

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Neja MAROLT

**MIKROPROPAGACIJA AVTOHTONIH SORT
ČESNA (*Allium sativum* L.) 'PTUJSKI JESENSKI' IN
'PTUJSKI SPOMLADANSKI'**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Neja MAROLT

MIKROPROPAGACIJA AVTOHTONIH SORT ČESNA (*Allium sativum* L.) 'PTUJSKI JESENSKI' IN 'PTUJSKI SPOMLADANSKI'

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**MICROPROPAGATION OF INDIGENOUS CULTIVARS OF
GARLIC (*Allium sativum* L.) 'PTUJSKI JESENSKI' AND 'PTUJSKI
SPOMLADANSKI'**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje Hortikultura. Delo je bilo opravljeno na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Jano MUROVEC in za somentorico izr. prof. Damijano KASTELEC.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Gregor OSTERC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: doc. dr. Jana MUROVEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: izr. prof. Damijana KASTELEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Dragan ŽNIDARČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

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

Neja Marolt

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK UDK 635.262:631.531:57.085.2(043.2)
- KG mikropropagacija/avtohtone sorte/česen/*Allium sativum*/'Ptujski jesenski'/'Ptujski spomladanski'/bazalna plošča stroka/razmnoževanje poganjkov
- AV MAROLT, Neja
- SA MUROVEC, Jana (mentorica)/KASTELEC, Damijana (somentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- LI 2015
- IN MIKROPROPAGACIJA AVTOHTONIH SORT ČESNA (*Allium sativum* L.)
'PTUJSKI JESENSKI' in 'PTUJSKI SPOMLADANSKI'
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
- OP XI, 46 str., 26 pregl., 12 sl., 58 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Proučevali smo vpliv različnih gojišč na uspešnost mikropropagacije česna (*Allium sativum* L. cv. 'Ptujski jesenski' in 'Ptujski spomladanski') v *in vitro* razmerah. Za indukcijo tvorbe poganjkov na izoliranih bazalnih ploščah strokov smo uporabili gojišče MS z vitamini z dodatkom 3 % saharoze, 0,1 mg/l NAA in 0,5 mg/l 2iP. Pri sorti 'Ptujski spomladanski' smo v petih tednih dobili v povprečju 12 poganjkov na strok, v desetih tednih pa 21,2. 75 % vseh strokov genotipa 'Ptujski jesenski' nastavljenih na gojišču za rast poganjkov je bilo okuženih, iz preostalih neokuženih strokov nam je v petih tednih uspelo dobiti v povprečju 3,9 poganjkov na strok, v devetih tednih pa 5,1. Regenerirane poganjke smo prestavili na štiri različna gojišča, kjer smo spremljali vpliv dveh osnovnih gojišč (MS z vitamini in BDS z vitamini, z dodanim 1g/l kalcijevim nitratom) v kombinaciji z NAA, v koncentraciji 0,5 ali 5 μ M ter BAP, v koncentraciji 1 ali 10 μ M, na razmnoževanje poganjkov. Do največjih razlik v številu poganjkov je po 21 tednih prišlo na gojišču BDS z dodanim kalcijevim nitratom in rastnima hormonoma NAA in BAP, v koncentraciji 5 μ M in 10 μ M (ČRP4), katerega mediana v številu novonastalih poganjkov statistično značilno odstopa od ostalih treh gojišč. V poskusu tvorbe čebulic smo opazovali vpliv povečane koncentracije saharoze (8 %) in dodajanja JA v koncentraciji 5 μ M na uspešnost tvorbe čebulic in koreninic, vendar se je izkazalo, da je bilo preživetje poganjkov boljše na gojišču brez dodatka JA. Po šestih tednih poskusa za tvorbo čebulic smo poganjke aklimatizirali, tisti, ki smo jih prenesli iz gojišča z dodatkom 8 % saharoze in brez JA, so imeli večji odstotek preživetja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du2
- DC UDC 635.262:631.531:57.085.2(043.2)
- CX micropropagation/indigenous cultivars/garlic/*Allium sativum*/'Ptujski jesenski'/'Ptujski spomladanski'/basal plate of clove/shoot multiplication
- AU MAROLT, Neja
- AA MUROVEC, Jana (supervisor)/KASTELEC, Damijana (co-supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
- PY 2015
- TY MICROPROPAGATION OF INDIGENOUS CULTIVARS OF GARLIC (*Allium sativum* L.) 'PTUJSKI JESENSKI' and 'PTUJSKI SPOMLADANSKI'
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
- NO XI, 46 p., 26 tab., 12 fig., 58 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB The effect of different culture media on micropropagation of garlic (*Allium sativum* L. cv. 'Ptujski jesenski' and 'Ptujski spomladanski') was studied *in vitro*. Garlic basal plates were used for shoot induction on MS medium with vitamins supplemented with 3 % sucrose, 0,1 mg/l NAA and 0,5 mg/l 2iP. The average number of shoots per clove of 'Ptujski spomladanski' was 12 in five weeks and 21,2 in ten weeks of culture. 75 % of 'Ptujski jesenski' cloves were infected on shoot growth medium, the average multiplication rate from uninfected cloves was 3,9 shoots per clove in five weeks and 5,1 in nine weeks. Regenerated shoots were then transferred to four different multiplication media, where the influence on shoot multiplication of two basal medium (MS with vitamins and BDS including vitamins, with added 1g/l of calcium nitrate) in combination with 0,5 μ M or 5 μ M NAA and 1 μ M or 10 μ M BAP was studied. The most significant difference in number of new shoots occurred on BDS medium with added calcium nitrate, combined with 5 μ M NAA and 10 μ M BAP (ČRP 4) after 21 weeks. Median of new shoots on ČRP4 medium was statistically different from other three, among which there were no statistical difference. Also the effect of sucrose (8 %) and 5 μ M JA on bulb and root formation was studied. Growth of explants on medium supplemented with JA was not effective for stimulating bulb and root formation, nor for survival of shoots. After six weeks in culture for bulb formation, shoots were acclimatized, those from medium with 8 % sucrose, without JA, had higher survival rate.

KAZALO VSEBINE

| | Str. |
|---|-----------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA | III |
| KEY WORDS DOCUMENTATION | IV |
| KAZALO VSEBINE | V |
| KAZALO PREGLEDNIC | VII |
| KAZALO SLIK | IX |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI | X |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 CILJI NALOGE | 2 |
| 1.2 DELOVNE HIPOTEZE | 2 |
| 2 PREGLED OBJAV | 3 |
| 2.1 SPLOŠNO O ČESNU | 3 |
| 2.1.1 Razmnoževanje česna | 3 |
| 2.1.2 Pozitivni učinki česna | 4 |
| 2.2 PRIDELAVA ČESNA | 5 |
| 2.3 PROBLEM VIRUSNIH OKUŽB ČESNA | 6 |
| 2.4 MIKROPROPAGACIJA ČESNA | 7 |
| 2.4.1 Faze in metode mikropropagacije | 7 |
| 2.4.2 Mikropropagacija česna s kulturo bazalnih plošč | 10 |
| 2.4.3 Mikropropagacija česna z adventivno regeneracijo iz koreninskih vršičkov | 11 |
| 2.4.4 Razmnoževanje poganjkov | 13 |
| 2.4.5 Tvorba čebulic <i>in vitro</i> | 13 |
| 3 MATERIAL IN METODE | 15 |
| 3.1 RASTLINSKI MATERIAL | 15 |
| 3.1.1 'Ptujski jesenski' | 15 |
| 3.1.2 'Ptujski spomladanski' | 15 |
| 3.2 RAZKUŽEVANJE MATERIALA | 15 |
| 3.2.1 Razkuževanje rastlinskega materiala | 15 |
| 3.2.2 Sterilizacija orodja | 16 |
| 3.2.3 Sterilizacija ddH₂O, cedil, gojišč, pladnjev, čaš | 16 |
| 3.3 GOJIŠČA | 16 |
| 3.3.1 Rastlinski rastni regulatorji | 16 |
| 3.3.2 Osnovno gojišče | 16 |
| 3.3.3 Postopek priprave gojišč | 18 |
| 3.4 PREVERJANJE ENDOGENIH OKUŽB | 18 |
| 3.5 POSKUS ADVENTIVNE REGENERACIJE IZ KORENINSKIH VRŠIČKOV | 19 |
| 3.6 POSKUS RASTI POGANJKOV IZ BAZALNIH PLOŠČ | 19 |
| 3.7 POSKUS RAZMNOŽEVANJA POGANJKOV | 20 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 3.8 | POSKUS TVORBE ČEBULIC | 21 |
| 3.9 | AKLIMATIZACIJA POGANJKOV | 22 |
| 3.10 | STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV | 22 |
| 4 | REZULTATI | 23 |
| 4.1 | RASTLINSKI MATERIAL | 23 |
| 4.2 | ENDOGENE OKUŽBE | 23 |
| 4.3 | ADVENTIVNA REGENERACIJA KORENINSKIH VRŠIČKOV | 25 |
| 4.4 | USPEH RASTI POGANJKOV IZ BAZALNE PLOŠČE | 27 |
| 4.5 | USPEH RAZMNOŽEVANJA POGANJKOV | 30 |
| 4.6 | USPEH TVORBE ČEBULIC IN AKLIMATIZACIJA | 34 |
| 5 | RAZPRAVA | 36 |
| 5.1 | ENDOGENE OKUŽBE | 36 |
| 5.2 | ADVENTIVNA REGENERACIJA KORENINSKIH VRŠIČKOV | 36 |
| 5.3 | RAST POGANJKOV IZ BAZALNE PLOŠČE | 37 |
| 5.4 | RAZMNOŽEVANJE POGANJKOV | 38 |
| 5.5 | TVORBA ČEBULIC IN AKLIMATIZACIJA | 38 |
| 6 | SKLEPI | 40 |
| 7 | POVZETEK | 41 |
| 8 | VIRI | 42 |
| | ZAHVALA | |

KAZALO PREGLEDNIC

| | Str. |
|--|------|
| Preglednica 1: Pridelovalne površine, hektarski pridelek, skupni pridelek, izvoz, uvoz, količina in cena odkupa česna v Sloveniji, za obdobje 2010-2014 (Zagorc in sod., 2015) | 5 |
| Preglednica 2: Pridelovalne površine, hektarski pridelek in skupni pridelek česna v svetu, za obdobje 2010-2013 (FAOSTAT, 2015) | 5 |
| Preglednica 3: Svetovna proizvodnja česna največjih držav pridelovalk in Slovenije za obdobje 2010-2013 (FAOSTAT, 2015) | 6 |
| Preglednica 4: Sestava MS osnovnega gojišča z vitamini (Duchefa Biochemie) | 17 |
| Preglednica 5: Sestava BDS osnovnega gojišča z vitamini (Duchefa Biochemie) | 17 |
| Preglednica 6: Sestava komercialnega pripravka za gojišče PDA (Biolife Italiana) | 18 |
| Preglednica 7: Sestava komercialnega pripravka za gojišče LB (Duchefa Biochemie) | 18 |
| Preglednica 8: Gojišče za adventivno regeneracijo iz koreninskih vršičkov (ČKV) | 19 |
| Preglednica 9: Gojišče za rast poganjkov iz delov bazalnih plošč (ČBP) | 20 |
| Preglednica 10: Inicijacija delov bazalnih plošč klonov in število glav 'Ptujskega spomladanskega' in 'Ptujskega jesenskega' na ČBP gojišču | 20 |
| Preglednica 11: Različne vrste gojišč za razmnoževanje poganjkov (ČRP) | 21 |
| Preglednica 12: Gojišči za tvorjenje čebulic česna | 21 |
| Preglednica 13: Prenos poganjkov s ČBP gojišča na gojišče za tvorjenje čebulic, aklimatizacija in prenos v lončke 'Ptujskega spomladanskega' | 21 |
| Preglednica 14: Povprečna masa glav in strokov stehtanih za posamezen klon česna PJ in PS s standardnim odklonom | 23 |
| Preglednica 15: Preliminarni test okužbe glav 'Ptujskega jesenskega' na gojišču PDA in LB | 24 |
| Preglednica 16: Preliminarni test okužbe glav 'Ptujskega spomladanskega' na gojišču PDA in LB | 24 |
| Preglednica 17: Število strokov uporabljenih za adventivno regeneracijo koreninskih vršičkov 'Ptujskega spomladanskega' česna | 25 |

- Preglednica 18: Število strokov uporabljenih za adventivno regeneracijo koreninskih vršičkov 'Ptujskega jesenskega' česna 26
- Preglednica 19: Število uporabljenih strokov, delov bazalnih plošč in regeneriranih poganjkov po 5 tednih kulture (število poganjkov 1) in po 10 tednih kulture (število poganjkov 2) 'Ptujskega spomladanskega' na ČBP po klonih 29
- Preglednica 20: Povprečno število poganjkov na strok po 5 in po 10 tednih ter povprečno število delov bazalnih plošč na strok PS po klonih 29
- Preglednica 21: Število inokuliranih strokov in rast poganjkov po 5 tednih kulture (Število poganjkov 1) in po 9 tednih kulture (Število poganjkov 2) 'Ptujskega jesenskega' na ČBP po klonih 30
- Preglednica 22: Frekvenca razlik med končnim seštevkom poganjkov (po 150 dneh) in začetnim številom poganjkov na epruveto na ČRP gojiščih pri PS 32
- Preglednica 23: Sposobnost razmnoževanja poganjkov 'Ptujskega spomladanskega' v prvih 77 dneh (Število poganjkov 1) in v naslednjih 73 dneh (Število poganjkov 2) 33
- Preglednica 24: Kvartili razmerja med končnim (po 150 dneh) številom poganjkov na epruveto in začetnim številom poganjkov na epruveto PS na ČRP gojiščih 33
- Preglednica 25: Uspešnost razmnoževanja poganjkov 'Ptujskega jesenskega' v prvih 95 dneh (Število poganjkov 1) in po 153 dneh (Število poganjkov 2) 34
- Preglednica 26: Začetno število poganjkov na gojiščih TČ1 in TČ2 ter razvoj korenin pred in med aklimatizacijo 34

KAZALO SLIK

| | Str. |
|--|------|
| Slika 1: Glavne metode mikropropagacije (prirejeno po George et al., 2008: 33) | 10 |
| Slika 2: Neokužen strok po sedmih dneh na gojišču PDA | 24 |
| Slika 3: Glivična okužba stroka na gojišču PDA | 25 |
| Slika 4: Pojav okužb med koreninjenjem strokov <i>in vitro</i> | 25 |
| Slika 5: Adventivna regeneracija iz koreninskih vršičkov česna 'Ptujski spomladanski' | 26 |
| Slika 6: Regeneracija poganjkov iz bazalnih plošč po 5 tednih kulture na ČBP | 27 |
| Slika 7: Odvisnost skupnega števila poganjkov na strok od števila delov bazalne plošče na strok PS | 28 |
| Slika 8: Razmnoževanje poganjkov po 10 tednih kulture na ČBP | 28 |
| Slika 9: Začetno število poganjkov PS prestavljenih iz gojišča ČBP na štiri gojišča ČRP | 31 |
| Slika 10: Razlika v številu poganjkov PS po 150 dneh kulture na ČRP gojiščih med končnim seštevkom poganjkov in začetnim stanjem | 32 |
| Slika 11: Tvorba čebulice v 40 dneh na gojišču TČ1 | 35 |
| Slika 12: Aklimatizacija rastlinic česna | 35 |

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|--|---|
| 2,4-D | diklorofenolocetna kislina |
| 2iP | N ⁶ -(2-izopentenil) adenin |
| ABA | abscizinska kislina |
| B5 gojišče | Gamborgovo gojišče |
| B-9 | daminozid |
| BAP | 6-benzilaminopurin |
| BDS gojišče | Dunstan in Short gojišče |
| BLM gojišče | Dunstan in Short gojišče modificirano s kalcijevim nitratom |
| Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O | kalcijev nitrat tetrahidrat |
| CCC | kloroholin klorid |
| ddH ₂ O | bidestilirana voda |
| DICA | dikloroizocianurna kislina |
| GarMbFV | Garlic mite-borne filamentous virus |
| GarV-X | Garlic virus-X |
| GCLV | Garlic common latent virus |
| HCl | klorovodikova kislina |
| IAA | indol-3-ocetna kislina |
| JA | jasmonska kislina |
| KNO ₃ | kalijev nitrat |
| KOH | kalijev hidroksid |
| LS gojišče | Linsmaier in Skoog gojišče |
| LYSV | Leek yellow stripe virus |
| MS gojišče | Murashige in Skoog gojišče |
| N6 gojišče | Chu gojišče |
| NAA | α-naftalenocetna kislina |
| NaClO | natrijev hipoklorit |
| NaOH | natrijev hidroksid |
| NH ₄ ⁺ | amonijev ion |
| NH ₄ Cl | amonijev klorid |
| NO ₃ ⁻ | nitratni ion |

| | |
|------|--------------------------|
| OYDV | Onion yellow dwarf virus |
| PJ | 'Ptujski jesenski' |
| PS | 'Ptujski spomladanski' |
| ShVX | Shallot virus X |
| SLV | Shalot latent virus |
| TuMV | Turnip mosaic virus |

1 UVOD

Česen (*Allium sativum* L.) je ena izmed najstarejših kmetijskih rastlin na svetu. Njegova uporaba je omenjena že v Antiki, uporablja se kot zdravilna rastlina in začimba. Vsebuje zdravilne sestavine, ima izredno močan vonj in je razširjen po Aziji, Evropi in Južni Ameriki (Keller in Senula, 2013). Velik pomen česna ni samo v svetu, ampak tudi v Sloveniji. Pridelava česna je v zadnjih dvajsetih letih v Sloveniji praktično zastala, bili smo v celoti odvisni od uvoza, večji del česna pa je bil uvožen iz Kitajske. Danes se pridelava ponovno oživlja, pridelavo bomo lahko povečali tako z večjimi površinami, ki bodo namenjene pridelavi kot tudi z večjimi pridelki, kar lahko dosežemo le s kvalitetnim sadilnim materialom. V Sloveniji se v glavnem pridelujeta dve avtothoni sorti, in sicer 'Ptujski jesenski' in 'Ptujski spomladanski' česen.

Česen se razmnožuje vegetativno, kar pomeni, da se pridobijo nove rastline iz posameznih vegetativnih delov rastline, zato je razmnoževanje česna z mikropropagacijo skozi desetletja razvoja znanja na področju genetike in žlahtnjenja, ki skrajšuje selekcijo in pospeši razmnoževanje v primerjavi s klasičnim načinom ali omogoči zadostno količino semena, napredovalo. Klonsko razmnoževanje *in vitro* je zelo pomembno pri razmnoževanju brezvirusnih sadik. Z mikropropagacijo lahko razmnožujemo mnogo rastlinskih vrst precej hitreje kot s klasičnim razmnoževanjem v kmetijstvu, v vegetativni fazi pa lahko ohranjamo tudi rastlinske vrste, ki v naravi sicer hitro zaključijo razvoj. Končni rezultat postopka propagacije je ukoreninjena sadika, ki je povsem enaka sadikam, pridobljenih s klasičnim načinom (Bohanec in sod., 2004).

Z namenom večje pridelave domačih avtohtonih sort česna je Semenarna Ljubljana d. d. leta 2010 uvedla žlahtniteljski program, da bi hitreje prišli do kvalitetnega sadilnega materiala, ki bi omogočal dosego večjih pridelkov. S konvencionalnimi načini pridelave semenskega česna, trenutno ni mogoče pridelati zadostne količine semena, poleg tega virusne in druge okužbe predstavljajo velik problem v komercialni pridelavi česna. Z bolj kvalitetnim semenskim materialom bi lahko postala pridelava česna tržno bolj zanimiva in bolj konkurenčna. S tem naj bi vplivala na večjo konkurenčnost slovenskega česna v primerjavi s tujim ter zmanjšala uvoz. Pridelava česna se je v Sloveniji v zadnjih letih povečala iz 292 ton v letu 2010 na 912 t v letu 2014, oziroma iz 38 hektarjev pridelovalnih površin na 129 ha (Zagorc in sod., 2015).

