

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Janja GORNIK

**KORENINJENJE KOSTANJA (*Castanea sativa* Mill.) V *IN VITRO*
RAZMERAH**

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij

**ROOTING OF CHESTNUT (*Castanea sativa* Mill.) IN *IN VITRO*
CONDITIONS**

GRADUATION THESIS
Higher professional studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek Visokošolskega strokovnega študija Kmetijstvo - agronomija smer Hortikultura. Opravljeno je bilo na Katedri za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

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

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: 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.

Janja Gornik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Vs
DK UDK 634.53:631.532:57.086.83(043.2)
KG kostanj/vegetativno razmnoževanje/tkivne kulture/gojišča/poganjki/koreninjenje
KK AGRIS F02/F30
AV GORNIK, Janja
SA LUTHAR, Zlata (mentorica)
KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI 2008
IN KORENINJENJE KOSTANJA (*Castanea sativa* Mill.) V *IN VITRO* RAZMERAH
TD Diplomsko delo (Visokošolski strokovni študij)
OP IX, 38 str., 7 pregl., 12 sl., 39 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Pravi kostanj (*Castanea sativa* Mill.) je lesnata rastlina, ki se težje razmnožuje tako generativno s semenom, kot tudi vegetativno s cepljenjem in potaknjenci. V poskus vegetativnega razmnoževanja so bili vključeni *in vitro* razmnoženi poganjki pravega kostanja genotip 'Sobota' iz območja severovzhodne Slovenije. Na vsakih štiri do šest tednov smo manjše poganjke subkultivirali na sveža razmnoževalna gojišča z oznakami M1, M2 do M5. Približno 1,5 cm poganjke pa na gojišča za koreninjenje z oznakami K1, K2 do K7. Gojišča so vsebovala makro- in mikroelemente MS (Murashige in Skoog, 1962) gojišča s polovično koncentracijo dveh nitratov KNO₃ in NH₄NO₃ (Vieitez in sod., 1983) ter različne koncentracije CaCl₂, hormonov in pH. Na M1 gojišču za razmnoževanje z 332,2 mg/l CaCl₂ in pH 5,7 je preživel kar 82,28% poganjkov, nekoliko manj 80,21% poganjkov je preživel na M3 gojišču z 1328,8 mg/l CaCl₂ in pH 5,7. Najmanj 72,37% poganjkov je preživel na M4 gojišču z 1328,8 mg/l CaCl₂ in pH 5,5. Najboljši množitveni faktor 1,4 preživelih poganjkov v skupku je nastalo na M3 gojišču. Na K2 gojišču je korenilo 6,38% poganjkov, od teh je imelo 67% eno korenino in 33% dve ali več. Na K3 gojišču je korenilo 13% poganjkov, vsi so imeli po eno korenino. Na K4 gojišču je korenilo največ, kar 16,66% poganjkov, od teh je imelo 33% poganjkov eno korenino in 67% dve ali več. Višja koncentracija CaCa₂ (1328,8 mg/l) v kombinaciji s povečano koncentracijo avksina IBA (2 in 4 mg/l) je ugodno vplivala na koreninjenje.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Vs
DC UDC 634.53:631.532:57.086.83(043.2)
CX chestnut/vegetative propagation/tissue culture/culture media/ shoots/rooting
CC AGRIS F02/F30
AU GORNIK, Janja
AA LUTHAR, Zlata (supervisor)
PP SI – 1000, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
PY 2008
TI ROOTING OF CHESTNUT (*Castanea sativa* Mill.) IN *IN VITRO* CONDITIONS
DT Graduation Thesis (Higher professional studies)
NO IX, 38 p., 7 tab., 12 fig. 39 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Chestnut is a woody species, which is difficult to propagate as generative with a seed as well as grafting and cuttings in vegetative way. In the experiment vegetative propagation were included *in vitro* propagated shoots of chestnut genotype 'Sobota' from northeast area of Slovenia. Every three to four weeks we subcultivated smaller shoots on to fresh culture media for propagation with marks M1, M2 to M5. We also subcultivated shoots of approximately 1.5 cm length to culture media for rooting with marks K1, K2 to K7. The culture media consisted of macro- and microelements MS (Murashige and Skoog, 1962) with half concentrated two nitrates KNO₃ and NH₄NO₃ (Vieitez et al., 1983) and different concentrations of CaCl₂, hormones, and pH. In the culture media M1 for propagation with hormones 332.2 mg/l CaCl₂ and pH 5.7 survived 82.28 % of shoots, a bit less 80.21% of shoots in the culture media M3 survived with 1328.8 CaCl₂ and pH 5.5. The least shoots 72.37% survived in the culture media M4. The best multiplying factor 1.4 of survived shoots in total was created in the culture media M3. In the culture media K2 6.38% of shoots were rooting, 67% of them had one root while 33% of them had two or more roots. In the culture media K3 13% of shoots were rooting and all had one root. In the culture media K4 the percentage of rooting was the highest 16.66% of shoots, 33% of these shoots had one root while 67% of them had two or more roots. Higher concentration of CaCl₂ (1328.8 mg/l) in combination with auxin IBA (2 and 4 mg/l) gave a positive influence to rooting.

KAZALO VSEBINE

	Ključna dokumentacijska informacija	str. III
	Key words documentation	IV
	Kazalo vsebine	V
	Kazalo preglednic	VII
	Kazalo slik	VIII
	Simboli in okrajšave	IX
1	UVOD	1
1.1	DELOVNA HIPOTEZA	1
1.2	CILJ NALOGE	2
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	RAZVRSTITEV, IZVOR IN RAZŠIRJENOST KOSTANJA	3
2.2	EKOLOŠKE ZAHTEVE	4
2.2.1	Klimatske razmere in lege	4
2.2.2	Talne razmere in vodni režim	4
2.3	UPORABNOST	5
2.4	GOJENJE V NASADIH	5
2.5	MORFOLOŠKE IN FIZIOLOŠKE LASTNOSTI	6
2.6	VEGETATIVNO RAZMNOŽEVANJE <i>IN VIVO</i>	8
2.7	VEGETATIVNO RAZMNOŽEVANJE <i>IN VITRO</i>	9
2.7.1	Koreninjenje kostanja <i>in vitro</i>	11
3	MATERIAL IN METODE	13
3.1	RASTLINSKI MATERIAL	13
3.2	SESTAVA GOJIŠČ	14
3.2.1	Priprava gojišča	16
3.2.2	Priprava založnih raztopin	16

3.3	METODE DELA	17
3.3.1	Subkultivacija poganjkov	17
3.3.2	Gojenje	17
3.3.3	Bonitiranje in obdelava podatkov	17
4	REZULTATI	18
4.1	RAZMNOŽEVANJE POGANJKOV	18
4.1.1	Preživeli poganjki	20
4.1.2	Propadli poganjki	21
4.1.3	Izločki in kalus	23
4.2	KORENINJENJE POGANJKOV	24
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	27
5.1	RAZPRAVA	27
5.1.1	Razmnožitev poganjkov	27
5.1.1.1	Preživeli poganjki	28
5.1.1.2	Propadli poganjki	29
5.1.1.3	Izločki in kalus	29
5.1.2	Koreninjenje	30
5.2	SKLEPI	30
6	POVZETEK	32
7	VIRI	35
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Sestava gojišč za razmnoževanje pravega kostanja	14
Preglednica 2: Sestava gojišč za koreninjenje pravega kostanja	15
Preglednica 3: Število inokuliranih, nastalih, preživelih in propadlih poganjkov pravega kostanja na petih gojiščih za razmnoževanje	18
Preglednica 4: Število vitalnih in rahlo vitrificiranih poganjkov pravega kostanja na petih gojiščih za razmnoževanje	20
Preglednica 5: Število rjavih in močno vitrificiranih oz. propadlih poganjkov pravega kostanja na petih gojiščih za razmnoževanje	21
Preglednica 6: Število inokuliranih, preživelih, koreninjenih in propadlih poganjkov pravega kostanja na sedmih gojiščih za koreninjenje	24
Preglednica 7: Število poganjkov pravega kostanja z eno, dvema ali več koreninami	25

