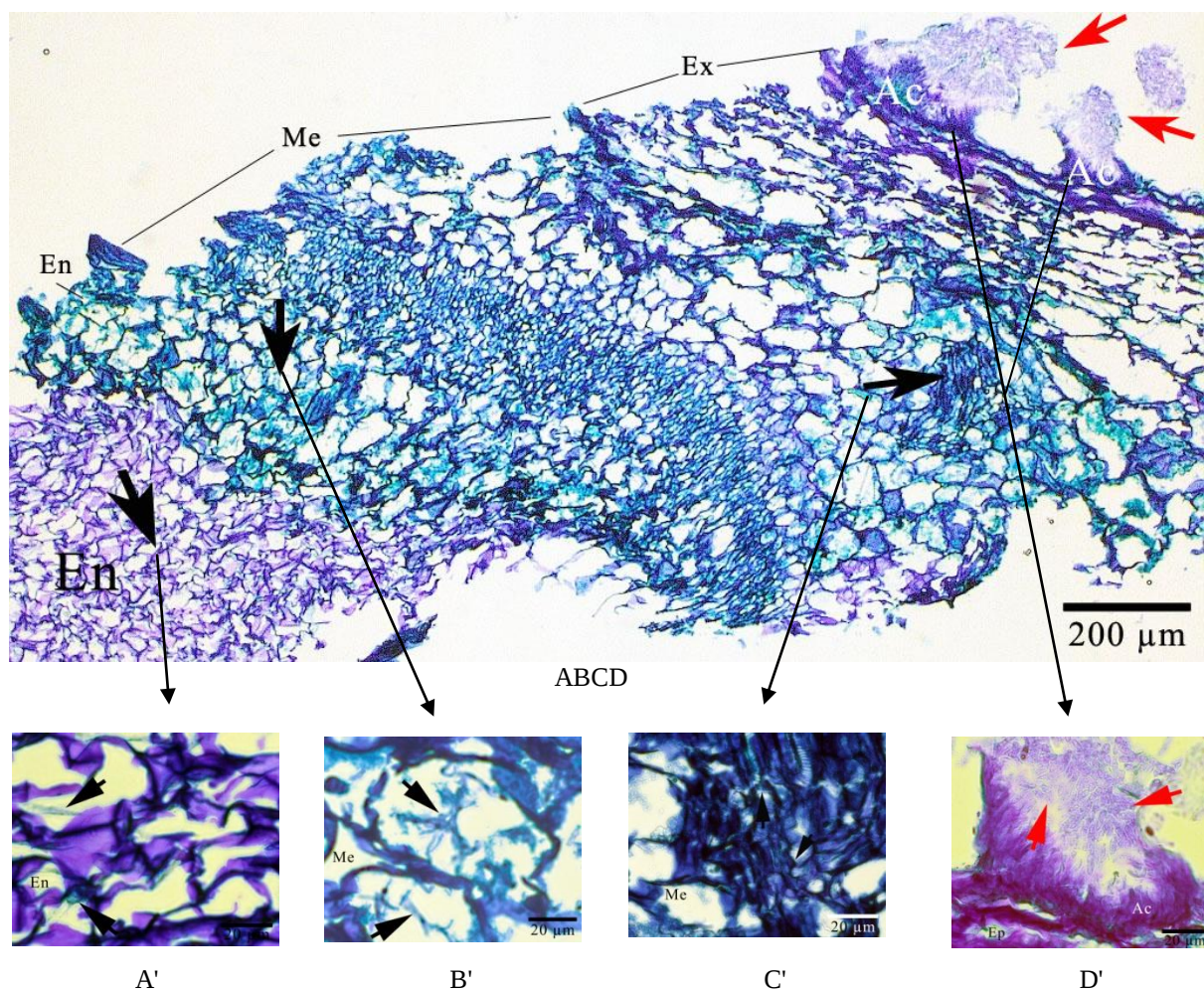


ABC – Barvanje svežega preparata z jodovico. V eksokarpu nismo zasledili škroba, v endokarpu je bilo škroba malo. Največ škroba se nahaja v mezofilnih celicah plodu fižola. A'A'' – Barvanje s Toluidin modro. B'B'' – Barvanje s Polakom. C'C'' – Barvanje s H&E. A' – Preparat s svetlo modro obarvanimi plastidi v mezofilnih celicah. B' – Preparat s fluorescentno zeleno obarvanimi plastidi v mezofilnih celicah (črni puščici). C' – Pri barvanju preparatov s H&E nismo zasledili plastidov. A'' – Preparat s svetlo modro

obarvanimi plastidi v subepidermalnih celicah. B'' – Preparat s fluorescentno zeleno obarvanimi plastidi v subepidermalnih celicah. C'' – Preparat z rjavo do rumeno obarvanimi plastidi v subepidermalnih celicah. Ex – eksokarp, Me – mezofilne celice, Sep – subepidermalne celice, En – endokarp.

