

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Maja ČREŠNAR

**VPLIV RAZKUŽEVANJA NA REGENERACIJO  
BRSTOV ČEŠNJE (*Prunus subhirtella* L.)**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Maja ČREŠNAR

**VPLIV RAZKUŽEVANJA NA REGENERACIJO BRSTOV ČEŠNJE  
(*Prunus subhirtella* L.)**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**INFLUENCE OF STERILIZATION ON BUD REGENERATION OF  
CHERRY (*Prunus subhirtella* L.)**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija kmetijstva – agronomija. Opravljeno je bilo na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin ter na Katedri za fitomedicino, kmetijsko tehniko, poljedelstvo, pašništvo in travništvo Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorico diplomske naloge imenovala izr. prof. dr. Zlato LUTHAR in za somentorja izr. prof. dr. Francija Celarja.

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

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

Član: doc. dr. Gregor OSTERC  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

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

Maja Črešnar

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMATIKA

ŠD Dn  
DK UDK 634.232:631.532:57.086.83(043.2)  
KG *Prunus*/češnja/brst/postopek razkuževanja/vegetativno razmnoževanje/tkivne kulture/pomlajevanje/gojišče  
KK AGRIS F30  
AV ČREŠNAR, Maja  
SA LUTHAR, Zlata (mentor)/CELAR, Franci (somentor)  
KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo  
LI 2009  
IN VPLIV RAZKUŽEVANJA NA REGENERACIJO BRSTOV ČEŠNJE (*Prunus subhirtella* L.)  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP IX, 36,[4] str., 7 pregl., 14 sl., 2 pril., 21 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI V poskus mikropropagacije smo vključili brste 40 let stare češnje *Prunus subhirtella* L. V kontrolnem poskusu smo neoluščene oz. oluščene brste direktno inokulirali na indukcijsko gojišče oz. jih predhodno 5 min namakali v 96% etanolu (EtOH) ali sterilni destilirani H<sub>2</sub>O. V poskus razkuževanja brstov je bilo vključenih 8 obravnavanj s 96% EtOH oz. s sterilno destilirano H<sub>2</sub>O v kombinaciji z 1,66% dikloroizocianurno kislino (DICA) oz. 1,66% PeraSafe (P). Vsi inokulirani brsti ne glede na obravnavanje v kontrolnem poskusu so bili že po 3 dneh okuženi z glivo oz. glivami. Po 7 do 10 dneh inokulacije so bile vidne že tudi okužbe z bakterijami. Največ 74,30% brstov je bilo okuženih z glivo *Pestalotia* sp., 16,20% z glivo *Phomopsis* sp., 6,70% z glivo *Trichoderma* sp. in samo 2,79% brstov se je okužilo z glivo *Penicillium* sp.. Pri obravnavanjih z razkuževanjem je bilo nekaj brstov uničenih z razkužili. Največ propadlih brstov je bilo pri petem do osmem obravnavanju, kjer smo neoluščene brste namočili za 5 min v 96% EtOH. Pri teh obravnavanjih je bila preživelost brstov od 1,81 do 7,27%. Več brstov je preživel in bilo vitalnih pri devetem do dvanajstem obravnavanju, kjer smo EtOH nadomestili s H<sub>2</sub>O. Tu je preživel od 4,54 do največ 34,54% brstov pri enajstem obravnavanju, kjer so bili brsti razkuženi 15 min s P. Gliva *Phomopsis* sp. je bila najštevilčnejša pri vseh 8 obravnavanjih, kljub uporabljenim razkužilom se je pojavila pri 15% vseh brstov, 4,88% brstov je bilo okuženih z glivo iz skupine *Mycelia* sterila, ki je v kontrolnem poskusu nismo zasledili, 1,93% brstov je bilo okuženih z glivo *Pestalotia* sp. in 0,34% z glivo *Penicillium* sp. Glivo *Trichoderma* sp. so uporabljena razkužila popolnoma uničila.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC  
CX *Prunus*/cherry/bud/sterilization procedure/vegetative propagation/tissue culture/rejuvenation/culture media  
CC AGRIS F30  
AU ČREŠNAR, Maja  
AA LUTHAR, Zlata (supervisor)/ CELAR, Franci (co-supervisor)  
PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy  
PY 2009  
TI INFLUENCE OF STERILIZATION ON BUD REGENERATION OF CHERRY (*Prunus subhirtella* L.)  
DT Graduation Thesis (Higher professional studies)  
NO IX, 36, [4] p., 7 tab., 14 fig., 2 ann., 21 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The process of micropropagation was performed on buds of 16 year old *Prunus subhirtella* L. cherry tree. In the control experiment we directly inoculated peeled and unpeeled buds onto induction media or previously soaked them for 5 min in 96% ethanol (EtOH) or sterile distilled H<sub>2</sub>O. The experiment of surface sterilization of buds included 8 treatments with 96% EtOH or sterile distilled H<sub>2</sub>O in combination with 1.66% dichloroisocyanuric acid (DICA) or 1.66% PeraSafe (P). All inoculated buds regardless of treatment in the control experiment were infected with fungus or fungi within 3 days. After 7 to 10 days from inoculation the buds began showing bacterial infections. The most, 74.30% of buds were infected with the fungus *Pestalotia* sp., 16.20% with the fungus *Phomopsis* sp., 6.70% with the fungus *Trichoderma* sp. and only 2.79% with the *Penicillium* sp. During sterilization treatments some buds were destroyed during the process. The most destroyed buds were seen in treatments five to eight, where unpeeled buds were soaked in 96% EtOH for 5 min. In these treatments the survival rates of buds were between 1.81 and 7.27%. More buds survived and remained vital in treatments nine to twelve, where EtOH was replaced with H<sub>2</sub>O. Here survival rates were between 4.54 and the most 34.54% of buds in treatment eleven, where buds were sterilized 15 min with P. The fungus *Phomopsis* sp. was most common in all 8 treatments. In spite of using sterilization agents it was present in 15% of all buds, 4.88% of buds were infected with the fungus *Mycelia sterila*, which was not detected in the control experiment, 1.93% of buds were infected with the fungus *Pestalotia* sp. and 0.34% with the fungus *Penicillium* sp. The fungus *Trichoderma* sp. was completely destroyed by used sterilization agents.

## KAZALO VSEBINE

|                                                                 | str.      |
|-----------------------------------------------------------------|-----------|
| Ključna dokumentacija                                           | III       |
| Key words documentation                                         | IV        |
| Kazalo vsebine                                                  | V         |
| Kazalo preglednic                                               | VII       |
| Kazalo slik                                                     | VIII      |
| Okrajšave in simboli                                            | IX        |
| <br>                                                            |           |
| <b>1 UVOD</b>                                                   | <b>1</b>  |
| 1.1 NAMEN NALOGE                                                | 2         |
| 1.2 CILJI NALOGE                                                | 2         |
| <b>2 PREGLED OBJAV</b>                                          | <b>3</b>  |
| 2.1 IZVOR IN BOTANIČNA RAZVRSTITEV                              | 3         |
| 2.2 SPLOŠNI OPIS IN GOJENJE ČEŠNJE <i>Prunus subhirtella</i> L. | 4         |
| 2.3 RAZMNOŽEVANJE <i>IN VITRO</i>                               | 4         |
| <b>2.3.1 Mikropropagacija</b>                                   | <b>5</b>  |
| <b>3 MATERIALI IN METODE DELA</b>                               | <b>7</b>  |
| 3.1 RASTLINSKI MATERIAL                                         | 7         |
| 3.2 METODE DELA                                                 | 7         |
| <b>3.2.1 Sestava gojišč</b>                                     | <b>7</b>  |
| <b>3.2.2 Priprava gojišč</b>                                    | <b>9</b>  |
| <b>3.2.3 Inicijacija kulture</b>                                | <b>9</b>  |
| 3.2.3.1 Priprava brstov                                         | 9         |
| 3.2.3.2 Opis sredstev za razkuževanje in razkuževanje brstov    | 10        |
| 3.2.3.3 Inokulacija brstov                                      | 11        |
| 3.2.3.4 Subkultivacija brstov in poganjkov                      | 12        |
| 3.2.3.5 Gojenje                                                 | 12        |
| 3.2.3.6 Bonitiranje in obdelava podatkov                        | 12        |
| <b>4 REZULTATI</b>                                              | <b>13</b> |
| 4.1 RAZKUŽEVANJE BRSTOV                                         | 13        |
| <b>4.1.1 Kontrolni poskus</b>                                   | <b>13</b> |
| <b>4.1.2 Razkuževanje z EtOH, DICA in P</b>                     | <b>17</b> |
| 4.2 MIKROPROPAGACIJA                                            | 23        |
| <b>4.2.1 Indukcija</b>                                          | <b>23</b> |
| <b>4.2.2 Regeneracija in razmnožitev</b>                        | <b>23</b> |
| <b>4.2.3 Koreninjenje</b>                                       | <b>25</b> |
| <b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI</b>                                     | <b>27</b> |
| 5.1 RAZPRAVA                                                    | 27        |
| <b>5.1.1 Kontrolni poskus</b>                                   | <b>27</b> |
| <b>5.1.2 Razkuževanje brstov</b>                                | <b>28</b> |

|              |                         |    |
|--------------|-------------------------|----|
| <b>5.1.3</b> | <b>Mikropropagacija</b> | 30 |
| 5.2          | SKLEPI                  | 32 |
| 6            | POVZETEK                | 33 |
| 7            | VIRI                    | 35 |
|              | ZAHVALA                 |    |
|              | PRILOGE                 |    |

## KAZALO PREGLEDNIC

|                                                                                                                                                                               | str. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Preglednica 1: Sestava gojišč za indukcijo, razmnoževanje in koreninjenje češnje <i>P. subhirtella</i>                                                                        | 8    |
| Preglednica 2: Število inokuliranih in okuženih brstov češnje <i>P. subhirtella</i> na indukcijskem gojišču v kontrolnem poskusu                                              | 13   |
| Preglednica 3: Število inokuliranih in okuženih brstov češnje <i>P. subhirtella</i> , razkuženih z EtOH, DICA in P po 3, 7, 13 in 21 dneh inokulacije na indukcijskem gojišču | 17   |
| Preglednica 4: Število okuženih brstov češnje <i>P. subhirtella</i> z različnimi glivami po razkuževanju z EtOH, DICA in P na indukcijskem gojišču                            | 18   |
| Preglednica 5: Število inokuliranih, okuženih in preživelih brstov češnje <i>P. subhirtella</i> razkuženih z EtOH, DICA in P na indukcijskem in razmnoževalnem gojišču        | 20   |
| Preglednica 6: Okuženi, propadli, regenerirani in razmnoženi brsti češnje <i>P. subhirtella</i> na razmnoževalnem gojišču                                                     | 23   |
| Preglednica 7: Število poganjkov češnje <i>P. subhirtella</i> , subkultiviranih na razmnoževalno gojišče in gojišče za koreninjenje                                           | 25   |



## KAZALO SLIK

|                                                                                                                                                                                               | str. |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Slika 1: Cvet okrasne češnje <i>Prunus subhirtella</i> L. (Opiola..., 2006)                                                                                                                   | 1    |
| Slika 2: Enoletni poganjek z brsti češnje <i>P. subhirtella</i>                                                                                                                               | 7    |
| Slika 3: Neoluščena brsta (A) in oluščena brsta (B) češnje <i>P. subhirtella</i>                                                                                                              | 10   |
| Slika 4: Inokulirani brsti češnje <i>P. subhirtella</i> na indukcijskem gojišču                                                                                                               | 12   |
| Slika 5: Odstotek glivičnih okužb brstov češnje <i>P. subhirtella</i> na indukcijskem gojišču po obravnavanjih v kontrolnem poskusu                                                           | 14   |
| Slika 6: Odstotek gliv <i>Pestalotia</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp., <i>Phomopsis</i> sp. in <i>Penicillium</i> sp. na brstih češnje <i>P. subhirtella</i> v kontrolnem poskusu              | 15   |
| Slika 7: Okuženi brsti 7 dni po inokulaciji na indukcijskem gojišču v kontrolnem poskusu: A – prvo obravnavanje; B – drugo obravnavanje; C – tretje obravnavanje; D – četrto obravnavanje     | 16   |
| Slika 8: Odstotek okuženih brstov češnje <i>P. subhirtella</i> z različnimi glivami po razkuževanju z EtOH, DICA in P na indukcijskem gojišču                                                 | 19   |
| Slika 9: Odstotek gliv <i>Pestalotia</i> sp., <i>Phomopsis</i> sp., <i>Penicillium</i> sp. in <i>Mycelia sterila</i> na brstih češnje <i>P. subhirtella</i> po razkuževanju z EtOH, DICA in P | 20   |
| Slika 10: Odstotek inokuliranih, okuženih, propadlih in preživelih brstov češnje <i>P. subhirtella</i> razkuženih z EtOH, DICA in P na indukcijskem in razmnoževalnem gojišču                 | 21   |
| Slika 11: Micelij gliv: A - <i>Pestalotia</i> sp., B - <i>Trichoderma</i> sp., C - <i>Phomopsis</i> sp., D - <i>Mycelia sterila</i>                                                           | 22   |
| Slika 12: Propadli in razprti brsti češnje <i>P. subhirtella</i> pri šestem in desetem obravnavanju na razmnoževalnem gojišču                                                                 | 24   |
| Slika 13: Odstotek preživelih, okuženih, propadlih in okuženih iz okolice brstov češnje <i>P. subhirtella</i>                                                                                 | 24   |
| Slika 14: Število poganjkov češnje <i>P. subhirtella</i> na razmnoževalnem gojišču in na gojišču za koreninjenje                                                                              | 26   |

## SIMBOLI IN OKRAJŠAVE

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

DICA - dikloroizocianurna kislina

P - PeraSafe

EtOH - etanol

BAP - 6-benzilamino purin; citokinin

IBA - indol maslena kislina, avksin

GA3 - giberelinska kislina, giberelin

pH - negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov

P. - *Prunus*

## 1 UVOD

Okrasna oz. japonska češnja *Prunus subhirtella* L. je drevo, ki cveti v jeseni oz. zgodaj spomladi. To je odvisno od jesenskega vremena. Kar ne odcveti jeseni, počaka do spomladi, do marca, aprila in cveti še pred olistanjem (slika 1) (Gliha, 2003).



Slika 1: Cvet okrasne češnje *Prunus subhirtella* L. (Opiola..., 2006)

Vegetativno razmnoževanje s potaknjenci pri večletnih lesnatih rastlinah je lahko zelo oteženo, zato lahko z alternativnim načinom razmnoževanja, kot je mikropropagacija, dosežemo želene rezultate. V postopkih mikropropagacije lahko iz fiziološko stare matične rastline pridobimo fiziološko pomlajene oz. rejuvenilizirane poganjke. Pomladitev je povratna sprememba organizma iz odrasle v juvenilno fazo, ki jo lahko dosežemo v postopku mikropropagacije z regeneracijo. Pomlajeni regeneranti oz. poganjki se lažje in hitreje ukoreninijo. Poganjki z močnim koreninskim sistemom se v postopku aklimatizacije zelo dobro prilagodijo zunanjim razmeram.

V *in vitro* razmerah lahko izhodiščni, pomlajen genotip vzdržujemo neomejeno dolgo oz. na nekaj subkultivacij obnovimo material zaradi somaklonske variabilnosti in po potrebi poganjke koreninimo, ne glede na rastno dobo. Na ta način lahko pocenimo proizvodnjo potaknjencev in s tem tudi sadike.

Pri vegetativnem razmnoževanju *in vivo* je material fiziološko toliko star, kot matična rastlina, ki nam predstavlja vir potaknjencev. Ti potaknjenci so morfološko zelo podobni rastlinam zraslih iz koščic, vendar so fiziološko toliko stari kot matična rastlina. Tu je običajno glavni vzrok težav pri *in vivo* koreninjenju. Čim je potaknjenec fiziološko starejši, tem težje se ukorenini. Za uspešno kulturo potaknjencev je potrebno, da je rastlina tako fiziološko kot morfološko mlada.

## 1.1 NAMEN NALOGE

Namen naloge je ugotoviti vpliv treh sredstev, etanola, dikloroizocianurne kisline in PeraSafe, na uspešnost razkuževanja in regeneracije oz. preživetje brstov češnje po razkuževanju. Uspešno razkuževanje mora uničiti čim več mikroorganizmov, ki so prisotni na rastlinskem materialu *in vivo* ter čim manj poškodovati rastlinsko tkivo. Rastlinske celice po razkuževanju morajo ohraniti sposobnost regeneracije oz. je postopek razkuževanja potrebno optimizirati v smer uspešne aseptične kulture. Lesnate rastline, ki rastejo več let *in vivo* so običajno okužene z več vrstami mikroorganizmov, zato je postopek razkuževanja oz. pridobitev aseptične kulture zelo zahteven, in je lahko ključnega pomena za uspeh gojenja v *in vitro* oz. mikropropagacije.