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Ločeni ženski in moški cvetovi na isti rastlini, listi in plodovi kostanja	7
Slika 2: Mikropropagacija pravega kostanja: A - poganjki štiri tedne na gojišču za razmnoževanje; B - poganjka primerna za nadaljnje razmnoževanje; C - poganjek primeren za koreninjenje	13
Slika 3: Odstotek preživelih in propadlih poganjkov pravega kostanja na petih gojiščih za razmnoževanje	18
Slika 4: Množitveni faktor nastalih in preživelih poganjkov pravega kostanja na petih gojiščih za razmnoževanje	19
Slika 5: Poganjki pravega kostanja nastali na gojišču za razmnoževanje	19
Slika 6: Odstotek vitalnih in rahlo vitrificiranih poganjkov pravega kostanja na petih gojiščih za razmnoževanje	21
Slika 7: Odstotek rjavih in močno vitrificiranih poganjkov pravega kostanja na petih gojiščih za razmnoževanje	22
Slika 8: Propadli poganjki: A - rjavi; B - močno vitrificirani	23
Slika 9: Negativni pojav pri razmnoževanju pravega kostanja: A - kalus na bazi razmnoženih poganjkov; B - kalus med poganjkom in koreninami	23
Slika 10: Odstotek nekoreninjenih zelenih, kalusiranih ter koreninjenih poganjkov pravega kostanja	25
Slika 11: Odstotki koreninjenih poganjkov pravega kostanja z eno oz. več koreninami	26
Slika 12: Koreninjeni poganjki pravega kostanja	26

SIMBOLI IN OKRAJŠAVE

BAP - benzilamino purin; citokinin

C. - *Castanea*

GA3 - giberelinska kislina

IAA - indol očetna kislina; avksin

IBA - indol maslena kislina; avksin

K1, K2 do K7 - gojišča za koreninjenje

M1, M2 do M5 - gojišča za razmnoževanje

MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ - bazalno Murashige in Skoog (1962) gojišče s polovično koncentracijo nitratov

NAA - α -naftalen očetna kislina; avksin

pH - negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov

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

$\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ - mikro Einstein na kvadratni meter na sekundo

1 UVOD

Pravi kostanj je bil v preteklosti pri nas in v Evropi veliko bolj razširjen kot je danes, ker sta velik del kostanjevih gozdov uničili bolezni, kostanjev rak in črnolovka. Zelo nevarna je gliva *Cryphonectria parasitica* Murr., ki povzroča kostanjev rak. Prvotno se je, kot parazit pojavljala na Kitajskem in Japonskem na sorodnikih evropskega pravega kostanja in tam ni povzročala velike škode. Leta 1904 se je pojavila na severnoameriškem kostanju (*Castanea dentata* Borkh.) in v nekaj letih tam uničila velike površine kostanjevih gozdov. Leta 1938 so bolezen opazili v Italiji, od tam se je razširila po vsej Evropi in po letu 1950 tudi v Slovenijo. Pri nas so se površine kostanjevih gozdov zmanjšale za več kot polovico. V novejšem času so odkrili pojav hipovirulence. Virus vpliva na glivo povzročiteljico kostanjevega raka, da postane nenevarna (Kotar in Brus, 1999). To daje upanje, da se bo upad kostanjeve populacije zmanjšal in da bi se v naših gozdovih in gajih zopet pojavil v večjem številu. Za načrtno sajenje, pogozdovanje se uporablja zdrav sadilni material, ki ga lahko razmnožimo tudi s tehnikami tkivnih kultur.

Kostanj je imel in ima zelo veliko vlogo v prehranjevanju, zdravilstvu, pohištveni in usnjarski industriji ter gradbeništvu. V zgodovini je bil zelo tesno povezan z življenjem ljudi v Evropi, Aziji in Severni Ameriki. Pomemben del prehrane je kostanj predstavljal na območjih Italije, Švice, Španije, Portugalske, Francije, Kitajske, Koreje in Japonske. V južnih delih Evrope je bil prav tako pomemben v prehrani, kot je danes krompir, saj je zelo hranljiv. Njegovi plodovi se lahko skladiščijo tudi pol leta in več. V preteklosti je bil v Sloveniji domači oz. pravi (evropski) kostanj (*Castanea sativa* Mill.) pomemben vir prehrane jeseni in pozimi ter cenjen pri premožnejših ljudeh. V drugih predelih Evrope je bil hrana revnih ljudi.

V času antičnih Grkov in Etruščanov so v posameznih predelih kostanj uvrščali med sadno drevje (Kotar in Brus, 1999). Sedaj se ga obravnava kot gozdno in sadno vrsto. Uvrščen je med lupinasto sadno drevje (Adamič, 1995). Evropski pravi kostanj (*Castanea sativa* Mill.) izvira iz območij ob Sredozemskem in Črnem morju, od tam so ga razširili Rimljani vzporedno s širjenjem vinske trte. Razširil se je daleč prek svojih naravnih rastišč oz. gen centrov proti severu. Kostanjeve gaje so ljudje sadili zaradi plodov, ki so služili za prehrano ljudi in živali ter za pridobivanje kostanjevega medu. V krajih z milo klimo in daljšo rastno dobo se je Evropski kostanj razširil v gozd in postal gozdna vrsta.

1.1 DELOVNA HIPOTEZA

Pravi kostanj se težje razmnožuje, tako generativno s semenom kot tudi vegetativno s potaknjenci in cepljenjem. Vegetativno razmnoževanje je danes bolj uveljavljeno, zaradi ohranjanja zelenega genotipa. Potaknjenci pravega kostanja se v naravnih razmerah zelo

težko ukoreninijo. Kljub temu, da so potaknjenci morfološko mladi (običajno enoletni ali dvoletni les) so fiziološko stari. S tehnikami tkivnih kultur lahko fiziološko star material pomladimo. Delovna hipoteza je bila modificirati in izbrati gojišča oz. gojišče za uspešno *in vitro* koreninjenje kostanja ter pridobiti vitalen sadilni material.

1.2 CILJ NALOGE

Cilj naloge je bil v *in vitro* razmerah razmnožiti čim več vitalnih poganjkov z močnim koreninskim sistemom, ki bi bili primerni za aklimatizacijo in gojenje na prostem.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RAZVRSTITEV, IZVOR IN RAZŠIRJENOST KOSTANJA

Pravi kostanj (*Castanea sativa* Mill.) spada v družino bukovk (*Fagaceae*), ki je razširjena na srednjih zemljepisnih širinah, predvsem na severni in manj na južni polobli in v tropih. V to družino je vključenih 8 rodov in okoli 1000 vrst (predvsem dreves), od katerih so najbolj znane bukve (*Fagus*), hrasti (*Quercus*) in kostanji (*Castanea*). Ti trije rodovi tudi prevladujejo v listnatih in mešanih gozdovih Severne Amerike in Evrazije.

Rod *Castanea* zajema poleg evropskega pravega kostanja (*Castanea sativa* Mill.), tudi nekaj pomembnejših azijskih in ameriških vrst. Pomembnejše in v literaturi največkrat omenjene azijske vrste so predvsem: *C. mollissima* Bl., *C. crenata* Sieb in Zucc, *C. davidii* Dode., *C. henryi* Rehd. in Wils, ameriške: *C. dentata* Borkh., *C. americana*, *C. pumila* Mill., *C. aschii* Sudw., *C. floridana* Ashe., *C. alnifolia* Nutt., *C. ozarkensis* Ashe. Pomembni so tudi križanci *C. sativa* x *C. crenata*, *C. sativa* x *C. pumila*, *C. sativa* x *C. dentata* (Sancin, 1988; Podjavoršek, 1999).