Slika 15: Morfološka analiza mezofilnih in subepidermalnih celic plodnega lista fižola s plastidi s histološkimi barvili

4.3 BARVANJE OKUŽENEGA PLODNEGA LISTA FIŽOLA S TOLUIDIN MODRO



ABCD – Preparat prečnega prereza plodnega lista fižola okuženega z glivo *Colletotrichum lindemuthianum* in obarvanega s Toluidin modro. Črne puščice označujejo svetlo modro obarvane glivne hife, rdeče puščice označujejo konidije, ko gliva zaključi razmnoževalni cikel. A' – endokarp z glivnimi hifami, B' – mezokarp z glivnimi hifami, C' – močno okužena prevajalna tkiva, D' – trosišče glive. Ex – eksokarp, Me – mezokarp, En – Endokarp, Ac – acervul.

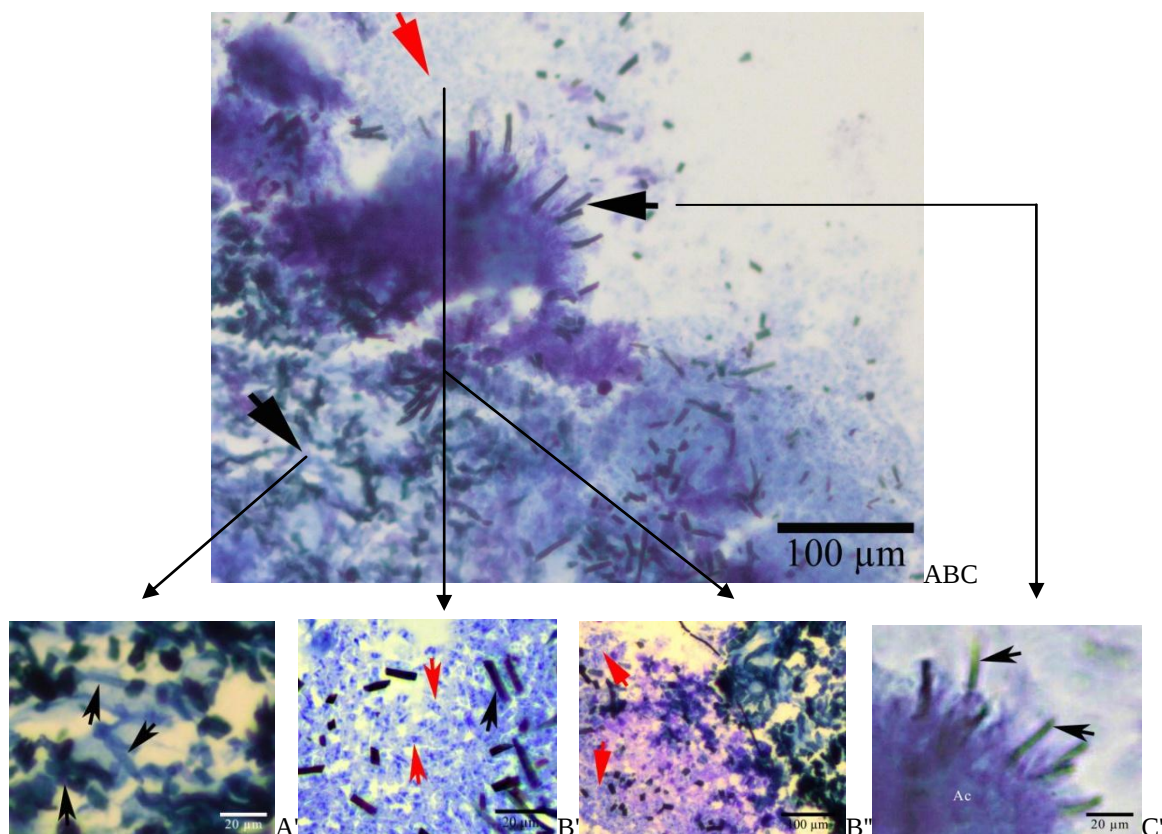
Slika 16: Morfološka analiza plodnega lista fižola okuženega z glivo *Colletotrichum lindemuthianum* in barvanega s Toluidin modro

Slika 16 prikazuje preparat prečnega prereza plodnega lista fižola okuženega z glivo *Colletotrichum lindemuthianum* in obarvanega s Toluidin modro. Pri barvanju s Toluidin

modro se je rastlinska celična stena obarvala temno modro in glivna celična stena svetlo modro.

4.4 BARVANJE IZOLATOV GLIVE S TOLUIDIN MODRO

Pri barvanju s Toluidin modro so se celične stene glive *Colletotrichum lindemuthianum* obarvale svetlo modro. Konidiji so se obarvali svetlo modro in vijolično (Slika 17).