## 1.2 CILJI NALOGE

S pravilnim izborom postopka razkuževanja lahko bistveno vplivamo na uspeh mikropropagacije, ki je pri lesnatih rastlinah ključnega pomena za morfološko in fiziološko pomladitev materiala. Z razkuževanjem brstov z različnimi razkužili smo želeli uničiti čim več mikroorganizmov in čim manj poškodovati rastlinski material.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 IZVOR IN BOTANIČNA RAZVRSTITEV

Češnja izvira iz Male Azije, nekje med Črnim in Kaspijskim morjem ter Kavkazom. Divja češnja se je od tod razširila daleč izven tega območja. Prve gojene sorte so verjetno nastale tudi tam, vendar je območje nastajanja kulturnih sort daleč zunaj tega ozemlja oz. gen centra in sega do Male Azije pa vse do Jadranskega morja in Švice. V sodobnem času se je to območje močno razširilo, saj se češnje goji po vseh celinah, kjer podnebne razmere omogočajo njihovo rast. Prvotno so nastale sorte z naravno selekcijo v različnih lokalno omejenih območjih. Danes se gojijo nove sorte češenj v različnih državah po svetu, tudi zunaj prvotnih območij, zlasti po Kanadi, ZDA in severni Evropi (Smole, 2000). Češnjeve nasade je možno videti vse do Norveške.

Domnevajo, da so bile divje (avtohtone oz. izvirne) japonske češnje kultivirane že v 8. stoletju, če ne že prej (Gliha, 2006). Na Japonskem jo omenja zabeležena legenda iz leta 408. Evropejcem je znana šele iz prehoda iz 19. v 20. stoletje. Tedaj je bila tudi imenovana in botanično opisana ter leta 1901 uvedena v Evropo na Britansko otočje (Gliha, 2003). Njeno strokovno ime je *Prunus subhirtella* 'Autumnalis', po japonsko Juugatsu zakura (Porcher in sod., 2004).

Bistvenih za nastanek japonskih žlahtnih češenj v preteklosti je sedem vrst avtohtonih japonskih češenj. Te rastejo na različnih predelih in klimatih Japonske. Najstarejše sorte kultiviranih japonskih češenj so mutanti in naključni križanci iz narave, ki so jih ljudje kultivirali in naprej množili s cepljenjem, pozneje pa začeli tudi načrtno križati, s čimer so pridobili še bolj razkošne in žlahtne sorte (Gliha, 2006).

Za nastanek gojenih sort češenj je najpomembnejša selekcija *Cerasus*, v katero je uvrščena tudi vrsta *Prunus avium* L. (Smole, 2000). Gojene sorte izhajajo iz divje češnje. Botanična razvrstitev je povzeta po Fito-info (2003).

DEBLO: *Spermatophyta* - semenke  
PODDEBLO: *Magnoliophytina* - kritosemenke  
RAZRED: *Magnoliopsida* - dvokaličnice  
PODRAZRED: *Rosidae*  
NADRED: *Rosanae*  
RED: *Rosales* - šipkovci  
DRUŽINA: *Rosaceae* - rožnice  
PODRUŽINA: *Prunoideae* - koščičasto sadje  
ROD: *Prunus* - sliva  
VRSTA: *subhirtella* - okrasna češnja

## 2.2 SPLOŠNI OPIS IN GOJENJE ČEŠNJE *Prunus subhirtella* L.

Je srednje veliko drevo šibke oz. nežne rasti z belimi cvetovi z odtenkom roza barve, s starostjo doseže do 5 m višine in širine. Poganjkov je veliko, so drobni, tanki in zlahka upogljivi ter na jesen obilno obloženi s popki. Podobna zanimivost kot pri judeževcu (*Cercis siliquastrum*), kjer je pogosta kauliforija, je pri cvetovih, ki se še uspejo razpreti pri nižjih temperaturah. Ti v bistvu nimajo cvetnih pecljev in so tesno nagnjeni eden poleg drugega. Cvetni peclji so normalno dolgi cca. 1,5 cm. Polvrstnati (polpolnjeni) cvetovi so široki od 2,5 do 3 cm. So očarljivo nakodrani in popolnoma beli, včasih tudi roza nadahnjeni, z rumenkasto sredino iz prašnikov. V ugodnih jesenih pride do krasne kombinacije prvega cvetja in še neodpadlega listja ognjenih barv (slika 1) (Gliha, 2003).

Večini japonskih češenj moramo v vrtu nameniti dovolj prostora, da pride polno do izraza. Največkrat jo sadimo posamično (soliterno) na travnato površino, na sončno ali le delno senčno lego (Gliha, 2003).

Jesenska japonska češnja uspeva v različnih vrtnih tleh (peščena, ilovnata, humozna), ki naj ne bodo sušna, lahko so tudi zmerno vlažna, le voda ne sme zastajati. Ob sajenju je priporočljivo dodati dober kompost, lahko pa tudi dobro preperel hlevski gnoj (Gliha, 2003).

Poleg šarke, ki razen lovorikovcev ogroža celotni rod *Prunus* in Cvetne monilije (*Monilinia laxa*), ki je zadnje čase precej pogosta pri nas, japonska češnja nima bolezni in škodljivcev. Proti voluharju je priporočljivo sajenje v mreže (Gliha, 2003).

## 2.3 RAZMNOŽEVANJE *IN VITRO*

*In vitro* razmnoževanje vključuje veliko ročnega dela, ki ga je praktično nemogoče poceniti. Razlogi, zakaj ni bolj uveljavljeno pri razmnoževanju lesnatih rastlin, so tudi v neraziskanih in nevpeljanih vseh fazah dela. Tako je še vedno poglavitno razmnoževanje s potaknjenci, kjer so bili v zadnjih letih storjene številne izboljšave. Kljub temu pa pri nekaterih lesnatih rastlinah še ni dovolj učinkovito. Zato se iščejo nove možnosti, tudi v *in vitro* tehnikah, ki bi povečale odstotek koreninjenja in pri tem ohranile vitalnost rastline.

Pri večini lesnatih rastlinah poteka razmnoževanje s potaknjenci brez težav. Nasprotno pa določene rastlinske vrste s potaknjenci le s težavo ukoreninimo. Glede na zmožnost razmnoževanja/koreninjenja s potaknjenci se v literaturi pojavlja delitev lesnatih rastlin v dve skupini (Spethmann, 1997):

- lesnate rasline, ki jih lažje razmnožujemo/koreninimo in
- lesnate rasline, ki jih težje razmnožujemo/koreninimo

Za uspešno kulturo potaknjencev je zelo pomembna fiziološka starost le teh. Fiziološko mlajši potaknjenci se veliko lažje in boljše koreninijo, kot fiziološko starejši. Pri tem je seveda zelo pomembno fiziološko stanje matične rastline, ki predstavlja vir potaknjencev. Lesnate rastline v splošnem s starostjo postajajo tudi fiziološko starejše. Tako so potaknjenci, pridobljeni iz starih dreves, fiziološko stari in pričakovati je slab uspeh koreninjenja in rasti teh potaknjencev. Strmeti je torej potrebno k ohranjanju fiziološko mladih matičnih rastlin (rez nazaj, *in vitro* razmnoževanje).

Upoštevati je potrebno, da se vsi deli ene rastline ne nahajajo v enakem fiziološkem stanju in starosti. Spodnji del debla je fiziološko najmlajši, robovi krošnje pa so fiziološko najstarejši (Osterc, 2001). Enoletni poganjki, ki se pretežno uporabljajo za potaknjence so fiziološko najstarejši del drevesa. Kljub temu da so morfološko, vizuelno in po starosti najmlajši del rastline.

Uspešno se lahko izognemo starosti matične rastline in razmnožimo pomlajen material s tehnikami tkivnih kultur. Tovrstno razmnoževanje ima lepo prihodnost, saj z njim lahko na relativno majhnem prostoru vzgojimo veliko število potomcev. To pa lahko pomeni pocenitev proizvodnje sadilnega materiala.

### **2.3.1 Mikropropagacija**

Mikropropagacija je temeljna tehnika tkivnih kultur. Je osnova vsem ostalim tehnikam, kajti končni cilj tudi zahtevnejših postopkov je rastlina, ki jo s temi metodami ohranjamo in razmnožujemo. V postopkih tkivnih kultur razlikujemo dve glavni poti regeneracije. Iz apikalnih ali aksilarnih vršičkov - meristemov in iz adventivnih tkiv ali meristemov, iz katerih v naravi organi običajno ne nastanejo. Ti lahko nastajajo neposredno iz inokuliranega tkiva ali pa nastopa kot vmesna faza kalus (Bohanec, 1992).

Vegetativno, hitro razmnoževanje rastlin je z uporabo tkivnih kultur postalo močna gospodarska veja, ki se uporablja tudi v agrokulturi in gozdarstvu. Rastline razmnožujemo z mikropropagacijo, kadar želimo skrajšati čas razmnoževanja in gojiti veliko število rastlin na majhnem prostoru, neodvisno od letnega časa ali kadar je klasično razmnoževanje dolgotrajno in težavno. Omogoča nam gojenje in ohranjanje genetsko enakega materiala - kloniranje (Ravnikar, 1996).

Aksilarni brsti iz vrhov poganjkov so nagnjeni k temu, da iz njih nastanejo majhni stranski brsti v sterilnih laboratorijskih pogojih. Ti poganjki so nato ločeni od prvotnega poganjka in se lahko ukoreninijo ali pa ponovno razmnožijo. Mikropropagacija je v zadnjem času področje raziskav, s katero lahko uspešno *in vitro* razmnožujemo različne sadne vrste, vključno s češnjami (Webster, 1996).

Mikropropagacijo spremljajo tako negativni, kot pozitivni pojavi.

Negativni pojavi:

1. Oprema za postavitve mikropropagacijskega laboratorija je lahko dražja, kot oprema za postavitve preprostega rastlinjaka.
2. Prostori za aklimatizacijo so lahko dragi, ni pa nujno, saj za aklimatizacijo lahko zelo dobro izkoriščamo malo boljše rastlinjake oz. posamezne dele rastlinjakov. Mikropropagirane rastline se lahko težje aklimatizirajo in pogosto potrebujejo daljši čas, kot konvencionalno razmnožene.
3. Regeneracija iz adventivnih tkiv občasno lahko povzroči, tekom mikropropagacije, nezaželene somatske mutacije (samoklonska variabilnost).

Pozitivni pojavi:

1. Omogoča razmnoževanje vse leto ne glede na vremenske razmere.
2. Hitro razmnoževanje materiala, ki je v majhnih zalogah.
3. Razmnoževanje klonov, pri katerih imamo velike težave pri uporabi drugih metod.
4. Ni potrebna uporaba fitofarmacevtskih sredstev kot pri konvencionalnih metodah.
5. Lahko inducira genske spremembe v materialu, ki posledično izboljšajo njihovo običajno razmnoževanje, ni pa nujno. Lahko ugodno vplivajo na izražanje drugih agronomsko ali gospodarsko pomembnih lastnosti.

Tehnike mikropropagacije se najpogosteje uporabljajo za:

- povečanje materiala, ki je v manjših zalogah,
- razmnoževanje materiala, ki se počasi in težavno razmnožuje z običajnimi oz. obstoječimi metodami.

Razen potreb po specifični laboratorijski opremi in priboru je potrebno za uspešno mikropropagacijo obvladati posamezne faze dela. Uspešno mikropropagacijo sestavlja več faz dela: priprava matičnih rastlin, razkuževanje rastlinskega materiala, inokulacija kulture, indukcija – regeneracija, razmnoževanje poganjkov, podaljševanje poganjkov in koreninjenje ter aklimatizacija.



### 3 MATERIAL IN METODE DELA

V poskus smo vključili zimske brste okrasne češnje (*Prunus subhirtella* L.). Češnja raste na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete. Enoletne poganjke z zimskimi brsti smo porezali 22.3.2005 in v laboratoriju s skalpelom z njih odrezali brste, tako da smo jih pri bazi čim manj poškodovali. Brstom smo pustili oz. odstranili luskoliste, odvisno od obravnavanja in tako pripravljene namočili za 5 min v sterilno vodo oz. površinsko sterilizirali s 96% etanolom (EtOH) v kombinaciji za 15 oz. 20 min z 1,6% dikloroizocianurno kislino (DICA) oz. 1,6% PeraSafe (P).

#### 3.1 RASTLINSKI MATERIAL

V *in vitro* poskus smo vključili 1040 brstov z enoletnih poganjkov 40 let stare okrasne češnje (*Prunus subhirtella* L.) (slika 2).



Slika 2: Enoletni poganjek z brsti češnje *P. subhirtella* (Celar, 2005)

#### 3.2 METODE DELA

Poskus mikropropagacije je potekal v laboratoriju za aseptični delo, kjer smo lahko ves čas ohranjali pridobljeno aseptično kulturo brstov in regenerantov.

##### 3.2.1 Sestava gojišč

Gojišča za indukcijo, regeneracijo oz. za razmnoževanje ter koreninjenje so vsebovala makro- in mikroelemente ter organske sestavine MS (Murashige in Skoog, 1962) gojišča (preglednica 1). Saharoze, kot vir ogljikovih hidratov in ogljika, je bilo 30 g/l v gojišču za indukcijo in razmnoževanje ter 20 g/l v gojišču za koreninjenje. Večje razlike so bile v sestavi in količini rastlinskih hormonov. Gojišče za indukcijo je vsebovalo avksin 0,1 mg/l indol očetne kisline (IBA), citokinin 1 mg/l benzilamino purina (BAP) in giberelin 0,1

mg/l giberelinske kisline (GA3). Gojišče za razmnoževanje je imelo enako količino avksina IBA, polovico 0,5 mg/l citokinina BAP in enako giberelina GA3. V gojišču za koreninjenje je bilo le 1 mg/l avksina IBA. Vrednost pH vseh gojišč je bila 5,7 in kot strjevalec je bil dodan agar 7 g/l (preglednica 1).

Preglednica 1: Sestava gojišč za indukcijo, razmnoževanje in koreninjenje češnje *P. subhirtella*

| Sestavine                                            | Gojišča za |               |              |
|------------------------------------------------------|------------|---------------|--------------|
|                                                      | indukcijo  | razmnoževanje | koreninjenje |
| Makroelementi (mg/l)                                 |            |               |              |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 170        | 170           | 170          |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                      | 1650       | 1650          | 1650         |
| MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O                | 370        | 370           | 370          |
| KNO <sub>3</sub>                                     | 1900       | 1900          | 1900         |
| CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O                | 440        | 440           | 440          |
| Mikroelementi (mg/l)                                 |            |               |              |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 6,2        | 6,2           | 6,2          |
| MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O                | 22,3       | 22,3          | 22,3         |
| ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O                | 8,6        | 8,6           | 8,6          |
| KJ                                                   | 0,83       | 0,83          | 0,83         |
| CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O                | 0,025      | 0,025         | 0,025        |
| CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O                | 0,025      | 0,025         | 0,025        |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O | 0,25       | 0,25          | 0,25         |
| Na <sub>2</sub> Fe- EDTA                             | 37,2       | 37,2          | 37,2         |
| FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O                | 27,8       | 27,8          | 27,8         |
| Ogljikov hidrat (g/l)                                |            |               |              |
| Saharoza                                             | 30         | 30            | 20           |
| Organske snovi, vitamini, hormoni (mg/l)             |            |               |              |
| Inozitol                                             | 100        | 100           | 100          |
| Tiamin                                               | 0,1        | 0,1           | 0,1          |
| Nikotin                                              | 0,5        | 0,5           | 0,5          |
| Piridoksin                                           | 0,5        | 0,5           | 0,5          |
| Glicin                                               | 2          | 2             | 2            |
| IBA                                                  | 0,1        | 0,1           | 1            |
| BAP                                                  | 1          | 0,5           | —            |
| GA3                                                  | 1          | 0,1           | —            |
| Strjevalec (g/l) in pH vrednost                      |            |               |              |
| Agar                                                 | 7          | 7             | 7            |
| pH                                                   | 5,7        | 5,7           | 5,7          |

### 3.2.2 Priprava gojišč

Gojišča za mikropropagacijo češnje *P. subhirtella* smo pripravili tako, da smo zatehtali v čašo komercialno bazalno MS gojišče, saharozo in inozitol (preglednica 1) ter jih prelili z bidestilirano vodo. Sestavine smo raztopili z mešanjem s pomočjo teflonskega magneta na električnem mešalu. Nato smo odpipetirali in dodali še vitamine (tiamin, piridoksin in nikotin) ter hormone (IBA, BAP in GA3) iz založnih raztopin, da smo ohranili natančnost. Končni volumen, razen dodatka glicina, ki smo ga dodali filtrsko po avtoklaviranju, smo določili v merilni bučki in prelili nazaj v čašo ter umerili pH vrednost med mešanjem z dodatkom kapljic 1N KOH ali 1N HCl. Tako pripravljeno gojišče smo prelili v steklenice, primerne za avtoklaviranje (proizvajalca Schott-Duran) in dodali agar. Gojišče smo avtoklavirali pri temperaturi 121 °C in pritisku 1,1 bar, 20 min.