1.1 CILJI NALOGE

Cilj magistrskega dela je bil vzpostaviti in optimizirati protokol mikropropagacije izbranih klonov česna 'Ptujski jesenski' in 'Ptujski spomladanski' za proizvodnjo semenskega materiala. Na ta način bi lahko pridelali semenski material brez endogenih okužb s hitrim postopkom *in vitro* razmnoževanja.

Osnovni namen naloge je bil ugotoviti, kakšne so možnosti in omejitve razmnoževanja dveh slovenskih avtohtonih sort česna v tkivni kulturi. Želeli smo preveriti vpliv sestave gojišč (ob dodatku različnih hormonov različnim osnovnim gojiščem) na regeneracijsko sposobnost poganjkov iz bazalnih plošč strokov česna in iz koreninskih vršičkov.

Regeneriranim poganjkom smo želeli stimulirati razvoj koreninic in čebulic v najkrajšem možnem času ter jih nato aklimatizirati.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevali smo, da bomo z uporabo in optimizacijo objavljenih protokolov za mikropropagacijo česna (s poskusom adventivne regeneracije iz koreninskih vršičkov in poskusom rasti poganjkov iz bazalnega dela stroka česna) uspeli namnožiti klone, ob predpostavki, da obstajajo razlike v odzivnosti med 'Ptujskim jesenskim' in 'Ptujskim spomladanskim'.

Različna osnovna gojišča v kombinaciji z različnimi koncentracijami rastlinskih hormonov vplivajo na uspešnost rasti in razmnoževanja poganjkov ter na njihovo nadaljnjo sposobnost aklimatizacije. Večje koncentracije rastnih hormonov bodo vodile v večjo sposobnost regeneracije poganjkov in večji delež dobro razvitih ukoreninjenih sadik.

Predvidevali smo, da bo prišlo do razlik v regeneraciji poganjkov med različnimi izsečki rastline (koreninskimi vršički in bazalnim delom stroka).

2 PREGLED OBJAV

2.1 SPLOŠNO O ČESNU

Česen je ena izmed najstarejših, po okusu najmočnejših užitnih čebulnic. Izhaja iz centralne Azije, iz območja Tadžikistana, Turkmenistana, Uzbekistana, severnega Irana, Afganistana in Pakistana (Block, 2010). Kot rastlinska vrsta ima zelo pomembno vlogo v kulinariki, saj je njegova uporaba razširjena tako v mediteranski kot azijski kuhinji. Uporablja se ga svežega in tudi dehidriranega, predelanega v pasto, kosmiče, zdrobljenega. Prisotnost česna na svetovnem trgu je v zadnjih letih zaradi sprememb potrošniških navad zelo velika. Česen trenutno predstavlja eno izmed glavnih sestavin mediteranske diete, saj so profilaktične in kurativne lastnosti česna v celoti dokazane (Codex Alimentarius Commission, 2014). Pridelujemo ga kot jesensko (ozimno, zimsko) in spomladansko (jaro) zelenjadnico v slovenskem pridelovalnem območju. Gojimo ga zaradi glavic (čebulic), sestavljenih iz strokov, katerih število je sortno značilno (Osvald in Kogoj Osvald, 2005).

Česen (*Allium sativum* L.) morfološko spada v rod *Allium*, ta pa v družino lukovk (*Alliaceae*), ki obsega okrog 780 vrst, tako ekonomsko pomembnih kot tudi divjih vrst. Rod *Allium* je razširjen v zmernem toplem pasu (Stavělíková, 2008). Znotraj rastlinske vrste česen je vključenih pet različnih podvrst, in sicer *Sativum*, *Ophioscorodon*, *Longicuspis*, *Subtropical* in *Pekinense*. Podvrsta *Sativum*, katere poreklo je mediteranskega izvora, predstavlja najbolj pogosto obliko česna, ki je prilagojena širom sveta. *Sativum* botanično pomeni gojen, kar dosledno nakazuje na dejstvo, da je divji tip *A. sativum* nepoznan (Block, 2010). Komercialno najpomembnejše vrste v družini lukovk so zagotovo čebula (*A. cepa* L.), česen (*A. sativum* L.) in kitajski drobnjak (*A. tuberosum* L.) (Song in sod., 2007). V Skupnem katalogu sort zelenjadnic EU je trenutno registriranih 115 kultivarjev česna, med katerimi so tudi trije slovenski: 'Ptujski jesenski', 'Ptujski spomladanski' in 'Jesenski Anka' (Directorate ..., 2015).

2.1.1 Razmnoževanje česna

Česen se razmnožuje izključno vegetativno, s stroki, saj je sterilen. Tak način razmnoževanja ima majhen multiplikacijski faktor in visok potencial prenašanja virusnih obolenj (Haque in sod., 1997). Multiplikacijski faktor česna na prostem znaša približno od pet do deset (v 1 letu se število strokov poveča za pet do desetkrat). Pridelava semenskega materiala in razvoj novih sort česna zato zahtevata relativno veliko let (Nagakubo in sod., 1993). Sadimo ga v dveh terminih, jeseni, meseca oktobra in novembra ter spomladi, februarja in marca. Če sadimo prepozno, aprila ali maja, se rastlinice česna slabo razvijejo in je pridelek temu primerno slabši. Sadimo ga na razdalje 25 do 3 cm x 12 do 15 cm, globina sajenja pa je 5 do 7 cm. Za hektar česnovega nasada porabimo od 800 do 1200 kg strokov (Osvald in Kogoj Osvald, 2005).

Izrednega pomena so pridelovalne razmere, v katerih gojimo česen, saj mu prija srednje topla in srednje vlažna klima. Za vznik je potrebna minimalna temperatura 5 °C, medtem ko je za rast in razvoj glavic optimalna temperatura 15 °C (Osvald in Kogoj Osvald, 2005).

Ravno izpostavljenost sadilnega materiala nižjim temperaturam je ključnega pomena za uspešno indukcijo vznika. Wu in sod. (2015) poročajo o pozitivnem vplivu nizkih temperatur na kasnejšo rast, cvetenje in končni pridelek, kot priložnosti gojenja česna v klimatskih razmerah, kjer temperature, potrebne za uspešen vznik ne padejo dovolj nizko. Z drugimi besedami, dvajsetdnevno shranjevanje glav česna pred sajenjem, v hladilnicah s temperaturo 5 °C ali za štirideset dni na 10 °C, ima učinek vernalizacije in na nek način omogoča izvensezonsko gojenje česna, v relativno krajšem času in z večjim pridelkom. Česnu najbolj ustrezajo srednje globoka tla, ki so dobro pognojena z organsko snovjo, rahlo kislila in dobro propustna (Osvald in Kogoj Osvald, 2005).

2.1.2 Pozitivni učinki česna

Česen in njegovi pripravki predstavljajo antidiabetične, antiaterosklerotične, antikancerogene in antisklerotične učinke, uporablja se ga tako v medicinske kot kulinarične namene. Znana je uporabnost v tradicionalni medicini, saj ima izjemen učinek na uravnavanje ravni holesterola, na zniževanje glukoze v krvi in tudi preprečuje možnost pojava srčnega napada ter izboljšuje imunski sistem (Suleria in sod., 2015).

Sestavljen je iz pomembnih bioaktivnih snovi, kot so alicin, ki doprinese k pekočemu okusu, ajoen – nenasičen disulfid, encimi, vitamin B, minerali in flavonoidi (Memudu in sod., 2015). Prehranska sestava stroka česna pretežno predstavlja 65 % vode, 28 % ogljikovih hidratov, 2,3 % organosulfitov, 2 % beljakovin, 1,2 % prostih aminokislin in 1,5 % vlaknin. Na kratko, s 100 g česna pokrijemo potrebo po 6,36 g beljakovin, 33,06 g ogljikovih hidratov in 58,58 g vode in vnesemo 149 kilokalorij (kcal) (Suleria in sod., 2015). Organosulfiti so učinkovine, ki naj bi zmanjševale pojavnost različnih tipov raka in prispevale k zmanjševanju trigliceridov v krvi ter posledično zniževale krvni pritisk (Butt, 2009). Česen predstavlja širok antibiotični spekter tako proti gram pozitivnim kot tudi gram negativnim bakterijam (Stavělíková, 2008).

Najnovejša raziskava opravljena na Sprague-Dawleyevih podganah moškega spola je pokazala, da se raven testosterona ob vsakodnevem dodatku česna v koncentraciji 200 mg/kg mase v obdobju 4 in 8 tednov poveča, v primerjavi s kontrolno skupino podgan, ki ni prejela ekstrakta česna (Memudu in sod., 2015). Zaidi in sod. (2015) po so ob izpostavitvi Albino Wistar podgan šesturnemu stresu in tretiranju s česnovim ekstraktom v koncentraciji 100 mg/kg pred in po njem, dokazali pozitiven učinek le tega na nevtraliziranje prostih radikalov v ledvicah in s tem na povečano aktivnost antioksidativnih encimov.

Daniel in sod. (2015) navajajo možnost potencialne uporabe olja ekstrahiranega iz česna, kot vir naravnih antimikrobičnih spojin v boju proti gnitju jabolka sort 'Granny Smith', 'Zlati delišes' in 'Pink Lady' v skladiščnih razmerah. Ob uporabi ekstrakta se je premer lezije na površini jabolka, ki sta ga povzročili glivi *Botrytis cinerea* in *Penicillium expansum*, uspešno zmanjšala v primerjavi z netretiranimi plodovi.

2.2 PRIDELAVA ČESNA

Leta 2013 so bile v Sloveniji po statističnih ocenah zelenjadnice pospravljene iz 4.845 hektarjev, skupno je bilo pridelanih 71 tisoč ton zelenjadnic, leta 2014 pa kar za iz 4 % več površin kot v letu prej, in sicer iz 5.057 hektarjev. V lanskem letu smo zaradi boljše letine skupno pridelali 86.209 ton zelenjadnic. Od tega je bil česen pridelan na 129 ha pridelovalnih površin, s skupnim pridelkom 912 ton, ki je pred štirimi leti dosegal le 292 ton. Od 129 ha površin je 67 ha površin v lasti tržno usmerjenih proizvajalcev. Hektarski pridelek česna je v Sloveniji v primerjavi s svetom veliko manjši in znaša 7,1 tone po ha. Vzpodbudne so številke o stanju izvoza, leta 2012 je ta znašal le 81 ton, leta 2014 pa kar 692 ton. Od leta 2010 proti 2013 je bilo čutiti tendenco k upadu uvoza tujega česna, ki je leta 2013 znašal 1.092 ton, v lanskem letu pa zopet nekoliko narasel na 1.408 ton. Leta 2010 v Sloveniji ni bilo moč beležiti nobenega odkupa česna, medtem ko je evidentirana prodaja tega v lanskem letu znašala 38 ton. Odkupne cene česna so se v zadnjih štirih letih povzpele iz 3.414,2 EUR za tono leta 2010 na 5.526 EUR/t leta 2013. Leta 2014 je odkupna cena padla na 3.670 EUR/t (Zagorc in sod., 2014, 2015).

Preglednica 1: Pridelovalne površine, hektarski pridelek, skupni pridelek, izvoz, uvoz, količina in cena odkupa česna v Sloveniji, za obdobje 2010-2014 (Zagorc in sod., 2015)

| | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 |
|--------------------------------|---------|---------|---------|---------|----------|
| Pridelovalna površina (ha) | 38,0 | 61,0 | 67,0 | 125,0 | 129,0 |
| Hektarski pridelek (t/ha) | 7,7 | 7,4 | 6,2 | 6,6 | 7,1 |
| Skupni pridelek (t) | 292,0 | 449,0 | 413,0 | 821,0 | 912,0 |
| Izvoz (t) | 233,0 | 99,0 | 81,0 | 252,0 | *692,0 |
| Uvoz (t) | 1.602,0 | 1.296,0 | 1.145,0 | 1.092,0 | *1.408,0 |
| Evidentirana prodaja–odkup (t) | 0 | 0 | 10,0 | 18,0 | 38,0 |
| Odkupna cena (EUR/t) | 3.414,2 | 5.582,6 | 5.585,9 | 5.526,0 | 3.670,0 |

*začasni podatki

Pridelovalne površine namenjene česnu se v svetovnem merilu povečujejo, leta 2010 so te znašale 1,3 milijonov hektarjev, leta 2013 pa 1,4 milijonov hektarjev. Svetovni hektarski pridelek je neprimerljivo večji od slovenskega, saj je leta 2013 znašal 18,6 ton po ha, slovenski pa 7,1 tone na ha. Pridelava česna v svetu je po zadnjih podatkih leta 2013 znašala 24,3 milijonov ton, in se ta iz leta v leto povečuje, od tega glavnino predstavlja Kitajska, z 19,2 milijoni tonami. Druga največja država pridelovalka je Indija z 1,3 milijoni ton, sledi ji Južna Koreja z 400.000 t letno. V Južni Ameriki prednjačita Argentina in Brazilija s približno 100.000 tonami na leto. Druge pomembnejše države proizvajalke so še Egipt, Bangladeš in Mjanmar z 200.000 tonami na letni ravni (FAOSTAT ..., 2015).

Preglednica 2: Pridelovalne površine, hektarski pridelek in skupni pridelek česna v svetu, za obdobje 2010-2013 (FAOSTAT ..., 2015)

| | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 |
|--------------------------------|------|------|------|------|
| Pridelovalna površina (mio ha) | 1,3 | 1,4 | 1,5 | 1,4 |
| Hektarski pridelek (t/ha) | 18,6 | 18,3 | 17,8 | 18,6 |
| Skupni pridelek (mio t) | 22,6 | 23,1 | 23,4 | 24,3 |

Preglednica 3: Svetovna proizvodnja česna največjih držav pridelovalk in Slovenije za obdobje 2010-2013 (FAOSTAT ..., 2015)

| Država pridelovalka | Skupni pridelek (mio t) | | | |
|---------------------|-------------------------|-------|-------|-------|
| | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 |
| Kitajska | 18,5 | 18,4 | 18,4 | 19,2 |
| Indija | 0,8 | 1,1 | 1,2 | 1,3 |
| Južna Koreja | 0,3 | 0,3 | 0,3 | 0,4 |
| Egipt | 0,2 | 0,3 | 0,3 | 0,2 |
| Bangladeš | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Mjanmar | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Argentina | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Brazilija | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Slovenija (t) | 292,0 | 449,0 | 413,0 | 821,0 |

2.3 PROBLEM VIRUSNIH OKUŽB ČESNA

Razmnoževanje brezvirusnega materiala česna po poti tradicionalne agronomske prakse je drago in težko izvedljivo, saj prenašalce (vektorje) virusov v okolju ni mogoče popolnoma uničiti (Ucman in sod., 1998). V EU je na razpolago brezvirusni semenski material, ki se seveda na polju hitro ponovno okuži, njegova cena pa je zelo visoka. V Sloveniji smo pridelovali posajen brezvirusni česen že dobrih dvajset let nazaj, vendar se je takšno razmnoževanje, zaradi previsoke cene opustilo (Pušenjak, 2013). Ker se česen večinoma razmnožuje vegetativno, se virusi prenašajo iz generacije v generacijo, poleg tega pa so rastline mnogokrat okužene z več različnimi virusi hkrati (Mavrič in sod., 1999).

Česen večinoma okužujejo filamentozni virusi iz treh virusnih rodov: potivirusi, karlavirusi in aleksivirusi. Na rastlinah rodu *Allium* so pogosto identificirani virus rumene pritlikavosti čebule (OYDV), virus rumene črtičavosti pora (LYSV) in mozaični virus repe (TuMV) ki spadajo v rod potivirusov. Od karlavirusov se na lukih pojavljata navadni latentni virus česna (GCLV) in latentni virus šalotke (SLV). Aleksivirusse zastopajo filamentozni virus česna, ki se prenaša s pršicami (GarMbFV), virus šalotke X (ShVX), virus česna X (GarV-X) in drugi (Katis in sod., 2012).

Yanju in sod. (2010) poročajo, da obstaja več kot 20 različnih virusov, ki napadajo česen, vendar sta najbolj razširjena in uničujoča LYSV in OYDV. OYDV je bil odkrit leta 1916 v Zahodni Virginiji (ZDA) in je razširjen na petih kontinentih. Stopnja okuženosti v Evropi je 52 %, v Aziji pa kar 86 %. Rastline okužene z omenjenim virusom so pritlikave, z rumenimi progami na listih in blago obliko kloroze. Prenaša se mehansko, z listnimi ušmi ter okuženimi sadilnim materialom. LYSV je bil odkrit leta 1957, na podlagi mikroskopskih, seroloških in bioloških identifikacij pa imenovan leta 1978. LYSV je razširjen na Kitajskem, v Franciji, Indiji, Egiptu, Avstraliji, na Nizozemskem, v Argentini in ostalih državah. Povzroča mozaične pege na listih, abnormalno stanje rastlin, rjave stroke in zmanjšuje končni pridelek česna. Bolezenski simptomi lahko zavisijo od samega seva virusa, občutljivosti gostujoče rastlinske vrste in okoljskih dejavnikov. Virus se prenaša s strojno opremo, žuželkami in drugimi prenašalci, najpogosteje z vegetativnim načinom razmnoževanjem česna. Tako kot OYDV tudi LYSV spada v skupino potivirusov (potato virus Y).

Znano je, da je česen na trgu množično okužen z OYDV, LYSV, GCLV in SLV. Poleg omenjenih so navzoči še drugi virusi, in sicer Garlic virus A, Garlic virus B, Garlic virus C in Garlic virus D (GarVs - aleksivirusi). O intenzivni zastopanosti virusov česna na Kitajskem, kot največji pridelovalki, poročajo Hu in sod. (2015), saj naj bi bili aleksivirusi, OYDV, LYSV in SLV zaznani v 50,9 %, 40,3 %, 28,3 % in 58,5 % vzorčnih listih.

Tkivne kulture so zato nedvomno zelo uporabna tehnika pri eliminaciji virusnih kompleksov in pridelavi brezvirusnih sadik (Ayabe in Sumi, 1998, 2001). Sadilni material česna predstavljajo klone okuženi s številnimi virusi, med katerimi sta najbolj uničujoča potivirusa, OYDV in LYSV. Vsak virus posebej naj bi oklestil pridelok glavic česna za od 20 do 60 %, v kombinaciji z drugimi okužbami pa do 80 % pridelka, odvisno od kultivarja in stadija obolenja. Z namenom povečanja stopnje razmnoževalnega brezvirusnega materiala je zato zaželena uporaba različnih metod mikropropagacije (Fereol in sod., 2002) v kombinaciji s postopki eliminacije virusov s kulturo meristemov, termoterapijo in kemoterapijo. Taškin in sod. (2013) navajajo, da oba virusa vzajemno (OYDV in LYSV) vplivata na upad pridelka česna tudi do 78 %. Primerjali so dve tehniki razmnoževanja, z meristemi in ravnimi vršički ter z Real-Time PCR metodo testirali prisotnost le teh. Potrdili so odsotnost obeh virusov pri metodi meristemov in prisotnost obeh pri drugi tehniki. Uzman in sod. (1998) navajajo, da so z obdelavo česnovih strokov s pomočjo termoterapije uspeli odpraviti od 90 do 100 % OYDV, vendar je multiplikacijski faktor novonastalih poganjkov termično obdelanih meristemov potem precej slabši kot pri meristemih, ki niso bili toplotno tretirani. O podobnem pozitivnem učinku termoterapije na eliminacijo virusov poročajo Torres in sod. (2000), saj jim je pri izpostavljenosti strokov na 37 °C za 35 dni uspelo vzgojiti 77 % brezvirusnih rastlin, v primeru povišanja temperature na 40 °C pa se je odstotek regeneriranja povišal za 20 %. Meristemom lahko s pomočjo kemoterapije (50 mg ribavirina na liter gojišča) izločimo viruse (Keller in Senula, 2013). Kot možen vir brezvirusnega sadilnega materiala predstavljajo nezrele zračne čebulice, ki jih v času cvetenja tvori cvetno steblo, rezultati kažejo, da ima ta tehnika primerljiv potencial izločanja virusov kot termoterapija (Ebi in sod., 2000).