ABC – Preparat glive *Colletotrichum lindemuthianum* obarvane s Toluidin modro. A' – Hife (črna puščica, svetlo modro obarvane), B' – konidiji (rdeči puščici, svetlo modro obarvani), B'' – konidiji (rdeči puščici, vijolično obarvani), C' – sete (črni puščici, fluorescentno zeleno obarvane), Ac – acervul.

Slika 17: Barvanje glive *Colletotrichum lindemuthianum*

5 RAZPRAVA

Histološke raziskave o fiksiranju z glivo okuženih vzorcev plodnega lista fižola s Carnoyevim B fiksativom in barvanju teh vzorcev s Toluidin modro, Polakom in Weigertovim železovim hematoksilinom in eozinom so relativno redke. Carnoy B je hitro vpijajoč fiksativ, ki koagulira proteine in nukleinske kisline, raztaplja lipide in ohrani ogljikove hidrate. Izbira fiksativa vpliva na celoten nadaljnji potek priprave preparatov, predvsem pa je pomemben v kombinaciji s histološkimi barvili – fiksativ in pH barvila (Kiernan, 1990).

5.1 BARVANJE NEOKUŽENIH CELIČNIH STEN PLODNEGA LISTA FIŽOLA S HISTOLOŠKIMI BARVILI

V našem poskusu smo uporabili Carnoy's B fiksativ s tremi različnimi metodami barvanja neokuženega – kontrola in z glivo okuženega plodnega lista fižola. Pri preučevanju z glivo okuženega rastlinskega tkiva se od izbranih barvil v raziskovalne namene največ uporablja Toluidin modro in se je v našem poskusu, v kombinaciji s Carnoy's B fiksativom, izkazal kot naprimernejša metoda za identifikacijo neokuženih in z glivo okuženih celičnih sten plodnega lista fižola ter celičnih sten glive. Preučevanja s Toluidin modro temeljijo predvsem na neokuženem ali z glivo okuženem rastlinskem tkivu lista (Silva in sod., 2006), hipokotila (Loureiro in sod., 2012), včasih tudi ploda (Marques in sod., 2013). Čeprav ga nekateri avtorji ne navajajo kot primerno metodo za razlikovanje med rastlinsko in glivno celično steno (Marques in sod., 2013) ga drugi uporabljajo kot alternativo za druga histološka barvila kot so Laktofenol modro in safranin O (Marques in sod., 2013; Loureiro in sod., 2012).

Botaniki pogosto uporabljajo Toluidin modro za razlikovanje med lignificiranimi in nelignificiranimi celičnimi stenami. Raziskovalne ustanove na ta način raziskujejo uporabno vrednost lesa v industrijske namene. Lignificirane celice obarva različno modro, odvisno od strukture preučevanega tkiva. Raziskovalne študije kažejo na to, da z barvanjem vlaken pri enokaličnicah ter s starostjo dreves, kjer se je pri starejših drevesih izkazalo, da so bile celične stene bolj lignificirane v primerjavi s celičnimi stenami mlajših dreves. Sekundarne celične stene ksilema pri grahu in hibiskusu so se po tej metodi barvanja obarvale temno modro (O'Brien in sod., 1964; Khalil in sod., 2010). Enako obarvanost sekundarnih celičnih sten ksilema smo zasledili v našem primeru, kjer smo najprej diagnosticirali neokuženo tkivo, da smo ga lahko primerjali z okuženim oziroma poškodovanim tkivom. Primarne epidermalne, subepidermalne in mezofilne celice plodnega lista fižola so se obarvale vijolično, medtem ko so se sekundarne celice ksilema obarvale temno modro. Primordialna in sekundarna celična stena ksilema, sta se obarvali temneje od primarne celične stene, kar pomeni, da sta bolj lignificirani (Khalil in sod., 2010). Značilno za lignifikacijo pa je, da se začne v primarni steni in se z zrelostjo organa

razširi na osrednjo lamelo in tvori sekundarno steno. Zaradi postopnega nalaganja lignina med osrednjo lamelo in primarno celično steno je težko natančno reči koliko in katere celice so lignificirane (Slika 12-A') (O'Brien in sod., 1964).

Prevajalna tkiva obarvana z Weigertovim železovim hematoksilinom in eozinom ter po Polaku so se obarvala temno do svetlo sivo. Pri vzorcih barvanih s H&E se je izrazito diferencialno obarvala primordialna, primarna in sekundarna celična stena ksilema. V tem primeru je bilo tkivo strukturno slabo ohranjeno (Slika 12-B'). Pri vzorcih barvanih po Polaku sta se izrazito diferencialno obarvali primarna in sekundarna celična stena (Slika 12-C').