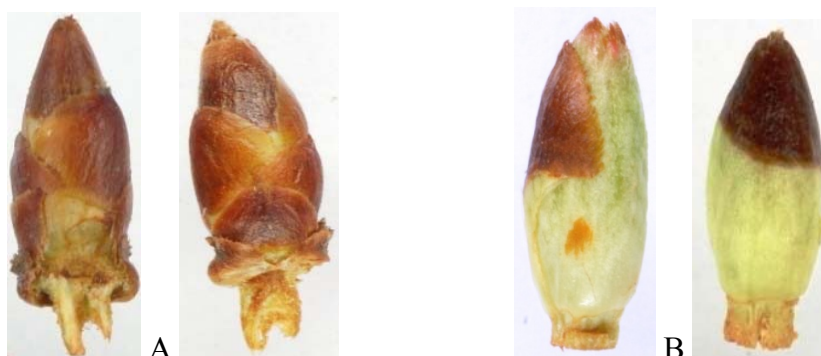
Po avtoklaviranju smo gojišča ohlajali pri sobni temperaturi ali v mrzli vodi ob neprestanem mešanju do približno 40 °C tik pred strjevanjem. V brezprašni komori smo še filtrsko dodali 2 mg/l glicina in temeljito premešali z vrtenjem steklenice, da se je snov enakomerno porazdelila po celem volumnu gojišča. Še toplo, a ne strjeno gojišče za indukcijo in regeneracijo oz. začetno razmnoževanje smo razlili v sterilne plastične petrijevke ø 90 x 15 mm, za razmnoževanje in koreninjenje v predhodno sterilizirane steklene kozarce s polipropilenskim pokrovom ø 55 x 72 mm in pustili, da se je gojišče ohladilo in strdilo.

### **3.2.3 Inicijacija kulture**

Na sterilno indukcijsko gojišče smo inokulirali razkuževane brste, na razmnoževalno gojišče inducirane brste in poganjke pri katerih smo izzvali razraščanje aksilarnih brstov ter na gojišče za koreninjenje vitalne poganjke.

#### **3.2.3.1 Priprava brstov**

Enoletne poganjke, z zaprtimi brsti in v začetni fazi odpiranja brstov, smo odrezali 22. Marca 2005 iz matičnih rastlin in jih prenesli v laboratorij. S pomočjo skalpela smo brste pri bazi odrezali s poganjka. Zimski brsti so obdani z rjavimi luskolisti. Tik pred razkuževanjem smo previdno, da čim manj poškodujemo tkivo, s skalpelom odstranili zunanje rjavo obarvane luskoliste (slika 3A in 3B).



Slika 3: Neoluščena brsta (A) in oluščena brsta (B) češnje *P. subhirtella* (Črešnar, 2005)

### 3.2.3.2 Opis sredstev za razkuževanje in razkuževanje brstov

#### **Etanol (EtOH)**

Etanol ( $C_2H_5OH$ ) oz. etil-alkohol je najpomembnejši alkohol, je v skupini kemičnih spojin, kjer molekule vsebujejo hidroksi -OH skupino, vezano na ogljikov atom. Je čista, brezbarvna tekočina, pekočega okusa, v razredčeni obliki ima neke vrste svež vonj, v bolj koncentrirani obliki pa bolj žgoči, ki hitro hlapi in se z vodo meša v vsakem razmerju. Zgori z modrim, zelo vročim plamenom v  $CO_2$  in  $H_2O$ . Tališče ima pri  $-114\text{ }^{\circ}C$  in vrelišče pri  $78,5\text{ }^{\circ}C$ , njegova specifična gostota je  $0,789\text{ g/ml}$  pri  $20\text{ }^{\circ}C$ . Izdelujejo ga z procesom vrenja, tudi veliko drugih organizmov ga uporablja za pridobitev energije iz sladkorja. Uporablja se za razkuževanje delovnih površin, laboratorijskega materiala, za izdelavo lakov, za proizvodnjo kisa, za zdravila, za izdelavo raznih zdravilnih ekstraktov (izvlečkov), v kozmetiki in za gorivo. Največ ga uporabljajo za pripravo alkoholnih pijač. V Rusiji izdelujejo iz njega sintetični kavčuk. Velikokrat ga primešajo bencinu za pogon eksplozijskih motorjev (Etanol..., 2002; Schroter in sod., 1993).

#### **Dikloroizocianurna kislina (DICA)**

Dikloroizocianurna kislina ( $C_3Cl_2N_3NaO_3$ ) je v obliki belega prahu oz. granul. Reakcija nastane, kadar je izpostavljena ognju ali pri mešanju z kisikovimi spojinami. pH vrednost je  $5,5 - 7,0$ . Klor v trdi obliki je obstojnejši kot v tekočini, kjer na svetlobi zelo hitro razpade in se veže s kisikom v neaktivno komponento (Sigma – Aldrich, 2006).

#### **PeraSafe (P)**

PeraSafe je pripravek v prahu, modro-bele barve, za varno in hitro sterilizacijo. V neodvisnih poskusih je dokazano, da je učinkovit proti bakterijam, virusom (HIV, hepatitis B in C), mikrobakterijam, glivam in sporam. Največ se uporablja za dezinfekcijo medicinskih instrumentov. PeraSafe je kemično peroksidni kompleks, ki sprošča peracetilne ione, ki dosežejo ravnotežje pri pH  $8,0$ . Raztopina vsebuje tudi vodikov peroksid in ocatno kislino in se razkroji v ogljikov dioksid in vodo (PeraSafe..., 2004).

### Kontrolni poskus

1. direktna inokulacija neoluščenih brstov = 40 brstov
2. direktna inokulacija oluščenih brstov = 47 brstov
3. neoluščeni brsti + EtOH - 5min = 40 brstov
4. neoluščeni brsti + H<sub>2</sub>O - 5min = 40 brstov

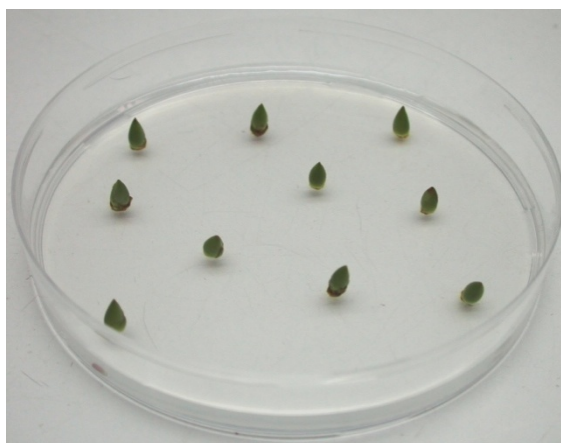
### Razkuževanje

5. neoluščeni brsti + EtOH – 5 min → oluščeni brsti + DICA – 15 min = 110 brstov
6. neoluščeni brsti + EtOH – 5 min → oluščeni brsti + DICA – 20 min = 110 brstov
7. neoluščeni brsti + EtOH – 5 min → oluščeni brsti + P – 15 min = 110 brstov
8. neoluščeni brsti + EtOH – 5 min → oluščeni brsti + P – 20 min = 110 brstov
9. neoluščeni brsti + H<sub>2</sub>O – 5 min → oluščeni brsti + DICA – 15 min = 110 brstov
10. neoluščeni brsti + H<sub>2</sub>O – 5 min → oluščeni brsti + DICA – 20 min = 110 brstov
11. neoluščeni brsti + H<sub>2</sub>O – 5 min → oluščeni brsti + P – 15 min = 110 brstov
12. neoluščeni brsti + H<sub>2</sub>O – 5 min → oluščeni brsti + P – 20 min = 110 brstov

Polovico neoluščenih brstov smo najprej 5 min namakali v sterilni bidestilirani H<sub>2</sub>O, ostalo polovico pa smo 5 min predhodno razkuževali s 96% EtOH. Pred nadaljnjim razkuževanjem smo previdno odstranili zunanje luskoliste in jih potem razkuževali 15 oz. 20 min z 1,6% DICA oz. 1,6% P. V 100 ml erlenmajerico smo nalili 50 ml bidestilirane vode, pokrili z dvema plastema alufolije in avtoklavirali. Zatehtali smo 0,83 g DICA in 0,83 g P in vsakega posebej stopili v 50 ml avtoklavirane vode in dodali 3 kapljice detergenta Tween 20 za boljšo omočljivost. Med razkuževanjem smo material večkrat premešali. Po 15 oz. 20 min smo odlili razkužilo in brste spirali z avtoklavirano bidestilirano vodo. Postopek spiranja smo ponovili trikrat, da smo čim bolj odstranili ostanke razkužila. Tako pripravljene brste smo zračno osušili na sterilnem filternem papirju in jih inokulirali na indukcijsko gojišče (preglednica 1). Skupno so bili štirje kontrolni poskusi, z oznakami 1 do 4 in osem postopkov razkuževanja oz. obravnavanj z oznakami 5 do 8.

#### 3.2.3.3 Inokulacija brstov

Razkužene brste češnje *P. subhirtella* smo po 10 oz. 11 ali 12 pri drugem obravnavanju inokulirali na indukcijsko gojišče v petrijevke ø 90 x 15 mm (slika 4). Petrijevke v katerih je bila kultura smo pred izhlapevanjem gojišča in morebitno sekundarno okužbo zaščitili s parafilmom. Uporabljeno orodje, pincete in skalpele smo sproti sterilizirali v visokotemperaturnem grelcu oz. suhem sterilizatorju pri 815 °C. Delo je ves čas potekalo v aseptičnih pogojih v brezprašni komori.



Slika 4: Inokulirani brsti češnje *P. subhirtella* na indukcijskem gojišču (Črešnar, 2008)

#### 3.2.3.4 Subkultivacija brstov in poganjkov

Brste smo po indukciji in začetku regeneracije, 21 dni po inokulaciji na indukcijsko gojišče, po 10 brstov subkultivirali na razmnoževalno gojišče v petrijevke. Poganjke velike 1,5 – 2 cm smo subkultivirali na gojišče za koreninjenje v steklene kozarce s polipropilenskim pokrovom (preglednica 1).

#### 3.2.3.5 Gojenje

Brste in regenerante smo gojili v rastni komori pri temperaturi  $25 \pm 1$  °C in fotoperiodi 16/8 ur (svetloba/tema) ter intenziteti svetlobe  $34 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

#### 3.2.3.6 Bonitiranje in obdelava podatkov

Vsak teden smo opravili bonitiranje. Popisali smo okužene brste in vrsto glivične okužbe, število induciranih brstov in nastalih regenerantov primernih za nadaljnje razmnoževanje in koreninjenje ter število propadlih brstov in poganjkov. Zbrane podatke smo uredili tabelarično in grafično. Izračunali smo odstotek okuženih brstov z različnimi glivami glede na obravnavanje oz. način sterilizacije ter odstotek preživelih brstov oz. poganjkov na indukcijskem oz. razmnoževalnem gojišču.

## 4 REZULTATI

### 4.1 RAZKUŽEVANJE BRSTOV

V težnji, da dobimo vitalno aseptično kulturo brstov brez poškodb od uporabljenih razkužil, smo izbrali štiri kontrolne poskuse in osem različnih postopkov razkuževanja.

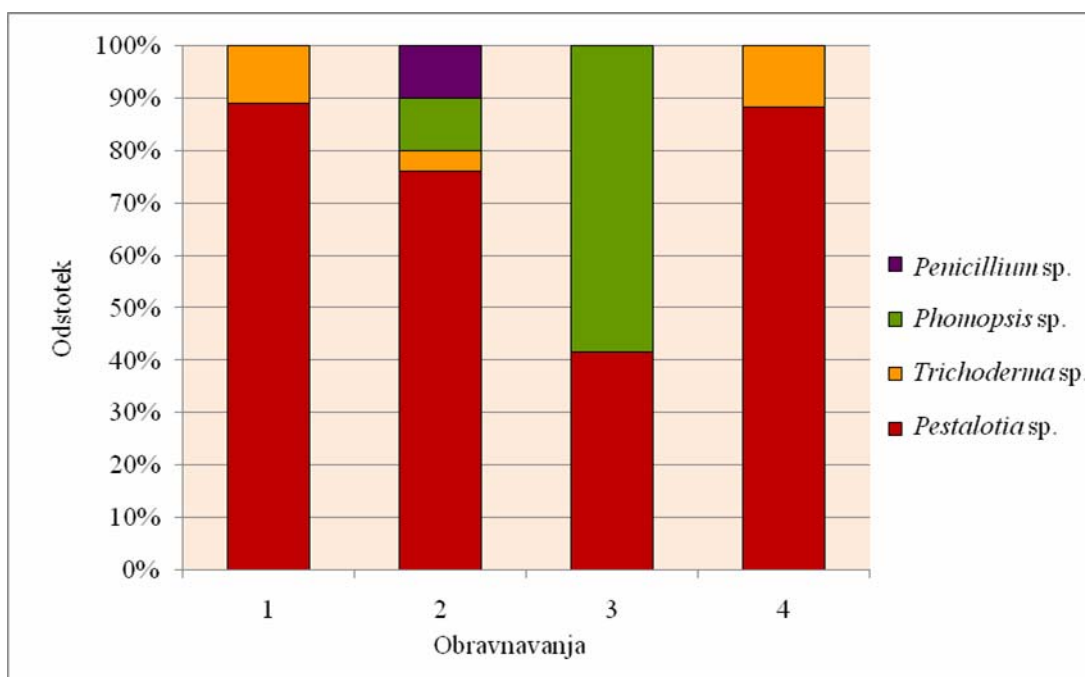
#### 4.1.1 Kontrolni poskus

Na gojišču za indukcijo se je 3 dni po inokulaciji začela pojavljati glivična okužba na vseh 167 brstih kontrolnega poskusa (preglednica 2, slika 5, 6, 7 in priloga A).

Preglednica 2: Število inokuliranih in okuženih brstov češnje *P. subhirtella* na indukcijskem gojišču v kontrolnem poskusu

| Obravnavanje     | Št. inokuliranih brstov | Gliva                 |                        |                      |                        |
|------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
|                  |                         | <i>Pestalotia</i> sp. | <i>Trichoderma</i> sp. | <i>Phomopsis</i> sp. | <i>Penicillium</i> sp. |
| 1                | 40                      | 40                    | 5                      | 0                    | 0                      |
| 2                | 47                      | 38                    | 2                      | 5                    | 5                      |
| 3                | 40                      | 17                    | 0                      | 24                   | 0                      |
| 4                | 40                      | 38                    | 5                      | 0                    | 0                      |
| Skupno št. okužb |                         | 133                   | 12                     | 29                   | 5                      |

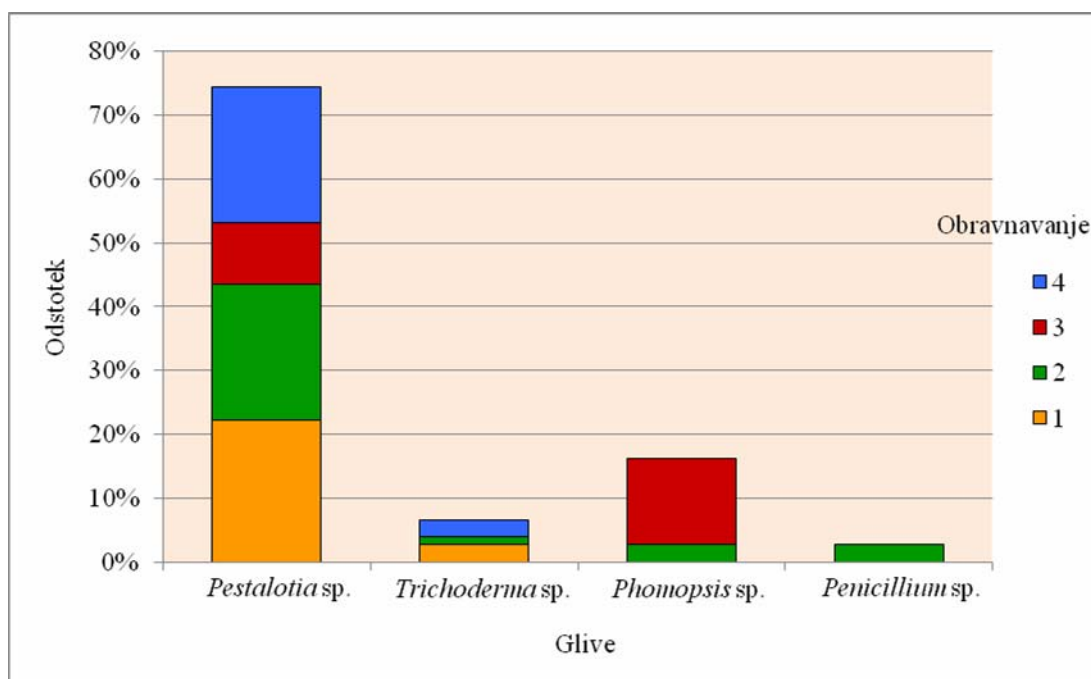
V kontrolnem poskusu s štirimi obravnavanji smo določili na inokuliranih brstih 4 različne rodove gliv. Najbolj pogosto se je pojavljala gliva *Pestalotia* sp., kar pri 133 brstih in je bila prisotna v vseh štirih obravnavanjih. Najmanj, samo 17 brstov je bilo okuženih z glivo *Pestalotia* sp. pri tretjem obravnavanju, po 38 brstov pri drugem in četrtem in največ vseh 40 brstov pri prvem obravnavanju. Gliva *Trichoderma* sp. se je pojavila pri 12 brstih v treh obravnavanjih, razen pri tretjem obravnavanju. Največkrat po 5 krat pri prvem in četrtem obravnavanju ter 2 krat pri drugem obravnavanju. Gliva *Phomopsis* sp. se je pojavila pri 29 brstih in sicer 5 krat v drugem in 24 krat v tretjem obravnavanju. *Penicillium* sp. je bila prisotna samo pri drugem obravnavanju in to v petih primerih. Skupno je bilo 45 okužb pri prvem obravnavanju, 50 pri drugem, 41 pri tretjem in 43 pri četrtem obravnavanju. Nekateri brsti so bili okuženi z več kot eno glivo (preglednica 2, slika 7 in priloga A).