2.4 MIKROPROPAGACIJA ČESNA

2.4.1 Faze in metode mikropropagacije

Mikropropagacija je nedvomno osnovna tehnika tkivnih kultur in ostalih zahtevnejših biotehnoloških postopkov, katerih končna faza je rastlinica, ki jo s to metodo ohranjamo in razmnožujemo. Od klasičnega razmnoževanja se mikropropagacija razlikuje v tem, da s tem načinom lahko vegetativno razmnožujemo skoraj vse vrste rastlin, da je hitrost razmnoževanja bistveno večja ter da lahko v vegetativni fazi ohranjamo tudi rastlinske vrste, ki v naravi hitro zaključijo razvoj. Gre za razmnoževanje (kloniranje) rastlin v zaprtih *in vitro* razmerah (Bohanec in sod., 2004).

Največje prednosti *in vitro* tehnik so zagotovo manjša prostorska zahtevnost za vzdrževanje večjega števila rastlinic. Postopki mikropropagacije potekajo v laboratorijih v aseptičnih razmerah, saj se na ta način izognemo možnim okužbam z bakterijami, plesnimi

in drugimi mikroorganizmi. Metoda omogoča razmnoževanje brezvirusnih rastlin, ki so bile testirane na viruse pred vzpostavitvijo kulture. Faktorji, ki pozitivno vplivajo na vegetativno regeneracijo so dodane hranilne snovi in rastni regulatorji v gojiščih, svetloba in temperatura v komorah za gojenje rastlin (George in sod., 2008). Glavne slabosti mikropropagacije so nedvomno stroški ročnega dela, potrebnega za obvladovanje postopka, zato razvijajo načine, kot so avtomatizacija ali robotizacija, s katerimi bi potrebo po ročnem delu omejili (Bohanec in sod., 2004). Poleg tega rastline gojene na gojišču s sladkorji in v vegetativnih rastnih komorah z visoko relativno zračno vlago sprva niso sposobne pokrivati potrebe po organskih snoveh s fotosintezo in so zato bolj dovzetne za izgubo vode ob aklimatizaciji in zavirane v rasti (George in sod., 2008). Debergh in Maene (1981) sta predlagala štiri faze v procesu mikropropagacije, ki jih delimo na:

Faza 0: priprava in selekcija materinih rastlin. Pri izbiri izsečka je najbolj zaželeno dobiti sterilni delček izvorne rastline, ki naj bi zajemal del meristemskega tkiva. Velik vpliv na uspeh mikropropagacije imajo rastne razmere, zlasti vpliv odmerkov gnojenja, osvetlitve in vodnega režima. Najbolj aktivna so zagotovo mlada tkiva – nezreli embriji, apikalni meristemi, meristemi v stranskih brstih, kambijske cone v čebulicah in gomoljih. Najbolj sterilni pa so notranji deli rastlin, to so meristemi znotraj gomoljev, korenov, brsti znotraj glavic, in semena (Bohanec, 1992).

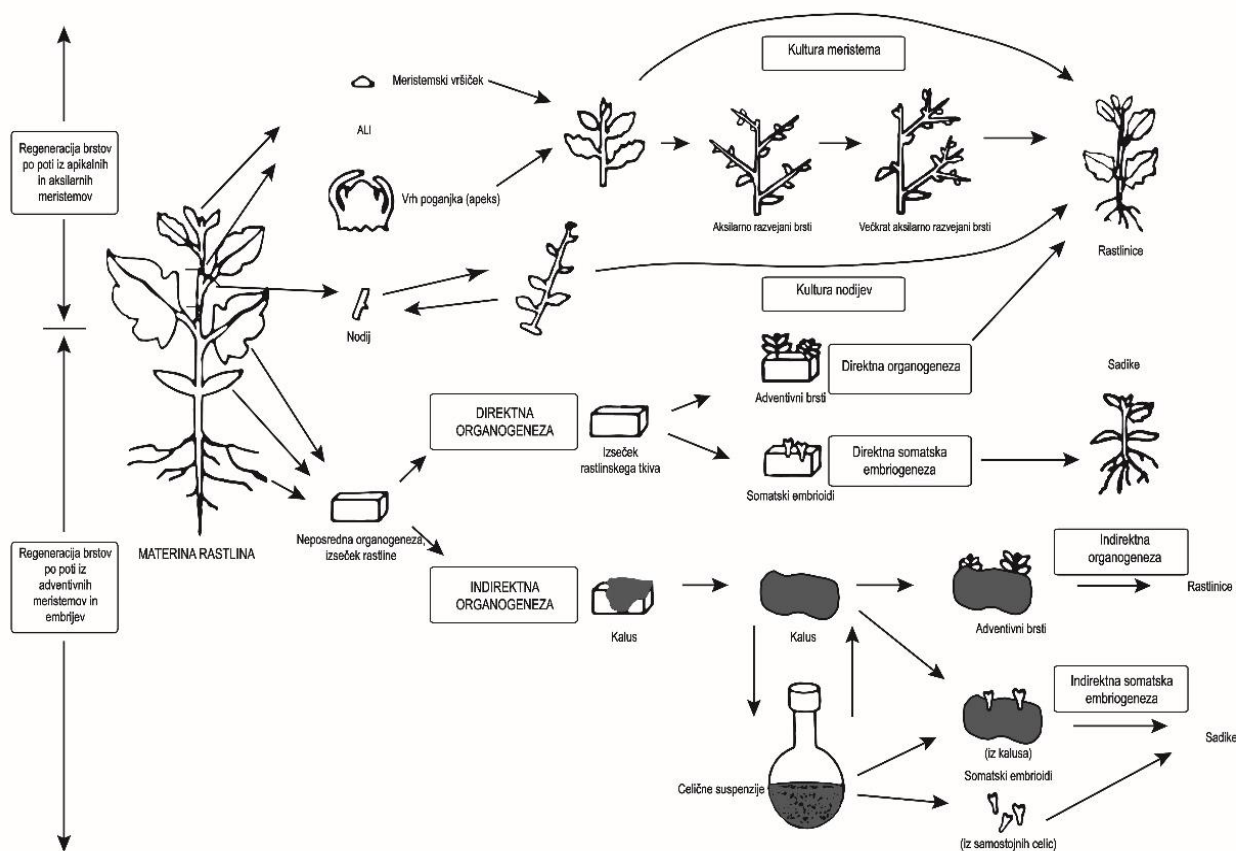
Faza 1: zagotavljanje aseptičnosti in iniciacija kulture. Keller in Senula (2013) predlagata predhodno spiranje pod tekočo vodo, da se odstranijo vsa umazana in odmrta tkiva. Naslednja faza je razkuževanje v 70 % etanolu, ki lahko močno poškoduje tkiva, prepreči pa zračne mehurčke, ki preprečuje dostop razkužila k rastlinskemu tkivu. Rastlinska tkiva se najpogosteje sterilizirajo z 12 % natrijevim hipokloritom (NaClO), ki je razredčen z deionizirano vodo v razmerju 1:4. Za boljšo omočljivost mu je dodan površinski detergent Tween 20 ali Tween 80. Endogene (notranje) okužbe z omenjenimi postopki ni mogoče odstraniti. Bakterijske in glivične okužbe lahko odstranimo tako, da s posebnimi gojiščmi preverjamo prisotnost oziroma odsotnost le teh in nadalje razmnožujemo le rastlinski material, ki na gojiščih ni kazal znakov okužb. Bakterijskim okužbam se lahko izognemo še na način, da kultiviramo meristeme ter z uporabo antibiotikov, ki pa so povečini škodljivi rastlinskemu tkivu. Roke in delovno površino si razkužujemo z alkoholom, orodje, s katerim tretiramo tkivo razkužujemo z avtoklaviranjem ali suhim sterilizatorjem, med delom pa ga razkužujemo v posebnih gorilnikih za razkuževanje. Tkiva manipuliramo v razkuženih petrijevkah ustreznega premera, kamor nalijemo gojišča, ki so lahko tekoča ali trda (strjena z agarjem, agarozo ali gelritom) (Bohanec, 1992).

Faza 2: razmnoževanje poganjkov. Ta faza zadeva izrasli inokulum, ki začne oblikovati vedno večje število poganjkov. Gojiščem dodajamo rastne regulatorje (avksine, citokinine), saj je končni cilj čim večje število poganjkov v čim krajšem času. V naslednjih ciklih lahko poganjke razmnožujemo in subkultiviramo še naprej, odvisno od vrste rastlin in rastnih razmer v *in vitro* razmerah (George in sod., 2008). Lahko pride do nezaželenega pojava hiperhidriranosti, ko *in vitro* poganjki postanejo steklasti, ta je v korelaciji s hitrostjo rasti, saj večji odmerki fitohormonov zvišujejo nevarnost omenjenega pojava, če pa so odmerki premajhni sta rast in razraščanje upočasnjena. Vzorci lahko propadejo tudi v primeru, če pride do rjavenja in odmiranja vršičkov poganjka. S tem se pospeši rast stranskih poganjkov, pri kateri se rjavenja lahko ponovijo (Bohanec, 1992).

Faza 3: podaljševanje poganjkov in koreninjenje. Poganjki in rastlinice so po fazi 2 premajhne, da bi bile sposobne samostojno rasti v zemlji. V tej fazi je potrebno rastline koreniniti na posebnih gojiščih, če že te niso pognale na gojiščih za razmnoževanje poganjkov, predvsem v zadnjem stadiju subkulture (George in sod., 2008). V nekaterih primerih se lahko zgodi, da potaknjen poganjek na gojišču za koreninjenje ne požene korenin ali pa nastane ob odrezanem mestu kalus. Ob nastanku kalusa se lahko prav tako oblikujejo korenine, ki pa nimajo direktnega stika s poganjkom, zato obstaja večja verjetnost, da sadike kasneje propadejo. V fazi 3 pripravimo rastlinice za rast v naravnem okolju, zato sta velikost poganjkov in število koreninskih laskov še kako pomembna (Bohanec, 1992).

Faza 4: aklimatizacija. Prehod iz *in vitro* heterotrofnih razmer v *ex vitro* avtotrofni način rasti mora biti izjemno previden, saj lahko rezultira v velik izpad propagiranega rastlinskega materiala. Poganjki so gojeni v razmerah z visoko zračno vlago in nizko intenziteto svetlobe, zato rastline v velikih primerih ne razvijejo epikutikularnega voska, ki omogoča delovanje listnih rež in imajo slabo razvit koreninski sistem. Mikropropagirane rastlinice ob koncu subkultiviranja niso sposobne v celoti fotosintetizirati, saj so tekom procesa preskrbljene z veliko količino saharoze ali drugim virom ogljikovih hidratov. Rastlinicam pod tekočo vodo speremo agar iz koreninic, nato pa jih prestavimo v primeren substrat, ki je lahko mešanica šote, peska, komposta in drugih sestavin (George in sod., 2008). Rastline gojimo v posebnih plastičnih kontejnerjih, ki simulirajo rastlinjak, s pokrovom iz prozorne plastike in možnostjo zračenja z odpiranjem ventilov na vrhu (Bohanec, 1992).

V postopku regeneracije brstov pri mikropropagaciji obstajata dve poti: iz apikalnih in aksilarnih meristemov ter iz adventivnih meristemov in embrijev. Brsti lahko nastanejo direktno iz inokuliranega tkiva ali pa v obliki vmesne faze kalusa (Bohanec, 1992). Iz materine rastline vzamemo meristemske vršičke iz glavnega ali stranskega poganjka, tako da dobimo kulturo poganjkov, ki jih lahko subkultiviramo neomejeno dolgo. Druga metoda regeneracije je s pomočjo neposredne organogeneze, kjer začenjamo pot iz različnih delov rastline (npr. listov, stebela, korenin). Neposredno (z direktno organogenezo) lahko nastanejo iz teh tkiv adventivni brsti ali somatski embrioidi. Posredno (z indirektno organogenezo) pa kot vmesna faza nastaja kalus, ki ga v tekočem gojišču lahko razbijemo in na ta način dobimo celične suspenzije. Iz kalusa in celičnih suspenzij pa lahko nastanejo somatski embrioidi (George in sod., 2008).



Slika 1: Glavne metode mikropropagacije (George in sod., 2008)

Začetki mikropropagacije česna sežejo v leto 1973, ko sta Havránek in Novák iz mladih listov česna pridobila kalusne kulture ter opazovala sposobnost diferenciacije brstov s pomočjo treh rastnih regulatorjev (IAA, 2,4-D in kinetin). Nekaj let kasneje je Abo El-Nil (1977) uspel pridobiti kulturo kalusa iz stebela, listnih diskov čebulice in stebelnih segmentov stroka. V vmesni fazi kalusa je odkril prisotnost filamentoznih virusov, v diferenciranih brstih in somatskih embrioidih pa ne.

2.4.2 Mikropropagacija česna s kulturo bazalnih plošč

Mikropropagacija česna pospeši vegetativno razmnoževanje in v primerjavi s klasičnim razmnoževanjem prednjači v zmožnosti proizvodnje večjega števila zdravih, brezvirusnih rastlin, ki imajo večji hektarski donos od okuženega materiala. Možen vir regeneracije poganjkov je bazalna plošča stroka, najbolje je glavice česna vzeti konec zime ali v začetku pomladi. Nekaj milimetrov nad spodnjim delom stroka se nahaja meristem, ki ga lahko izrežemo v premeru 0,5 mm ali pa bazalni notranji del stroka debeline 2 - 3 mm in dolžine 3 - 5 mm, ki vključuje bazalno ploščo in meristem ter ga inokuliramo na MS gojišče z dodanima 0,1 mg/l NAA in 0,5 mg/l 2iP. Možna je tudi regeneracija iz drugih primarnih meristemov, bazalnih delov mladega socvetja ali pa iz zračnih čebulic, ki jih tvori cvetno steblo. Prvi poganjki se pojavijo nekje med enim do dveh tednov po iniciaciji

kulture, med drugim in šestim tednom kulture je potrebno snope poganjkov previdno ločiti. Če razraščanje poganjkov v snopih ni uspešno, ga lahko izzovemo z vzdolžnim prerezom debelejših poganjkov. Vzdrževanje subkulture naj ne bi presehalo 6 - 8 tednov, kar je odvisno od genotipa česna (Keller in Senula, 2013).

Indukcijo kalusa in regeneracijo poganjkov česna se lahko izzove iz različnih delov rastlin in z različnimi kombinacijami rastnih regulatorjev. Luciani in Pellegrini (2006) sta dokazali, da je v 6 mesecih mogoče pridobiti 41 % regeneriranega kalusa iz bazalnih plošč s 0,045 μM 2,4-D in 4,43 μM BAP. Iz meristemov pa se je regeneriralo 57 % kalusa na gojišču z 0,45 μM 2,4-D. Mukhopadhyay in sod. (2005) poročajo o pozitivnem učinku 2,4-D (9,05 μM) in kinetina (0,93 μM) na rastni indeks sorte 'Rossete', saj je ta pri 180 dni starem kalusu znašal 0,758. Koch in sod. (1995) navajajo, da je izboljšano regeneracijo poganjkov iz bazalnih plošč stroka in 1 do 2 mm luskolista moč doseči iz kompaktnega kalusa, ki je bil gojen na gojišču z dodanimi 3 μM 2,4-D, 3 μM IAA in 9 μM 2iP. Število novonastalih poganjkov genotipa 'Frankon' se je povečalo za 42,5 % v 20 tednih. Za izolacijo protoplastov, s pomočjo katerih so opazovali regeneracijo celičnih sten in delitev celic, je bila uporabljena kultura kalusa. Za tvorbo kalusa so bili inokulirani bazalni deli listov kultivarja 'Moravan', premera 2-3 mm na gojišču MS z dodatkom 9,1 μM 2,4-D in 2,2 μM BAP. Po 80 dneh kulture je bilo odzivnih 71 % izsečkov, po 120 dneh pa 78 % (Fellner in Havránek, 1994). Za razvoj adventivnih brstov z iniciacijo meristemov (0,5 mm) sorte 'Howaito roppen' je bilo uporabljeno MS gojišče, obogateno z 2 mg/l BAP-a, 0,02 mg/l NAA in 3 % saharoze, uspešnost tvorbe novih brstov v 70 dneh je bila 94 % in poganjkov 73 %. Zatem so rastline predstavili na LS gojišče brez rastnih regulatorjev, kjer je bila sposobnost koreninjenja 100 % (Hasegawa in sod., 2002).

Razvoj novih poganjkov brez tvorbe kalusa iz kulture meristemov 'Ptujskega spomladanskega' česna je bil uspešno na B5 gojišču z 1 μM IAA in 1 μM BAP. Poganjki so bili nato predstavljeni na gojišče za razmnoževanje poganjkov, z dodanima 5 μM JA in 5 μM 2iP. V povprečju so dobili 6-7 poganjkov na meristem, brez vmesne faze kalusa. Meristemi, ki so bili odvzeti iz strokov tretiranih s termoterapijo so bili uspešnejši, saj se jih je v 4 tednih regeneriralo do 92 %, medtem ko so se netretirani meristemi uspeli regenerirati v 47 % (Ucman in sod., 1998).

2.4.3 Mikropropagacija česna z adventivno regeneracijo iz koreninskih vršičkov

Regeneracija iz koreninskih vršičkov oziroma koreninskega meristema ponuja možnost razvoja brezvirusnih rastlin. O učinkoviti metodi mikropropagacije z direktno regeneracijo iz koreninskih vršičkov poročajo Haque in sod. (1997), saj naj bi rastni regulatorji v štirih kombinacijah avksinov in citokininov (2,4-D + kinetin, 2,4-D + BAP, NAA + kinetin in NAA + BAP) stimulirali rast poganjkov. Multiplikacijski faktor je bil največji (75 %) v kombinaciji z 1 μM NAA in 10 μM BAP. Optimalna koncentracija avksinov je bila torej 1 μM , pri manjši koncentraciji (0,1 μM 2,4-D) njegovo delovanje ni bilo učinkovito pri razmnoževanju poganjkov, medtem ko je bilo izraščanje poganjkov pri večjih koncentracijah (5 μM 2,4-D in 10 μM NAA) onemogočeno. Kalus je bil pri koncentraciji manjši od 1 μM NAA obarvan zelene barve, pri večjih koncentracijah pa rumene barve. BAP je bil najučinkovitejši pri koncentraciji 10 μM in v kombinaciji z NAA bolj efektiven

kot kinetin (drugi vir citokininov). Če novonastali poganjki po enem mesecu od prvotne iniciacije niso bili prestavljeni na gojišča z manjšimi koncentracijami rastnih regulatorjev, so pričeli kazati znake hiperhidriranosti.

Vitrifikacija ali hiperhidriranost je degenerativni pojav z odstopajočim polnjenjem intercelularnih prostorov z vodo, ki dajejo rastlini steklast videz (Keller in Senula, 2013). Število novonastalih poganjkov je bilo večje pri tistih rastlinah, ki so bile starejše oz. nastavljene na gojišču dlje časa. Tako je bilo spremljano število novih poganjkov v časovnem obdobju treh, šestih, devetih, dvanajstih, petnajstih in osemnajstih dni od začetka brstenja. Najboljše rezultate v intenzivnosti izražanja novih poganjkov je dal časovni okvir petnajstih dni po brstenju (95 %). Rastni regulatorji imajo velik vpliv na svežo maso, število poganjkov in koreninic. BAP je signifikantno povečal svežo maso rastlinic in število poganjkov na izseček. Večje koncentracije BAP-a imajo pozitiven vpliv na število novonastalih poganjkov, vendar so ti poganjki manjši. Primerjana so bila tudi različna osnovna gojišča, MS, B5 in N6. Na MS so bili poganjki daljši in debelejši, kot tisti na B5 gojišču. Razlika med B5 in MS gojiščem je v količini nitratov, saj je ta višja pri MS, posebno amonijevega. S to metodo se je moč izogniti vmesni fazi kalusa in preprečiti tveganja somaklonske variabilnosti. V obdobju dveh mesecev jim je uspelo pridobiti 10 poganjkov na koreninski vršiček (okrog 380 poganjkov iz enega samega stroka česna) (Haque in sod., 1997).