Kitajski pravi kostanj (*Castanea mollissima* Blume) je do 20 m visoko drevo, ki raste na severu in zahodu Kitajske in deloma tudi v Koreji. Razširjen je tudi drugje po Aziji in Ameriki ter Evropi. Japonski pravi kostanj (*C. crenata* Sieb et Zucc.) je manjše do 15 m visoko drevo in raste na japonskih gorskih predelih (Anić in sod., 1959). Ti dve azijski vrsti uporabljajo za križanja z evropskim in tudi ameriškim pravim kostanjem z namenom pridobivanja križancev, ki bi bili odporni na kostanjev rak in črnilovko. Obe azijski vrsti imata veliko naravno odpornost proti tema dvema boleznima (Sanchez in sod., 1997).

Ameriški pravi kostanj (*C. dentata* Borkh.) je do 30 m visoko drevo, ki raste predvsem na vzhodnem delu Severne Amerike. Pred letom 1900 je bil ena najpomembnejših gozdnih vrst v Ameriki. Kostanjev rak je v pičlih 50 letih uničil 25% kostanjevih gozdov Severne Amerike (Serres in sod., 1990).

Evropski pravi kostanj izvira iz okolice Sredozemskega morja od Portugalske do Kaspijskega morja (Solar, 2001a). Razširjen je v južni Evropi (Turčiji, Balkanu, Italiji, Portugalskem, Franciji in Nemčiji), zahodni Aziji in severozahodni Afriki (Anić in sod., 1959; Eleršek, 2001).

V Sloveniji raste pravi kostanj samoniklo v vseh toplejših gričevnatih legah. Večje površine so na primorskem flišu, v Beli Krajini ter jugo- in severovzhodnih predelih Slovenije (Kotar in Brus, 1999). Tu raste avtohtoni tip domačega kostanja do nadmorske višine okrog 800 m in zanj je značilna celinska klima (Solar, 2001a).

V Sloveniji imamo tudi nekaj manj kot 11 ha intenzivnih nasadov kostanja (Štampar, 2004). Leta 2002 so bile v Sadni izbor za Slovenijo uvrščene 4 perspektivne sorte evrojaponskega kostanja (*C. castanea* x *C. crenata*). To so sorte 'Marsol', 'Maraval', 'Bouche de betizac' in 'Precoce migoule' (Godec in sod., 2003).

2.2 EKOLOŠKE ZAHTEVE

2.2.1 Klimatske razmere in lege

Kostanj je vrsta, ki je ekološko zahtevnejša in dobro uspeva le v toplejšem podnebjju z daljšo rastno dobo 6 - 7 mesecev. Ustrezajo mu območja z vlažno klimo (obilne padavine in visoka zračna vlaga), toplimi poletji, milo zimo, veliko svetlobe, kjer ni močnih vetrov, zgodnih in poznih pozeh, previsokih temperatur in dolgih sušnih obdobj. Uvrščamo ga med polsencozdržne drevesne vrste na toplih rastiščih. V krajih izven njegove naravne razprostranjenosti potrebuje za rast in razvoj več svetlobe (Kotar in Brus, 1999).

Kostanju najbolj ustreza mediteranska in zmerna kontinentalna klima s srednjo letno temperaturo 11 - 15 °C. V času dormance prenese tudi do -26 °C. Uspešno ga je mogoče gojiti do nadmorske višine 700 m. Višje plodovi ne dozorevajo, razen če ni v bližini večjega vodnega vira, ki pozitivno vpliva na temperaturna nihanja, povečuje zračno vlažnost in jakost osvetlitve (Solar, 2001a).

Za nizke temperature je občutljiv zlasti zgodaj spomladi, a ker cveti razmeroma pozno (junij - julij) ga le te ne prizadenejo. Težje prenaša hitre temperaturne spremembe med dnevom in nočjo. V času cvetenja mu najbolj ustrezajo temperature med 15 in 18 °C (Sancin, 1988). Škodijo mu zimski mraz, če temperatura pade pod -20 °C in poletne suše.

Odporen je proti vetrovom in viharjem (Kotar in Brus, 1999). Najbolje uspeva na rahlo nagnjenih in dobro osvetljenih južnih legah, ki niso izpostavljene premočnim vetrovom (Solar, 2001a).

2.2.2 Talne razmere in vodni režim

Raste na globokih, strukturnih tleh, saj razvije globoke in obsežne korenine, zato potrebuje vsaj do 2 m globoka tla. Kostanj je kalcifobna rastlina in ne prenaša apna v tleh. Velika količina kalcijevega karbonata predstavlja limitni faktor za gojenje te sadne vrste. Najbolj mu ustrezajo kislata tla s pH reakcijo med 4,0 - 6,0 (Solar, 2001a). Za rast potrebuje zmerno sveža, globoka in zračna tla z visoko vsebnostjo kalija. Dobro uspeva na glinastih tleh s silikatno podlago (Kotar in Brus, 1999). Na apnenčastih tleh raste le, če so le-ta prekrita z debelo plastjo rdeče prsti (na Primorskem). Dobro uspeva na flišu. V gozdovih je kostanj v združbi z gradnom, z rdečim borom in smreko, manj z bukvijo. V grmovni plasti

prevladuje borovnica, v pritlični pa mahovi (Mlakar, 1990). Gojenje kostanja je v gozdarskem smislu v Sloveniji najbolj uspelo v acidofilnih (kislih) bukovih gozdovih, še posebej v vlažnejših oblikah združb s sajenjem in panjevskim gojenjem (Gregorič in sod., 1975).

Kostanj je velik porabnik vode, ne prenaša pa visoke podtalnice ali prevlažnih tal, v katerih se vlaga neprestano zadržuje (Solar, 2001a). Za rast in optimalni razvoj potrebuje od 1000 do 1500 mm padavin letno.

2.3 UPORABNOST

Kostanj je zanimiva in danes žal dokaj pozabljena drevesna vrsta, ki ima široko uporabnost. Uporabne ima vse rastlinske dele: cvetove, plodove, listje, les in lubje.

Cvetovi so dobra čebelja paša (Bulatović, 1983; Mlakar, 1990). Kostanjev med je svetlo rumen, zelo močnega vonja in je trpko, sladko-grenkega okusa. Pomaga pri boleznih jeter in čiru na želodcu (Katalinić, 1973).

Plodovi se uporabljajo za prehrano ljudi (kot nadomestek za krompir in moko) in živali (prašičev, perutnine, goveda). So zelo hranljivi, saj vsebujejo veliko ogljikovih hidratov do 47% (od tega je največ škroba), vitaminov (predvsem vitamin C) in mineralov (kalija, fosforja, magnezija, kalcija). Plod kostanja vsebuje prav toliko ogljikovih hidratov kot koruza (Bulatović, 1983). V zdravilstvu se uporablja tudi olje iz plodov.

Lubje se uporablja v zdravilstvu kot antipiretik in antidiaroič (sredstvo proti vročini in driski) (Petauer, 1993). Lubje in les se uporabljata za pridobivanje tanina. Lubje vsebuje do 12,5% tanina, les pa do 16% (Anić in sod., 1959). Tudi listi delujejo blago antidiaroično. Prav tako delujejo ugodno na dihala (proti oslovskemu kašlju) in za zdravljenje revme. Odpadlo listje so včasih uporabljali za steljo domačim živalim (Petauer, 1993).