Slika 5: Odstotek glivičnih okužb brstov češnje *P. subhirtella* na indukcijskem gojišču po obravnavanjih v kontrolnem poskusu

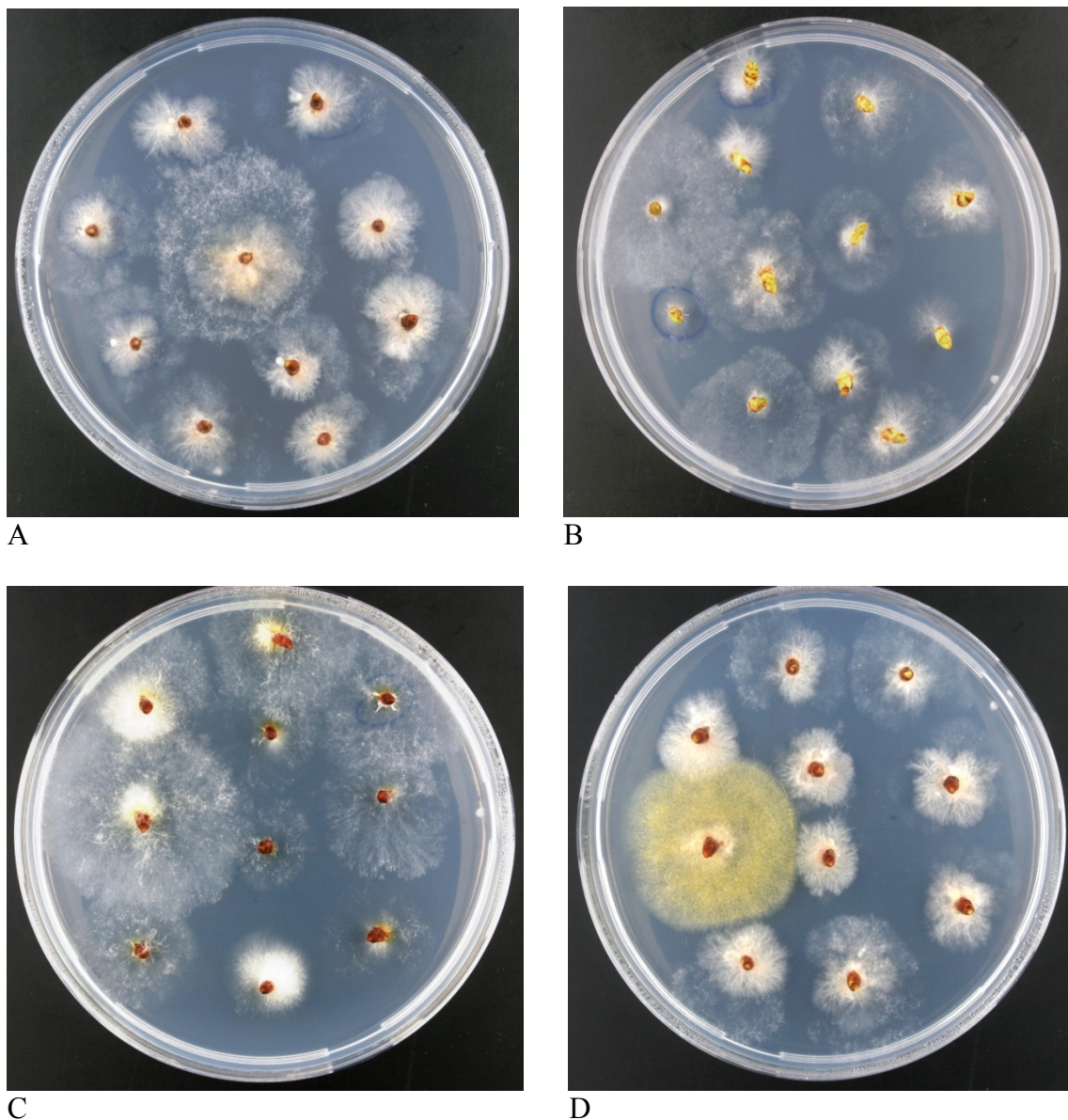
Pri prvem obravnavanju je bilo okuženih 88,89% brstov češnje *P. subhirtella* z glivo *Pestalotia* sp. in 11,11% brstov z glivo *Trichoderma* sp.. Pri drugem obravnavanju je bilo 76,00% brstov okuženih z glivo *Pestalotia* sp., 4,00% brstov z glivo *Trichoderma* sp., 10,00% brstov se je okužilo z glivo *Phomopsis* sp. in prav tako 10,00% brstov z glivo *Penicillium* sp.. Pri tretjem obravnavanju se je z glivo *Pestalotia* sp. okužilo 41,46% brstov in z glivo *Phomopsis* sp. 58,54% brstov. Pri četrtem obravnavanju se je okužilo 88,37% brstov z glivo *Pestalotia* sp. in 11,63% brstov z glivo *Trichoderma* sp. (slika 5 in 7).





Slika 6: Odstotek gliv *Pestalotia* sp., *Trichoderma* sp., *Phomopsis* sp. in *Penicillium* sp. na brstih češnje *P. subhirtella* v kontrolnem poskusu

V kontrolnem poskusu je bilo skupno 74,30% brstov češnje *P. subhirtella* okuženih z glivo *Pestalotia* sp., 16,20% z glivo *Phomopsis* sp., 6,70% z glivo *Trichoderma* sp. ter samo 2,79% z glivo *Penicillium* sp. (slika 6 in 7).



Slika 7: Okuženi brsti 7 dni po inokulaciji na induksijskem gojišču v kontrolnem poskusu: A = prvo obravnavanje; B = drugo obravnavanje; C = tretje obravnavanje; D = četrto obravnavanje (Celar, 2005)

Pojav gliv na brstih in gojiščih je bil zelo hiter, že tri dni po inokulaciji smo opazili sledove prvih hif. Sedem dni po inokulaciji je gliva že prerasla brst in je bila okužba jasno vidna (slika 7 A, B, C in D). V tem obdobju se je začela pojavljati tudi bakterijska okužba (slika 7C - tretja vrsta, prvi brst od leve proti desni). Bakterijska okužba se je pojavila in razvijala bistveno počasneje od glivične okužbe.

#### 4.1.2 Razkuževanje z EtOH, DICA in P

Preglednica 3: Število inokuliranih in okuženih brstov češnje *P. subhirtella*, razkuženih z EtOH, DICA in P po 3, 7, 13 in 21 dneh inokulacije na indukcijskem gojišču

| Obravnavanje | Št. inokuliranih brstov | Št. okuženih brstov po inokulaciji |       |        |        | Št. propadlih brstov/okuženi iz okolice | Št. preživelih brstov |
|--------------|-------------------------|------------------------------------|-------|--------|--------|-----------------------------------------|-----------------------|
|              |                         | 3 dni                              | 7 dni | 13 dni | 21 dni |                                         |                       |
| 5            | 110                     | 9                                  | 6     | 0      | 1      | 1/20                                    | 73                    |
| 6            | 110                     | 35                                 | 16    | 2      | 0      | 1/24                                    | 32                    |
| 7            | 110                     | 1                                  | 18    | 1      | 1      | 1/29                                    | 59                    |
| 8            | 110                     | 0                                  | 25    | 0      | 1      | 1/35                                    | 48                    |
| 9            | 110                     | 23                                 | 17    | 0      | 0      | 1/23                                    | 46                    |
| 10           | 110                     | 3                                  | 44    | 2      | 1      | 0/16                                    | 44                    |
| 11           | 110                     | 28                                 | 12    | 3      | 2      | 0/15                                    | 50                    |
| 12           | 110                     | 36                                 | 27    | 3      | 1      | 0/23                                    | 20                    |

Brsti so bili na indukcijskem gojišču 3 tedne oz. 21 dni. Tri dni po inokulaciji se je pri petem obravnavanju okužilo 9 brstov, pri šestem obravnavanju 35 brstov, pri sedmem obravnavanju se je okužil 1 brst, pri osmem obravnavanju ni bilo okuženih brstov, pri devetem obravnavanju se je okužilo 23 brstov, pri desetem obravnavanju so se okužili 3 brsti, pri enajstem obravnavanju se je okužilo 28 brstov in pri dvanajstem obravnavanju 36 brstov (preglednica 3).

Sedem dni po inokulaciji je bilo pri petem obravnavanju dodatno 6 okuženih brstov, pri šestem obravnavanju 16 okuženih brstov, pri sedmem obravnavanju 18 okuženih brstov, pri osmem obravnavanju 25 okuženih brstov, pri devetem obravnavanju 17 okuženih brstov, pri desetem obravnavanju 44 okuženih brstov, pri enajstem obravnavanju 12 okuženih brstov in pri dvanajstem obravnavanju 27 okuženih brstov (preglednica 3).

Trinajst dni po inokulaciji sta bila pri šestem in desetem obravnavanju dodatno okužena po 2 brsta, pri sedmem obravnavanju 1 brst, pri enajstem in dvanajstem obravnavanju pa so bili okuženi po 3 brsti. Pri petem, osmem in devetem obravnavanju ni bilo okuženih brstov (preglednica 3).

Enaindvajset dni po inokulaciji se je na gojišču za indukcijo pri petem, sedmem, osmem, desetem in dvanajstem obravnavanju okužil po 1 brst, pri enajstem obravnavanju pa 2. Pri šestem in devetem obravnavanju ni bilo okuženih brstov (preglednica 3).

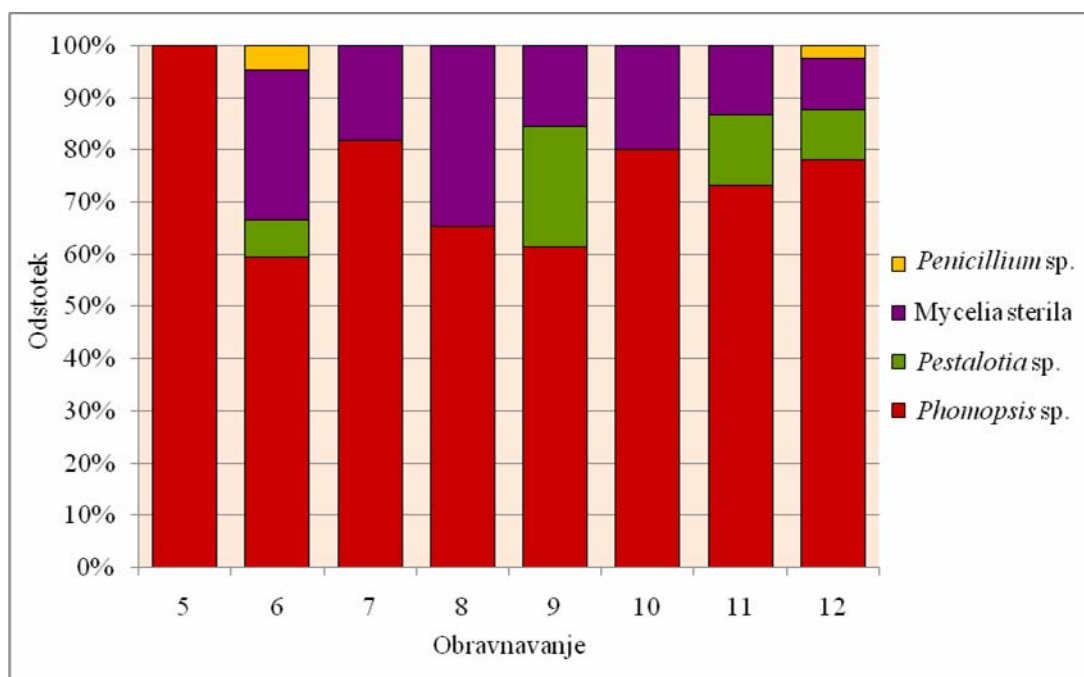
Pri petem, šestem, sedmem, osmem in devetem obravnavanju je v obdobju 21 dni po en brst propadel, luskolisti so postali temno rjavi (preglednica 3).

Pri vseh obravnavanjih od petega do dvanajstega so se brsti zaradi prepoznega prestavljanja na sveže gojišče okužili od sosednjih okuženih brstov. Pri petem obravnavanju se je okužilo 20 brstov, pri šestem obravnavanju 24 brstov, pri sedmem obravnavanju 29 brstov, pri osmem obravnavanju kar 35 brstov, pri devetem obravnavanju 23 brstov, pri desetem obravnavanju 16 brstov, pri enajstem obravnavanju 15 brstov in pri dvanajstem obravnavanju 23 brstov (preglednica 3).