Kim E. K. in sod. (2003) poročajo o 15 novonastalih poganjkih iz posameznega koreninskega vršička v tekočem gojišču, 13 pa v poltrdnem gojišču. Rast koreninskih vršičkov so inducirali na MS gojišču z 2 % saharoze in jih po enem tednu od začetka brstenja prestavili na gojišče za regeneracijo poganjkov (MS z dodanim 0,5 mg/l 2iP). Pomemben faktor je intenziteta osvetljenosti, pri 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ je nastalo 21 novih poganjkov, medtem ko osvetlitev večja od 50 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ni stimulirala izražanja večjega števila poganjkov ali večje sveže mase poganjkov. Optimalna temperatura je po njihovih navedbah v tekočem gojišču 25 °C. Myers in Simon (1998) poročata o 85,3 % regeneraciji poganjkov in 35,8 % regeneraciji korenin na štirimesečnem kalusu nastalem na koreninskih vršičkih. Prvotno gojišče za razvoj kalusa v 8 tednih sta obogatila z 4,5 μM 2,4-D in ga nato subkultivirala še v naslednjih osmih tednih na gojišču, kateremu sta dodala 4,7 μM pikloram in 0,49 μM 2iP. Kalus je bil prestavljen za mesec dni v tekoče gojišče osnovanem na B5 gojišču in dodanima regulatorjema: 4,5 μM 2,4-D in 24,49 μM L-triptofanom. Končno napredovanje kalusa sta spremljala 14 tednov na trdnem gojišču z dodanim 1,4 μM pikloramom in 13,3 μM BAP-om.

Za indukcijo koreninskih vršičkov so bili 1 cm veliki izsečki stroka vzgojeni na MS gojišču. Po 4 tednih so bili ti prestavljeni na gojišče za indukcijo kalusa (MS bazalno gojišče z 4,5 μM 2,4-D, 0,5 μM 2iP in 0,2 g/l kazein hidrolizata) in shranjeni dva meseca v temi na 27±2 °C. Kalus je bil nato prenesen na MS gojišče z 8,8 μM BAP in 0,1 μM NAA, po petih mesecih kulture je sorta 'Jonas' regenerirala 84 % kalusa (Scotton in sod., 2013). Haque in sod. (2003) je na gojišču za regeneracijo koreninskih vršičkov (0,7 % agar) uspelo vzpodbuditi razrast 40 koreninic na strok česna japonske sorte 'White roppen' v 15 do 20 dneh od začetka brstenja. Največje število poganjkov (7,4) so dobili na MS gojišču z dodatkom 0,8 % manitola. Število novonastalih poganjkov je bilo izračunano na podlagi 40 pridobljenih koreninskih vršičkov na strok, ki se je gibalo med 200 in 296 v dveh mesecih.

2.4.4 Razmnoževanje poganjkov

Na sposobnost razmnoževanja poganjkov vpliva sestava osnovnega gojišča (MS, BDS, BLM), z različnim razmerjem nitrata in amonija ($\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$), v kombinaciji z različnimi rastnimi fitohormoni (NAA in BAP) in dodanimi ogljikovimi hidrati. Do razlik v multiplikacijski stopnji pride med različnimi genotipi (kloni, subkulturami posameznih klonov). Luciani in sod. (2001) poročajo o 70-100 % stopnji preživetja klonov Español Selección Ascasubi (ESA), Español Selección Médanos (ESM) in I 50, bodisi zaradi propada poganjkov, bodisi zaradi nezmožnosti razmnoževanja le teh. Ne glede na osnovno gojišče, so najboljše multiplikacijske rezultate dali rastlinski hormoni v največjih koncentracijah (5 μM NAA in 10 μM BAP). Ob koncu tretje subkulture (135 dni po iniciaciji) je na MS gojišču z omenjenima koncentracijama NAA in BAP nastalo 7 poganjkov na izseček, na BLM gojišču 14 novih regeneriranih poganjkov, druga subkultura (90 dni od začetka kulture) pa je na BDS gojišču pognala 9 poganjkov. Povprečna števila poganjkov na MS gojišču za tri različne klone so bila 27, 78 in 77, na BDS gojišču 48, 306 in 157 poganjkov na izseček, medtem ko je na BLM gojišču v 140 dneh zraslo povprečno 140 (ESA), 542 (ESM) in 743 (I 50) poganjkov. Glavna razlika med gojiščema BDS in BLM je v koncentraciji nitrata, ki je v BLM večja in na ta način spodbuja rast regeneriranih poganjkov (Luciani in sod., 2001). Ucman in sod. (1998) so za namnožitev poganjkov na sorti 'Ptujski spomladanski' uporabili osnovno B5 gojišče z dodatkom 5 μM JA in 5 μM 2iP (A) ali z 5 μM NAA in 10 μM BAP (B). Po treh tednih kulture se je namnožilo veliko število poganjkov, v primeru A so v povprečju dobili 3,2 poganjka, iz gojišča B pa 4,1. Po 6 tednih se je število novonastalih poganjkov podvojilo, iz B gojišča so dobili 9,3 poganjke na izseček. V povprečju so dobili od 6 do 7 poganjkov na meristem, brez tvorbe kalusa.

Seabrookovi (1994) je na MS gojišču z dodanima 0,1 mg/l NAA in 2 mg/l BAP uspelo za pet različnih genotipov namnožiti 6,1 ('Block'), 9,5 ('Chets'), 7,1 ('Shaw'), 8 ('#72') in 7,2 ('Elephant') poganjkov na bazalno ploščo. Roksana et al. (2002) poročajo o nastanku $9,8 \pm 1,2$ poganjkov na izoliran vršiček poganjka v 21 dneh. Rast so spodbudili na tekočem in poltrdem MS gojišču z dodanima 0,5 mg/l 2iP in 0,25 mg/l NAA.

2.4.5 Tvorba čebulic *in vitro*

Razvoj čebulic iz poganjkov v *in vitro* razmerah lahko prispeva k uspešnejši aklimatizaciji v *ex vitro* razmerah, poleg tega pa imajo rastlinice v bodoče boljše skladiščne sposobnosti. Večja koncentracija saharoze v MS gojišču prispeva k povečani tvorbi čebulic in stimulira razvoj založnih organov. Najbolj zaželen rezultat je tvorba mnogoterih čebulic iz enega samega izsečka rastline (snopu poganjkov). Optimalna koncentracija saharoze, ki vpliva na pospešeno tvorjenje čebulic je po Kim E. K. in sod. (2003) 11 %. Pomemben aspekt pri tvorbi čebulic je tudi uporaba jasmonske kisline, saj je pri koncentraciji 10 μM po 9 tednih kulture vplivala na razvoj 135 čebulic na izseček. Razvoj čebulic v tekočih gojiščih je lahko posledica inhibicije rasti poganjkov in listov. Pospeševalci, kot so CCC, ABA in B-9 različno vplivajo na oblikovanje in rast česnovih čebulic. CCC v koncentraciji 100 mg/l je izzval 63 čebulic na izseček, medtem ko sta ABA v koncentraciji 0,1 mg/l in B-9 v koncentraciji 50 mg/l vplivala na razvoj 33 in 43 čebulic po izsečku. Indukcija in rast

čebulic kultivarja 'Danyang' sta bila primerjana v popolni temi v enem primeru in v razmerah s 16 urno fotoperiodo v drugem primeru. Več čebulic se je tvorilo v razmerah teme, in sicer 29 čebulic na izseček, v razmerah 16 urne fotoperiode pa je nastalo 18 čebulic na izseček (Kim E. K. in sod., 2003).

Tvorbo čebulic česna pri sorti 'Ptujski spomladanski' je spodbudilo gojišče s 5 μM JA in 5 μM 2iP po 6 do 10 tednih. Stimulativni učinek JA na razvoj skladiščnih organov pri česnu brez termoterapije je bil od 17 do 49 %, medtem ko se je v primeru termoterapije razvilo od 67% do 88 % čebulic (Ucman in sod., 1998). O veliki stopnji *in vitro* tvorbe čebulic korejskega 'Euisung' iz segmentov česnovih listov (96 %) poročajo Kim S. in sod. (2003). Po dveh mesecih kulture so izsečke prestavili na MS gojišče z dodano JA, v koncentraciji 2 mg/l in 120 g saharoze na liter gojišča. Do intenzivne tvorbe čebulic je prišlo na gojiščih BDS in BLM z dodatkom 0,5 μM NAA in 1 μM BAP ter na gojišču MS z dodanima 5 μM NAA in 1 μM BAP (Luciani in sod., 2001). Seabrook (1994) navaja sposobnost oblikovanja čebulic na gojišču z manjšo koncentracijo makro in mikroelementov. Saharozna je bila nadomeščena z glukozo in manitolom, ki sta v kombinaciji z nižjo koncentracijo soli inducirala razvoj čebulic. Povprečno število nastalih čebulic na 50 poganjkov je variiralo odvisno od kultivarja, 62 ('Chets'), 44 ('Elephant'), 43 ('#72'), 26 ('Shaw') in 9 ('Block'). Nagakubo in sod. (1999) so z metodo meristemov 'Howaito-roppen' česna na gojišču LS z dodanima 1 μM IAA in 1 μM BAP namnožili 85 % poganjkov in 104 čebulice (v petih ciklikih) na gojišču LS modificiranim z 56,5 mM KNO_3 in 3,5 mM NH_4Cl ter 5 μM NAA in 10 μM BAP.

Vpliv saharoze, jasmonske kisline in teme na nastanek čebulic pri 'Ptujskem jesenskem' so proučevali Žel in sod. (1997). Za štiritredensko razmnoževanje poganjkov (brez kalusa) iz bazalnih plošč so uporabili B5 osnovno gojišče z dodanimi, 3 % saharozo, 5 μM JA in 5 μM 2iP. Sledila so gojišča za tvorbo čebulic z različnimi koncentracijami saharoze in z 5 μM JA ali brez nje. Najbolje se je obneslo gojišče z 8 % saharozo, saj se je v 12 tednih iz 86 do 90 % poganjkov uspelo oblikovati čebulice, pri 8 % saharozi in 5 μM JA je bilo povprečno število čebulic na bazalno ploščo 11,5. Veliko število poganjkov po 4 tednih kulture ni nujno rezultiralo v velikem številu čebulic. Po 8 in 12 tednih kulture so proučevali vpliv svetlobe (16 urna fotoperioda) in teme na nastanek čebulic in ugotovili, da višja stopnja saharoze na nek način kompenzira odsotnost svetlobe.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Avtohtoni sorti česna (*Allium sativum* L.) 'Ptujski jesenski' in 'Ptujski spomladanski' je donirala Semenarna Ljubljana iz Selekcijsko-poskusnega centra na Ptuju. V poskusih smo uporabljali njihov izbran semenski material. Česen smo dobili konec novembra 2013 in ga od začetka (december 2013) do konca (junij 2014) poskusov hranili na sobni temperaturi laboratorija Katedre za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin. 'Ptujski jesenski' (PJ) je bil zastopan z 10 kloni, za vsak klon so bile na razpolago štiri glave, torej skupno 40 glav sorte PJ. Pri 'Ptujskem spomladanskem' (PS) je bilo zastopanih 9 klonov, prav tako za vsak klon 4 glave, z izjemo enega klona PS, kjer so bile prisotne 3 glave, torej skupno 35 glav sorte PS.

3.1.1 'Ptujski jesenski'

Allium sativum L. 'Ptujski jesenski' je sorta česna, ki se ga sadi jeseni (v začetku novembra) in se ga pobira že konec junija, z namenom sprotne uporabe. Glave tehtajo od 30 do 50 g in so sestavljene iz 10 do 15 strokov (Černe in Jakić, 1988). Sorta se uspešno skladišči samo do konca novembra, torej ne več kot štiri mesece (Pušenjak, 2013).

3.1.2 'Ptujski spomladanski'

Allium sativum L. 'Ptujski spomladanski' je sorta česna, ki se ga sadi jeseni (oktobra ali novembra) in spomladi (februarja in marca), pobira pa pozno poleti. Glave tehtajo od 20 do 30 g in razvijejo 15 do 20 strokov, včasih tudi več strokov (Černe in Jakić, 1988). Odlikuje ga izredna skladiščna sposobnost, do osem mesecev (Pušenjak, 2013).

3.2 RAZKUŽEVANJE MATERIALA

3.2.1 Razkuževanje rastlinskega materiala

Čebulam česna smo najprej odstranili ovojne liste in jih razdelili na posamezne stroke. Stroke česna smo sterilizirali s polminutnim do enominutnim namakanjem v 70 % raztopini etanola. Sledilo je 20 minutno razkuževanje v sterilnih 0,5 litrskih čašah na magnetnem mešalu, v 1,67 % raztopini Na-dikloroizocianurne kisline (DICA) (Sigma), kateri smo dodali 10 kapljic detergenta Tween 20 (Sigma) na liter bidestilirane vode (ddH₂O) (Millipore sistem). Sredstvu za razkužilo smo dodali sredstvo za omočilo z razlogom zmanjšanja površinske napetosti, ki bi lahko zmanjšala učinkovitost razkuževanja. Zatem smo stroke za eno uro potopili v ddH₂O z dodatkom nanosliverja (Aldrich), v koncentraciji 100 mg/l. Po vsakem izmed naštetih postopkov smo stroke dvakrat do trikrat polminutno izpirali v predhodno avtoklavirani ddH₂O, s pomočjo steriliziranih cedil in čaš.

3.2.2 Sterilizacija orodja

Za zagotavljanje aseptičnih pogojev dela smo pincete in skalpele sterilizirali s pregrevanjem v visokotemperaturnem grelcu, ki se je nahajal v brezprašni komori, katero smo predhodno razkužili s 70 % raztopino etanola.

3.2.3 Sterilizacija ddH₂O, cedil, gojišč, pladnjev, čaš

Za sterilizacijo (ddH₂O in gojišča) in pribora (kovinska cedila, čaše, papirnati pladnji) smo uporabili 15 minutno avtoklaviranje v avtoklavu Zirbus E75, pri 121 °C in nadtlaku 1,13 bar.

3.3 GOJIŠČA

3.3.1 Rastlinski rastni regulatorji

V poskusih so bili uporabljeni naslednji rastlinski rastni regulatorji:

AVKSINI: NAA – α -naftalenocetna kislina (Sigma)

CITOKININI: BAP – 6-benzilaminopurin (Sigma) in 2iP – N⁶-(2-izopentenil) adenin (Sigma)

JASMONATI: JA – jasmonska kislina (Duchefa Biochemie)

Rastlinski rastni regulatorji so bili pripravljene v različnih založnih raztopinah in uporabljeni v različnih koncentracijah in kombinacijah. Rastna regulatorja NAA in 2iP sta topna v kalijevem hidroksidu (1 N KOH) in sta bila hranjena v obliki praška v hladilniku na 4 °C. BAP se prav tako nahaja v obliki praška in je hranjen na 4 °C, topen je v klorovodikovi kislini (HCl). Jasmonska kislina v obliki tekočine (115 mM, Duchefa Biochemie) je bila shranjena v hladilniku na 4 °C, za pripravo založne raztopine le te smo jo morali raztopiti v 100 % etanolu (Merck Millipore). Avksine in citokinine smo uporabili pri poskusih za adventivno regeneracijo iz koreninskih vršičkov, rast poganjkov iz bazalnih plošč in razmnoževanje poganjkov. Jasmonsko kislino pa smo dodali v gojišče za tvorbo čebulic.

3.3.2 Osnovno gojišče

Kot osnovo za pripravo gojišč za adventivno regeneracijo koreninskih vršičkov, za rast poganjkov iz bazalne plošče, za dve gojišči za razmnoževanje poganjkov ter za gojišče za tvorbo čebulic smo uporabljali Murashige in Skoog (MS) osnovno gojišče z vitamini (Murashige in Skoog., 1962) (preglednica 4). Za drugi dve gojišči za razmnoževanje poganjkov pa smo uporabili BDS osnovno gojišče z vitamini (Dunstan in Short, 1977) (preglednica 5).

Preglednica 4: Sestava MS osnovnega gojišča z vitamini (Duchefa Biochemie, 2015c)

| | Masna koncentracija mg/l | Množinska koncentracija µM | |
|----------------------------|---|----------------------------|--------|
| Mikroelementi | CoCl ₂ *6H ₂ O | 0,025 | 0,11 |
| | CuSO ₄ *5H ₂ O | 0,025 | 0,10 |
| | FeNa EDTA | 36,70 | 100,00 |
| | H ₃ BO ₃ | 6,20 | 100,27 |
| | KI | 0,83 | 5,00 |
| | MnSO ₄ *H ₂ O | 16,90 | 100,00 |
| | Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O | 0,25 | 1,03 |
| | ZnSO ₄ *7H ₂ O | 8,60 | 29,91 |
| Makro- elementi | CaCl ₂ | 332,02 | 2,99 |
| | KH ₂ PO ₄ | 170,00 | 1,25 |
| | KNO ₃ | 1900,00 | 18,79 |
| | MgSO ₄ | 180,54 | 1,50 |
| | NH ₄ NO ₃ | 1650,00 | 20,61 |
| Vitamini | Glicin | 2,00 | 26,64 |
| | Mioinozitol | 100,00 | 554,94 |
| | Nikotinska kislina | 0,50 | 4,06 |
| | Piridoksin HCl | 0,50 | 2,43 |
| | Tiamin HCl | 0,10 | 0,30 |

Preglednica 5: Sestava BDS osnovnega gojišča z vitamini (Duchefa Biochemie, 2015a)

| | Masna koncentracija mg/l | |
|-----------------------|---|-------|
| Mikroelementi | MnSO ₄ *4H ₂ O | 13,2 |
| | ZnSO ₄ *7H ₂ O | 2,0 |
| | KJ | 0,75 |
| | H ₃ BO ₃ | 3,0 |
| | KJ | 0,83 |
| | CuSO ₄ *5H ₂ O | 0,039 |
| | Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O | 0,25 |
| | CoCl ₂ *6H ₂ O | 0,025 |
| Vir železa | Na ₂ EDTA *2H ₂ O | 37,25 |
| | FeSO ₄ *7H ₂ O | 27,85 |
| Makroelementi | CaCl ₂ *2H ₂ O | 150 |
| | NH ₄ H ₂ PO ₄ | 230 |
| | KNO ₃ | 2530 |
| | MgSO ₄ *7H ₂ O | 247 |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 134 |
| | NH ₄ NO ₃ | 320 |
| | NaH ₂ PO ₄ *2H ₂ O | 172 |
| Vitamini | Nikotinska kislina | 1 |
| | Piridoksin Hcl | 1 |
| | Tiamin HCl | 10 |
| | Mioinozitol | 100 |

3.3.3 Postopek priprave gojišč

Gojišča smo pripravili tako, da smo v čašo najprej zatehtali osnovno gojišče (PDA, LB, MS, BLM), saharozo in jih prelili z bidestilirano vodo. Sestavine smo raztopili z mešanjem na magnetnem mešalu s pomočjo teflonskega magneta. Nato smo odpipetirali še hormone iz založnih raztopin in dodali še ostale sestavine (nanosilver, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Ko je postala mešanica homogena, smo končni volumen gojišč določili v merilni bučki z dodajanjem bidestilirane vode do oznake, ter raztopino spet prelili nazaj v čašo, da smo umerili pH vrednost. Z dodajanjem 1 N NaOH smo pH vrednost zvišali, z 1 N HCl pa znižali s stalnim mešanjem na magnetnem mešalu. Ko smo pH umerili, smo zatehtali še potrebno količino agarja in ga dodali raztopini. Raztopino smo prelili v graduirane laboratorijske Schott steklenice in jih zaprli s plastičnimi pokrovi. Gojišča smo sterilizirali v avtoklavu 20 minut pri 121 °C in nadtlaku 1,13 bar. Po končanem avtoklaviranju smo počakali, da se gojišča nekoliko ohladijo in jih nato v brezprašni komori razlili v sterilizirane plastične posodice, petrijevke ali epruvete. Da smo dosegli še večjo aseptičnost, smo posodice, petrijevke in epruvete pokrili s prilegajočimi pokrovčki in počakali, da so se gojišča strdila.