5.2 BARVANJE NEOKUŽENIH CELIC Z JEDRI IN PLASTIDI S HISTOLOŠKIMI BARVILI

Barvilo H&E se v histologiji uporablja za barvanje jeder in citoplazme v rastlinskem, živalskem in človeškem tkivu. Metodo barvanja jeder v plodnem listu fižola smo izvedli po metodi, ki jo opisuje Kiernan (1990). Jedra so se v plodnem listu fižola obarvala temno rdeče do vijolično in citoplazma rdeče. Do izrazite diferencirane obarvanosti jeder je prišlo v vzorcih obarvanih po Polaku. Jedra so se obarvala svetlo vijolično in citoplazma rahlo zrnato rumeno. Pri metodi barvanja s Toluidin modro naj bi se jedra v neokuženih vzorcih obarvala svetlo modro. V našem primeru so se jedra obarvala temno rdeče in so bila zelo slabo diferencirano obarvana v primerjavi z drugim tkivom. Predvidevamo, da smo vzorce predolgo namakali v danem barvilu.

Pri barvanju trajnih preparatov plodnega lista fižola so se nam v mezofilnih celicah obarvali tudi plastidi. Plastidi so se v neokuženih vzorcih plodnega lista fižola izrazito diferencialno obarvali s Toluidin modro in s Polakom. Pri barvanju s H&E nismo zasledili obarvanih plastidov. Glede na dobljene rezultate pri svežih preparatih lahko predvidevamo, da so obarvani plastidi v trajnih preparatih škrobna zrna. O'Brien in sod. (1964) navajajo barvanje škrobnih zrn s Toluidin modro, vendar se jim le ta niso obarvala.

5.3 RAZVOJ GLIVE *Colletotrichum lindemuthianum* V PLODNEM LISTU FIŽOLA IN OBARVANOST OKUŽENIH CELIČNIH STEN PLODNEGA LISTA FIŽOLA S HISTOLOŠKIMI BARVILI

Razvoj glive *Colletotrichum lindemuthianum* v rastlinskem tkivu poteka v treh fazah: biotrofična faza, benigna nekrotrofija in nekrotrofična faza (Skipp in Deverall, 1973). Biotrofična faza se začne, ko klična hifa prodre v epidermalne celice in v njih tvori nabrekel infekcijski vezikel (O'Connell in sod., 1985). V tem stadiju celične stene ohranjajo svojo izodiametrično strukturo in s tem tudi protoplast ne izgubi svoje polprepustnosti (Skipp in Deverall, 1972). V našem primeru sta se pri barvanju s Toluidin modro penetracijska hifa in infekcijski vezikel obarvala svetlo modro in rastlinske epidermalne celice vijolično (Slika 9-A"). Enako so se obarvale hife glive *Colletotrichum lindemuthianum*. Silva in sod. (2006) prikazujejo obarvanost vzorcev s Toluidin modro v isti barvi. Loureiro in sod. (2012) navajajo, da so pri barvanju hipokotila kavovca s Toluidin modro, zasledili razvoj penetracijske hife in infekcijskega vezikla v svetlo modri barvi, pri barvanju z laktofenol modro pa v sivkasto črni barvi. Prav tako isti avtorji navajajo, da so se pri barvanju s Toluidin modro primarne glivne hife obarvale svetlo modro. Pri metodi barvanja s Polakom in H&E v našem primeru nismo zasledili penetracijske hife in infekcijskega vezikla. Okužene epidermalne celice so se v obeh primerih obarvale svetlo rjavo do rumeno.

Razvoj iz biotrofične v nekrotrofično fazo se začne približno 24 ur po nanosu glivne suspenzije na rastlinsko tkivo. Fazo nakazujejo številne ultrastrukturne in fiziološke spremembe v okuženem rastlinskem tkivu (Wharton in Dieguez-Urbeondo, 2004). Benigna nekrotrofija, kot prehodna faza med biotrofično in nekrotrofično fazo, vključuje krčenje citoplazme, ki se kaže v odcepitvi citoplazme od celične stene in kopičenju njene mase proti sredini rastlinske celice, razvije se primarna hifa. Okužene celične stene in citoplazma plodnega lista fižola so se pri barvanju s Toluidin modro obarvale svetlo modro. Svetlo modro obarvane primarne hife smo zasledili v spodnji plasti epidermalnih celic (Slika 9 in 10). Zaradi okužbe z glivo postanejo celične stene krhke, tonoplast se uniči in plazemska membrana izgubi svojo polprepustnost. V tem času lahko celica odmre, rastlina pa še ne kaže nobenih vidnih zunanjih znamenj okužbe (Skipp in Deverall, 1972). Po metodi priprave trajnih preparatov po Polaku in s H&E smo zasledili izrazito deformacijo celičnih sten epidermalnih celic plodnega lista fižola.