Zelo uporaben je les kostanja, saj je trden in trajen. Uporablja se v gradbeništvu: za parket, lesene konstrukcije, manjše mostove, ostrešja, podporne stebre, za pohištvo, v sodarstvu, v rezbarstvu, za kurjavo, železniške pragove, za pridobivanje celuloze, tanina in vinogradniško kolje (Petauer, 1993; Kotar in Brus, 1999; Grecs, 2002).

2.4 GOJENJE V NASADIH

Včasih je pridelava kostanjevih plodov temeljila na pobiranju kakovostnih plodov v kostanjevih gozdovih, danes pa ga pridelujejo predvsem v monokulturnih nasadih, ki zahtevajo intenzivno oskrbo.

Drevesa gojimo lahko s pravokotno, kvadratno ali trikotno razporeditvijo dreves. Minimalna razdalja sajenja je 9 x 9 m. Pri kvadratni razporeditvi je to 123 dreves/ha pri trikotni pa 145 dreves/ha (Solar, 2001b). Bolje je, če ga sadimo na razdalje 10 x 10 do 10 x 15 m. To je 70 - 100 dreves/ha, ker kostanj potrebuje veliko prostora za rast. Gojitvene oblike, ki se uporabljajo so izboljšana piramida in kotlasta krona z 2 - 4 ogrodnimi vejami (Štampar, 2002).

V prvih letih po sajenju je potrebna obdelava in zastiranje tal okoli posamezne sadike. V juvenilni dobi drevo potrebuje dvakrat letno gnojenje z dušikom. V obdobju rodnosti potrebuje poleg dušika še veliko kalija in magnezija (Solar, 2001b). V rodnih nasadih redčimo krošnjo, izrezujemo polomljene in odmrle veje, da dosežemo dobro osvetlitev in tvorbo asimilatov (Štampar, 2002).

2.5 MORFOLOŠKE IN FIZIOLOŠKE LASTNOSTI

Kostanj je dolgoživa drevesna vrsta, ki zlahka doseže 200 - 600 in tudi 1000 let (Sancin, 1988). Kostanjevo drevo zraste do višine 30 - 40 m. V prvih letih po kalitvi raste razmeroma počasi, v starosti 10 - 50 let je priraščanje hitro, potem se upočasni, vendar traja vse do starosti več sto let. V dobrih razmerah doseže prsni premer debla do 3 m. To je največkrat ravno in čokato. Skorja je v mladosti gladka in tanka ter olivne barve, v starosti 20 let in več pa vzdolžno razbrazdana in rjavosiva (Fabčič, 1997).

Listi so enostavni, ozki, suličasti in nazobčani, 12 - 20 cm dolgi in 3 - 6 cm široki. Zgoraj so temno zeleni in gladki, spodaj svetlo zeleni do belkasti, goli ali nekoliko dlakavi. Na otip so nekoliko usnjati. Listni peclji so dolgi od 0,5 - 2,5 cm (slika 1).

Brsti so majhni, koničasto jajčasti, rdečerjavi, goli ali nekoliko puhasti in pokriti z 2 - 3 luskolisti. Poganjki so bleščeči, rdečerjavi in pokriti s številnimi lenticelami (Mlakar, 1990; Kotar in Brus, 1999). Poganjki imajo premenjalno nameščene brste v 5 vrstah. Končni brst je posamičen in večji od stranskih. Brstenje se začne na koncu marca oz. v začetku aprila, odvisno od sorte. Vegetativni cikel od brstenja do zorenja plodov traja 140 do 190 dni (Sancin, 1988).

Koreninski sistem kostanja je močno razvejan in seže globoko v tla. Glavna korenina seže tudi do 6 m v globino. V zemlji najprej razvije močno vertikalno korenino, pozneje pa še močne stranske korenine (Kotar in Brus, 1999). Glavnina korenin je pri kostanju, ki je razmnožen s semenom od 0,5 do 2,7 m, pri rastlini, ki je razmnožena s koreninskimi poganjki pa od 0,2 do 1,2 m (Babnik, 1992).

Kostanj je enodomna rastlina. Rodni les je enoletni. Moški in ženski cvetovi se razvijajo ločeno na isti rastlini (Katalinić, 1973; Solar, 2001a) (slika 1). Cvetovi so 12 - 20 cm dolgi

pokončni klasi (mačice), ki zrastejo iz pazduh listov. V klasu rastejo enospolni cvetovi v nepravih kobulih. Večina klasov nosi samo moške cvetove. Moški kobil je sestavljen iz 7 cvetov. Posamezen moški cvet ima 8 - 12 prašnikov in drobno okrnjeno plodnico (Kotar in Brus, 1999). Ženski cvetovi se razvijajo pri vrhu enoletnih poganjkov posamično ali v skupinah do 5 cvetov (Solar, 2001a). Ženski cvetovi rastejo v klobčku ter so obdani s skupnim zelenim luskastim ovojem - skledico ali kupulo. V ženskih cvetovih so tudi okrnjeni prašniki (Kotar in Brus, 1999). Zeleni luskasti ovoj sprva varuje ženski cvet, med letom pa se razvije v ježico, ki se v času dozorelosti razpre v 2, 3 ali 4 dele (Solar, 2001a) (slika 1).



Slika 1: Ločeni ženski in moški cvetovi na isti rastlini, listi in plodovi kostanja (Flora..., 1999)

Pri nas cveti junija in v začetku julija. Za začetek cvetenja potrebuje temperaturo 15 - 18 °C (Kotar in Brus, 1999). Cvetenje je sukcesivno in traja dlje časa, tudi do 4 tedne (Solar, 2001a). Cvetenje posameznega drevesa traja okoli 10 dni (Katalinić, 1973). Kostanj spada med žužkocvetke (oprašujejo ga čebele in drugi insekti), cvetni prah pa raznaša tudi veter (Kotar in Brus, 1999; Solar, 2001a). Kostanj je zelo medonosna rastlina, ki jo obiskuje okrog 300 vrst žuželk. Za dobro oploditev je potrebno čim več moških socvetij in lepo, toplo vreme, ki omogoča prenos cvetnega prahu (Solar, 2001a). Od cvetenja do zorenja

plodov je potrebnih od 75 - 120 dni. Zgodnje kostanjeve sorte zorijo že konec septembra, pozne pa novembra (Sancin, 1988).

Plodovi se razvijejo iz enega klobčka ženskih cvetov in ostanejo do dozoritve v ovoju oz. kupuli (ježici). Znotraj ježice so 2 - 3 orehi, ki jih imenujemo kostanji. Ti kostanji so 2 - 3 cm dolgi, temno rjavi s svetlejšimi vzdolžnimi progami. Na spodnji strani, kjer so se držali kupule, imajo svetlejšo proggo. Na vrhu so kostanji dlakavi in imajo posušen ostanek perigona (Kotar in Brus, 1999). Vsi cvetovi se vedno ne oplodijo, zato se v ježici nahaja navadno le en ali dva in le redko trije plodovi (Sancin, 1988). Ko ti dozori se ježica odpre in odpade skupaj s plodovi (slika 1). Rastline nastale iz semena zarodijo v 12. do 15. letu, cepljene rastline pa v 2. - 4. letu (Babnik, 1992). Kostanj obrodi običajno vsako leto, vendar močnejše obrodi vsake tri leta. Dobro prehranjeno, gojeno drevo ima v povprečju letno od 100 - 200 kg plodov (Kotar in Brus, 1999). Plodove hranimo v shrambah ali sadnih hladilnicah pri 80% relativni zračni vlagi in temperaturi okoli 0 °C.