3.4 PREVERJANJE ENDOGENIH OKUŽB

Za odkrivanje okuženosti semenskega materiala smo uporabili dve gojišči: krompirjev dekstrozni agar (ang. potato dextrose agar, PDA, preglednica 6), ki se uporablja za gojenje gliv ter Luria-Bertani (ali Lysogeny broth, LB, preglednica 7) gojišče, ki se uporablja za gojenje bakterij. Po en strok vsake glave smo sterilizirali po postopku sterilizacije, opisanem v poglavju 3.2.1, nato pa smo vsak strok prerezali na polovico in eno polovico inokulirali na gojišče PDA, drugo pa na gojišče LB. Inokulirane polovice strokov smo gojili v rastnih komorah na 24 ± 1 °C in 16 urni fotoperiodi. Kulture s stroki smo po enem tednu pregledali za prisotnost okužb in si zabeležili v katerih glavah so prisotne endogene okužbe. V nadaljnje poskuse smo vključili vse neokužene glave in tudi nekatere okužene, v primerih ko na razpolago ni bilo več neokuženega rastlinskega materiala.

Preglednica 6: Sestava komercialnega pripravka za gojišče PDA (Biolife Italiana, 2015)

| Sestavine | Koncentracija (g/l) |
|---------------------|---------------------|
| Krompirjev ekstrakt | 5 |
| Dekstroza | 20 |
| Agar | 17 |

Preglednica 7: Sestava komercialnega pripravka za gojišče LB (Duchefa Biochemie, 2015b)

| Sestavine | Koncentracija (g/l) |
|-----------------|---------------------|
| Tripton | 10 |
| NaCl | 10 |
| Kvasni ekstrakt | 5 |

Gojišču smo prilagodili pH na 7.

3.5 POSKUS ADVENTIVNE REGENERACIJE IZ KORENINSKIH VRŠIČKOV

Stroke smo sterilizirali kakor je že opisano v poglavju 3.2.1 in jih inokulirali na gojišče za koreninjenje, ki je bilo sestavljeno iz bidestilirane vode in 8 g/l agarja (in 10 mg/l nanosilverja, v primeru okuženega rastlinskega materiala), ter jih gojili v rastnih komorah pri 24 ± 1 °C in 16 urni fotoperiodi. Po dveh tednih, ko so iz strokov pognale koreninice z zadovoljivo dolžino, smo odrezali koreninske vršičke, dolžin 0,3-0,5 cm ter jih inokulirali na gojišče za adventivno regeneracijo iz koreninskih vršičkov (ČKV, preglednica 8). Inokulirane koreninske vršičke smo gojili v rastnih komorah pri 24 ± 1 °C in 16 urni fotoperiodi. V naslednjih tridesetih dneh smo pregledovali petrijevke in spremljali morebiten pojav adventivnih poganjkov.

Preglednica 8: Gojišče za adventivno regeneracijo iz koreninskih vršičkov (ČKV)

| Sestavine | Koncentracija |
|--|---------------|
| MS osnovno gojišče z vitamini (Duchefa) (mg/l) | 4.405,2 |
| NAA (mg/l) | 0,2 |
| BAP (mg/l) | 2,0 |
| Saharoza (%) | 3,0 |
| Agar (%) | 0,8 |

Gojišču smo pH prilagodili na 5,8.

Za pripravo ČKV gojišča po Haque et al. (1997) smo v bidestilirani vodi raztopili komercialni pripravek MS osnovno gojišče z vitamini, dodali smo saharozo, da je bila končna koncentracija 3 %. Iz založne raztopine NAA 20 mg/100 ml smo odpipetirali 1 ml na liter gojišča (1 μ M) ter iz založne raztopine BAP 1 g/l, 2 ml na liter gojišča (10 μ M). Nastali raztopini smo z NaOH priredili pH na 5,8, dodali 8 g/l agarja in sterilizirali z avtoklaviranjem.

3.6 POSKUS RASTI POGANJKOV IZ BAZALNIH PLOŠČ

Za pripravo gojišča za rast poganjkov iz bazalnih plošč strokov smo v bidestilirani vodi raztopili MS osnovno gojišče z vitamini in dodali saharozo do končne koncentracije 3 %. Iz založne raztopine NAA s koncentracijo 20 mg/100 ml smo odpipetirali 500 μ l na liter gojišča in iz založne raztopine 2iP (s koncentracijo 50 mg/100 ml) smo odpipetirali 1 ml na liter gojišča. Z NaOH smo raztopini priredili pH na 5,8 in nato dodali agar v koncentraciji 0,8 %. V primeru sorte 'Ptujski jesenski' smo v gojišče dodali še nanosilver (Aldrich), v koncentraciji 10 mg/l. Pripravljena gojišča smo v petrijevkah (Sterilin®) do uporabe shranjevali v hladilniku pri 4 °C v sterilni embalaži. Po sterilizaciji strokov česna, smo le te pri bazalnem delu narezali na kocke, debeline 2-3 mm in dolžine 3-5 mm. V primeru večjih strokov, smo bazalno ploščo razrezali na več delov, pri manjših strokih pa je bazalna plošča zajemala le eno kocko, da smo dobili željeno dimenzijo. Nato smo dele bazalnih plošč inokulirali v petrijevke z gojiščem za regeneracijo poganjkov iz bazalnih plošč (ČBP, preglednica 9) ter jih gojili v rastnih komorah pri 20-25 °C in 16 urni fotoperiodi. Postopek regeneracije poganjkov iz delov bazalnih plošč smo prevzeli od Keller in Senula (2013).

Preglednica 9: Gojišče za rast poganjkov iz delov bazalnih plošč (ČBP)

| Sestavine | Koncentracija |
|--|---------------|
| MS osnovno gojišče z vitamini (Duchefa) (mg/l) | 4.405,2 |
| NAA (Sigma) (mg/l) | 0,1 |
| 2iP (Sigma) (mg/l) | 0,5 |
| Saharoza (%) | 3,0 |
| Agar (Duchefa) (%) | 0,8 |

Gojišču smo pH prilagodili na 5,8.

Na gojišče ČBP smo inokulirali dele bazalnih plošč v 4 terminih, 5 klonov oziroma 8 glav 'Ptujskega spomladanskega' ter 25 glav, pripadajočim 7 klonom 'Ptujskega jesenskega'. Skupno smo inokulirali 121 strokov PS in 84 strokov PJ (preglednica 10).

Preglednica 10: Inicijacija delov bazalnih plošč klonov in število glavic 'Ptujskega spomladanskega' in 'Ptujskega jesenskega' na ČBP gojišču

| Sorta | Kloni | Število glav | Število strokov |
|-------|--|--------------|-----------------|
| PS | 10-193, 10-221, 10-243, 10-166, 10-191 | 8 | 121 |
| PJ | 10-145, 10-50, 10-300, 10-296, 10-119, 10-101, 10-263 | 25 | 84 |

Po iniciaciji delov bazalnih plošč v petrijevkah, smo po 35 dneh regenerirane poganjke prestavili v plastične epruvete, z 8 ml svežega ČBP gojišča (subkultiviranje). Po petih tednih smo prešteli število poganjkov v plastičnih epruvetah.

Po 9 do 10 tednih smo ponovno prešteli število poganjkov, regenerirane poganjke pa smo nato uporabili v nadaljnjih poskusih za razmnoževanje poganjkov (poglavje 3.7) in tvorbo čebulic (poglavje 3.8).

3.7 POSKUS RAZMNOŽEVANJA POGANJKOV

Po devetih ali desetih tednih v kulturi ČBP, smo poganjke prestavili na štiri različna gojišča za razmnoževanje poganjkov. Ob tem smo spremljali vpliv dveh različnih osnovnih gojišč ter dodatka različnih koncentracij avksinov in citokininov na sposobnost razmnoževanja poganjkov. Poleg MS osnovnega gojišča smo preizkušali še BLM gojišče po Luciani et al. (2001), ki je sestavljeno iz BDS osnovnega gojišča z dodanim 1 g/l kalcijevim nitratom, v kombinaciji z avksinom NAA, v koncentraciji 0,5 ali 5 μ M ter citokininom BAP, v koncentraciji 1 ali 10 μ M (preglednica 11). Plastične epruvete v katere smo prestavljali poganjke, smo nato inkubirali v rastnih komorah na 16 urni fotoperiodi, pri 25 ± 2 °C.

Preglednica 11: Različne vrste gojišč za razmnoževanje poganjkov (ČRP)

| Sestavine | ČRP1 | ČRP2 | ČRP3 | ČRP4 |
|---|---------|---------|---------|---------|
| MS z vitamini (Duchefa) (mg/l) | 4405,19 | 4405,19 | / | / |
| BDS z vitamini (Duchefa) (mg/l) | / | / | 3567,59 | 3567,59 |
| Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O (Kemika) (g/l) | / | / | 1 | 1 |
| NAA (Sigma) (mg/l) | 0,1 | 1 | 0,1 | 1 |
| BAP (Sigma) (mg/l) | 0,225 | 2,25 | 0,225 | 2,25 |
| Saharoza (g/l) | 30 | 30 | 30 | 30 |
| Agar (Duchefa) (g/l) | 8 | 8 | 8 | 8 |

pH gojišč je bil prilagojen na 5,8.

Novonastale poganjke na ČRP gojiščih smo enkrat subkultivirali in jih seštelili in nazadnje podali njihovo končno število. Ker je bilo delo časovno zahtevno, je bil poskus razmnoževanja poganjkov izveden v razmiku nekaj dni. Poganjke PS smo gojili na ČRP gojiščih 150 dni, medtem ko smo poganjke PJ gojili na ČRP gojiščih 153 dni. Po koncu gojenja v tkivni kulturi smo poganjke aklimatizirali (poglavje 3.9).

3.8 POSKUS TVORBE ČEBULIC

V tem poskusu smo opazovali vpliv povišane koncentracije saharoze in dodajanja jasmanske kisline na tvorbo in debeljenje čebulic česna PS *in vitro*. Trdna gojišča so bila ponovno osnovana na podlagi mešanice makro- in mikroelementov po Murashige in Skoog-u (1962). Uporabljena je bila komercialna mešanica MS osnovnega gojišča z vitamini, kateremu smo dodali 80 g saharoze ter 8 g agarja na liter gojišča. Enemu gojišču (t.j. gojišču TČ2) smo dodali jasmansko kislino v koncentraciji 5 µM, gojišče TČ1 pa je bilo brez jasmanske kisline in služilo za primerjavo (preglednica 12). Plastične epruvete s kulturami so bile dane v rastno komoro za 5-6 tednov, na temperaturo 23±2 °C in 16 urno fotoperiodo. Po 40 - 42 dneh smo spremljali sposobnost tvorbe koreninic in čebulic.

Preglednica 12: Gojišči za tvorjenje čebulic česna

| Sestavine | TČ1 | TČ2 |
|--|--------|--------|
| MS osnovno gojišče z vitamini (Duchefa) (mg/l) | 4405,2 | 4405,2 |
| Saharoza (Duchefa) (g/l) | 80,0 | 80,0 |
| Agar (g/l) | 8,0 | 8,0 |
| Jasmanska kislina (Duchefa) (µl/l) | / | 43,5 |

Gojiščema smo pH priredili na 5,8.

Preglednica 13: Prenos poganjkov s ČBP gojišča na gojišče za tvorjenje čebulic, aklimatizacija in prenos v lončke 'Ptujskega spomladanskega'

| | Datum | Kloni | Število glav | Število strokov | Gojišče |
|---------------------|-------------|-----------|--------------|-----------------|---------|
| Prenos iz ČBP na TČ | 30. 4. 2014 | | | | |
| Aklimatizacija | 9. 6. 2014 | PS 10-221 | 2 | 7 | TČ1 |
| Prenos v lončke | 23. 7. 2014 | | | | |
| Prenos iz ČBP na TČ | 9. 5. 2014 | | | | |
| Aklimatizacija | 20. 6. 2014 | PS 10-221 | 1 | 4 | TČ2 |
| Prenos v lončke | 23. 7. 2014 | | | | |

3.9 AKLIMATIZACIJA POGANJKOV

Prenos rastlinic v *in vivo* pogoje smo izvedli po poskusu za tvorjenje čebulic. Po 40-42 dneh na TČ gojišču smo poganjke posadili v plastične mini rastlinjake s šotno mešanico (preglednica 13). Rastlinjak je bil sestavljen iz pladnja, pokritega s pokrovom iz prozorne plastike in možnostjo zračenja z odpiranjem drsnika na vrhu ali odpiranjem pokrova. Plastični rastlinjaki so bili postavljeni v aklimatiziran prostor brez direktne sončne svetlobe. V tej fazi smo rastlinice navajali na ponoven avtotrofen način življenja. Spremljali smo število rastlinic, ki so preživele aklimatizacijo in določili odstotek preživetja.

3.10 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Analizo smo naredili posebej za 'Ptujski jesenski' in 'Ptujski spomladanski', zaradi velikih razlik v številu regeneriranih poganjkov med tema dvema sortama. Rezultate poskusa smo obdelali z regresijsko analizo, kjer smo primerjali odvisnosti skupnega števila poganjkov na strok od števila delov bazalne plošče stroka in od klona. Z neparametrično Kruskal-Wallisovo analizo variance in nadaljnji testi mnogoterih primerjav smo primerjali porazdelitve števila poganjkov pri štirih različnih gojiščih. Podatke analiz smo statistično obdelali v programskem okolju R z grafičnim vmesnikom R Commander (R Core Team, 2015).

4 REZULTATI

4.1 RASTLINSKI MATERIAL

Zabeležili smo povprečne mase glav in povprečno število strokov na glavo izbranih klonov sort 'Ptujski jesenski' in 'Ptujski spomladanski'. Stehtali smo 4 glave na klon, razen v primeru klona PS 10-243 tri glave. Strokov nismo prešteli pri klonih PS 10-307 in PS 10-243, saj jih nismo uporabili v poskusih mikropropagacije. Iz preglednice 14 je razvidno, da je razlika v povprečni masi glav in številu strokov na glavo med sortama očitna. Povprečna masa glave PJ je bila $58,77 \pm 1,54$ g, PS pa $48,75 \pm 1,48$ g. Povprečno število strokov na glavo pri PJ je znašalo $6,0 \pm 1,2$ stroka, pri PS pa $13,0 \pm 2,6$ stroka na glavo. Klon PS 10-166 je imel v povprečju največje število strokov, 19, glava pa je tehtala $54,9 \pm 1,6$ g.

Preglednica 14: Povprečna masa glav in strokov stehanih za posamezen klon česna PJ in PS s standardnim odklonom

| Klon | Povprečna masa glav (g) | Povprečno število strokov na glavo |
|-----------|-------------------------|------------------------------------|
| PJ 10-119 | $61,5 \pm 4,2$ | 4,25 |
| PJ 10-300 | $61,7 \pm 7,2$ | 5,00 |
| PJ 10-296 | $66,2 \pm 11,1$ | 6,75 |
| PJ 10-101 | $57,3 \pm 2,6$ | 7,75 |
| PJ 10-263 | $53,3 \pm 8,1$ | 7,75 |
| PJ 10-87 | $52,8 \pm 5,6$ | 7,25 |
| PJ 10-220 | $58,0 \pm 5,5$ | 5,25 |
| PJ 10-145 | $57,3 \pm 11,2$ | 4,50 |
| PJ 10-50 | $54,9 \pm 7,5$ | 5,25 |
| PJ 10-37 | $58,8 \pm 10,0$ | 4,50 |
| PS 10-261 | $52,1 \pm 1,5$ | 11,75 |
| PS 10-193 | $52,1 \pm 1,5$ | 15,25 |
| PS 10-191 | $56,2 \pm 6,1$ | 16,50 |
| PS 10-307 | $50,0 \pm 7,0$ | / |
| PS 10-166 | $54,9 \pm 6,2$ | 19,00 |
| PS 10-221 | $42,1 \pm 4,9$ | 15,33 |
| PS 10-229 | $50,7 \pm 3,5$ | 14,50 |
| PS 10-243 | $43,8 \pm 0,1$ | / |
| PS 10-218 | $35,5 \pm 4,1$ | 17,50 |

4.2 ENDOGENE OKUŽBE

Okužbe so se začele kazati že po nekaj dnevnem testiranju v rastnih komorah. PJ se je izkazal za bolj okuženega kot PS. Od 40 glav PJ sta bili neokuženi samo po ena glava klona PJ 10-101 in ena glava klona PJ 10-263, ter glava klona PJ 10-296 samo na gojišču za preverjanje glivičnih okužb (PDA) (preglednici 15 in 16).

Preglednica 15: Preliminarni test okužbe glav 'Ptujskega jesenskega' na gojišču PDA in LB

| Klon | PDA | | LB | |
|-----------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| | Št. neokuženih glav | Št. okuženih glav | Št. neokuženih glav | Št. okuženih glav |
| PJ 10-119 | 0 | 4 | 0 | 4 |
| PJ 10-300 | 0 | 4 | 0 | 4 |
| PJ 10-296 | 1 | 3 | 0 | 4 |
| PJ 10-101 | 1 | 3 | 1 | 3 |
| PJ 10-263 | 1 | 3 | 1 | 3 |
| PJ 10-87 | 0 | 4 | 0 | 4 |
| PJ 10-220 | 0 | 4 | 0 | 4 |
| PJ 10-145 | 0 | 4 | 0 | 4 |
| PJ 10-50 | 0 | 4 | 0 | 4 |
| PJ 10-37 | 0 | 4 | 0 | 4 |
| Skupaj | 3 | 37 | 2 | 38 |

Preglednica 16: Preliminarni test okužbe glav 'Ptujskega spomladanskega' na gojišču PDA in LB

| Klon | PDA | | LB | |
|-----------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| | Št. neokuženih glav | Št. okuženih glav | Št. neokuženih glav | Št. okuženih glav |
| PS 10-261 | 0 | 4 | 1 | 3 |
| PS 10-193 | 3 | 1 | 3 | 1 |
| PS 10-191 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| PS 10-307 | 0 | 4 | 0 | 4 |
| PS 10-166 | 3 | 1 | 3 | 1 |
| PS 10-221 | 3 | 1 | 3 | 1 |
| PS 10-229 | 0 | 4 | 0 | 4 |
| PS 10-243 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| PS 10-218 | 0 | 4 | 0 | 4 |
| Skupaj | 12 | 23 | 13 | 22 |

Število neokuženih glav PS na PDA gojišču je bilo 12, okuženih pa 23, na LB gojišču pa 13 neokuženih (slika 2) in 22 okuženih glav (slika 3). Za nadaljnje poskuse mikropropagacije smo imeli na voljo 5 % glav PJ in 34,3 % glav PS oziroma 18,7 % vsega rastlinskega materiala, ki smo ga prejeli od Semenarne Ljubljana.