Preglednica 4: Število okuženih brstov češnje *P. subhirtella* z različnimi glivami po razkuževanju z EtOH, DICA in P na indukcijskem gojišču

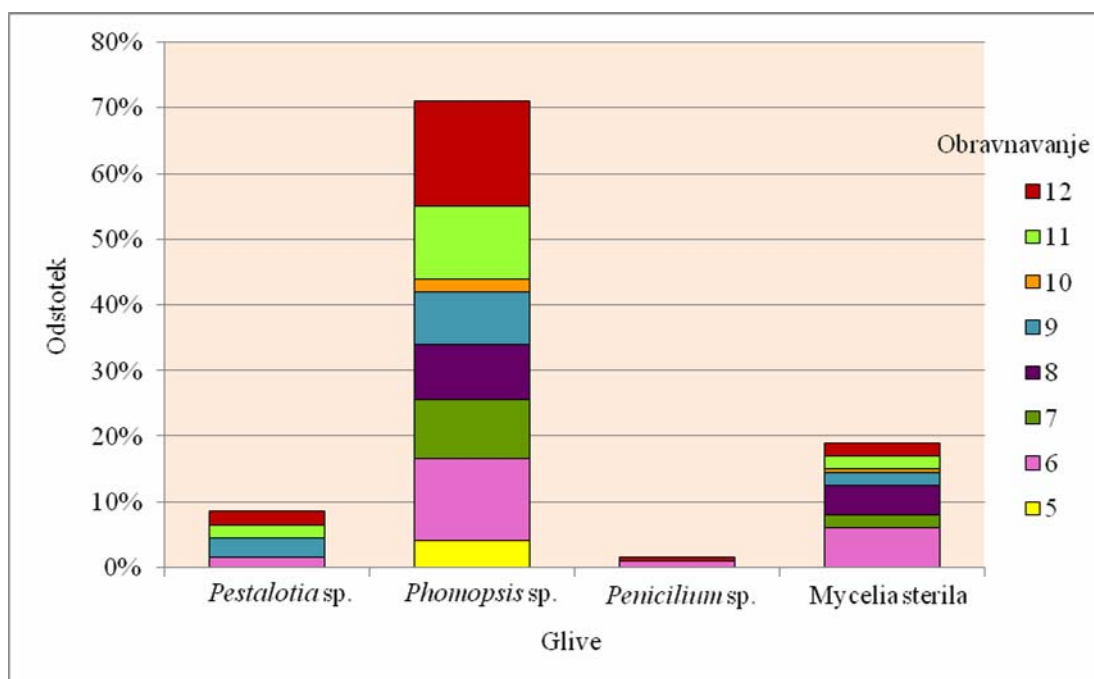
| Obravnavanja     | Gliva                 |                      |                        |                        |
|------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|------------------------|
|                  | <i>Pestalotia</i> sp. | <i>Phomopsis</i> sp. | <i>Penicillium</i> sp. | <i>Mycelia</i> sterila |
| 5                | 0                     | 8                    | 0                      | 0                      |
| 6                | 3                     | 25                   | 2                      | 12                     |
| 7                | 0                     | 18                   | 0                      | 4                      |
| 8                | 0                     | 17                   | 0                      | 9                      |
| 9                | 6                     | 16                   | 0                      | 4                      |
| 10               | 0                     | 4                    | 0                      | 1                      |
| 11               | 4                     | 22                   | 0                      | 4                      |
| 12               | 4                     | 32                   | 1                      | 4                      |
| Skupno št. okužb | 17                    | 142                  | 3                      | 38                     |

Pri prvem prestavljanju brstov zaradi okužbe, se je pri petem obravnavanju pojavila gliva *Phomopsis* sp. v 8 primerih. V šestem obravnavanju so se pojavile vse tri glive, ki smo jih določili, *Pestalotia* sp. pri 3 brstih, *Phomopsis* sp. pri 25 brstih in *Penicillium* sp. pri 2 brstih ter neznana oranžno rjava gliva - brez spor *Mycelia* sterila pri 12 brstih. Pri naslednjem, sedmem obravnavanju sta se pojavili glivi *Phomopsis* sp. pri 18 brstih in *Mycelia* sterila pri 4 brstih. Pri osmem obravnavanju sta se pojavili enaki glivi kot pri sedmem obravnavanju, gliva *Phomopsis* sp. pri 17 brstih in *Mycelia* sterila pri 9 brstih. Pri desetem obravnavanju se je poleg glive *Phomopsis* sp. pri 16 brstih in *Mycelia* sterila pri 4 brstih pojavila še *Pestalotia* sp. pri 6 brstih. Pri desetem obravnavanju so bili okuženi samo 4 brsti z glivo *Phomopsis* sp. in 1 brst z glivo *Mycelia* sterila. Pri enajstem obravnavanju so bili okuženi 4 brsti z glivo *Pestalotia* sp., 22 brstov z glivo *Phomopsis* sp. in 4 brsti z glivo *Mycelia* sterila. Pri dvanajstem obravnavanju so bile prisotne vse 4 glive, *Pestalotia* sp. pri 4 brstih, *Phomopsis* sp. pri 32 brstih, *Penicillium* sp. pri 1 brstu in *Mycelia* sterila pri 4 brstih. Skupno se je pojavila gliva *Pestalotia* sp. 17 krat, gliva *Phomopsis* sp. 142 krat, gliva *Penicillium* sp. 3 krat in gliva *Mycelia* sterila 38 krat (preglednica 4 in priloga B).



Slika 8: Odstotek okuženih brstov češnje *P. subhirtella* z različnimi glivami po razkuževanju z EtOH, DICA in P na indukcijskem gojišču

Pri petem obravnavanju je pri okuženih brstih češnje *P. subhirtella* bila prisotna 100% samo gliva *Phomopsis* sp.. Pri šestem obravnavanju so se brsti okužili z vsemi 4 omenjenimi glivami. Gliva *Phomopsis* sp. se je pojavila pri 59,53% brstov, gliva *Pestalotia* sp. se je pojavila pri 7,14% brstov, gliva *Mycelia sterila* se je pojavila pri 28,57% brstov in gliva *Penicillium* sp. pri 4,76% brstov. Pri sedmem obravnavanju se je 81,82% brstov okužilo z glivo *Phomopsis* sp. in 18,18% brstov z glivo *Mycelia sterila*. Pri osmem obravnavanju se je 65,38% brstov okužilo z glivo *Phomopsis* sp. in 34,62% brstov z glivo *Mycelia sterila*. Pri devetem obravnavanju se je 61,54% brstov okužilo z glivo *Phomopsis* sp., 23,08% brstov se je okužilo z glivo *Pestalotia* sp. in 15,38% brstov se je okužilo z glivo *Mycelia sterila*. Pri desetem obravnavanju se je 80% brstov okužilo z glivo *Phomopsis* sp. in 20% brstov z glivo *Mycelia sterila*. Pri enajstem obravnavanju se je 73,34% brstov okužilo z glivo *Phomopsis* sp., 13,33% brstov se je okužilo z glivo *Pestalotia* sp. in prav tako 13,33% brstov se je okužilo z glivo *Mycelia sterila*. Pri dvanajstem obravnavanju se je 78,05% brstov okužilo z glivo *Phomopsis* sp., 9,76% brstov se je okužilo z glivo *Pestalotia* sp., 9,76% brstov se je okužilo z glivo *Mycelia sterila* in 2,43% brstov se je okužilo z glivo *Penicillium* sp. (slika 8).



Slika 9: Odstotek gliv *Pestalotia* sp., *Phomopsis* sp., *Penicillium* sp. in *Mycelia sterila* na brstih češnje *P. subhirtella* po razkuževanju z EtOH, DICA in P

Gliva *Pestalotia* sp. se je pojavila pri 8,50% brstov, gliva *Phomopsis* sp. se je pojavila pri 71,00% brstov, gliva *Penicillium* sp. pri 1,50% brstov in gliva *Mycelia sterila* pri 19,00% brstov (slika 9 in 11).

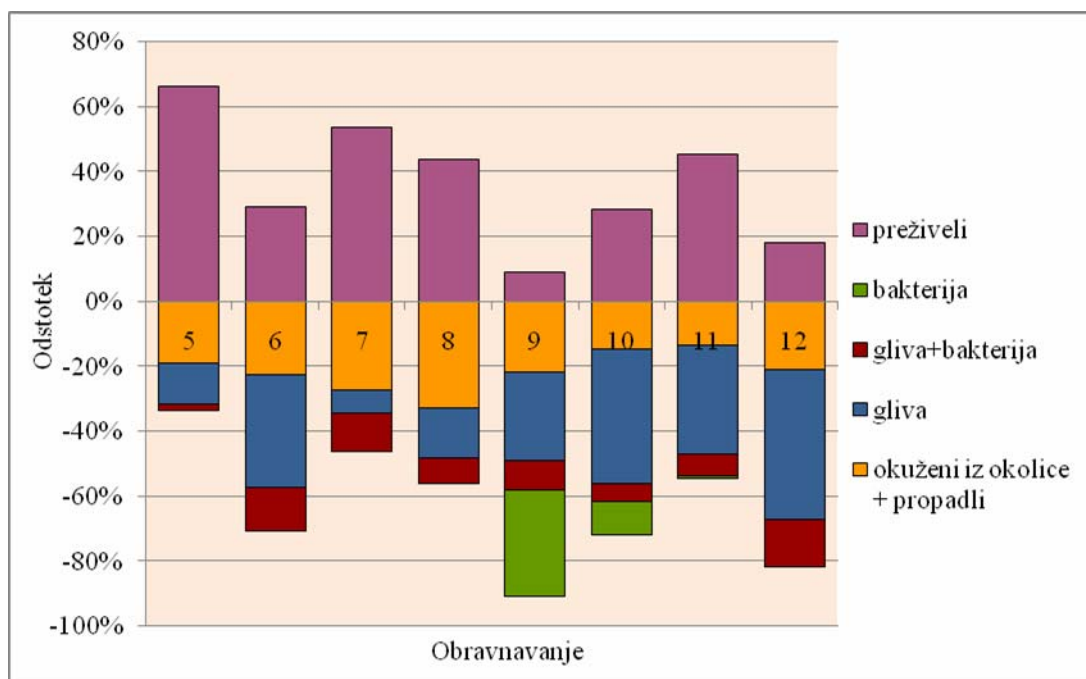
Preglednica 5: Število inokuliranih, okuženih in preživelih brstov češnje *P. subhirtella* razkuženih z EtOH, DICA in P na indukcijskem in razmnoževalnem gojišču

| Obravnavanje | Št. inokuliranih | Število okuženih |           |                 | Okuženi iz okolice | Propadli | Št. preživelih |
|--------------|------------------|------------------|-----------|-----------------|--------------------|----------|----------------|
|              |                  | gliva            | bakterija | gliva+bakterija |                    |          |                |
| 5            | 110              | 14               | 0         | 2               | 20                 | 1        | 73             |
| 6            | 110              | 38               | 0         | 15              | 24                 | 1        | 32             |
| 7            | 110              | 8                | 0         | 13              | 29                 | 1        | 59             |
| 8            | 110              | 17               | 0         | 9               | 35                 | 1        | 48             |
| 9            | 110              | 30               | 36        | 10              | 23                 | 1        | 10             |
| 10           | 110              | 46               | 11        | 6               | 16                 |          | 31             |
| 11           | 110              | 37               | 1         | 7               | 15                 |          | 50             |
| 12           | 110              | 51               | 0         | 16              | 23                 |          | 20             |

Na gojišču za indukcijo in razmnoževanje se je tri tedne po inokulaciji pri petem obravnavanju okužilo 16 brstov, 14 z glivo in 2 s kombinacijo glive in bakterije. 20 brstov se je okužilo z glivo oz. bakterijo sosednjega brsta oz. iz okolice, 1 brst je propadel, 73 brstov je preživel. Pri šestem obravnavanju se je okužilo 38 brstov z glivo in 15 brstov s



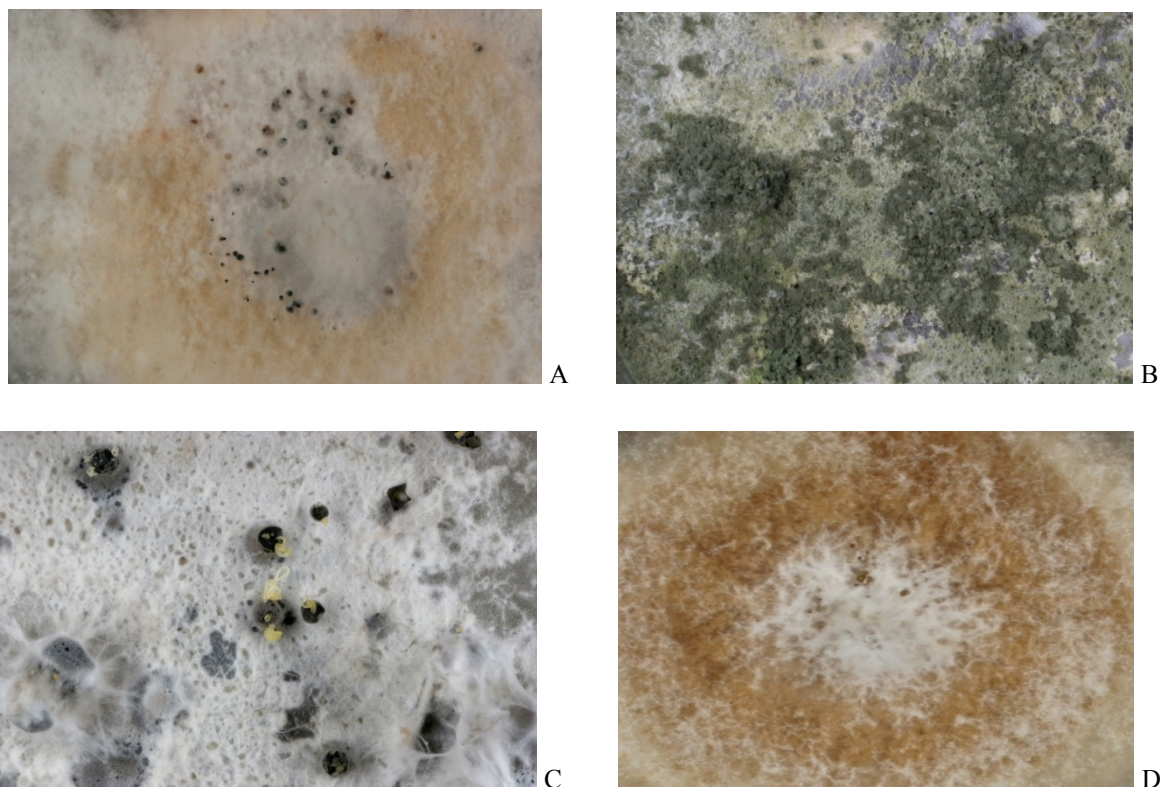
kombinacijo glive in bakterije. 24 brstov je bilo okuženih iz okolice, 1 brst je propadel, 32 brstov je preživel. Pri sedmem obravnavanju se je okužilo 8 brstov z glivo in 13 brstov s kombinacijo glive in bakterije. 29 brstov je bilo okuženih iz okolice, 1 brst je propadel, 59 brstov je preživel. Pri osmem obravnavanju se je okužilo 17 brstov z glivo in 9 brstov s kombinacijo glive in bakterije. 35 brstov je bilo okuženih iz okolice, 1 brst je propadel, 48 brstov je preživel. Pri devetem obravnavanju se je okužilo 30 brstov z glivo, 36 brstov z bakterijo in 10 brstov s kombinacijo glive in bakterije. 23 brstov se je okužilo iz okolice, 1 brst je propadel, 10 brstov je preživel. Pri desetem obravnavanju se je okužilo 46 brstov z glivo, 11 brstov z bakterijo in 6 brstov s kombinacijo glive in bakterije, 16 brstov je bilo okuženih iz okolice, 31 brstov je preživel. Pri enajstem obravnavanju se je okužilo 37 brstov z glivo, 1 brst z bakterijo in 7 brstov s kombinacijo glive in bakterije, 15 brstov se je okužilo iz okolice, 50 brstov je preživel. Pri dvanajstem obravnavanju se je okužilo 51 brstov z glivo in 16 brstov s kombinacijo glive in bakterije. 23 brstov se je okužilo iz okolice in 20 brstov je preživel (preglednica 5).



Slika 10: Odstotek inokuliranih, okuženih, propadlih in preživelih brstov češnje *P. subhirtella* razkuženih z EtOH, DICA in P na indukcijskem in razmnoževalnem gojišču

Pri petem obravnavanju se je 12,73% brstov okužilo z glivami, 1,82% brstov pa se je okužilo z kombinacijo glive in bakterije, 19,09% brstov se je okužilo iz okolice okuženih brstov oz. so propadli, 66,36% brstov je preživelih oz. so bili neokuženi. Pri šestem obravnavanju se je 34,54% brstov okužilo z glivami, 13,64% brstov se je okužilo s kombinacijo glive in bakterije, 22,73% brstov se je okužilo iz okolice oz. so propadli,

29,09% brstov je preživel. Pri sedmem obravnavanju se je 7,27% brstov okužilo z glivami, 11,82% se je okužilo s kombinacijo glive in bakterije, 27,27% brstov se je okužilo iz okolice oz. so propadli, 53,64% brstov je preživel. Pri osmem obravnavanju se je 15,45% brstov okužilo z glivami, 8,18% brstov se je okužilo s kombinacijo glive in bakterije, 32,73% brstov se je okužilo iz okolice oz. so propadli in 43,64% brstov je preživel. Pri devetem obravnavanju se je 27,27% brstov okužilo z glivami, 32,73% brstov se je okužilo z bakterijami na regeneracijskem gojišču, 9,09% brstov se je okužilo s kombinacijo glive in bakterije, 21,82% brstov se je okužilo iz okolice oz. so propadli in 9,09% brstov je preživel. Pri desetem obravnavanju se je 41,82% brstov okužilo z glivami, 10,00% brstov se je okužilo z bakterijami na regeneracijskem gojišču, 5,45% brstov se je okužilo s kombinacijo glive in bakterije, 14,55% brstov se je okužilo iz okolice oz. so propadli in 28,18% brstov je preživel. Pri enajstem obravnavanju se je 33,64% brstov okužilo z glivami, 0,91% se je okužilo z bakterijami, 6,36% brstov se je okužilo s kombinacijo glive in bakterije, 13,64% brstov se je okužilo iz okolice oz. so propadli in 45,45% brstov je preživel. Pri dvanajstem obravnavanju se je 46,36% brstov okužilo z glivami, 14,55% brstov se je okužilo s kombinacijo glive in bakterije, 20,91% brstov se je okužilo iz okolice oz. so propadli in 18,18% brstov je preživel (slika 10).