Prehod glive v nekrotrofično fazo se začne 24-72 ur po nanosu trosov, z razvojem sekundarnih glivnih hif (O'Connell in sod., 2000). Pri vseh treh načinih barvanja smo zasledili, da so se iz primarnih hif razvile sekundarne hife, ki so kolonizirale subepidermalne celice. Pri barvanju s Toluidin modro so se sekundarne hife obarvale svetlo modro, pri barvanju s Polakom so se sekundarne hife obarvale sivo do brezbarvno, pri barvanju s H&E pa so se primarne (črna puščica) in sekundarne hife (Slika 10, črna

puščica, rdeče obkroženo) obarvale rumeno do rjavo. Gliva *Colletotrichum lindemuthianum* iz primarnih hif tvori sekundarne hife, ki nadaljujejo razrast med celicami (Silva in sod., 2006) med katerimi zato nastane medcelični prostor (Slika 11). Pozorni moramo biti na razliko med samo hifo in z glivo okuženo rastlinsko celico. Lahko da celično steno kolonizirane oziroma propadle rastlinske celice zamenjamo z glivno hifo. Izrazita diferenciranost med glivno in rastlinsko celično steno se je pokazala pri barvanju s Toluidin modro. Pričakovali smo, da se bodo hife izrazito diferencialno obarvale pri vzorcih barvanih s Polakom, saj se barvilo veliko uporablja v živalski histologiji za barvanje hitina.

S tvorbo sekundarnih glivnih hif gliva zaključi svoj razvojni cikel. Takrat tvori trosišča – acervule in trose. Z barvilom Toluidin modro so se trosišča (acervuli) obarvala vijoličnomodro, konidiji pa vijolično. Podobno barvanje trosišča in hif v mezofilnih celicah navajajo Marques in sod. (2013). Temno obarvane sterilne hife z odebeljeno celično steno so sete, ki sodelujejo pri sproščanju trosov iz trosišča. Loureiro in sod. (2012) so zasledili trosišča in izraščajoče sete pri barvanju z Laktofenol modro. Pri barvanju po Polaku so se trosišča obarvala vijolično do rjavo, konidiji sivo do brezbarvno, sete pa so se obarvale temno vijolično. Pri barvanju s H&E smo zasledili trosišča (acervule) v rdeči barvi z bruhajočimi sivimi oziroma brezbarvnimi konidiji. Set pri tem načinu barvanja nismo zasledili (Slika 14-A', A'', A'''), saj ne izključujemo možnosti, da pri rezanju preparatov nismo prišli do njih.

Pri obrambi rastline pred nadaljno kolonizacijo s patogenom pride do različnih postinfekcijskih obrambnih reakcij s strani rastline. Eden od teh načinov je tudi izločanje lignina oziroma zadebelitev celičnih sten. Pričakovali smo, da bomo s katerim izmed načinov barvanja okuženim celicam določili strukturne spremembe npr. kalozne papile, ki nastanejo po okužbi z glivo.

Po okužbi gostitelja ne pride le do morfoloških sprememb v njegovi celični steni ampak tudi v organelih njegovih celic. V okuženih vzorcih plodnega lista fižola so se jedra izrazito diferencialno obarvala s Toluidin modro. Svetlo modro obarvana jedra so se razlikovala od okuženih rastlinskih celičnih sten (temno modro obarvane), kar pri barvanju po Polaku in H&E tega nismo zasledili. Zaradi krčenja citoplazme so se jedra premaknila proti sredini in postala ovalne oblike (Slika 13-A'). Enako strukturno spremembo navajajo Skipp in Deverall (1973).

V okuženih vzorcih je prišlo do obarvanosti plastidov pri vseh treh načinih barvanja trajnih preparatov. Plastidi oziroma škrobna zrna so se močno sintetizirali tudi v subepidermalnih celicah. Predvidevamo lahko, da je to posledica obrambne reakcije rastline pred okužbo s patogenom. Izrazito diferencialno so se plastidi oziroma škrobna zrna obarvali pri vzorcih obarvanih s Polakom, Toluidin modro in H&E (Slika 15-A''B''C'').

5.4 BARVANJE GLIVE *Colletotrichum lindemuthianum* S TOLUIDIN MODRO

V okviru našega raziskovanja smo želeli potrditi, da se micelij glive *Colletotrichum lindemuthianum* obarva svetlo modro. V ta namen smo pripravili trajne preparate iz kulture glive *Colletotrichum lindemuthianum* in jih barvali s polikromatskim barvilom Toluidin modro. Ugotovili smo, da se hife glive obarvajo svetlo modro ter temno modro. V reproduktivni fazi je gliva oblikovala nespolna trosišča (acervule), ki so se obarvali vijolično oziroma svetlo modro. Iz nespolnih trosišč so bruhali vijolični oziroma svetlo modri konidiji, vidne so bile tudi fluorescentno zelenkaste sete (Slika 17-ABC). Celična stena je dinamična struktura, ki ima pri različnih vrstah in oblikah gliv številne kvantitativne in kvalitativne specifičnosti. Razlike v strukturi celične stene lahko nastanejo tudi kot odziv na stres iz okolja (shranjevanje, starost, fiziološko stanje kulture).