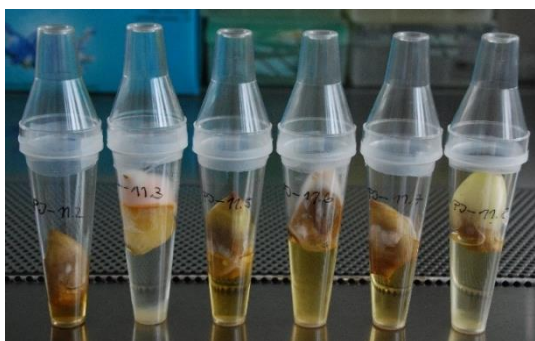
Slika 2: Neokužen strok po sedmih dneh na gojišču PDA



Slika 3: Glivična okužba stroka na gojišču PDA

4.3 ADVENTIVNA REGENERACIJA KORENINSKIH VRŠIČKOV

V poskus smo vključili neokužen in okužen rastlinski material (z dodatkom nanosilverja v času koreninjenja). Med koreninjenjem strokov so se pojavljale okužbe tudi pri nekaterih strokih, ki v preliminarnem testiranju (poglavje 4.2) niso kazali znakov endogenih okužb (Slika 4). Koreninili smo 84 strokov PJ in 102 stroka PS. Ker so se med koreninjenjem pojavljale okužbe, smo na ČKV gojišča prestavili koreninske vršičke iz le 20 strokov PS in 5 strokov PJ (preglednici 17 in 18).



Slika 4: Pojav okužb med koreninjenjem strokov *in vitro*

Preglednica 17: Število strokov uporabljenih za adventivno regeneracijo koreninskih vršičkov 'Ptujskega spomladanskega' česna

| | Iz neokuženih glav | Iz okuženih glav | Skupaj |
|---|--------------------|------------------|-------------|
| Število strokov nastavljenih na gojišče za koreninjenje | 59 | 43 | 102 |
| Število okuženih strokov na gojišču za koreninjenje | 43 (72,9 %) | 39 (90,7 %) | 82 (80,4 %) |
| Število neokuženih strokov na gojišču za koreninjenje | 16 (27,1 %) | 4 (9,3 %) | 20 (19,6 %) |
| Število koreninskih vršičkov na ČKV gojišču | 167 | 192 | 359 |
| Število okuženih koreninskih vršičkov na ČKV gojišču | 88 (52,7 %) | 34 (17,7 %) | 122 (34 %) |
| Število neokuženih koreninskih vršičkov na ČKV gojišču | 79 (47,3 %) | 158 (82,3 %) | 237 (66 %) |

'Ptujski spomladanski'

Iz 16 strokov neokuženih glav PS smo na ČKV gojišče inokulirali 167 koreninskih vršičkov, od katerih se jih je 88 (52,7 %) med poskusom okužilo. Iz okuženih glav smo dobili 192 koreninskih vršičkov, od katerih se jih je okužilo 34 (17,7 %). Rezultati poročajo o pozitivnem učinku nanosilverja, kot potencialnem zaviralcu širitve endogenih okužb, tako v času koreninjenja kot tudi kasneje med gojenjem koreninskih vršičkov na gojišču za adventivno regeneracijo iz koreninskih vršičkov. Od 359 inokuliranih koreninskih vršičkov PS nam jih je uspelo vzdrževati 237, ostale smo odstranili zaradi okužbe. Od 237 koreninskih vršičkov pa niso vsi kazali znakov regeneriranja, kot kaže slika 5.



Slika 5: Adventivna regeneracija iz koreninskih vršičkov česna 'Ptujski spomladanski'

Pri 'Ptujskem spomladanskem' smo po 12 tednih od inokulacije koreninskih vršičkov na ČKV gojišču dobili 171 poganjkov, ti so v nekaterih primerih tvorili koreninice, spet drugi so kazali znake hiperhidriranosti. V 12 tednih se nam je v povprečju namnožilo 8,6 poganjkov na strok PS.

'Ptujski jesenski'

Preglednica 18: Število strokov uporabljenih za adventivno regeneracijo koreninskih vršičkov 'Ptujskega jesenskega' česna

| | Iz neokuženih glav | Iz okuženih glav | Skupaj |
|---|--------------------|------------------|-----------|
| Število strokov nastavljenih na gojišče za koreninjenje | 20 | 64 | 84 |
| Število okuženih strokov na gojišču za koreninjenje | 17 (85 %) | 62 (96,9 %) | 79 (94 %) |
| Število neokuženih strokov na gojišču za koreninjenje | 3 (15 %) | 2 (3,1 %) | 5 (6 %) |
| Število koreninskih vršičkov na ČKV gojišču | 24 | 16 | 40 |
| Število okuženih koreninskih vršičkov na ČKV gojišču | 24 (100 %) | 10 (62,5 %) | 34 (85 %) |
| Število neokuženih koreninskih vršičkov na ČKV gojišču | 0 | 6 (37,5 %) | 6 (15 %) |

Od 40 koreninskih vršičkov PJ je bilo takih, ki so jih tvorile neokužene glave, 24 in takih, ki so nastali iz okuženih glav, 16. Od 24 koreninskih vršičkov, ki smo jih gojili na ČKV gojišču brez nanosilverja, ni preživel niti en, od 16 koreninskih vršičkov na ČKV gojišču z dodatkom nanosilverja pa je bilo preživelih 6 (37,5 %). V nekaterih primerih se je izkazalo, da so bili stroki neokuženih glav, uspešni v poskusu koreninjenja, nato okuženi

na gojišču za regeneracijo iz koreninskih vršičkov. Iz petih strokov česna, nam je uspelo pridobiti 40 koreninskih vršičkov 'Ptujskega jesenskega' česna., od katerih se jih je 34 okužilo (85 %) (preglednica 18). Iz koreninskih vršičkov 'Ptujskega jesenskega' nismo dobili nobenega poganjka.

4.4 USPEH RASTI POGANJKOV IZ BAZALNE PLOŠČE

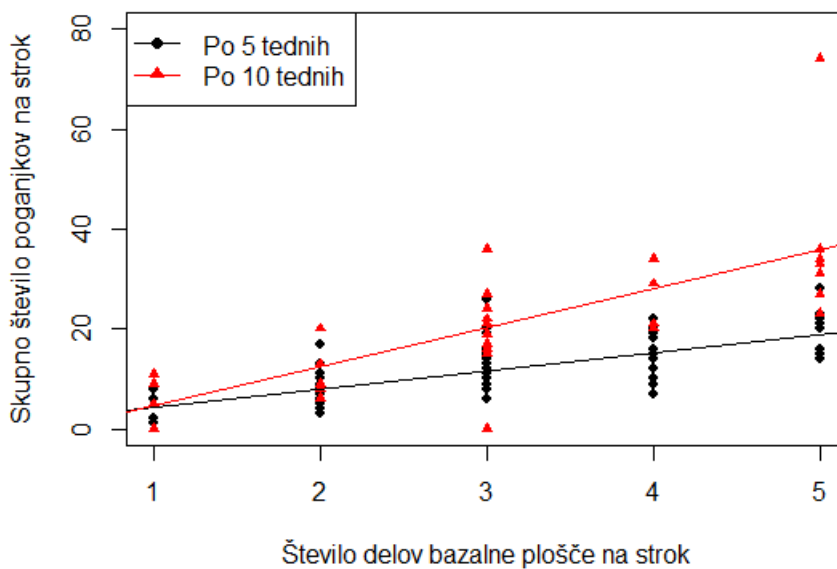
'Ptujski spomladanski'

Pri poskusu regeneracije poganjkov iz bazalnih plošč smo inokulirali dele bazalnih plošč na gojišče ČBP (preglednica 10) in spremljali uspešnost regeneriranja tako, da smo na vsakem delu bazalnih plošč prešteli novonastale poganjke po petih in po desetih tednih. Inokulirali smo dele bazalnih plošč 121 strokov iz neokuženih glav. Na ČBP gojišču je ostalo neokuženih 81,8 % (99 strokov). Po prvih petih tednih smo sešteli regenerirane poganjke 80 strokov (66,1 % vseh inokuliranih strokov) v petrijevkah (slika 6) in jih nato subkultivirali naprej v plastične epruvete (slika 8). Regeneracije ostalih 19 strokov nismo spremljali. Po desetih tednih smo spremljali skupno število novonastalih poganjkov 40 strokov, preostalih strokov nismo vrednotili, saj je bilo delo vzporedno z ostalimi poskusi časovno zahtevno.



Slika 6: Regeneracija poganjkov iz bazalnih plošč po 5 tednih kulture na ČBP

Regresijska analiza odvisnosti skupnega števila poganjkov na strok od števila delov bazalne plošče stroka in od klona je pokazala, da klon nima statistično značilnega vpliva. Pri 95 % zaupanju se je skupno število poganjkov na strok ob povečanju števila delov bazalne plošče za 1 povečalo od 2,8 do 4,5 v petih tednih. V nadaljnjih analizah informacije o klonih in glavah nismo upoštevali. Analizirano je bilo skupno število poganjkov na strok, za katerega smo ugotovili, da je odvisno od števila delov bazalnih plošč. Po 10 tednih se je pri 95 % zaupanju skupno število poganjkov na strok ob povečanju števila delov bazalne plošče za 1 povečalo od 5,1 do 10,5 (slika 7).



Slika 7: Odvisnost skupnega števila poganjkov na strok od števila delov bazalne plošče na strok PS

V najboljšem primeru nam je iz 5 delov bazalnih plošč na strok uspelo namnožiti skupno 28 poganjkov v petih tednih in v desetih tednih 74 poganjkov na strok.



Slika 8: Razmnoževanje poganjkov po 10 tednih kulture na ČBP

Preglednica 19: Število uporabljenih strokov, delov bazalnih plošč in regeneriranih poganjkov po 5 tednih kulture (število poganjkov 1) in po 10 tednih kulture (število poganjkov 2) 'Ptujskega spomladanskega' na ČBP po klonih

| Klon | Število strokov | Število delov bazalnih plošč | Število poganjkov 1 | Število poganjkov 2 |
|-----------|-----------------|------------------------------|---------------------|---------------------|
| PS 10-166 | 21 | 69 | 262 | ni podatkov |
| PS 10-191 | 19 | 51 | 216 | ni podatkov |
| PS 10-193 | 6 | 24 | 89 | (iz 6 strokov) 184 |
| PS 10-221 | 26 | 78 | 276 | (iz 19 strokov) 359 |
| PS 10-243 | 8 | 28 | 115 | (iz 8 strokov) 156 |
| Skupaj | 80 | 250 | 958 | 699 |

Iz 80 strokov smo uspeli dobiti 250 delov bazalnih plošč. Po 5 tednih kulture na ČBP gojišču se nam je iz 80 strokov oz. 250 delov bazalnih plošč namnožilo 958 poganjkov PS. Povprečno število regeneriranih poganjkov na strok je bilo 12,0. Po desetih tednih naključno nismo spremljali števila novonastalih poganjkov dveh klonov (PS 10-166 in PS 10-191) in 7 strokov klona PS 10-221, saj je delo vzporedno z drugimi poskusi zahtevalo veliko časa. V 10 tednih kulture na gojišču ČBP smo iz 40 strokov dobili 699 poganjkov, to je v povprečju 21,2 poganjkov na strok (preglednica 19, preglednica 20).

Preglednica 20: Povprečno število poganjkov na strok po 5 in po 10 tednih ter povprečno število delov bazalnih plošč na strok PS po klonih

| Klon | Povprečno število delov bazalnih plošč/strok | Povprečno število poganjkov/strok po 5 tednih | Povprečno število poganjkov/strok po 10 tednih |
|------------------|--|---|--|
| PS 10-166 | 3,3 | 12,5 | ni podatka |
| PS 10-191 | 2,7 | 11,4 | ni podatka |
| PS 10-193 | 4,0 | 14,8 | 30,7 |
| PS 10-221 | 3,0 | 10,6 | 18,9 |
| PS 10-243 | 3,5 | 14,4 | 19,5 |
| Skupno povprečje | 3,3 | 12,0 | 21,2 |

Največje povprečno število poganjkov na strok regeneriranih v 5 tednih je bilo 14,8, v 10 tednih pa 30,7. Omenjeni rezultati veljajo za klon PS 10-193. Iz enega stroka nam je uspelo inokulirati različno število delov bazalnih plošč, tako smo iz enega stroka v povprečju izrezali od 2,7 – 4,0 delov bazalnih plošč na strok. Povprečno število delov bazalnih plošč na strok PS je znašalo 3,3 (preglednica 20).

'Ptujski jesenski'

Na gojišče za rast poganjkov smo inokulirali dele bazalnih plošč 84 strokov 'Ptujskega jesenskega', iz okuženih glav (preglednica 10). Pojav okužb inokuliranih delov bazalnih plošč na ČBP gojišču je bil znaten, saj nam je uspelo vzdrževati le izsečke iz 21 strokov (25 % vseh strokov). Poleg okužb je bila tudi sposobnost regeneracije poganjkov manjša.

Do velikega števila okuženih strokov je najverjetneje prišlo, ker smo za razmnoževanje poganjkov iz bazalnih plošč uporabili le okužen semenski material PJ. Od 21 neokuženih strokov se je po petih tednih regeneriralo 81 poganjkov, tako je bilo povprečno število

poganjkov na strok 3,9. V naslednjih 4 tednih subkultiviranja smo zabeležili število novonastalih poganjkov klona, ki je imel najmanjšo nagnjenost k okužbam (PJ 10-263). V 9 tednih kulture smo tako dobili skupno 41 poganjkov omenjenega klona, v povprečju 5,1 poganjka na strok (preglednica 21).

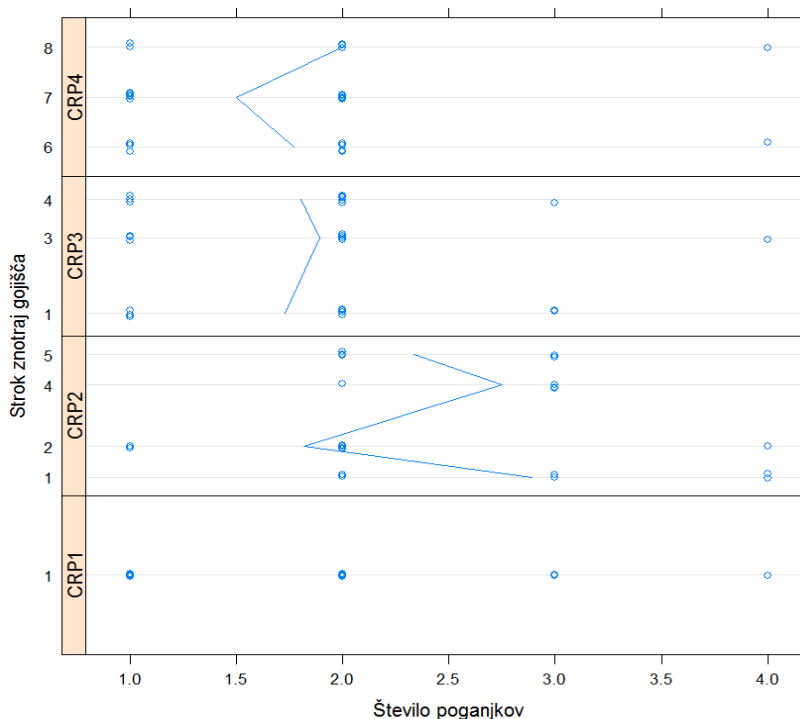
Preglednica 21: Število inokuliranih strokov in rast poganjkov po 5 tednih kulture (Število poganjkov 1) in po 9 tednih kulture (Število poganjkov 2) 'Ptujskega jesenskega' na ČBP po klonih

| Klon | Število strokov | Število poganjkov 1 | Število poganjkov 2 |
|-----------|-----------------|---------------------|---------------------|
| PJ 10-50 | 5 | 23 | ni podatka |
| PJ 10-101 | 1 | 2 | ni podatka |
| PJ 10-119 | 1 | 3 | ni podatka |
| PJ 10-145 | 2 | 3 | ni podatka |
| PJ 10-263 | 8 | 32 | 41 |
| PJ 10-296 | 3 | 12 | ni podatka |
| PJ 10-300 | 1 | 6 | ni podatka |
| Skupaj | 21 | 81 | 41 |

4.5 USPEH RAZMNOŽEVANJA POGANJKOV

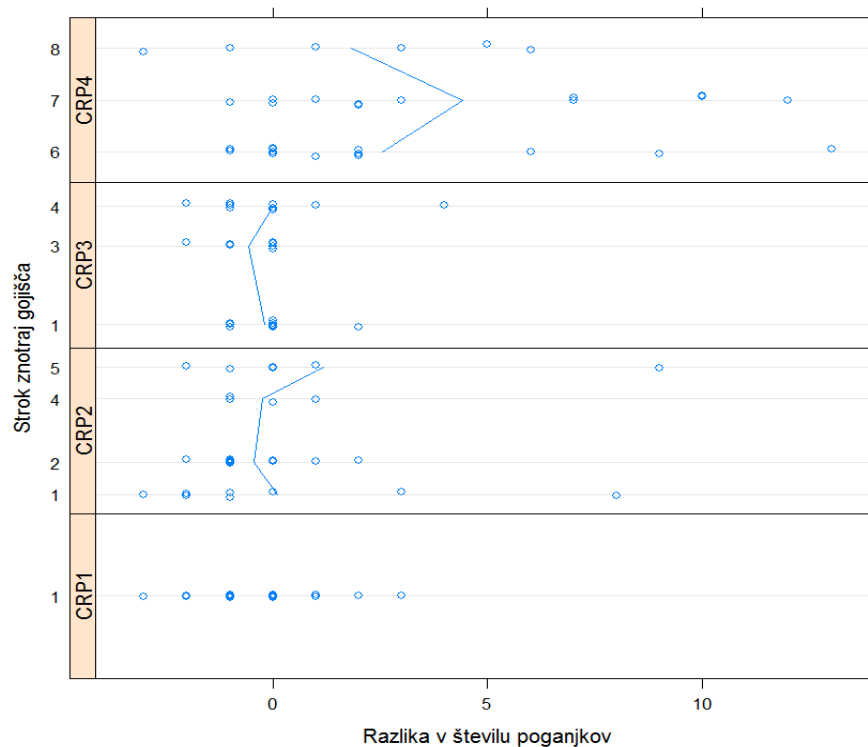
'Ptujski spomladanski'

Po poskusu regeneracije poganjkov iz bazalnih plošč na gojišču ČBP, smo preverjali uspešnost štirih različnih gojišč za razmnoževanje poganjkov (ČRP1, ČRP2, ČRP3, ČRP4). Bazalne plošče iz katerih so izraščali novi poganjki v petrijevkah smo prestavili v epruvete na štiri različna gojišča (preglednica 11). Zanimalo nas je predvsem število na novo regeneriranih poganjkov ter učinkovitost posameznega gojišča. Iz ČBP gojišča smo na ČRP gojišča prestavili poganjke namnožene iz 10 strokov. Število razmnoženih poganjkov smo šteli v dveh terminih, 77 dni od iniciacije na ČRP in nato še 73 dni na svežih gojiščih, skupno 150 dni od iniciacije.



Slika 9: Začetno število poganjkov PS prestavljenih iz gojišča ČBP na štiri gojišča ČRP

Iz slike 9 je razvidno, da je bilo najmanjše začetno število poganjkov PS prestavljenih iz ČBP na ČRP gojišča 1, največje pa 4. Črte na grafu povezujejo povprečno število poganjkov na strok znotraj posameznega gojišča. Na ČRP1 so bili nastavljeni poganjki regenerirani iz enega samega stroka, na ČRP2 iz petih strokov, na ČRP3 in ČRP4 pa iz treh strokov.



Slika 10: Razlika v številu poganjkov PS po 150 dneh kulture na ČRP gojiščih med končnim seštevkem poganjkov in začetnim stanjem

Razlika v številu poganjkov po 150 dneh med končnim seštevkem poganjkov in začetnim stanjem je bila očitna na gojišču ČRP4, saj je povprečno število poganjkov na strok (črte na sliki 10) odstopalo od drugih treh gojišč. Največ se je namnožilo 13 poganjkov na strok (ČRP4), ponekod pa smo izgubili tudi do največ 3 poganjke (ČRP1, ČRP2, ČRP4).