Kostanj glede na plodove v splošnem delimo na dva tipa: maroni in navadni kostanji. Maroni rastejo v toplejših, zmernih predelih. V ježici se razvije en posebno velik, okroglast plod s svetlejšo rjavo lupino z izrazitimi svetlimi progami. Divje rastoči avtohtoni kostanji pa imajo v ježici 2 - 3 manjše plodove s temnejšo lupino (Lüdders, 2004).

Kalivost kostanja je 60 - 70%. Semena kalijo 4 - 6 tednov in vzkalijo naslednjo pomlad (Mlakar, 1990), klična lista ostaneta v zemlji (Kotar in Brus, 1999). V prvem letu rastlina zraste do 10 cm, do tretjega leta do 0,5 m. Do 10 leta raste razmeroma počasi, potem pa hitreje in pri 50 letih zraste do 25 m. Kostanj ima veliko sposobnost obnavljanja iz štorov in je idealna vrsta za panjevsko gospodarjenje, ker dobro odganja iz panjev in korenin (Mlakar, 1990; Perko, 1995).

2.6 VEGETATIVNO RAZMNOŽEVANJE *IN VIVO*

Vegetativno razmnoževanje je nesporna oblika razmnoževanja rastlin, z namenom ohranjanja genetskih lastnosti matične rastline. Pri vegetativnem razmnoževanju iz dela matične rastline nastane nova rastlina, ki se ukorenini in ima enake genetske lastnosti kot matična rastlina. Taka rastlina se imenuje klon.

Vegetativno razmnoževanje je lahko neposredno (avtovegetativno), ko nova rastlina v celoti nastane iz ene matične rastline in ima v celoti enak genom ter posredno (ksenovegetativno), kjer je nova rastlina sestavljena iz cepiča in podlage (cepljenje). Avtovegetativni načini razmnoževanja so: razmnoževanje s potaknjenci (zeleni, lesnati, koreninski, listni), grobanice, vlačnice, razmnoževanje z živicami, koreninski izrastki, grebeničenje, deljenje.

Lesnate rastline glede razmnoževanja delimo na rastline, ki jih lažje vegetativno razmnožujemo in ni večjih težav pri razmnoževanju ter tiste, ki jih težje razmnožujemo in pri katerih se pojavljajo različne težave. Rod *Castanea* (kostanji) sodi glede razmnoževanja med najbolj zahtevne lesnate vrste skupaj z drugimi predstavniki družine bukovek *Fagaceae* (Šiftar, 1999).

V novejšem času so razvili metodo cepljenja na kaleči kostanjev plod. Pri tej metodi najprej sredi februarja stratificirajo seme pri temperaturi 5 °C, nato ga nakaljujejo v rastlinjaku pri temperaturi 22 - 25/18 °C (dan/noč). Cepiče naberejo decembra in shranijo na hladnem. V začetku marca, ko seme vzkali izvedejo cepljenje (kopulacijo) na hipokotil. Cepljenko shranijo v vlažnem mahu v rastlinjaku z urejenim sistemom meglenja. Uspešno cepljene rastline nato presadijo v lončke s substratom in jih gojijo v rastlinjaku. Konec maja jih presadijo na prosto (Šiftar, 1992).

Glavni vzrok težav pri vegetativnem razmnoževanju kostanja s cepljenjem je neskladje (inkompatibilnost) podlage in cepiča, pri potaknjencih pa fiziološko staranje matične rastline. Kostanj se je v preteklosti razmnoževal s semenom (generativno), danes pa zelene sorte razmnožujemo s cepljenjem (vegetativno), s čimer se ohrani genotip ter zelene lastnosti. Alternativa, ki se uporablja v novejšem času je razmnoževanje z zelenimi poganjki v *in vitro* razmerah (Osterc, 2004).

2.7 VEGETATIVNO RAZMNOŽEVANJE *IN VITRO*

Pri vegetativnem razmnoževanju *in vitro* iz izsečka (to je organ ali košček tkiva, celica) rastline v sterilnih pogojih vzgojimo na posebej pripravljenem gojišču novo rastlino. Rastlinske celice imajo sposobnost regeneracije in diferenciacije. Temu pojavu rečemo totipotentnost, ko iz ene celice lahko nastane cela nova rastlina. Za tako razmnoževanje se uporabljajo različne tehnike tkivnih kultur, med katere spada tudi mikropropagacija.

Za delo s tkivnimi kulturami potrebujemo laboratorij s specifično opremo in priborom, ki omogoča delo v sterilnih razmerah. Poleg opreme potrebujemo tudi različne kemikalije, ki sestavljajo gojišča. Nepogrešljive so anorganske (makro- in mikroelementi, sladkorji, voda) in organske snovi (rastlinski hormoni oz. fitoregulatorji, vitamini, inozitol, strjevalci). Za shranjevanje in gojenje tkivnih kultur potrebujemo rastne komore v katerih se vzdržujejo optimalne razmere: temperatura, fotoperioda (svetlo/temno) in intenziteta osvetlitve.

Mikropropagacija je temeljna tehnika tkivnih kultur in je tudi osnova vseh ostalih tehnik. Proces mikropropagacije v splošnem razdelimo na več faz: gojitev in priprava matičnih rastlin, iniciacija kulture, indukcija in regeneracija, razmnoževanje poganjkov,

podaljševanje poganjkov in koreninjenje ter aklimatizacija. Vsaka od faz ima svoje specifične zahteve dela in težave, ki se lahko pojavijo (Bohanec, 1992).

Za uspešno mikropropagacijo je zelo pomembna izbira matične rastline. Pri lesnatih rastlinah, ki jih težje vegetativno razmnožujemo, je zelo pomembna fiziološka starost rastline iz katere vzamemo material. Pomembne so rastne razmere, prehranjenost, vodni režim in zdravstveno stanje rastline. Rastlinski material (izsečke) je potrebno tudi pravilno pripraviti za nadaljnje delo. Ne smemo ga izpostavljati neugodnim razmeram ali ga poškodovati. Preden začnemo z delom je potrebno odstraniti vse umazane, odmrle, nagnite in poškodovane dele.

Kadar rastlinski material oz. izseček (meristem, del lista, korenine, stebela, brsti, cvetni deli itd.) za mikropropagacijo vzamemo iz naravnih razmer, ga je potrebno predhodno površinsko sterilizirati, da pridobimo aseptično kulturo. Rastlinski material je lahko okužen z bakterijami, glivami površinsko ali notranje. Za površinsko sterilizacijo tkiv se uporabljajo različna razkužila, kot so: dikloroizocianurna kislina, natrijev hipoklorit, kalcijev hipoklorit, živosrebrov hipoklorid, vodikov peroksid itd. Razkužilom dodajamo tudi detergent za boljšo omočljivost. Vsa razkužila so bolj ali manj strupena in je treba z njimi delati previdno, da ne poškodujemo rastlinskega materiala. Koncentracije in čas razkuževanja so odvisne od vrste razkužila in materiala, ki ga razkužujemo. Razkužen rastlinski material naprej obravnavamo kot sterilni in vsi nadaljnji postopki morajo potekati v sterilnih razmerah. Po razkuževanju rastlinske izsečke inokuliramo na pripravljeno gojišče in shranimo v rastnih komorah, kjer se vzdržujejo optimalne razmere za indukcijo, regeneracijo in nadaljnjo rast ter razvoj (Bohanec, 1992).

V fazi indukcije pride do prvih sprememb izsečka. Celice, tkiva nabreknejo, se povečajo in lahko se pojavi rast kalusa. Naslednja faza je regeneracija razvoj celic ali tkiv s specializiranimi funkcijami, tudi regeneracija embrioidov in organov ter regenerantov - poganjkov. V tej fazi izseček zraste in začne oblikovati nove poganjke. Gojišča v tej fazi vsebujejo običajno več citokininov in manj avksinov. Način razmnoževanja poganjkov je odvisen od vrste rastline in njenega načina rasti. Rastline, ki imajo poganjke z nodiji, segmentiramo na nodije in le-te subkultiviramo na gojišče. Tako lahko pridobimo večje število poganjkov. S tem, ko odrežemo glavni poganjek odstranimo apikalno dominanco, kar sproži rast stranskih poganjkov. Subkultivacijo lahko večkrat ponovimo.