6 SKLEPI

- S svetlobno mikroskopijo smo potrdili, da se v celicah plodnega lista fižola nalagajo različne plasti celic, sestavljene iz osrednje lamele, primarne in sekundarne celične stene.
- Največ lignina se kopiči v osrednji lameli in sekundarni celični steni plodnega lista fižola. Prevaljalne celice plodnega lista fižola so se izrazito diferencialno obarvale pri barvanju s Toluidin modro.
- Pri neokuženih vzorcih so se jedra izrazito diferencialno obarvala po Polaku in s H&E. Plastidi so se izrazito diferencialno obarvali s Toluidin modro in po Polaku. Pri okuženih vzorcih so se tako jedra kot plastidi izrazito diferencialno obarvali s Toluidin modro.
- Glivne celične stene in okužene celične stene plodnega lista fižola so se izrazito diferencialno obarvale pri vzorcih obarvanih s Toluidin modro.
- Zaradi okužbe z glivo je prišlo do deformacije celic in medceličnih prostorov, škrob oziroma plastidi so se začeli kopičiti v subepidermalnih celicah.
- Trosišča glive, konidiji in sete so se izrazito diferencialno obarvali pri vzorcih obarvanih s Toluidin modro in po Polaku.
- Pri barvanju preparatov iz čiste kulture glive *Colletotrichum lindemuthianum* s Toluidin modro so se hife in sete obarvale enako kot pri barvanju okuženega plodnega lista fižola. Konidiji so se pri tem načinu barvanja obarvali vijolično in svetlo modro.

7 POVZETEK

Glive iz rodu *Colletotrichum* sodijo med gospodarsko najpomembnejše škodljive organizme na kmetijskih rastlinah, pa tudi na okrasnem drevju in grmičevju. Bolezenska znamenja glive *Colletotrichum lindemuthianum* se na plodnem listu fižola kažejo kot uleknjene podolgovate ali okrogle pege, ki so sprva svetlejše kasneje pa potemniijo in jih prekrijejo rožnati sluzasti skupki trosov. Hife glive *Colletotrichum lindemuthianum* prodirajo v notranjost rastlinskega tkiva preko kutikule in epidermalnih celic do mezofilnih celic.

V nalogi smo ugotavljali morfološke spremembe plodu fižola okuženega z glivo *Colletotrichum lindemuthianum*. Na Kmetijskem inštitutu na Oddelku za varstvo rastlin smo najprej izvedli okuževanje rastlinskega materiala. Na Oddelku za biologijo, na Katedri za zoologijo, smo nato pripravili trajne preparate neokuženega in okuženega rastlinskega tkiva. Fiksirane koščke tkiva smo dehidrirali, rehidrirali in vklopili v parafin. Vzroce smo rezali na mikrotomu in jih za morfološko analizo plodu fižola obarvali s tremi različnimi histološkimi barvili. Raziskavo smo podkrepili z barvanjem glive *Colletotrichum lindemuthianum* s Toluidin modro. Dobljene rezultate, trajnih neokuženih ter trajnih okuženih preparatov, smo spremljali pod svetlobnim mikroskopom.

Namen te raziskave je bil ugotoviti primernost izbranih metod barvanja rastlinskih in glivnih celičnih sten pred in po nanosu glivne suspenzije na plodove fižola za namen svetlobne mikroskopije ter strukturne spremembe, ki nastanejo na plodu fižola po okužbi z glivo. V ta namen smo uporabili histološke metode barvanja trajnih histoloških preparatov s Toluidin modro, Polakom in Weigertovim železovim hematoksilinom in eozinom. Neokužene rastlinske celične stene so se izrazito diferencialno obarvale z vsemi tremi načini barvanja. Z glivo okužene rastlinske celične stene in glivne celične stene so se izrazito diferencialno obarvale s Toluidin modro. Enako so se glivne hife obarvale pri barvanju preparatov iz kulture glive *Colletotrichum lindemuthianum*. Neokužena rastlinska jedra so se izrazito diferencialno obarvala po Polaku in H&E, medtem ko so se okužena rastlinska jedra izrazito diferencialno obarvala s Toluidin modro. Plastidi, ki so se izrazito diferencialno obarvali po Polaku, so se po okužbi z glivo začeli kopičiti v subepidermalnih celicah.