Slika 11: Micelij gliv: A - *Pestalotia* sp., B - *Trichoderma* sp., C - *Phomopsis* sp., D - Mycelia sterila (Celar, 2005)



## 4.2 MIKROPROPAGACIJA

### 4.2.1 Indukcija

Na indukcijskem gojišču so bili inokulirani brsti češnje *P. subhirtella* 21 dni. V tem obdobju so se brsti povečali, postali intenzivno zeleni in nekateri so se razprli. Nekaj neokuženih brstov je propadlo, odvisno od obravnavanja.

### 4.2.2 Regeneracija in razmnožitev

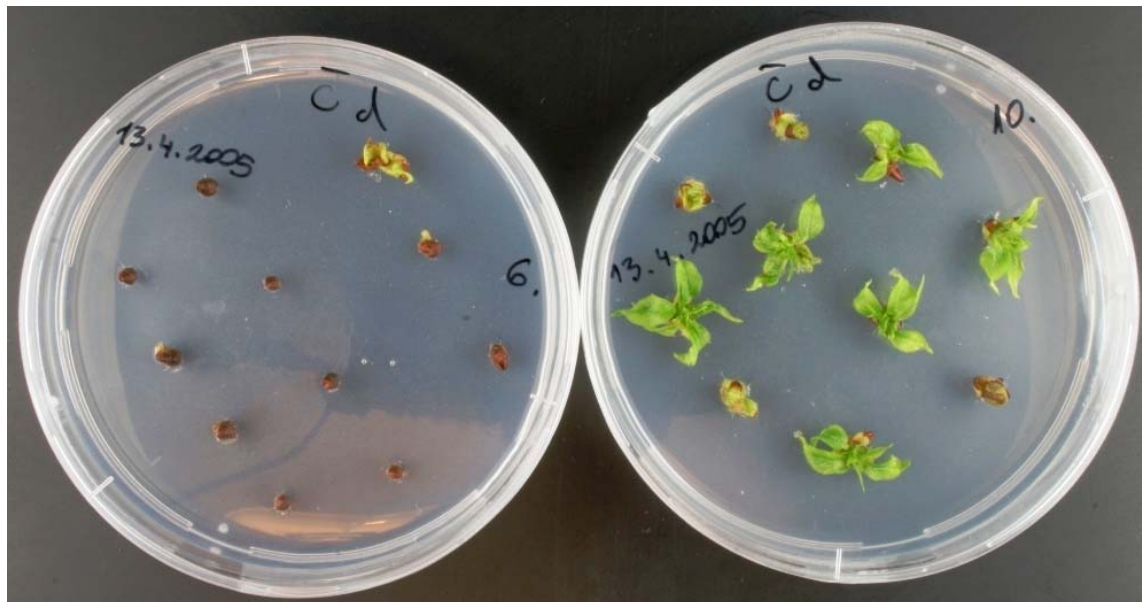
Po 3 tednih smo vitalne brste prestavili iz indukcijskega na regeneracijsko gojišče, oz. na gojišče za razmnoževanje.

Preglednica 6: Okuženi, propadli, regenerirani in razmnoženi brsti češnje *P. subhirtella* na razmnoževalnem gojišču

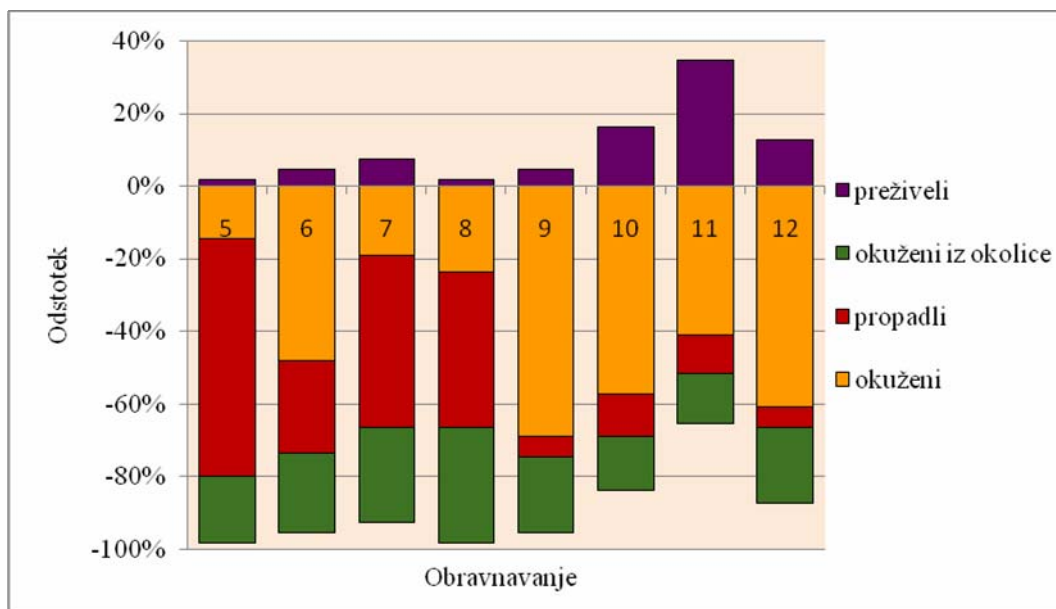
| Obravnavanje | Št. brstov                |          |           |                             |                 |
|--------------|---------------------------|----------|-----------|-----------------------------|-----------------|
|              | na razmnoževalnem gojišču | okuženih | propadlih | regeneriranih → razmnoženih | subkultiviranih |
| 5            | 73                        |          | 71        | 2 → 4                       | 4               |
| 6            | 32                        |          | 27        | 0                           | 5               |
| 7            | 59                        |          | 51        | 7 → 14                      | 15              |
| 8            | 48                        |          | 46        | 1 → 2                       | 3               |
| 9            | 46                        | 36       | 5         | 2 → 4                       | 7               |
| 10           | 44                        | 13       | 13        | 11 → 22                     | 29              |
| 11           | 50                        |          | 12        | 7 → 14                      | 45              |
| 12           | 20                        |          | 6         | 0                           | 14              |

Na regeneracijskem oz. razmnoževalnem gojišču sta se še v dveh primerih pojavili okužbi in sicer pri devetem in desetem obravnavanju po 8 in 22 dneh subkultivacije na regeneracijsko oz. razmnoževalno gojišče. Triintrideset dni po inokulaciji (16.5.2005) je pri petem obravnavanju propadlo 71 brstov, preživela sta 2 brsta iz katerih so se razmnožili 4 poganjki. Pri šestem obravnavanju je propadlo 27 brstov, 5 brstov pa je bilo subkultiviranih na razmnoževalno gojišče. Pri sedmem obravnavanju je propadlo 51 brstov, iz 7 se je regeneriralo 14 poganjkov. Pri osmem obravnavanju je propadlo 46 brstov, iz 1 sta se regenerirala 2 poganjka. Pri devetem obravnavanju se je okužilo 36 brstov, propadlo je 5 brstov, iz 2 so nastali 4 poganjki. Pri desetem obravnavanju se je okužilo 13 brstov in ravno toliko jih je propadlo, iz 11 pa je nastalo 22 poganjkov. Pri enajstem obravnavanju je propadlo 12 brstov, iz 7 je nastalo 14 poganjkov. Pri dvanajstem

obravnavanju je propadlo 6 brstov (preglednica 6). Večina propadlih brstov se ni razprla (slika 12).



Slika 12: Propadli in razprti brsti češnje *P. subhirtella* pri šestem in desetem obravnavanju na razmnoževalnem gojišču (Celar, 2005)



Slika 13: Odstotek preživelih, okuženih, propadlih in okuženih iz okolice brstov češnje *P. subhirtella*

Skupaj je pri petem obravnavanju preživelo 1,82% brstov, okužilo se je 14,55% brstov, propadlo je 65,45% brstov in 18,18% brstov je bilo okuženih iz okolice. Pri šestem obravnavanju je preživelo 4,55% brstov, okužilo se je 48,18% brstov, propadlo je 25,45%

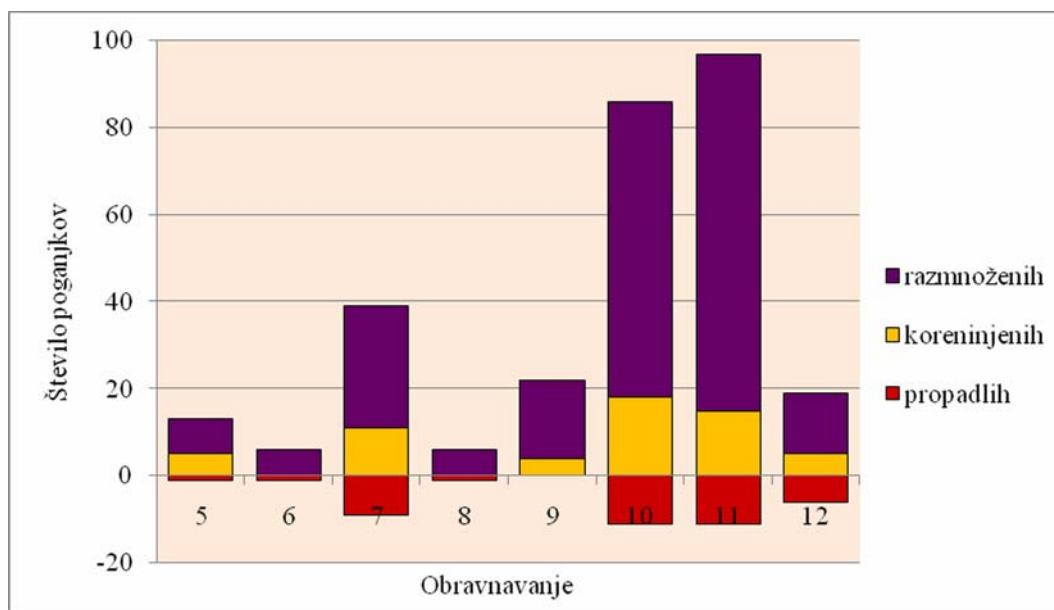
brstov in 21,82% brstov se je okužilo iz okolice. Pri sedmem obravnavanju je preživel 7,27% brstov, okužilo se je 19,09% brstov, propadlo je 47,28% brstov in 26,36% brstov se je okužilo iz okolice. Pri osmem obravnavanju je preživel 1,81% brstov, okužilo se je 23,64% brstov, propadlo je 42,73% brstov in 31,82% brstov se je okužilo iz okolice. Pri devetem obravnavanju je preživel 4,55% brstov, okužilo se je 69,09% brstov, propadlo je 5,45% brstov in 20,91% brstov se je okužilo iz okolice. Pri desetem obravnavanju je preživel 16,36% brstov, okužilo se je 57,27% brstov, propadlo je 11,82% brstov in 14,55% brstov se je okužilo iz okolice. Pri enajstem obravnavanju je preživel 34,54% brstov, okužilo se je 40,91% brstov, propadlo je 10,91% brstov in 13,64% brstov se je okužilo iz okolice. Pri dvanajstem obravnavanju je preživel 12,73% brstov, okužilo se je 60,91% brstov, propadlo je 5,45% brstov in 20,91% brstov se je okužilo iz okolice.

#### 4.2.3 Koreninjenje

Preglednica 7: Število poganjkov češnje *P. subhirtella* subkultiviranih na razmnoževalno gojišče in gojišče za koreninjenje

| Obravnavanje | Št. poganjkov          |           |              |             | Skupno preživeli |
|--------------|------------------------|-----------|--------------|-------------|------------------|
|              | na razmnoženem gojišču | propadlih | koreninjenih | razmnoženih |                  |
| 5            | 4                      | →1        |              |             | 13               |
|              |                        |           | →5           |             |                  |
|              |                        |           |              | →8          |                  |
| 6            | 5                      | →1        |              |             | 6                |
|              |                        |           | →0           |             |                  |
|              |                        |           |              | →6          |                  |
| 7            | 15                     | →9        |              |             | 39               |
|              |                        |           | →11          |             |                  |
|              |                        |           |              | →28         |                  |
| 8            | 3                      | →1        |              |             | 6                |
|              |                        |           | →0           |             |                  |
|              |                        |           |              | →6          |                  |
| 9            | 7                      | →0        |              |             | 22               |
|              |                        |           | →4           |             |                  |
|              |                        |           |              | →18         |                  |
| 10           | 29                     | →11       |              |             | 86               |
|              |                        |           | →18          |             |                  |
|              |                        |           |              | →68         |                  |
| 11           | 45                     | →11       |              |             | 97               |
|              |                        |           | →15          |             |                  |
|              |                        |           |              | →82         |                  |
| 12           | 14                     | →6        |              |             | 19               |
|              |                        |           | →5           |             |                  |
|              |                        |           |              | →14         |                  |

Pri petem obravnavanju se je iz 4 subkultiviranih poganjkov razmnožilo skupno 13 poganjkov, 5 poganjkov je bilo prestavljenih na gojišče za koreninjenje in 8 ponovno na gojišče za razmnoževanje. Pri šestem obravnavanju se je iz 5 poganjkov razmnožilo 6 poganjkov, ki so bili prestavljeni na gojišče za razmnoževanje. Pri sedmem obravnavanju se je iz 15 poganjkov razmnožilo 39 poganjkov, 11 je bilo prestavljenih na gojišče za koreninjenje in 28 na razmnoževalno gojišče. Pri osmem obravnavanju se je iz 3 poganjkov razmnožilo 6 poganjkov, ki so bili prestavljeni na razmnoževalno gojišče. Pri devetem obravnavanju se je iz 7 poganjkov razmnožilo 22 poganjkov, 4 so bili prestavljeni na gojišče za koreninjenje in 18 na razmnoževalno gojišče. Pri desetem obravnavanju se je iz 29 poganjkov razmnožilo 86 poganjkov, 18 je bilo prestavljenih na gojišče za koreninjenje in 68 na razmnoževalno gojišče. Pri enajstem obravnavanju se je iz 45 poganjkov razmnožilo 97 poganjkov, 15 je bilo prestavljenih na gojišče za koreninjenje in 82 na razmnoževalno gojišče. Pri dvanajstem obravnavanju se je iz 14 poganjkov razmnožilo 19 poganjkov, 5 je bilo prestavljenih na gojišče za koreninjenje in 14 na razmnoževalno gojišče (preglednica 7, slika 14).



Slika 14: Število poganjkov češnje *P. subhirtella* na razmnoževalnem gojišču in na gojišču za koreninjenje

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

V poskus mikropropagacije smo vključili brste 40 let stare češnje *P. subhirtella* L., ki raste na Laboratorijskem polju Biotehniške fakultete in 12 različnih obravnavanj. Od katerih so bila 4 obravnavanja vključena v kontrolni poskus in 8 obravnavanj je vključevalo razkuževanje brstov z etanolom (EtOH), dikloroizocianurno kislino (DICA) in PeraSafe (P).

#### 5.1.1 Kontrolni poskus

Brstom smo pustili oz. odstranili luskoliste in tako pripravljene direktno inokulirali na indukcijsko gojišče oz. jih predhodno za 5 min namočili v 96% EtOH ali sterilno destilirano H<sub>2</sub>O.

V kontrolnem poskusu brste nismo tretirali z DICA in ne s P. Vsi nastavljeni brsti ne glede na obravnavanje so bili že po 3 dneh na indukcijskem gojišču okuženi z glivo oz. glivami. Po 7 do 10 dneh inokulacije so bile vidne že tudi okužbe z bakterijami. Pri prvem obravnavanju smo brste direktno inokulirali na gojišče in po 3 dneh inokulacije je bilo kar 88,89% brstov okuženih z glivo *Pestalotia* sp. in samo 11,11% z glivo *Trichoderma* sp.. Pri drugem obravnavanju, kjer smo oluščene brste direktno inokulirali na gojišče je bilo 76% brstov okuženih z glivo *Pestalotia* sp. in samo 4% z glivo *Trichoderma* sp. ter 10% z glivo *Phomopsis* sp. in *Penicillium* sp.. Pri tretjem obravnavanju smo neoluščene brste namakali 5 min v 96% EtOH in z glivo *Pestalotia* sp. je bilo okuženih 41,46% brstov in z glivo *Phomopsis* sp. 58,54% brstov. Pri četrtem obravnavanju smo EtOH nadomestili s sterilno destilirano H<sub>2</sub>O in 88,37% brstov je bilo okuženih z glivo *Pestalotia* sp. in 11,63% brstov z glivo *Trichoderma* sp..