Nezaželeni pojavi v tej fazi so lahko vitifikacija (hiperhidracija), izločanje eksudatov (fenolov, pigmentov), odmiranje vršičkov, premajhni, nizki poganjki in rast kalusa.

Vitifikacija je pojav, ko celice, tkiva sprejemajo preveč vode. Vakuole v celicah se povečajo in napolnijo z vodo, celične stene se stanjšajo. Gojeni poganjki postanejo steklasti, prosojni, tkiva so polna vode in nabrekla. Na vitifikacijo lahko vplivajo hormoni

v gojišču (predvsem citokinini) in velika zračna vlaga v posodicah za gojenje. Vitifikacijo poganjkov lahko zmanjšamo s pogostejšo subkultivacijo na gojišča, ki vsebujejo več strjevalca in dodajanjem komponent, ki preprečujejo vitifikacijo.

Izločeni eksudati zavirajo rast in lahko povzročajo odmiranje sosednjih celic. Ukrepi s katerimi zmanjšamo izločanje snovi so pogostejše subkultiviranje ter dodajanje oglja ali antioksidantov v gojišča.

Odmiranje vršičkov je fiziološki pojav, ko vršiček poganjka porjavi in odmre, to sproži močnejšo rast stranskih poganjkov pri katerih se lahko rjavenje ponovi. Odmiranje se pojavi zaradi pomanjkanja hranil, predvsem železa in premajhne transpiracije v kulturi. To odpravimo oz. omilimo z dodajanjem železa in kalcija v gojišče (Bohanec, 1992).

Premajhne poganjke, v obliki rozete v fazi razmnoževanja subkultiviramo na gojišče z dodanim giberelinom za podaljševanje poganjkov. Nato poganjke subkultiviramo na gojišče za koreninjenje. Za koreninjenje se navadno uporabljajo gojišča z manjšo koncentracijo makro- in mikroelementov, manj saharoze in strjevalca in brez hormonov ali le z avksini (indol maslena kislina - IBA, indol očetna kislina - IAA, α -naftalen očetna kislina - NAA). V tej fazi je lahko problem kalus, ki nastane na odrezanem mestu, kjer bi morale pognati korenine. Če se korenine oblikujejo iz kalusa nimajo neposrednega stika s poganjkom, tudi prevodni sistem ni spojen in kasneje v postopku aklimatizacije lahko sadike propadejo. Namesto na gojišču za koreninjenje, lahko poganjki določenih rastlinskih vrst, koreninijo kar v substratu (Bohanec, 1992).

V postopku aklimatizacije se poganjke - mlade rastline, ki so rastle v heterotrofnih razmerah prilagaja na avtotrofni način rasti. Pomembna je izbira rastnega substrata, stalna visoka zračna vlaga, redno zračenje, primerna toplota, svetloba (Gordon, 1991).

2.7.1 Koreninjenje kostanja *in vitro*

Raziskovalca Soyulu in Ertürk (1999) sta opozorila, da sta pri razmnoževanju in koreninjenju kostanja *in vitro* zelo pomembna starost matičnih rastlin in genotip. S fiziološko starim materialom so uspehi zelo majhni ali pa jih sploh ni.

Leta 1983 so Vieitez in sodelavci objavili raziskavo v kateri so za koreninjenje uporabili polovično koncentracijo gojišča $MS-\frac{1}{2}NO_3$. Na tem gojišču so imeli 73% koreninjenje. S to raziskavo so dokazali, da je možno tudi *in vitro* razmnoževanje kostanjevih poganjkov, ki izvirajo iz starejših dreves. Zaključili so tudi, da na razmnoževanje in različno uspešnost različnih klonov verjetno vplivajo tudi posamezni genotipi oz. genetske razlike med kloni in da so potrebne modifikacije glede metod in uporabljenih gojišč za različne genotipe.

Mullins (1987) je opravil razen regeneracije tudi raziskavo s koreninjenjem kostanja. Poganjke je pomočil v raztopino avksina IBA, nato jih je posadil v substrat in shranil v rastlinjaku z urejenim meglenjem in talnim ogrevanjem. Poganjki s koreninami, ki so nastali v *in vitro* razmerah so imeli nizko stopnjo preživetja, ko so jih presadili v substrat. Poganjki, ki so koreninili *in vivo* pa so bolje preživeli. Pri enem klonu kostanja ni bilo indukcije korenin pri nobeni izmed teh dveh metod.

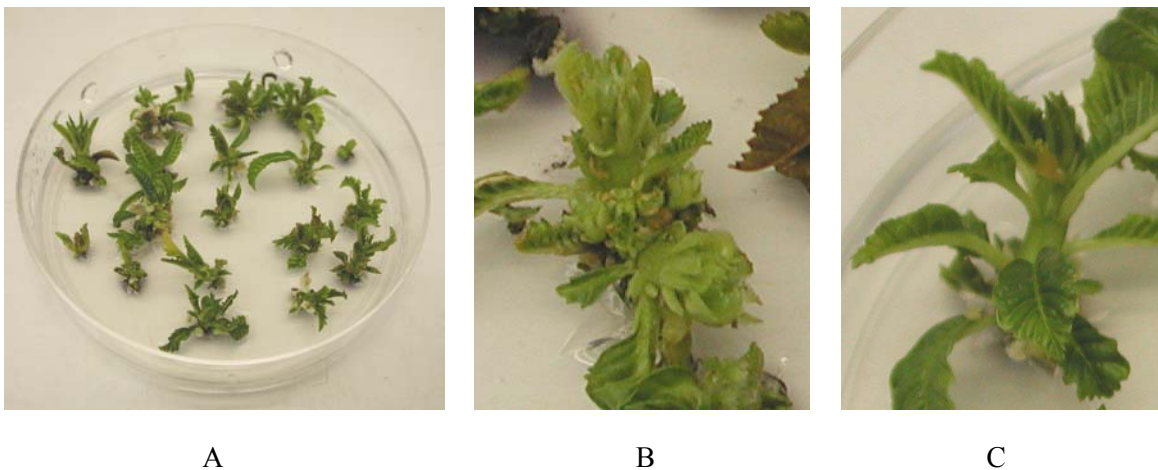
Piagnani in Eccher (1988) sta proučevala faktorje, ki vplivajo na razmnoževanje in koreninjenje kostanja *in vitro*. Med drugim tudi različne koncentracije dušika in njegov vpliv na vitrifikacijo in pojavljanje nekroz. Ugotovila sta, da nizke koncentracije dušika v gojišču vplivajo na rast kostanja, medtem ko visoke koncentracije dušika povzročajo vitrifikacijo. Popolna odsotnost dušika v gojišču pa povzroča klorozo izsečkov. Ugotovila sta tudi velike razlike, glede razmnoževanja in koreninjenja med različnimi kloni kostanja in različnimi izsečki, ki sta jih uporabila.

3 MATERIAL IN METODE DE LA

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Brti za mikrorazmnoževanje kostanja v tkivni kulturi so bili nabrani na pomlajenem, cepljenem 7 let starem kostanju na območju severovzhodne Slovenije. Poimenovan je bil genotip 'Sobota'. Poganjki z brsti so bili porezani v marcu in aprilu leta 2003 in po površinski sterilizaciji inokulirani na gojišče za indukcijo in nato na gojišče za regeneracijo (Zavrl Fras, 2004). Poganjki velikosti 0,5 - 1,5 cm, ki so nastali na regeneracijskem gojišču, so bili razrezani na segmente in inokulirani na razmnoževalno gojišče v petrijevke 90 × 20 mm (Vodenik, 2005).