S Toluidin modro smo potrdili spremembe, ki nastanejo med širjenjem glive v plodnem listu fižola. Začetne poti prodora glive v rastlinsko tkivo temeljijo na mehanskem pritisku, ki ga izvaja gliva s pomočjo penetracijske hife in tvorbe infekcijskega vezikla znotraj celice. Zaradi krčenja citoplazme se jedra in ostali organeli pomaknejo proti sredini celice in celica izgubi svojo pravilno obliko. Posledično nastanejo medcelični prostori. Tako ima gliva lažji dostop do sosednjih celic oziroma celo do oddaljenih ksilemskih celic. Okužbo sosednjih celic in razgradnjo produktov v rastlinskih celicah opravlja gliva s pomočjo

sekundarnih hif in hidrolitičnih encimov. Nadaljnje raziskave naj temeljijo na spremljanju okužbe s histokemijskimi raziskavami z namenom določitve biološko aktivnih snovi (rastne regulatorje, toksine in encime), ki jih sprošča gliva v času svojega razvoja v rastlini. Izsledke širjenja glive v okuženem plodu je potrebno potrditi z vrstičnim elektronskim mikroskopom.

8 VIRI

- Agrios G., 2005. Plant Pathology. 5th ed. New York, Academic Press: 922 str.
- Bailey J.A., O'Connell R.J., Pring R.J., Nash C. 1992. Infection strategies of *Colletotrichum* species. V: *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford, CABI: 88-120
- Batič F., 2004. Teze za predavanja. Gradivo za študente. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo. Gradivo razdeljeno na predavanjih.
- Batič F., Košmerlj – Levačič B., Martinčič A., Cimerman A., Turk B., Gogala N., Seliškar A., Šercelj A., Kosi G. 2011. Botanični terminološki slovar. Ljubljana. Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani, Gozdarski inštitut Slovenije. ZRC SAZU: 652 str.
- Barreto Bergter E., Gorin P. A. J. 1983. Structural chemistry of polysaccharides from fungi and lichens. V: *Advances in carbohydrates chemistry and biochemistry*. Tipson R. S., Horton D. (eds). New York, Academic Press: 67-132
- Bloomsteadt M. 2007. Modifications of cellulosic fibers by carboxymethyl cellulose – effects on fiber and sheet properties. Helsinki, University of Technology: 75 str.
- Bolwell P.P., Page A., Pislewska M., Wojtaszek P. 2001. Pathogenic infection and the oxidative defences in plant apoplast. *Protoplasma*, 217: 20-32
- Bulawa C. E., 1993. Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annual Review of Microbiology*, 47: 505-534
- Celar F. 2011. Teze za predavanja. Gradivo za študente. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek agronomijo. Gradivo razdeljeno na predavanjih.
- Cosgrove D. J. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature review. Molecular cell biology*, 6: 850-861
- Dermastia M. 2010. Pogled v rastline. Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo: 237 str.
- Eaton R. A., Hale M. D. C. 1993. Wood decay, pests and protection. London, Chapman and Hall: 546 str.

- FITO-INFO, 2014. Slovenski informacijski sistem za varstvo rastlin. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Fitosanitarna uprava RS. <http://www.fito-info.bf.uni-lj.si/> (20.4.2014)
- Grun C. H. 2003. Structures and biosynthesis of α -glucans. Ph. D. Dissertation. Utrecht, University of Utrecht: 143 str.
- Keegstra K. 2010. Plant cell wall. Plant Physiology, 154: 483-586
- Kiernan J.A. 1990. Histological and histochemical methods. Theory and practice. 2nd ed. Department of Anatomy and Cell Biology, Scion: 433 str.
- Khalil A. H. P. S., Ireana Yustra A. F., Bhat A. H., Jawaaid M. 2010. Cell wall ultrastructure, anatomy, lignin distribution, and chemical composition of Malaysian cultivated kenaf fiber. Industrial Crops and Product, 31: 113-121
- Klis F. M., Mol P., Hellingwerf K., Brul S. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Reviews, 26, 3: 239-256
- Kollar R., Reinholds B. B., Petrakova E., Yeh H. J., Ashwell G., Drgonova J., Kapteyn J. C., Kliss F. M., Cabib E. 1997. Architecture of the yeast cell wall. Journal of Biological Chemistry, 272, 28: 17762-17775
- Kranjčič B. 2001. Razvojna in funkcionalna morfologija z anatomijo. Tretja izpopolnjena izdaja, Maribor, Univerza v Mariboru, Fakulteta za Kmetijstvo: 451 str.
- Leban I. 2007. Les zgradba. Ljubljana. Center Republike Slovenije za poklicno izobraževanje
http://www.cpi.si/files/cpi/userfiles/Lesarstvo_tapetništvo/3-ZGRADBALESA.pdf
(23.4. 2014)
- Leite B., Nicholson R.L. 1992. Mycosporine alanine – a self inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. Experimental Mycology, 16: 76-86
- Lopez A.M.Q. 2001. Taxonomia, patogenese e controle de especies do genero *Colletotrichum*. Revisao Anual de Patologia de Plantas, 9: 291-339
- Loureiro A., Nicole M. R., Varzea V., Moncada P., Bertrand B., Silva M. C. 2012. Coffe resistance to *Colletotrichum kahawae* is associated with lignification, accumulation of

phenols and cell death at infection sites. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 77: 23-32

Maček J. 1991. Bolezni poljščin. Ljubljana, Kmečki glas: 267 str.