Pri obravnavanjih kontrolnega poskusa so se okužili vsi brsti, kar je dokaz, da so bili brsti primarno okuženi z glivami in tudi z bakterijami. Glive v ugodnih *in vitro* razmerah hitreje rastejo in se razmnožujejo kot bakterije. Prve hife gliv smo na brstih in gojišču opazili že po treh dneh inokulacije, medtem ko smo bakterije opazili šele po 7 do 10 dneh inokulacije. Največ 74,30% brstov češnje pri vseh štirih obravnavanjih kontrolnega poskusa je bilo okuženih z glivo *Pestalotia* sp., kar nakazuje, da je ta gliva prisotna pri večini brstov češnje, 16,20% brstov se je okužilo z glivo *Phomopsis* sp. in 6,70% brstov z glivo *Trichoderma* sp.. Samo pri drugem obravnavanju, kjer smo nastavili oluščene brste se je pojavila gliva *Penicillium* sp., ki smo jo verjetno pridobili s postopkom luščenja.

Iz rezultatov kontrolnega poskusa je razvidno, da je bila pestrejša okužba glede prisotnih gliv pri oluščenih brstih, v primerjavi z neoluščenimi. Zato smo se pri obravnavanjih v

poskusu razkuževanja odločili za oluščene brste, da ugotovimo, katero od razkužil je učinkovitejše pri uničenju mikroorganizmov in čim manj poškoduje brste.

### 5.1.2 Razkuževanje brstov

Pri petem obravnavanju smo neoluščene brste 5 min tretirali s 96% EtOH in jim nato odstranili zunanje luskoliste ter 15 min razkuževali z 1,66% DICA. 12,73% brstov se je okužilo z glivo *Phomopsis* sp., 1,82% s kombinacijo iste glive in bakterije, 19,09% brstov se je okužilo iz okolice okuženih brstov oz. so propadli, ker so bili prepozno prestavljeni na sveže gojišče ter 66,36% brstov je preživel oz. so bili neokuženi.

Pri šestem obravnavanju smo čas razkuževanja z DICA podaljšali iz 15 na 20 min. Okužilo se je več brstov kot pri petem obravnavanju in to kar 34,54% z glivo in 13,64% brstov s kombinacijo glive in bakterije. 22,73% brstov se je okužilo iz okolice oz. so propadli in 29,09% brstov je preživel. Pri šestem obravnavanju so se brsti okužili z vsemi štirimi potrjenimi glivami. Na 59,53% brstov se je pojavila gliva *Phomopsis* sp., na 28,57% brstov je bila prisotna *Mycelia sterila*, na 7,14% brstov se je pojavila gliva *Pestalotia* sp. in 4,76% brstov je bilo okuženih z glivo *Penicillium* sp..

Pri sedmem obravnavanju smo razkužilo DICA zamenjali z P in oluščene brste 15 min razkuževali. Samo 7,27% brstov je bilo okuženih z glivo in 11,82% brstov s kombinacijo glive in bakterije, 27,27% brstov se je okužilo z okolice oz. je propadlo in 53,64% brstov je preživel. Pri tem obravnavanju sta bili potrjeni samo dve glivi. Z glivo *Phomopsis* sp. je bilo okuženih 81,82% brstov in z glivo *Mycelia sterila* 18,18% brstov.

Pri osmem obravnavanju smo čas razkuževanja brstov s P podaljšali iz 15 na 20 min. Pri tem obravnavanju se je 15,45% brstov okužilo z glivami, 8,18% brstov se je okužilo s kombinacijo glive in bakterije, 32,73% se je okužilo iz okolice oz. so propadli in 43,64% brstov je preživel. Podobno kot pri sedmem obravnavanju sta bili tudi tu prisotni glivi *Phomopsis* sp. pri 65,38% brstov in *Mycelia sterila* pri 34,62% brstov. S podaljšanim časom razkuževanja se je odstotek okuženih brstov, tako pri DICA kot pri P povečal in preživel je 14,55% brstov manj pri DICA kot pri P.

Deveto obravnavanje je bilo podobno petemu s to razliko, da smo EtOH nadomestili s H<sub>2</sub>O. Pri tem obravnavanju se je 27,27% brstov okužilo z glivami, 32,73% brstov se je okužilo z bakterijo, 9,09% brstov se je okužilo s kombinacijo glive in bakterije, 21,82% brstov se je okužilo iz okolice oz. so propadli in 9,09% brstov je preživel. Največ 61,54% brstov je bilo okuženih z glivo *Phomopsis* sp., 23,08% brstov z glivo *Pestalotia* sp. in 15,38% brstov z glivo *Mycelia sterila*.

Deseto obravnavanje je bilo podobno šestemu samo, da smo EtOH nadomestili s H<sub>2</sub>O. 41,82% brstov se je okužilo z glivami, 10,00% brstov z bakterijami, 5,45% brstov s kombinacijo glive in bakterije, 14,55% brstov se je okužilo iz okolice oz. so propadli in 28,18% brstov je preživel. Kar 80% brstov se je okužilo z glivo *Phomopsis* sp. in 20% brstov z glivo *Mycelia* sterila.

Enajsto obravnavanje je bilo podobno sedmemu samo EtOH smo nadomestili s H<sub>2</sub>O. 33,64% brstov se je okužilo z glivami, 0,91% brstov z bakterijami, 6,36% brstov s kombinacijo glive in bakterije, 13,64% brstov iz okolice oz. so propadli in 45,45% brstov je preživel. 73,34% brstov se je okužilo z glivo *Phomopsis* sp., 13,33% brstov z glivo *Pestalotia* sp. in prav tako 13,33% brstov se je okužilo z glivo *Mycelia* sterila.

Dvanajsto obravnavanje je bilo podobno osmemu samo EtOH smo zamenjali s H<sub>2</sub>O. Pri tem obravnavanju se je 46,36% brstov okužilo z glivami, 14,55% brstov s kombinacijo glive in bakterije, 20,91% brstov iz okolice oz. so propadli in 18,18% brstov je preživel. 78,05% brstov se je okužilo z glivo *Phomopsis* sp., 9,76% brstov z glivo *Pestalotia* sp., 9,76% brstov z glivo *Mycelia* sterila in 2,43% brstov se je okužilo z glivo *Penicillium* sp..

Zaradi hitrega pojava glivične okužbe in nepravočasnega prestavljanja neokuženih brstov na sveže indukcijsko gojišče se je precej brstov okužilo iz okuženih brstov v okolici. To okužbo brstov smo posebej obravnavali, saj bi bili rezultati nenatančni, če bi prišteli okužbo iz okolice k dejansko okuženim brstom.

Od petega do dvanajstega obravnavanja se gliva *Trichoderma* sp. ni pojavljala, kljub temu, da se je v kontrolnem poskusu pojavila pri treh obravnavanjih, kar nakazuje, da je bila v postopkih razkuževanja z DICA oz. s P uničena. Pri teh obravnavanjih se je v večjem številu začela pojavljati neznana oranžno rjava gliva – brez spor, katero smo uvrstili v skupino *Mycelia* sterila, ki najbrž raste zelo počasi in jo druge glive s hitrejšo rastjo, če so prisotne prerastejo. Te v kontrolnem poskusu nismo zasledili.

Gliva *Phomopsis* sp. se je pri obravnavanjih od pet do dvanajst pojavila kar 142 krat, bistveno manj 38 krat se je pojavila okužba brstov z glivo *Mycelia* sterila, z glivo *Pestalotia* sp. je bilo okuženih samo 17 brstov, gliva *Penicillium* sp. pa se je pojavila samo v 3 primerih. To nakazuje, da je gliva *Phomopsis* sp. najbolj odporna na vsa uporabljena razkužila, saj se je pojavljala pri vseh postopkih razkuževanja brstov. Tudi *Mycelia* sterila se pojavlja v vseh obravnavanjih razkuževanja, razen pri petem, vendar v precej manjšem obsegu kot gliva *Phomopsis* sp.. Gliva *Pestalotia* sp. se pojavlja samo pri šestem, devetem, enajstem in dvanajstem obravnavanju in to v majhnem obsegu. Gliva *Penicillium* sp. se je pojavila 3 krat pri šestem obravnavanju in 1 krat pri dvanajstem obravnavanju, kar je lahko posledica sekundarne okužbe oz. vnosa glive iz okolja pri prestavljanju brstov na sveže gojišče.

Od petega do osmega obravnavanja je preživel 212 brstov, kar je 94 brstov več, kot pri obravnavanjih devet do dvanajst, kjer je preživel le 118 brstov. To nakazuje, da je predhodno namakanje neoluščenih brstov za 5 min v 96% EtOH zmanjšalo število gliv in bakterij na brstih. Pri obravnavanjih od devet do dvanajst so se razvile samo bakterije na brstih, ki jih pri obravnavanjih od pet do osem ni bilo. Razvile so se še na regeneracijskem gojišču in to pri devetem in desetem obravnavanju kot samostojna okužba, ko so se brsti razprli in je bila večja površina lista, do katerega mogoče razkužilo ni prodrlo v stiku z gojiščem. Na indukcijskem gojišču smo zasledili bakterije le v kombinaciji z glivami. To dokazuje, da je EtOH primerno razkužilo za bakterije. Največ bakterij smo zasledili pri tretiranju brstov s kombinacijo H<sub>2</sub>O in DICA. Najmanj bakterij in gliv pa se je razvilo pri tretiranju s kombinacijo EtOH in P.

Pri lesnatih rastlinah se pogosto, kot razkuževalno sredstvo uporablja 70% EtOH v kombinaciji z 1 - 3 % natrijevim hipokloritom (Meier – Dinker, 1986; Preil, 1997) oz. 80% izopropanolom (Snir, 1982). V obeh primerih so razkuževali zaprte brste, pri katerih so po razkuževanju opazili nekroze oz. poškodbe, ki so vplivale na odstotek preživetja in nadaljnje razmnoževanje poganjkov. Meier - Dinkel (1986) poroča, da s kombinacijo EtOH in natrijevega hipoklorita v povprečju preživi postopek razkuževanja 43% brstov, na katerih so bile opazne poškodbe od razkužila. V našem poskus pri obravnavanjih s 96% EtOH je postopek razkuževanja preživel 1,81 do 7,27% brstov, kar je manj kot pri obravnavanjih, kjer smo EtOH nadomestili s H<sub>2</sub>O. Tu je bila preživelost brstov od 4,54 do 34,54%. Za DICA je znano, da zelo malo oz. ne poškoduje rastlinskega materiala in da je uspešnejša pri razkuževanju, predvsem bakterijskih okužb od ostalih sredstev tudi od natrijevega hipoklorita.

### 5.1.3 Mikropropagacija

Po razkuževanju smo brste češnje *P. subhirtella* inokulirali za 21 dni na indukcijsko gojišče. V tem obdobju so se nepoškodovani brsti od razkužil povečali, postali intenzivno zeleni in nekateri so se razprli. Nekaj neokuženih brstov je propadlo odvisno od obravnavanja. Tudi v naravi vsi brsti ne odženejo. Po 3 tednih smo vitalne brste predstavili iz indukcijskega na regeneracijsko gojišče oz. gojišče za razmnoževanje. Nastale regenerante oz. skupke regenerantov smo odrezali pri bazi in subkultivirali na sveže razmnoževalno gojišče. Pri nekaterih brstih pri devetem in desetem obravnavanju so se na regeneracijskem oz. razmnoževalnem gojišču po 8 do 22 dneh subkultivacije začele pojavljati bakterije. Pri devetem obravnavanju je bilo okuženih 32,73% brstov in pri desetem 11,82% brstov.



Pri petem obravnavanju je preživel oz. bilo vitalnih 1,81% brstov iz katerih smo na regeneracijskem oz. razmnoževalnem gojišču dobili poganjke in okužilo oz. propadlo jih je 98,19%. Pri šestem obravnavanju je preživel 4,54% brstov, okužilo oz. propadlo jih je 95,46%. Pri sedmem obravnavanju je preživel 7,27% brstov in se okužilo oz. propadlo 92,73% brstov. Pri osmem obravnavanju je preživel 1,81% brstov in se okužilo oz. propadlo 98,19% brstov. Pri devetem obravnavanju je preživel 4,54% brstov in se okužilo oz. propadlo 95,46% brstov. Pri desetem obravnavanju je preživel 16,36% brstov in se okužilo oz. propadlo 83,64% brstov. Pri enajstem obravnavanju je preživel 34,54% brstov in se okužilo oz. propadlo 65,46% brstov. Pri dvanajstem obravnavanju je preživel 12,73% brstov in se okužilo oz. propadlo 87,27% brstov.

Veliko število brstov se na razmnoževalnem gojišču ni razprlo in niso tvorili poganjkov, postali so rjavi in so propadli. Nekaj brstov je bilo uničenih s postopki razkuževanja. Največ propadlih brstov je bilo pri petem do osmem obravnavanju, kjer smo brste namočili za 5 min v 96% EtOH. Pri teh obravnavanjih je bila preživelost brstov od 1,81 do 7,27%. Več brstov je preživel in bilo vitalnih pri devetem do dvanajstem obravnavanju, kjer smo EtOH nadomestili z H<sub>2</sub>O. Tu je preživel od 4,54 do 34,54% brstov.

Meier - Dinkel (1986) poroča, da 55% razkuženih brstov s 70% EtOH in 3% natrijevim hipokloritom ni preživel. Postopek razkuževanja brstov javorja in lilije z natrijevim hipokloritom in vroče vode (HWT) ni preživel več kot 25% brstov (Langens - Gerrits in sod., 1998).

V našem poskusu smo uporabili višjo koncentracijo EtOH, kot jo priporoča Meier - Dinkel (1986) in temu primerno smo imeli več poškodb od EtOH. Ker smo s 96% EtOH tretirali neoluščene brste in jih odrezali od poganjka ne tik pri bazi, smo predvidevali, da meristem ne bo poškodovan. A rezultati nakazujejo, da je EtOH prodril tudi do meristema oz. poškodoval luskoliste in bazo, ki varujejo meristem. Te celice so bile poškodovane in niso bile sposobne črpati hranil iz gojišča in meristem je na indukcijskem gojišču (21 dni) oz. na razmnoževalnem propadel.

Osterc in sod. (2004) navajajo, da so dobili pri samo 15 min razkuževanja brstov češnje *P. subhirtella* z 1,66% DICA statistično boljše rezultate indukcije brstov in v nadaljnjih subkultivacijah vitalnejše poganjke, glede rasti in razvoja korenin, kot pri 30 sec razkuževanja s 70% EtOH v kombinaciji z 20 min 2% DICA.

Razmnoževanju poganjkov je sledila faza koreninjenja. Večje, vitalne, približno 1,5 do 2 cm regenerante oz. pognjke smo subkultivirali na gojišče za koreninjenje.

## 5.2 SKLEPI

V kontrolnem poskusu, pri direktni inokulaciji brstov na indukcijsko gojišče, se je kar 74,30% brstov češnje *P. subhirtella* okužilo z glivo *Pestalotia* sp., kar nakazuje, da je ta gliva v naravi prisotna pri večini brstov češnje.

Poleg glive *Pestalotia* sp. je bilo v kontrolnem poskusu 16,20% brstov okuženih z glivo *Phomopsis* sp., 6,7% brstov z glivo *Trichoderma* sp. in 2,79% brstov je bilo okuženih z glivo *Penicillium* sp., ki se je pojavila samo pri drugem obravnavanju, kjer smo brstom odstranili zunanje luskoliste.

Pri tretjem obravnavanju kontrolnega poskusa je bilo najmanj okužb, ker smo neoluščene brste tretirali 5 min s 96% EtOH.

Vsi brsti kontrolnega poskusa so bili že po 3 dneh inokulacije okuženi z glivo oz. glivami. Po 7 do 10 dneh inokulacije so bile vidne že tudi okužbe z bakterijami.

V poskus razkuževanja brstov je bilo vključenih 8 obravnavanj s 96% EtOH oz. sterilno H<sub>2</sub>O v kombinaciji z 1,66% DICA oz. 1,66% P. Nekaj brstov odvisno od obravnavanja je bilo uničenih z razkuževanjem.

Največ propadlih brstov je bilo pri petem do osmem obravnavanju, kjer smo neoluščene brste namočili za 5 min v 96% EtOH. Pri teh obravnavanjih je preživel od 1,81 do 7,27% brstov.

Več brstov je preživel in bilo vitalnih pri devetem do dvanajstem obravnavanju, kjer smo EtOH nadomestili s H<sub>2</sub>O. Tu je preživel od 4,54 do 34,54% brstov. Največ 34,54% brstov je preživel pri enajstem obravnavanju, kjer smo oluščene brste 15 min razkuževali s P.

Zaradi hitrega pojava in izbruha okužb z glivami in nepravočasnega subkultiviranja na sveže gojišče se je od 13,64 do 32,73% brstov okužilo iz okolice okuženih brstov. Te smo ocenjevali posebej.