Poskus koreninjenja kostanja v *in vitro* razmerah smo zasnovali v letu 2006 in opravili 5 subkultivacij. Na vsake štiri do šest tednov (slika 2A) smo manjše poganjke, velike približno do 0,5 cm odrezali pri bazi (slika 2B) in direktno subkultivirali na sveža, modificirana razmnoževalna MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ (Murashige in Skoog, 1962; Vieitez in sod., 1983) gojišča v petrijevke z oznakami M1, M2 do M5 (preglednica 1). Večje poganjke od 0,5 - 1,5 cm smo pred subkultivacijo na gojišča za razmnoževanje razrezali na segmente, z namenom pridobiti čim več poganjkov primernih za koreninjenje. Poganjke velike približno 1,5 cm in več (slika 2C) smo subkultivirali na modificirana gojišča za koreninjenje z oznakami K1, K2 do K7 (preglednica 2) v steklene kozarce s polipropilenskim pokrovom 55 × 75 mm.



Slika 2: Mikropropagacija pravega kostanja: A - poganjki štiri tedne na gojišču za razmnoževanje; B - poganjka primerna za nadaljnje razmnoževanje; C - poganjek primeren za koreninjenje

3.2 SESTAVA GOJIŠČ

Preglednica 1: Sestava gojišč za razmnoževanje pravega kostanja

Sestavine	Gojišča				
	M1	M2	M3	M4	M5
Makroelementi (mg/l)					
NH ₄ NO ₃	825	825	825	825	825
KNO ₃	950	950	950	950	950
KH ₂ PO ₄	170	170	170	170	170
CaCl ₂	332,2	664,4	1328,8	1328,8	1328,8
MgSO ₄	180,7	180,7	180,7	180,7	180,7
Mikroelementi (mg/l)					
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	37,26	37,26	37,26	37,26	37,26
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
MnSO ₄ x H ₂ O	16,9	16,9	16,9	16,9	16,9
KJ	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83
NaMoO ₄ x 2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6
Organske snovi (mg/l)					
Inozitol	100	100	100	100	100
Tiamin	1	1	1	1	1
BAP	1	1	1	1	1
GA3	-	-	-	-	0,1
Ogljikov hidrat (g/l)					
Saharoza	30	30	30	30	30
Strjevalec (g/l) in pH vrednost					
Agar	8	8	8	8	8
pH	5,7	5,7	5,7	5,5	5,7

Osnovno MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ (Vieitez in sod., 1983) gojišče za razmnoževanje kostanja je vsebovalo bazalno (makro- in mikroelemente) MS (Murashige in Skoog, 1962) gojišče s polovično koncentracijo dveh nitratov (KNO₃ in NH₄NO₃), zvišali smo koncentracijo CaCl₂ ter spremenili pH vrednost. Ostale organske sestavine so bile enake kot v literaturi Vieitez in sod. (1983), razen koncentracije benzilamino purina (BAP) in dodane giberelinske kisline (GA3). V vsa M1, M2 do M5 razmnoževalna gojišča smo dodali 1 mg/l BAP in v M5 gojišče še 0,1 mg/l GA3 (preglednica 1).

Razmnoževalno M1 gojišče je vsebovalo 332,2 mg/l CaCl₂, njegova pH vrednost je bila 5,7. M2 gojišče je vsebovalo 664,4 mg/l CaCl₂ in M3 gojišče 1328,8 mg/l CaCl₂, ostalo je bilo enako kot pri M1 gojišču. M4 gojišče je imelo vse sestavine enake kot M3 gojišče, razen znižane pH vrednosti na 5,5. M5 gojišče je imelo vse sestavine in pH vrednost enako kot M3 gojišče, dodano je bilo smo 0,1 mg/l GA3 (preglednica 1).

Preglednica 2: Sestava gojišč za koreninjenje pravega kostanja

Sestavine	Gojišča						
	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7
Makroelementi (mg/l)							
NH ₄ NO ₃	825	825	825	825	825	825	825
KNO ₃	950	950	950	950	950	950	950
KH ₂ PO ₄	170	170	170	170	170	170	170
CaCl ₂	150	332,2	1328,8	1328,8	1328,8	1328,8	1328,8
MgSO ₄	180,7	180,7	180,7	180,7	180,7	180,7	180,7
Mikroelementi (mg/l)							
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	37,26	37,26	37,26	37,26	37,26	37,26	37,26
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8	27,8
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2	6,2
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
MnSO ₄ x H ₂ O	16,9	16,9	16,9	16,9	16,9	16,9	16,9
KJ	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83
NaMoO ₄ x 2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6	8,6
Organske snovi (mg/l)							
Inozitol	100	100	100	100	100	100	100
Tiamin	1	1	1	1	1	1	1
IBA	1	1	2	4	6	4	4
GA3	-	-	-	-	-	0,1	0,1
IAA	-	-	-	-	-	-	2
NAA	-	-	-	-	-	-	2
Ogljikov hidrat (g/l)							
Saharoza	30	30	30	30	30	30	30
Strjevalec (g/l) in pH vrednost							
Agar	8	8	8	8	8	8	8
pH	5,7	5,7	5,7	5,5	5,5	5,7	5,7

K1, K2 do K7 gojišča za koreninjenje poganjkov so se od M1, M2 do M5 razmnoževalnih gojišč razlikovala v koncentraciji CaCl_2 , citokininih: indol masleni kislini (IBA), indol očetni kislini (IAA) in α -naftalen očetni kislini (NAA) ter giberelinu (GA3) in pH vrednosti (preglednica 2).

K1 gojišče je vsebovalo 150 mg/l CaCl_2 in 1 mg/l IBA ter pH vrednost je bila 5,7. K2 gojišče se je od K1 razlikovalo samo v koncentraciji CaCl_2 (332,2 mg/l). K3 gojišče je vsebovalo 1328,8 mg/l CaCl_2 in 2 mg/l IBA. K4, K5, K6 in K7 gojišča so imela enako koncentracijo CaCl_2 kot K3 gojišče. V K4 gojišče je bilo poleg ostalih sestavin dodano 4 mg/l IBA in pH vrednost je bila 5,5. K5 gojišče se je od K4 razlikovalo v povečani koncentraciji 6 mg/l IBA. K6 gojišče je vsebovalo 4 mg/l IBA in 0,1 mg/l GA3 ter pH vrednost je bila 5,7. K7 gojišče se je od K6 razlikovalo v vsebnosti 2 mg/l IAA in 2 mg/l NAA (preglednica 2).

3.2.1 Priprava gojišča

Sestavine gojišč (makro- in mikroelemente, saharozo in ostale organske sestavine), za vegetativno razmnoževanje kostanja, smo stekali in pretresli v čašo ter prelili z bidestilirano vodo. Sestavine smo raztopili z mešanjem s teflonskim magnetom na električnem mešalniku. Nato smo s pipetiranjem iz založnih raztopin dodali nekatere mikroelemente, vitamin in hormone. V merilni bučki smo določili končni volumen gojišča, prelili nazaj v čašo in določili pH vrednost. K1, K2 do K7 gojiščem za koreninjenje smo dodali agar in ga stopili v mikrovalovni pečici ter razlili v steklenice s polipropilenskim pokrovom. M1, M2 do M5 razmnoževalna gojišča smo prelili v steklenice Scott-Duran in dodali agar.

Gojišča smo avtoklavirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in pritisku 1,1 bar. Po sterilizaciji smo M1, M2 do M5 gojišča ohladili na 40 - 60 °C, premešali z vrtenjem steklenice in v brezprašni komori prelili v sterilne plastične petrijevke $\varnothing = 90 \times 20$ mm. Gojišča so se ohladila in strdila pri sobni temperaturi.