Preglednica 22: Frekvenca razlik med končnim seštevkem poganjkov (po 150 dneh) in začetnim številom poganjkov na epruveto na ČRP gojiščih pri PS

| Razlika v poganjkih | ČRP1 | ČRP2 | ČRP3 | ČRP4 |
|---------------------|------|------|------|------|
| -3 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| -2 | 4 | 4 | 2 | 0 |
| -1 | 11 | 12 | 10 | 4 |
| 0 | 10 | 6 | 15 | 6 |
| 1 | 2 | 3 | 1 | 3 |
| 2 | 1 | 1 | 1 | 5 |
| 3 | 1 | 1 | 0 | 2 |
| 4 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 8 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 9 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 1 |

Za razliko med končnim številom poganjkov (po 150 dneh) in začetnim številom poganjkov je bila narejena Kruskal-Wallisova analiza variance in nadaljnji testi mnogoterih primerjav, ki so prikazali, da mediana števila novonastalih poganjkov na ČRP4 statistično značilno odstopa od mediane ostalih treh gojišč, med katerimi ni statistično značilnih razlik.

Število poganjkov PS je po 150 dneh v večini primerov ostalo enako, veliko poganjkov ni preživel, zaradi prenosa iz ČBP gojišča na ČRP. Iz preglednice 22 je razvidno, da so porazdelitve nastalih poganjkov različne po gojiščih ČRP. Pri ČRP3 in ČRP4 gojišču je v največjih primerih ostalo število poganjkov nespremenjeno, medtem ko se je na ČRP1 in ČRP2 število poganjkov največkrat zmanjšalo za en poganjek. Največjo sposobnost razmnoževanja je bilo mogoče zaslediti na ČRP4 gojišču, zaradi večjih vsebnosti avksinov in citokininov ter dodanim kalcijevimi nitratom osnovnemu gojišču BDS. Na ČRP4 gojišču se je v 150 dneh število poganjkov povečalo za 97. Pri ČRP1 in ČRP3 gojišču je bilo končno število poganjkov manjše od začetnega števila, le 2 poganjka sta se namnožila na ČRP2 (preglednica 23).

Preglednica 23: Sposobnost razmnoževanja poganjkov 'Ptujskega spomladanskega' v prvih 77 dneh (Število poganjkov 1) in v naslednjih 73 dneh (Število poganjkov 2)

| Gojišče | Začetno število poganjkov | Število poganjkov 1 | Število poganjkov 2 |
|---------|---------------------------|---------------------|---------------------|
| ČRP1 | 54 | 54 | 39 |
| ČRP2 | 71 | 75 | 73 |
| ČRP3 | 54 | 50 | 47 |
| ČRP4 | 53 | 53 | 150 |
| Skupaj | 232 | 232 | 309 |

Po 77 dneh kulture je ostalo število poganjkov enako začetnemu stanju (232). Po 150 dneh nam je na gojiščih ČRP1, ČRP2 in ČRP3 večinoma uspelo samo vzdrževati poganjke, nekateri pa niso preživel v kulturi. V času med drugim in prvim štetjem se je pojavilo veliko novih poganjkov samo na gojišču ČRP4 (preglednica 23).

Preglednica 24: Kvartili razmerja med končnim (po 150 dneh) številom poganjkov na epruveto in začetnim številom poganjkov na epruveto PS na ČRP gojiščih

| Gojišče | Kvartili | | | | |
|---------|----------|------|------|------|-------|
| | 0 % | 25 % | 50 % | 75 % | 100 % |
| ČRP1 | 0 | 0,5 | 0,6 | 1,0 | 3,0 |
| ČRP2 | 0 | 0,5 | 0,6 | 1,0 | 5,5 |
| ČRP3 | 0 | 0,5 | 1,0 | 1,0 | 5,0 |
| ČRP4 | 0 | 1,0 | 2,0 | 4,3 | 8,0 |

Izračunali smo tudi razmerje med končnim številom poganjkov na epruveto in začetnim številom poganjkov na epruveto. Kvartili posameznih vrednosti po ČRP gojiščih so v preglednici 24. Pri ČRP4 je to razmerje največ 8. V 50 % se je število poganjkov največ podvojilo, v 75 % primerov pa se je povečalo za največ 4,3 krat. Najslabše rezultate smo dobili pri ČRP1 gojišču, saj se je število poganjkov povečalo za največ trikrat, v polovici primerov se je število skoraj razpolovilo, v tri četrt primerih pa je ostalo enako. Na ČRP2 se je število poganjkov povečalo največ 5,5 krat, pri ČRP3 pa 5 krat (preglednica 24).

'Ptujski jesenski'

Izveden je bil manjši poskus razmnoževanja poganjkov 'Ptujskega jesenskega'.

Preglednica 25: Uspešnost razmnoževanja poganjkov 'Ptujskega jesenskega' v prvih 95 dneh (Število poganjkov 1) in po 153 dneh (Število poganjkov 2)

| Gojišče | Začetno število poganjkov | Število poganjkov 1 | Število poganjkov 2 |
|---------|---------------------------|---------------------|---------------------|
| ČRP1 | 30 | 25 | 20 |
| ČRP2 | 26 | 20 | 29 |
| ČRP3 | 30 | *24 | *17 |
| ČRP4 | 24 | *22 | *39 |
| Skupaj | 110 | 88 | 90 |

* prisotne okužbe

Pri poskusu razmnoževanja poganjkov smo po 153 dneh kulture na ČRP gojiščih dobili manjše število poganjkov (t.j. 90) v primerjavi s prvotnim inokuliranim številom poganjkov na ČRP gojiščih (t.j. 110) (preglednica 25). Poleg zabeleženih okužb je bila tudi namnožitev poganjkov zanemarljiva, saj so stroki nastavljeni na gojišču ČRP pripadali okuženim glavam PJ. Na ČRP4 gojišču se je število poganjkov povečalo iz 22 na 39, vendar se je izmed teh v 95 dneh okužil en poganjek, v 153 dneh pa še dodatnih 17. Okužbe so bile prav tako prisotne na ČRP3 gojišču, od 24 poganjkov sta se v prvem obdobju okužila dva in v naslednjem, po 153 dneh od 17 poganjkov še dodatna dva. Pri ČRP1 se je število poganjkov zmanjšalo za 10 od izvornega, zaradi izsušitve. Na ČRP2 gojišču pa se nam je število poganjkov najprej zmanjšalo za 6, nato pa povečalo za 9.

4.6 USPEH TVORBE ČEBULIC IN AKLIMATIZACIJA

Na gojiščih za tvorbo čebulic (TČ1 in TČ2), kamor smo iz ČBP gojišča prestavili poganjke sort 'Ptujski spomladanski', smo spremljali vpliv povečane koncentracije saharoze in jasmonske kisline na tvorbo čebulic. Na TČ1 in TČ2 gojišče smo prestavili po 60 poganjkov in opazovali število novonastalih koreninic po 40 - 42 dneh. Število odebeljenih čebulic smo spremljali le na gojišču brez dodane JA (TČ1). Opazovali smo vpliv TČ gojišč na razvoj sadik v času aklimatizacije, tako da smo ob presajanju sadik iz rastlinjakov v plastične lončke zabeležili število novonastalih koreninic.

Preglednica 26: Začetno število poganjkov na gojiščih TČ1 in TČ2 ter razvoj korenin pred in med aklimatizacijo

| Gojišče | Število poganjkov prestavljenih iz ČBP na TČ | Št. koreninic po 40-42 dneh | Število aklimatiziranih poganjkov | Število koreninic po aklimatizaciji |
|---------|--|-----------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| TČ1 | 60 | 208 | 58 | 280 |
| TČ2 | 60 | 205 | 58 | 30 |

Od 60 poganjkov je bilo po 40 dneh kulture na TČ1 gojišču 33 takih poganjkov, ki so tvorili čebulice (slika 11), 8 poganjkov je bilo hiperhidriranih, 14 popolnoma neodebeljenih in 5 poganjkov je propadlo. Na TČ1 gojišču se je v 40 dneh razvilo 208 koreninic, na TČ2 (t.j. z dodatkom JA) gojišču pa v 42 dneh 205 koreninic.



Slika 11: Tvorba čebulice v 40 dneh na gojišču TČ1

V plastične rastlinjake smo nato prestavili iz vsakega gojišča po 58 poganjkov (slika 12). V naslednjih 44 dneh je preživelo 55 rastlin (94,8 %) iz TČ1 gojišča (od skupno 58 poganjkov), ki so tvorile 280 koreninic, v povprečju 5,1 korenin na rastlinico. Vpliv TČ2 gojišča z dodano JA na aklimatizirane rastline ni bil najbolj pozitiven, saj je v 33 dneh od 58 poganjkov preživelo le 7 rastlin (12,1 %), ki so skupaj tvorile 30 koreninic, to je v povprečju 4,3 korenine na rastlinico (preglednica 26).



Slika 12: Aklimatizacija rastlinic česna

Na koncu so uspešno aklimatizirane rastlinice (skupno 62) prevzeli žlahtnitelji iz Semenarne Ljubljana, iz njih jim je uspelo vzgojiti 5 mikrogomoljčkov, ki so jih gojili naprej.

5 RAZPRAVA

5.1 ENDOGENE OKUŽBE

Pri preliminarnem testu endogenih okužb smo preverjali prisotnost bakterij in gliv. Razlike med sortama 'Ptujski jesenski' in 'Ptujski spomladanski' so bile očitne, saj sta bili od 40 glav PJ neokuženi le 2 glavi, od 35 glav PS pa 12 glav česna. V nadaljnje poskuse smo vključili tako neokužen rastlinski material, kot tudi okuženega, saj je bilo neokuženih le 18,7 % glav.

5.2 ADVENTIVNA REGENERACIJA KORENINSKIH VRŠIČKOV

V poskusu adventivne regeneracije koreninskih vršičkov so bile vključene tako neokužene kot okužene glave PJ in PS. Do okužb je prišlo že med samim koreninjenjem strokov, tako da smo dobili korenine le iz 19,6 % strokov sorte 'Ptujski spomladanski' in 6 % strokov sorte 'Ptujski jesenski'. Koreninski vršički so na gojišču za adventivno regeneracijo (ČKV) tvorili 171 poganjkov, kar je potrdilo poročanje Haque in sod. (1997) o uspešni regeneraciji poganjkov iz koreninskih vršičkov. Spremljali pa smo tudi aspekt uporabe nanosilverja v gojišču za koreninjenje in za adventivno regeneracijo iz koreninskih vršičkov. Dodatek nanosilverja v času koreninjenja okuženih strokov je povzročil manjšo stopnjo okuženosti koreninskih vršičkov kot pri neokuženih strokih (brez dodanega nanosilverja). Pri PS nam je uspelo ohraniti 82,3 % vseh koreninskih vršičkov iz okuženih strokov in 47,3 % vseh koreninskih vršičkov iz neokuženih strokov. Vsi koreninski vršički iz neokuženih strokov PJ so bili okuženi, medtem ko je iz okuženih strokov preživelo 37,5 % vseh koreninskih vršičkov. Iz 79 koreninskih vršičkov PS smo po 12 tednih uspeli namnožiti 171 poganjkov, iz 6 koreninskih vršičkov PJ pa nismo dobili nobenega poganjka. Vzrokov za neuspešno stimulacijo razraščanja poganjkov iz koreninskih vršičkov je lahko več, začeni s postopkom koreninjenja. Namesto celega stroka bi lahko po objavi Scottona in sod. (2013) za indukcijo koreninskih vršičkov uporabili le 1 cm izseček bazalne plošče stroka in se na ta način izognili večjemu pojavu okužb. Poleg tega bi lahko poizkusili koreninjenje na MS osnovnem gojišču (Scotton in sod., 2013) in dodatkom 2 % saharoze (Kim E. K. in sod., 2003). Tretji vidik, ki zadeva sposobnost adventivne regeneracije iz koreninic lahko zavisi od genotipa česna, intenzitete osvetljenosti v času kulture, ki naj ne bi bila višja od $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in temperature, ki je najbolj optimalna pri 25 °C (Kim E. K. in sod., 2003). Dosedanje učinkovite metode adventivne regeneracije poganjkov iz koreninskih vršičkov so bile razvite za sorte 'White roppen' (Haque in sod., 1997, 2003), 'Danyang' (Kim E. K., 2003), 'Jonas' (Scotton in sod., 2013) in druge. Poleg omenjenih dejavnikov ima tudi sestava gojišča pomemben vpliv na regeneracijo izsečkov, za najbolj učinkovite so se izkazali dodatki številnih rastnih regulatorjev (NAA, BAP, 2iP, 2,4-D, pikloram, L-triptofan) (Haque in sod., 1997, 2003, Kim E. K. in sod., 2003, Myers in Simon, 1998, Scotton in sod., 2013).

5.3 RAST POGANJKOV IZ BAZALNE PLOŠČE

V primerjavi z metodo regeneracije iz koreninskih vršičkov, so bili rezultati pri indukciji rasti poganjkov iz dela bazalne plošče stroka boljši, iz česar lahko sklepamo, da je eden izmed faktorjev, ki vpliva na uspešnost regeneriranja, vrsta izsečka. Po 10 tednih smo po poti regeneracije poganjkov iz delov bazalnih plošč stroka PS dobili v povprečju 21,2 poganjkov na strok, v 12 tednih pa se nam je po poti adventivne regeneracije iz koreninskih vršičkov regeneriralo v povprečju 8,6 poganjkov na strok PS. Pri PJ smo v 9 tednih iz delov bazalnih plošč namnožili v povprečju 5,1 poganjkov na strok, iz koreninskih vršičkov pa se po poti adventivne regeneracije ni namnožil noben poganjek PJ. Bazalna plošča se je izkazala za najbolj primeren inokulum za regeneracijo poganjkov 'Ptujskega spomladanskega' in 'Ptujskega jesenskega' česna.

Po 5 tednih kulture nam je uspelo namnožiti 958 poganjkov iz 80 strokov česna PS oz. 250 delov bazalnih plošč, tako smo v povprečju dobili 12 poganjkov na strok. Število inokuliranih delov bazalnih plošč na strok po klonih ni bilo enakomerno porazdeljeno, v najboljšem primeru smo dobili 4 dele bazalne plošče, v najslabšem pa 2,7 delov bazalne plošče na strok. Regresijska analiza odvisnosti skupnega števila poganjkov na strok od števila delov bazalne plošče stroka in klona je pokazala, da klon nima statistično značilnega vpliva. Ugotovili smo, da je skupno število poganjkov na strok odvisno od števila delov bazalnih plošč. V nadaljnjih poskusih rasti poganjkov iz bazalnih plošč bi bilo torej smiselno uporabiti najdebelejše stroke, iz katerih bi dobili večje število poganjkov. Po desetih tednih rasti poganjkov iz bazalnih plošč smo dobili v povprečju 21,2 poganjkov na strok PS. V najboljšem primeru smo v 10 tednih dobili 30,7 poganjkov na strok znotraj enega klona PS oz. 7,7 poganjkov na del bazalne plošče. Stopnja regeneriranja bazalnih plošč je bila v desetih tednih 81,4 %, drugi avtorji poročajo o 71 % odzivnosti izsečkov v 11 tednih (Fellner in Havránek, 1994) in 73 % rasti novih poganjkov (Hasegawa in sod., 2002).

Pri sorti 'Ptujski jesenski' je na gojišču za rast poganjkov iz bazalnih plošč prihajalo do velikega števila okužb (navkljub dodatku nanosilverja), saj smo uporabili le okužen semenski material, kajti neokužen ni bil na razpolago. Iz okuženih glav nam je uspelo vzdrževati 21 strokov, ki so kazali znake regeneracije in v petih tednih v povprečju smo dobili 3,9 poganjkov na strok, v devetih tednih pa 5,1.

Povprečno število strokov na glavo PS, ki se jih je namnožilo iz enega stroka v eni rastni sezoni v zemlji, je bilo $13,0 \pm 2,6$, povprečno število strokov na glavo PJ pa je bilo $6,0 \pm 1,2$. Podatki veljajo za rastlinski material, ki smo ga uporabili v naših poskusih. Torej so naši rezultati boljši kot, če bi taiste stroke posadili v zemljo. Povprečno število 12 poganjkov na strok PS smo dobili v petih tednih, tako da bi lahko te dobljene poganjke še dodatno namnožili in v enem letu iz enega stroka dejansko dobili več poganjkov kakor v zemlji.

5.4 RAZMNOŽEVANJE POGANJKOV

V tem delu poskusa smo preverjali vpliv štirih različnih gojišč za razmnoževanje poganjkov (ČRP) na porazdelitev novonastalih poganjkov. S Kruskal-Wallisovo analizo variance in nadaljnji testi mnogoterih primerjav za razliko med končnim številom poganjkov (po 150 dneh) in začetnim številom poganjkov smo prikazali, da je mediana števila novonastalih poganjkov na ČRP4 gojišču statistično značilno odstopala od mediane ostalih treh gojišč, med katerimi ni bilo statistično značilnih razlik. Do razlik med gojišči je prišlo zaradi uporabe različnih osnovnih gojišč (MS z vitamini in BLM z vitamini), modificiranimi z različnimi koncentracijami NAA, BAP in $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Z našimi rezultati sorte 'Ptujski spomladanski' smo potrdili rezultate Luciani in sod. (2001), ki so dobili največji multiplikacijski faktor poganjkov na gojišču BDS, z dodatkom 1g/l kalcijevega nitrata, 5 μM NAA in 10 μM BAP. Po 150 dneh kulture je ostalo število poganjkov v večini primerov nespremenjeno, razlog lahko tiči v začetnem številu predstavljenih poganjkov iz gojišča za rast poganjkov (ČBP) na gojišča ČRP. Največje število razmnoženih poganjkov na strok PS na ČRP4 gojišču je bilo 13. Izračunali in primerjali smo razmerja med končnim številom poganjkov na epruveto in začetnim številom poganjkov na epruveto med štirimi različnimi gojišči. Pri ČRP4 je bilo to razmerje največ 8, pri ČRP3 5, pri ČRP2 5,5 in ČRP1 3.

Pri sorti 'Ptujski jesenski' ni bilo mogoče opaziti sposobnosti razmnoževanja poganjkov, saj je bilo končno število poganjkov manjše kot začetno. Poleg okužb je pogosto prihajalo do propada poganjkov. Okužbe v poznih fazah kulture so povzročene od zunanjih dejavnikov in niso rezultat odziva tkiva, stroka ali poganjka. Eden izmed zaviralnih dejavnikov, ki vpliva na razmnoževanje poganjkov bi lahko bil začetni snop predstavljenih poganjkov, ki so bili prešibki. V drugi vrsti pa je bila starost posamezne subkulture predolga, gojišča prehransko izčrpana, zato so v velikih primerih poganjki propadli.

5.5 TVORBA ČEBULIC IN AKLIMATIZACIJA

Sposobnost tvorjenja čebulic (TČ) smo opazovali le pri 'Ptujskem spomladanskem', kjer smo primerjali dve gojišči brez in z dodatkom 5 μM JA. Z našimi rezultati nismo potrdili rezultatov Žel in sod. (1997), ki so dokazali, da jasmonska kislina spodbudi nastanek čebulic. Na gojišču brez JA so se po 5 tednih na 55 % poganjkov tvorile čebulice, 13,3 % poganjkov je bilo hiperhidriranih, 23,3 % popolnoma neodebeljenih, 8,3 % poganjkov pa je propadlo. Žel in sod. (1997) je v 12 tednih uspelo dobiti čebulice iz 86-90 % poganjkov.