Marques J. P. R., Soares M., K., M., Apezato-Da-Gloria B. 2013. New staining technique for fungal-infected plant tissue. *Turkish Journal Botany*, 37:784-787

Mendgen K., Hahn M. 2002. Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science*, 7: 352-356

Moraes S. R. G, Tanaka F. A. O., Massola N. M. 2013. Histopathology of *Colletotrichum gleosporoides* on guava fruits (*Psidium guajava* L.). *Comunicacao cientifica*, 35: 657-664

Munda A., Gerič Stare B. 2011. Glive iz rodu *Colletotrichum*, povzročiteljice antraknoze na sadnem drevju in jagodičevju v Sloveniji. Zbornik predavanj in referatov. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 57-60

Nassar M. A. R., Boghdady S. M., Ahmed M. Y. 2010. Botanical study on *Phaseolus vulgaris* L. II – Anatomy of vegetative and reproductive organs. *Journal of American Science*, 6, 12: 217-229

O' Brien T. P., Feder N., McCully M.E. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine blue O. *Protoplasma*, 2: 367-373

O'Connell R. J. Bailey J. A., Richmond D. V. 1985. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiology. Physiological Plant Pathology*, 27: 75-98

O'Connell R. J., Perfect S., Hughes B., Carzaniga R., Bailey J., Green J. 2000. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. V: *Colletotrichum: host specificity, pathology and host-pathogen interaction*. Prusky D., Freeman S., Dickman M. B. (ed). Minnesota, APS Press: 57-77

Ogle H.J., Gowanlock D. H., Irwin J.A.G. 1990. Infection of *Stylosanthes guianensis* and *S. scabra* by *Colletotrichum gleosporoides*. *Phytopathology*, 80: 837-842

Prusky D. 1996. Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Review of Phytopathology*, 34: 413-434

- Prusky D., Plumbley R. A. 1992. Quiescent infections of *Colletotrichum* in tropical and subtropical fruit. V: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Baliey J. A., Jeger M. J. (eds), Wallingford, CABI: 337-357
- Reš M. 2007. Fižol. Družina: Slovenski katoliški tednik, 56, 45: 1
- Ross I. K. 2001. Fungal cell walls. Santa Barbara, University of California: 7 str.
<http://www.els.net> (20.4. 2014)
- Silva D. C. M., Varzea V., Guerra-Guimaraes L., Azinheira H. G., Fernandez D., Petitot S. A. Bertrand B., Lashermes P., Nicole M. 2006. Coffe resistance to the main diseases: leaf rust and coffe berry disease. *Plant Physiology*, 18, 1: 119-147
- Sinkovič T. 2010. Uvod v botaniko: za študente Visokošolskega študija kmetijstva – smer agronomija in hortikultura – bolonjski študij. Ljubljana, Biotehniška fakulteta. Oddelek za agronomijo: 208 str.
- Skipp R. A., Deverall B. J. 1972. Relationship between fungal growth and host changes visible by light microscop during infection of bean hypocotyls (*Phaseolus vulgaris*) susceptible and resistant to physiological races of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiology. Plant Pathology*, 2: 357-362
- Skipp R. A., Deverall B. J. 1973. Studies on cross-protection in the antrachnose disease of bean. *Physiology. Plant Pathology*, 3: 299-302
- Three most important layers of cell wall. (2.5.2014)
<http://www.yourarticlelibrary.com/biology/3-most-important-layers-of-cell-wall-735-words/6289/> (3.4.2014)
- Turk B. 2002. Gradivo pri predmetu botanika. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo.
<http://web.bf.uni-lj.si/ag/botanika/gradiva/Table/Fabaceae/pdf>. (23.7.2014)
- Varzea V. M. P., Rodrigues jr. C. J., Silva M. C., Pedro J. P., Marques D. V. 1999. High virulance of *Colletotrichum kahawae* isolate from Cameroon as compared with other isolates from the other regions. V: *Proceedings of the 18th International conference on coffe science*. Helsinki, Finland: 119-147
- Wharton S. P., Dieguez-Uribeondo J. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardin Botanico de Madrid*, 61, 1: 3-22

Yeung E.C., 1999. The use of histology in the study of plant tissue culture system – some practical comments. In Vitro Cell, 35: 137-142