Gliva *Phomopsis* sp. je bila najštevilčnejša pri vseh 8 obravnavanjih, kljub uporabljenim razkuževalnim sredstvom se je pojavila pri 15% vseh brstov, 4,88% brstov je bilo okuženih z glivo *Mycelia sterila*, ki je v kontrolnem poskusu nismo zasledili, 1,93% brstov je bilo okuženih z glivo *Pestalotia* sp. in 0,34% z glivo *Penicillium* sp..

Glivo *Trichoderma* sp. so uporabljena razkužila popolnoma uničila.

## 6 POVZETEK

V poskus mikropropagacije smo vključili brste češnje *P. subhirtella* L. in 12 različnih obravnavanj. Obravnavanja od 1 do 4 so bila vključena v kontrolni poskus. Pri vsakem od teh 4 obravnavanj smo nastavili 40 brstov, razen pri drugem obravnavanju, kjer smo jih nastavili 47. Pri ostalih 8 obravnavanjih, ki so vključevala razkuževanje brstov smo nastavili po 110 brstov v petrijevke po deset brstov. Pri vseh 8 obravnavanjih od petega do dvanajstega smo brste najprej za 5 min namočili v 96% EtOH oz. v sterilno destilirano H<sub>2</sub>O, nato smo jim odstranili zunanje luskoliste in razkuževali 15 oz. 20 min z 1,66% DICA oz. 1,66% P. Tako pripravljene brste smo inokulirali na indukcijsko gojišče.

V kontrolnem poskusu so se že po treh dneh inokulacije pojavile glivične okužbe na vseh nastavljenih brstih. Najpogostejša gliva pri kontrolnem poskusu je bila *Pestalotia* sp., ki se je pojavila v 74,30%, gliva *Phomopsis* sp. se je pojavila v 16,20%, *Trichoderma* sp. se je pojavila v 6,70% in gliva *Penicillium* sp. se je pojavila le v 2,79%. Po 7 do 10 dneh inokulacije so bile vidne že tudi okužbe z glivami.

V poskusu razkuževanja brstov je bilo nekaj brstov uničenih z razkužilom. Največ propadlih brstov je bilo pri petem do osmem obravnavanju, kjer smo neoluščene brste namočili za 5 min v 96% EtOH. Pri teh obravnavanjih je bila preživelost brstov od 1,81 do 7,27%. Več brstov je preživel in bilo vitalnih pri devetem do dvanajstem obravnavanju, kjer smo EtOH nadomestili s H<sub>2</sub>O. Po teh obravnavanjih je preživel od 4,54 do 34,54% brstov.

Gliva *Phomopsis* sp. se je pri obravnavanjih od pet do dvanajst pojavila kar 142 krat, bistveno manj 38 krat se je pojavila okužba brstov z glivo *Mycelia sterila*, z glivo *Pestalotia* sp. je bilo okuženih samo 17 brstov, gliva *Penicillium* sp. pa se je pojavila samo v 3 primerih. To nakazuje, da je gliva *Phomopsis* sp. najbolj odporna na vsa uporabljena razkužila, saj se je pojavljala po vseh postopkih razkuževanja brstov. Tudi *Mycelia sterila* se pojavlja v vseh obravnavanjih razkuževanja, razen pri petem, vendar v precej manjšem obsegu kot gliva *Phomopsis* sp.. Gliva *Pestalotia* sp. se pojavlja samo pri šestem, devetem, enajstem in dvanajstem obravnavanju in to v majhnem obsegu. Gliva *Penicillium* sp. se je pojavila 3 krat pri šestem obravnavanju in 1 krat pri dvanajstem obravnavanju, kar je lahko posledica sekundarne okužbe oz. vnosa glive iz okolja pri prestavljanju brstov na sveže gojišče.

Pri petem do osmem obravnavanju je preživel 94 brstov več, kar 212, kot pri obravnavanjih od devetega do dvanajstega, kjer je preživel le 118 brstov. To nakazuje, da je predhodno namakanje neoluščenih brstov za 5 min v 96% EtOH zmanjšalo število gliv in bakterij na brstih. Pri obravnavanjih od devet do dvanajst so se razvile bakterije, ki jih pri obravnavanjih od pet do osem ni bilo. Razvile so se šele na regeneracijskem gojišču kot

samostojna okužba, saj smo jih na indukcijskem gojišču zasledili le v kombinaciji z glivo. To pomeni, da je 96% EtOH dobro razkužilo za bakterije. Največ bakterij se je razvilo pri tretiranju s kombinacijo H<sub>2</sub>O in DICA. Najmanj bakterij in gliv pa se je razvilo pri tretiranju s kombinacijo EtOH in P. Najmanj okužb na indukcijskem gojišču je bilo pri obravnavanjih od pet do osem, kjer smo brste namakali predhodno za 5 min v 96% EtOH. Pri petem obravnavanju je preživel 66,36% brstov, pri šestem 29,09%, pri sedmem 53,64%, pri osmem pa je preživel 43,64% brstov. Pri devetem obravnavanju je preživel 9,09% brstov, pri desetem 34,54%, pri enajstem 45,45% in pri dvanajstem 18,18% brstov.

Nekaj brstov se je okužilo iz okolice okuženih brstov, ker smo jih prepozno subkultivirali na sveže gojišče. Največ okužb brstov z glivami je bilo pri devetem do dvanajstem obravnavanju, manj s kombinacijo glive in bakterije in šele na regeneracijskem gojišču pri devetem in desetem obravnavanju se je pojavila samostojna okužba z bakterijo.

Največ 71% brstov je bilo okuženih z glivo *Phomopsis* sp., manj 19% brstov z glivo *Mycelia sterila*, 8,50% brstov z glivo *Pestalotia* sp. in 1,50% brstov z glivo *Penicillium* sp. V kontrolnem poskusu se pojavi gliva *Trichoderma* sp., ki je v poskusu razkuževanja nismo zasledili. Pojavila se je oranžna nedoločljiva gliva, ki ni tvorila spor in smo jo uvrstili v skupino *Mycelia sterila*.

Po 21 dneh smo brste subkultivirali z indukcijskega na regeneracijsko gojišče oz. gojišče za razmnoževanje. Poganjke, ki so bili povprečno veliki 1,5 do 2 cm smo subkultivirali na gojišče za koreninjenje, manjše na sveže razmnoževalno gojišče, da razmnožimo čim več vitalnih poganjkov.

## 7 VIRI

- Bohanec B. 1992. Tehnike rastlinskih tkivnih kultur. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Center za rastlinsko biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin: 168 str.
- Sigma – Aldrich. 2006. Katalog kemijskih sredstev, Dikloroizocianurna kislina – Sodium dichloroisocyanurate  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/ALDRICH/218928>  
(24.11.2008)
- Etanol. 2002.  
<http://sl.wikipedia.org/wiki/Etanol> (24.11.2008)
- Fito – info. 2003  
<http://www.fito-info.bf.uni-lj.si> (24.11.2008)
- Gliha P. 2003. Češnja desetega meseca. Moj mali svet, 35, 10: 26
- Gliha P. 2006. Japonska češnja – od nekdanjega simbol Japonske. Moj mali svet, 38, 4: 25-27
- Langens – Gerrits M., Albers M., de Klerk G.-J. 1998. Hot – water treatment before tissue culture reduces initial contamination in *Lilium* and *Acer*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 52: 75 - 77
- Meier – Dinkel A. 1986. In vitro Vermehrung ausgewählter Genotypen der Vogelkirsche (*Prunus avium* L.). Allgemeine Forst – und Jagdzeitung, 157: 139–144
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497
- Opiola Jerzy. 2006. Poland. 29.10.2008  
[http://en.wikiversity.org/wiki/Image:Prunus\\_subhirtella\\_a2.jpg](http://en.wikiversity.org/wiki/Image:Prunus_subhirtella_a2.jpg) (26.11.2008)
- Osterc G., Luthar Z., Štampar F. 2004. The importance of sterilization procedure for procuring vigorous cherry plants (*Prunus* sp.) *in vitro*. Acta agriculturae Slovenica, 83: 45-51
- Osterc G. 2001. Fenomen fiziološkega staranja lesnatih rastlin kot dejavnik razmnoževanja s potaknjenci. Sodobno kmetijstvo 34, 10: 430-434

PeraSafe. 2008. Antec International Limited, Anglija (propagandni material)

Porcher Michel H. in sod., Sorting Prunus Cultivar Names. Multilingual Multiscript Plant Name Database - A Work in Progress 1995 - 2020. Institute for Land & Food Resources. The University of Melbourne 25.5.2004  
[http://www.plantnames.unimelb.edu.au/Sorting/Prunus\\_cultivars.html](http://www.plantnames.unimelb.edu.au/Sorting/Prunus_cultivars.html) (2.12.2008)

Preil W. 1997. In-vitro–Vermehrung von Gehölzen. V: Die Baumschule. Krüssmann G. (ur.). Berlin, Parey, Germany: 449–471

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

Schroter W., Lautenschlager K. H., Bibrack H., Schnabel A. 1993. Kemija: Splošni priročnik. 1. izdaja. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 712 str.

Smole J. 2000. Češnje in višnje: pridelovanje in uporaba. Ljubljana, Kmečki glas: 146 str.

Snir I. 1982. In vitro propagatin of sweet cherry cultivars. HortScience, 17, 2: 192–193

Spethmann W. 1997. Propagation of *Prunus avium* by summer and winter cuttings and survival after different storage treatments. Acta Horticulturae, 169: 353-362

Webster A. D. 1996. Propagation of sweet and sour cherries. V: Cheries: crop physiology, Production and Uses. Webster A. D. in Looney N. E. (ur.). Wallingford, CAB International: 167–202

## **ZAHVALA**

Mentorici izr. prof. dr. Zlati Luthar se zahvaljujem za neizmerno pomoč pri delu v laboratoriju, strokovno pomoč in pomoč pri pisanju diplomskega dela.

Somentorju izr. prof. dr. Franciju Celarju se zahvaljujem za strokovno pomoč na področju fitomedicine.

Prof. dr. Ivanu Kreftu, predsedniku komisije in doc. dr. Gregorju Ostercu, članu komisije se zahvaljujem za temeljit pregled in popravek diplome.

Zahvaljujem se tudi mojim staršem, ki sta me med študijem ves čas podpirala in spodbujala ter Gregorju, ki me je prav tako ves čas spodbujal pri pisanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi Maji in sodelavcem Funsportsa za spodbudo in podporo.

## PRILOGA A

Pojav gliv na brstih češnje *P. subhirtella* 7 dni po inokulaciji na indukcijskem gojišču v kontrolnem poskusu

| Obravnavanje | Petrijevka | Gliva                 |                        |                      |                        |
|--------------|------------|-----------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
|              |            | <i>Pestalotia</i> sp. | <i>Trichoderma</i> sp. | <i>Phomopsis</i> sp. | <i>Penicillium</i> sp. |
| 1            | 1          | 10                    | 1                      |                      |                        |
| 1            | 2          | 10                    | 1                      |                      |                        |
| 1            | 3          | 10                    | 1                      |                      |                        |
| 1            | 4          | 10                    | 2                      |                      |                        |
| 2            | 1          | 4                     | 2                      | 5                    | 1                      |
| 2            | 2          | 12                    |                        |                      | 1                      |
| 2            | 3          | 10                    |                        |                      | 1                      |
| 2            | 4          | 12                    |                        |                      | 2                      |
| 3            | 1          | 6                     |                        | 4                    |                        |
| 3            | 2          | 5                     |                        | 5                    |                        |
| 3            | 3          | 2                     |                        | 8                    |                        |
| 3            | 4          | 4                     |                        | 7                    |                        |
| 4            | 1          | 10                    |                        |                      |                        |
| 4            | 2          | 9                     | 1                      |                      |                        |
| 4            | 3          | 9                     | 1                      |                      |                        |
| 4            | 4          | 10                    | 3                      |                      |                        |



## PRILOGA B

Pojav gliv na brstih češnje *P. subhirtella* 8 dni po inokulaciji na indukcijskem gojišču po površinski sterilizaciji z EtOH, DICA in P

| Obravnavanje | Petrijevka | Gliva                 |                      |                        |                 |
|--------------|------------|-----------------------|----------------------|------------------------|-----------------|
|              |            | <i>Pestalotia</i> sp. | <i>Phomopsis</i> sp. | <i>Penicillium</i> sp. | Mycelia sterila |
| 5a           | 1          |                       | 2                    |                        |                 |
| 5b           | 2          |                       | 1                    |                        |                 |
| 5c           | 3          |                       | 1                    |                        |                 |
| 5d           | 4          |                       | 3                    |                        |                 |
| 5e           | 5          |                       | 1                    |                        |                 |
| 6a           | 1          |                       | 1                    |                        |                 |
| 6b           | 2          |                       | 2                    |                        |                 |
| 6c           | 3          |                       | 2                    |                        | 2               |
| 6c           | 4          |                       | 1                    |                        | 1               |
| 6d           | 5          |                       | 1                    |                        | 1               |
| 6d           | 6          |                       | 4                    | 1                      | 1               |
| 6e           | 7          | 2                     | 3                    |                        | 3               |
| 6e           | 8          | 1                     | 2                    | 1                      |                 |
| 6f           | 9          |                       | 3                    |                        | 1               |
| 6g           | 10         |                       | 3                    |                        | 1               |
| 6g           | 11         |                       | 3                    |                        | 2               |
| 7            | 1          |                       | 1                    |                        |                 |
| 7            | 2          |                       | 2                    |                        |                 |
| 7            | 3          |                       | 2                    |                        |                 |
| 7            | 4          |                       | 1                    |                        |                 |
| 7            | 5          |                       | 6                    |                        |                 |
| 7            | 6          |                       | 1                    |                        |                 |
| 7            | 7          |                       | 2                    |                        | 3               |
| 7            | 8          |                       | 1                    |                        |                 |
| 7            | 9          |                       | 2                    |                        | 1               |
| 8            | 1          |                       | 1                    |                        | 1               |
| 8            | 2          |                       | 2                    |                        | 1               |
| 8            | 3          |                       | 2                    |                        |                 |
| 8            | 4          |                       |                      |                        | 3               |
| 8            | 5          |                       | 4                    |                        | 2               |
| 8            | 6          |                       | 1                    |                        | 1               |
| 8            | 7          |                       | 2                    |                        | 1               |
| 8            | 8          |                       | 2                    |                        |                 |
| 8            | 9          |                       | 3                    |                        |                 |

se nadaljuje

nadaljevanje

| Obravnavanje | Petrijevka | Gliva                 |                      |                        |                        |
|--------------|------------|-----------------------|----------------------|------------------------|------------------------|
|              |            | <i>Pestalotia</i> sp. | <i>Phomopsis</i> sp. | <i>Penicillium</i> sp. | <i>Mycelia</i> sterila |
| 9a           | 1          |                       | 3                    |                        | 1                      |
| 9b           | 2          |                       | 3                    |                        |                        |
| 9c           | 3          |                       |                      |                        | 1                      |
| 9d           | 4          | 1                     |                      |                        | 1                      |
| 9e           | 5          | 1                     | 1                    |                        |                        |
| 9f           | 6          | 1                     | 1                    |                        |                        |
| 9g           | 7          | 3                     | 3                    |                        |                        |
| 9g           | 8          |                       | 3                    |                        |                        |
| 9h           | 9          |                       | 2                    |                        | 1                      |
| 10a          | 1          |                       | 1                    |                        | 1                      |
| 10b          | 2          |                       | 2                    |                        |                        |
| 10c          | 3          |                       | 1                    |                        |                        |
| 11a          | 1          |                       | 1                    |                        |                        |
| 11b          | 2          |                       |                      |                        | 1                      |
| 11c          | 3          | 4                     | 1                    |                        |                        |
| 11c          | 4          |                       | 2                    |                        |                        |
| 11c          | 5          |                       | 4                    |                        |                        |
| 11d          | 6          |                       | 4                    |                        |                        |
| 11e          | 7          |                       | 2                    |                        | 1                      |
| 11e          | 8          |                       | 4                    |                        |                        |
| 11f          | 9          |                       | 1                    |                        | 2                      |
| 11g          | 10         |                       | 3                    |                        |                        |
| 12a          | 1          |                       | 2                    |                        | 1                      |
| 12b          | 2          |                       | 2                    |                        |                        |
| 12c          | 3          |                       | 1                    |                        | 1                      |
| 12d          | 4          |                       | 2                    | 1                      |                        |
| 12e          | 5          | 3                     | 1                    |                        |                        |
| 12e          | 6          |                       | 5                    |                        |                        |
| 12f          | 7          |                       | 3                    |                        | 1                      |
| 12f          | 8          | 1                     | 2                    |                        |                        |
| 12g          | 9          |                       | 7                    |                        |                        |
| 12g          | 10         |                       | 3                    |                        |                        |
| 12g          | 11         |                       | 4                    |                        | 1                      |