Po petih in šestih tednih smo čebulice aklimatizirali, povprečno število koreninic na rastlinico, iz poganjkov na TČ1 gojišču se je v času aklimatizacije povečalo iz 3,5 na 5,1, na TČ2 gojišču pa iz 3,4 na 4,3 korenine na rastlino. Stopnja preživetja rastlinic iz gojišča brez JA je bila po šestih tednih 94,8 %, na gojišču modificiranem z JA pa le 12,1 %. Naši rezultati nakazujejo, da ima jasmonska kislina inhibitorni vpliv na razvoj čebulic sorte 'Ptujski spomladanski'.

Da bi se tvorilo še večje število čebulic bi lahko gojišče obogatili z višjo koncentracijo saharoze, tako kot navajajo Kim E. K. in sod. (2003) je optimalna koncentracija 11 % ali

pa z dodajanjem drugih rastnih pospeševalcev, kot so CCC, ABA in B-9. Predpogoj za uspešno tvorbo čebulic je tudi tretiranje strokov s termoterapijo, saj je v literaturi mogoče zaslediti, da se v primeru termoterapije razvije od 67 - 88 % čebulic, brez tretiranja pa le od 17 - 49 % čebulic (Ucman in sod., 1998).

6 SKLEPI

V poskusu smo dokazali, da obstajajo razlike v stopnji okuženosti in sposobnosti regeneriranja med genotipoma 'Ptujski jesenski' in 'Ptujski spomladanski', saj smo že v preliminarnem testu na prisotnost endogenih okužb ugotovili, da je prisotnost bakterijskih in glivičnih okužb v rastlinskem materialu, s katerim smo razpolagali v poskusu pri PJ 95 % in pri PS 65,7 %.

Ugotavljali smo iz katerega dela stroka česna je bila mikropropagacija uspešnejša. Stopnja regeneracije je bila večja pri izsečkih iz dela bazalne plošče stroka, medtem ko je bila odzivnost koreninskih vršičkov na adventivno regeneracijo slabša. Povprečno število regeneriranih poganjkov na strok s kulturo bazalnih plošč v petih tednih je bilo 12, v desetih tednih pa 21,2 pri PS. V petih tednih smo iz enega stroka PJ namnožili v povprečju 3,9 poganjkov in v devetih tednih 5,1. Sposobnost koreninjenja strokov (postopek pridobitve koreninskih vršičkov za adventivno regeneracijo) je bila pri PS 19,6 % in 6 % pri PJ. Uporaba nanosilverja v gojišču je zaviralno vplivala na širitev okužb, stopnja neokuženosti koreninskih vršičkov je bila pri PS 66% in pri PJ 15 %. Po poti adventivne regeneracije koreninskih vršičkov smo v 12 tednih regenerirali povprečno 8,6 poganjkov na strok PS, iz strokov PJ nismo dobili nobenega poganjka.

Uspeli smo vzpostaviti protokol za rast poganjkov iz dela bazalne plošče stroka. Indukcijsko gojišče je bilo sestavljeno iz MS osnovnega gojišča z vitamini, z dodanimi 0,1 mg/l NAA, 0,5 mg/l 2iP in 3 % saharoze. V petih tednih se je regeneriralo 958 poganjkov iz 80 strokov PS in 81 poganjkov iz 21 strokov PJ. Pri 'Ptujskem spomladanskem' smo z regresijsko analizo odvisnosti skupnega števila poganjkov na strok od števila delov bazalne plošče na strok in od klona pokazali, da klon nima statistično značilnega vpliva. Pri 95 % zaupanju se skupno število poganjkov na strok ob povečanju števila delov bazalne plošče za 1 povečalo od 5,1 do 10,5 v 10 tednih kulture. V analizah nismo upoštevali informacije o klonih in glavah, saj smo ugotovili, da je bilo skupno število poganjkov na strok odvisno od števila delov bazalnih plošč.

Na štirih gojiščih za razmnoževanje poganjkov PS je število le teh v večini primerov ostalo nespremenjeno, vendar je Kruskal-Wallisova analiza mnogoterih primerjav prikazala, da je osnovno BLM gojišče z vitamini, modificirano z 1 g/l kalcijevega nitrata in najvišjimi koncentracijami rastnih regulatorjev (5 μ M NAA, 10 μ M BAP), statistično značilno odstopalo v porazdelitvi nastalih poganjkov. Pri PJ je bilo končno število poganjkov manjše od začetnega. Na stopnjo razmnoževanja poganjkov vplivajo osnovna gojišča, koncentracije rastnih regulatorjev, razmerje med nitratnimi in amonijevimi ioni v gojišču in časovni okvir v katerem ohranjamo posamezno subkulturo.

Na tvorbo čebulic PS je povečana koncentracija saharoze imela pozitiven učinek, saj je čebulice tvorilo 55 % poganjkov, stopnja preživetja rastlinic iz gojišča z dodano 8 % saharozo je bila 94,8 %, aklimatizacijo pa je uspešno prestalo le 12,1 % poganjkov iz gojišča modificiranega z jasmonske kisline. Dejavniki, ki vplivajo na uspešnost regeneriranja poganjkov so vrsta izsečka, fiziološko stanje dela rastline, ki ga inokuliramo, genotip in rastni dejavniki v kulturi (rastni regulatorji, osnovno gojišče, temperatura, osvetljenost, vlaga, dolžina subkultiviranja).

7 POVZETEK

Česen (*Allium sativum* L.) je ena izmed najstarejših, po okusu najmočnejših užitnih čebulnic, ki se jo uporablja kot zdravilno rastlino in začimbo. Njegova uporaba je razširjena po Aziji, Evropi in Latinski Ameriki tako v kulinarične, kot tudi v medicinske namene, saj ima antibiotične in antikancerogene učinke. Razmnožujemo ga vegetativno s stroki, saj je večina genotipov izgubila sposobnost tvorbe semen. *In vitro* tehnike, posebno mikropropagacija se uporabljajo za pospeševanje vegetativnega razmnoževanja in pridobivanja brezvirusnih rastlin, ki imajo večji hektarski pridelek.

Namen naloge je bil ugotoviti, kakšne so možnosti in omejitve razmnoževanja česna v tkivni kulturi dveh avtohtonih sort, 'Ptujski jesenski' in 'Ptujski spomladanski'. Proučevali smo vpliv različnih gojišč na uspešnost mikropropagacije česna. Poskus je potekal v letih 2013/14 v laboratorijih Katedre za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin.

V poskusu smo uspeli vzpostaviti protokol mikropropagacije s kulturo bazalnih plošč stroka izbranih klonov česna 'Ptujski spomladanski' in 'Ptujski jesenski' za proizvodnjo semenskega materiala. S tem namenom smo pridobili semenski material brez endogenih okužb na gojišču za regeneracijo poganjkov po Murashige in Skoog-u z dodatkom 3 % saharoze in rastnih regulatorjev NAA, v koncentraciji 0,1 mg/l ter 2iP, v koncentraciji 0,5 mg/l. V petih tednih kulture smo pri PS uspeli namnožiti 958 poganjkov iz 80 strokov, kar je v povprečju 12 poganjkov na strok. Po desetih tednih pa se je regeneriralo 699 poganjkov iz 33 strokov PS, v povprečju 21,2 poganjkov na strok. Od sorte 'Ptujski jesenski' nam je na gojišču za rast poganjkov iz bazalnih plošč uspelo vzdrževati 25 % neokuženih strokov, tako da smo v petih tednih dobili v povprečju 3,9 poganjkov na strok, v devetih tednih pa 5,1.

Regenerirane poganjke smo predstavili na štiri različna gojišča, kjer smo spremljali vpliv dveh osnovnih gojišč na razmnoževanje poganjkov (MS z vitamini in BDS z vitamini, z dodanim 1g/l kalcijevim nitratom) v kombinaciji z NAA, v koncentraciji 0,5 ali 5 μ M ter BAP, v koncentraciji 1 ali 10 μ M. Ugotovili smo razlike med gojišči za razmnoževanje poganjkov, saj je mediana v številu novonastalih poganjkov gojišča BLM z dodanim kalcijevim nitratom in dodatkom najvišjih koncentracij rastnih dejavnikov (ČRP4) statistično značilno odstopalo od ostalih treh gojišč.

V poskusu tvorbe čebulic smo opazovali vpliv povečane koncentracije saharoze (8 %) in dodajanja JA v koncentraciji 5 μ M na uspešnost tvorbe čebulic in koreninic, vendar se je izkazalo, da je bilo preživetje poganjkov boljše na gojišču brez dodatka JA. Po šestih tednih poskusa za tvorbo čebulic smo poganjke aklimatizirali, tisti, ki smo jih prenesli iz gojišča z dodatkom 8 % saharoze in brez JA, so imeli večji odstotek preživetja.

8 VIRI

- Abo El-Nil M. M. 1977. Organogenesis and embryogenesis in callus cultures of garlic (*Allium sativum* L.). Plant Science Letters, 9: 259-264
- Ayabe M, Sumi S. 1998. Establishment of a novel tissue culture method, stem-disc culture, and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.). Plant Cell Reports, 17: 773-779
- Ayabe M., Sumi S. 2001. A novel and efficient tissue culture method – "stem-disc dome culture" - for producing virus-free garlic (*Allium sativum* L.). Plant Cell Reports, 20: 503-507
- Biolife Italiana. 2015. Milano. PDA gojišče (popis embalaže izdelka)
- Block E. 2010. Garlic and other Alliums. Cambridge, The Royal Society of Chemistry: 454 str.
- Bohanec B. 1992. Tehnike rastlinskih tkivnih kultur. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: 169 str.
- Bohanec B., Javornik B., Strel B. 2004. Osnove rastlinske biotehnologije. Gensko spremenjena hrana. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 28 str. http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2718/Gensko_spremenjena_hrana/1.pdf (september 2015)
- Butt M. S., Sultan M. T., Butt M. S., Iqbal J. 2009. Garlic: nature's protection against physiological threats. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 49: 538-551
- Codex Alimentarius Commission. 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Agenda Item 8. Proposal for new work on a codex standard for garlic: 5 str.
- Černe M., Jakić O. 1988. Pridelovanje česna. Tehnološki list. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 12 str.
- Daniel C. K., Lennox C. L., Vries F. A. 2015. *In vivo* application of garlic extracts in combination with clove oil to prevent postharvest decay caused by *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Neofabraea alba* on apples. Postharvest Biology and Technology, 99: 88-92
- Debergh P. C., Maene L. J. 1981. A scheme for the commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Scientia Horticulturae, 14: 335-345
- Directorate General for Health & Consumers. 2015. Seeds and Plant Propagation Material: Varieties-Vegetables. <http://ec.europa.eu/food/plant/propagation/catalogues/database/public/index.cfm?event=VarietyQuerySubmit&page=0> (maj 2015)

Duchefa Biochemie. 2015a. Haarlem. BDS gojišče (popis embalaže izdelka)

Duchefa Biochemie. 2015b. LB broth high salt.

<https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/L1704> (december, 2015)

Duchefa Biochemie. 2015c. Murashige & Skoog medium including vitamins.

<https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/M0222> (december, 2015)

Dunstan D. I., Short K. C. 1977. Improved growth of tissue cultures of the onion, *Allium cepa*. *Physiologia Plantarum*, 41: 70-72

Ebi M., Kasai N., Masuda K. 2000. Small inflorescence bulbils are best for micropropagation and virus elimination in garlic. *Hortscience*, 35: 735-737

FAOSTAT. 2015. Statistics division. Production. Crops.

<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E> (maj 2015)

Fellner M., Havránek P. 1994. Culture of protoplasts isolated from leaves and callus cultures of *Allium sativum* and *Allium longicuspis*: a preliminary report. *Biologisches Zentralblatt*, 113: 317-328

Fereol L., Chovelon V., Causse S. 2002. Evidence of a somatic embryogenesis process for plant regeneration in garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Cell Reports*, 21: 197-203

George E. F., Hall M. A., De Klerk G. J. 2008. Micropropagation: uses and methods. V: Plant propagation by tissue culture 3rd edition. Springer: 29-64

Hasegawa H., Sato M., Suzuki M. 2002. Efficient plant regeneration from protoplasts isolated from long-term, shoot primordia-derived calluses of garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Plant Physiology*, 159: 449-452

Havránek P., Novák F. J. 1973. The bud formation in the callus cultures of *Allium sativum* L. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 68: 308-318

Haque S. M., Wada T., Hattori K. 1997. High frequency shoot regeneration and plantlet formation from root tip of garlic. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 50: 83-89

Haque S. M., Wada T., Hattori K. 2003. Effects of sucrose, mannitol and KH_2PO_4 on proliferation of root tip derived shoots and subsequent bulblet formation in garlic. *Asian Journal of Plant Sciences*, 2: 903-908

Hu X., Lei Y., Wang P., Tang L., He C., Song Y., Xiong X., Nie X. 2015. Development of a multiplex reverse transcription-PCR assay for simultaneous detection of garlic viruses. *Journal of Integrative Agriculture*, 14: 900-908

Katis N. I., Maliogka V. I., Dovas C. I. 2012. Viruses of the genus *Allium* in the Mediterranean region. *Advances in Virus Research*, 84: 163-208

- Keller E. R. J., Senula A. 2013. Micropropagation and cryopreservation of garlic (*Allium sativum* L.). Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants, methods in molecular biology. Springer Science+Business Media New York, 994: 353-368
- Kim E. K., Hahn E. J., Murthy H. N., Paek K. Y. 2003. High frequency of shoot multiplication and bulblet formation of garlic in liquid cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73: 231-236
- Kim S., Guo D., Jung D., Kwon S. 2003. Multiple shoots regeneration and *in vitro* bulblet formation from garlic callus. *Plant Biotechnology Journal*, 5: 95-99
- Koch M., Tanami Z., Salomon R. 1995. Improved regeneration of shoots from garlic callus. *Hortscience*, 30: 378
- Luciani G. F., Marinangeli P. A., Curvetto N. R. 2001. Increasing nitrate/ammonium ratio for improvement of garlic micropropagation. *Scientia Horticulturae*, 87: 11-20
- Luciani G. F., Pelligini C. 2006. Effects of explants and growth regulators in garlic callus formation and plant regeneration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 87: 139-143
- Mavrič I., Mirkovič V., Ravnikar M. 1999. Virusne okužbe rastlin iz rodu *Allium*. V: Zbornik predavanj in referatov 4. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin, Portorož, 3.-4. marec 1999. Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo: 45-50
- Memudu A. E., Akinrinade I. D., Ogundele O. M. 2015. Retention of testicular integrity and testosterone levels upon ingestion of garlic cloves (*Allium sativum*) in the Sprague-Dawley rat. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5: 319-323
- Myers J. M., Simon P. W. 1998. Continuous callus production and regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) using root segments from shoot tip-derived plantlets. *Plant Cell Reports*, 17: 726-730
- Mukhopadhyay M. J., Sengupta P., Mukhopadhyay S., Sen S. 2005. In vitro stable regeneration of onion and garlic from suspension culture and chromosomal instability in solid callus culture. *Scientia Horticulturae*, 104: 1-9
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-496
- Nagakubo T., Nagasawa A., Ohkawa H. 1993. Micropropagation of garlic through in vitro bulblet formation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32: 175-183
- Nagakubo T., Takaichi M., Oeda K., Oshio H. 1999. Rapid propagation of high quality garlic seed-bulb derived from meristem-tips. *Plant Biotechnology*, 16: 207-212

- Osvald J., Kogoj Osvald M. 2005. Vrtnarstvo: splošno vrtnarstvo in zelenjadarstvo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: 591 str.
- Pušenjak M. 2013. Tehnološki list česen 2013.
http://www.kmetzav-mb.si/Teholoska_navodila_cesen_2013.pdf (oktober, 2015)
- R Core Team. 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
<http://www.R-project.org/> (oktober, 2015)
- Roksana R., Alam M. F., Islam R., Hossain M. M. 2002 In vitro bulblet formation from shoot apex in garlic (*Allium sativum* L.). Plant Tissue Culture, 12: 11-17
- Seabrook J. E. A. 1994. In vitro propagation and bulb formation of garlic. Canadian Journal of Plant Science: 155-159
- Scotton D. C., Benedito V. A., De Molfetta J. B., Rodrigues B. I. FP. Tulmann-Neto A., Figueira A. 2013. Horticultura Brasileira, 31: 80-85
- Song, S. I., Cheong J. J., Choi Y. D. 2007. Onion, garlic and related species. Biotechnology in agriculture and forestry 59. Transgenic crops IV edited by Pua, E. C., Davey, M. R. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 414-433
- Stavěliková H. 2008. Morphological characteristics of garlic (*Allium sativum* L.) genetic resources collection – Information. Supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Project No. 0002700602. Prague, Scientia Horticulturae, 35: 130-135
- Suleria H. A. R., Butt M. R., Khalid N., Sultan S., Raza A., Aleem M., Abbas M. 2015. Garlic (*Allium sativum*): diet based therapy of 21st century – a review. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, 5: 271-278
- Taşkin H., Baktemur G., Kurul M., Büyükalaca S. 2013. Use of tissue culture techniques for producing virus-free plant in garlic and their identification through Real-Time PCR. Hindawi publishing corporation. The scientific world journal, Volume 2013, Article ID 781282, 5 str.
- Torres A. C., Fajardo T. V., Dusi A. N., Resende R. O., Buso J. A. 2000. Shoot tip culture and thermotherapy for recovering virus-free plants of garlic. Horticultura Brasileira, 18: 192-195
- Ucman R., Žel J., Ravnikar M. 1998. Thermotherapy in virus elimination from garlic: influences on shoot multiplication from meristems and bulb formation in vitro. Scientia Horticulturae, 73: 193-202
- Wu C., Wang M., Dong Y., Cheng Z., Meng H. 2015. Growth, bolting and yield of garlic (*Allium sativum* L.) in response to clove chilling treatment. Scientia Horticulturae, 194: 43-52

Zagorc B., Moljk B., Pintar M. Poročilo o stanju kmetijstva, živilstva, gozdarstva in ribištva v letu 2013. Pregled po kmetijskih trgih. 2014. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije:132str.

http://www.kis.si/f/docs/Porocila_o_stanju_v_kmetijstvu_OEK/ZP-2013-trgi.pdf
(oktober 2015)

Zagorc B., Moljk B., Pintar M. Poročilo o stanju kmetijstva, živilstva, gozdarstva in ribištva v letu 2014. Pregled po kmetijskih trgih. 2015. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije:129str.

http://www.kis.si/f/docs/Porocila_o_stanju_v_kmetijstvu_OEK/ZP-2014-trgi_koncno.pdf (oktober 2015)

Zaidi S. K., Ansari S. A., Ashraf G. Md., Jafri M. A., Tabrez S., Banu N. 2015. Renoprotective effect of garlic extract against immobilization stress induced changes in rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5: 364-369

Žel J., Debeljak N., Uzman R., Ravnkar M. 1997. The effect of jasmonic acid, sucrose and darkness on garlic (*Allium sativum* L. cv. 'Ptujski jesenski') bulb formation *in vitro*. In *Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 33: 231-235

ZAHVALA

Najprej se iskreno zahvaljujem mentorici doc. dr. Jani MUROVEC za vse nasvete, usmerjanje in strokovno pomoč tekom nastajanja magistrske naloge. Za komentarje in koristne napotke pri vrednotenju rezultatov se zahvaljujem somentorici izr. prof. Damijani KASTELEC.

Najlepša hvala prof. dr. Gregorju OSTERCU, dr. Karmen STOPAR in doc. dr. Draganu ŽNIDARČIČU za hiter pregled naloge.

Prav tako se zahvaljujem vsem zaposlenim na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin ter kolegom študentom za vso pomoč v laboratoriju.

Hvala vsem dragim osebam za vzpodbudne besede in potrpežljivost v času pisanja naloge. Posebna zahvala gre družini, ki mi je stala ob strani in me podpirala skozi vsa leta študija. Hvala štirim gospem za vso pozitivno energijo, spodbujanje in drugim prijateljem, ki ste nepozabno in čudovito obarvali moja študentska leta.