3.2.2 Priprava založnih raztopin

Pripravili smo založne raztopine hormonov (BAP, IBA, IAA, NAA, GA3), vitamina (tiamin) in mikroelementov (kobaltov klorid, bakrov sulfat, kalijev jodid, natrijev molibdat, borova kislina, cinkov sulfat). Z analitsko tehtnico smo zatehtali desetkratno ali stokratno količino potrebne sestavine, jo raztopili z vodo, bazo ali kislino ter dolili do 100 ml destilirano vodo. Pri pripravi gojišča smo, za vsako sestavino v založni raztopini, preračunali potrebno količino oz. volumen. Na ta način smo ohranili natančnost

koncentracije sestavin gojišča, ki jo pri običajnem tehtanju z navadno ali analitsko tehtnico ne bi mogli zagotoviti.

3.3 METODE DELA

Poskus koreninjenja kostanja je potekal v laboratoriju za aseptično delo, kjer smo lahko ves čas ohranjali aseptično kulturo poganjkov. Poskus je bil zasnovan v letu 2006 in je vključeval 5 subkultivacij za razmnoževanje poganjkov in koreninjenje ter sprotno bonitiranje.

3.3.1 Subkultivacija poganjkov

Na vsake 4 - 6 tednov smo nastale poganjke odrezali pri bazi in jih subkultivirali na sveža M1, M2 do M5 razmnoževalna gojišča v petrijevke, večje poganjke pa na K1, K2 do K7 gojišča za koreninjenje v steklene kozarce s polipropilenskim pokrovom. Ko so bili poganjki na razmnoževalnem gojišču dovolj veliki in v gojišču veliko fenolnih izločkov in nastalega kalusa, smo postopek subkultivacije ponovili, da je bil negativen vpliv izločkov in kalusa čim manjši.

3.3.2 Gojenje

Poganjke smo gojili v rastni komori pri temperaturi 22 ± 1 °C in fotoperiodi 16/8 ur (svetloba/tema) ter intenziteti svetlobe $40 \mu\text{E}/\text{m}^2 \text{ s}$.

3.3.3 Bonitiranje in obdelava podatkov

Bonitiranje smo opravili pri vsaki subkultivaciji. V obdobju poskusa je bilo opravljenih 5 subkultivacij. Spremljali smo število nastalih poganjkov v skupkih oz. razmnožitev, število vitalnih in rahlo vitrificiranih ter rjavih in močno vitrificiranih ter primernih za koreninjenje. Zbrane podatke smo uredili tabelarično in grafično ter jih predstavili z opisno statistiko.

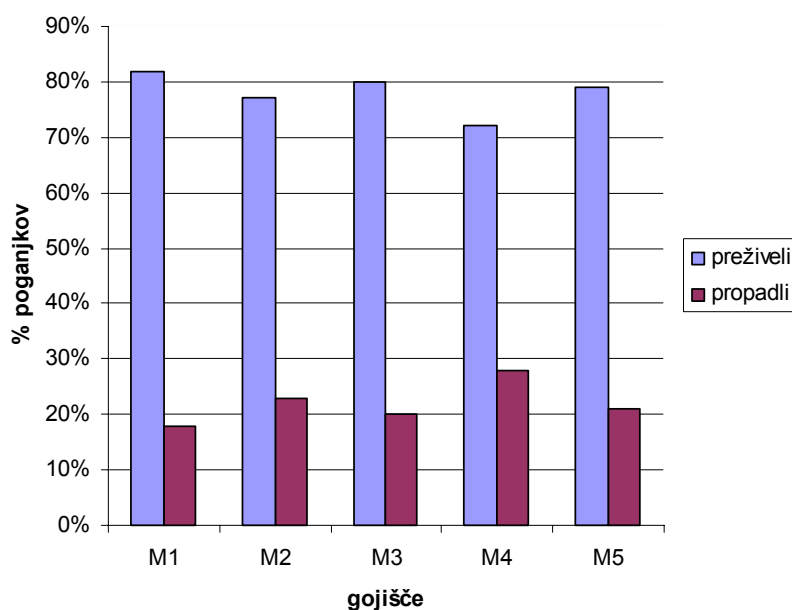
4 REZULTATI

4.1 RAZMNOŽEVANJE POGANJKOV

Preglednica 3: Število inokuliranih, nastalih, preživelih in propadlih poganjkov pravega kostanja na petih gojiščih za razmnoževanje

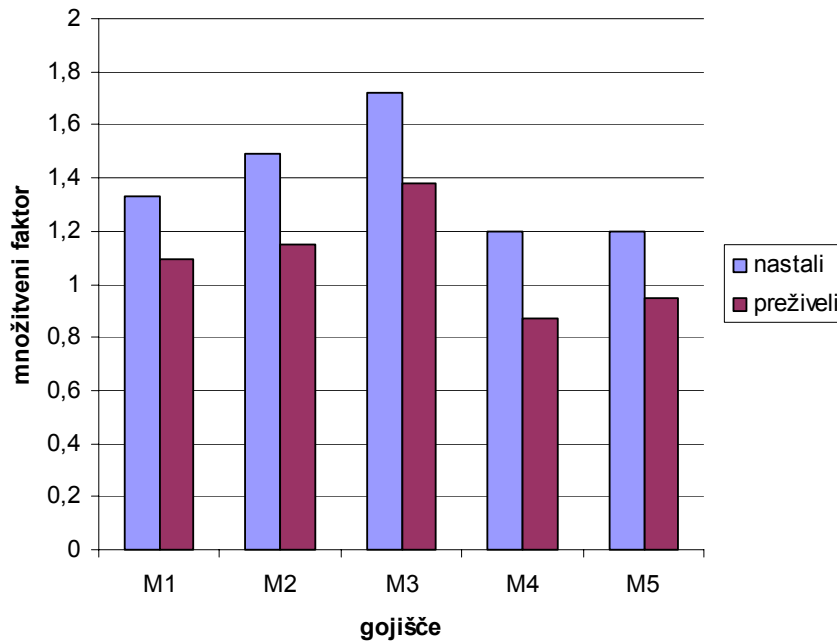
Gojišče	Poganjki			
	inokulirani	nastali	preživali	propadli
M1	250	333	274	59
M2	273	408	315	93
M3	215	369	296	73
M4	214	257	186	71
M5	146	176	139	37

Na M1 gojišče je bilo inokuliranih 250 poganjkov oz. segmentov, iz njih je po končanih subkultivacijah nastalo 333 poganjkov, preživelih jih je 274 in propadlo jih je 59. Na M2 gojišče je bilo nastavljenih 273 poganjkov, nastalo jih je 408, preživelih je 315 in propadlo je 93 poganjkov. Na M3 gojišče je bilo vključenih 215 poganjkov, nastalo jih je 369, preživelih je 296 in propadlo jih je 73. Na M4 gojišču je iz 214 inokuliranih poganjkov nastalo 275 in preživelih jih je 186 ter propadlo jih je 71. Na M5 gojišču je od skupno 146 inokuliranih poganjkov nastalo 176, preživelih jih je 139 in propadlo jih je 37 (preglednica 3).



Slika 3: Odstotek preživelih in propadlih poganjkov pravega kostanja na petih gojiščih za razmnoževanje

Največ 82,28% oz. 80,21% poganjkov je preživel na M1 in M3 gojišču za razmnoževanje. Nekoliko manj 78,99% in 77,21% je bilo vitalnih na M5 in M2 gojišču. Najmanj 72,37% je preživel oz. bilo uporabnih za nadaljnje delo na M4 gojišču. Propadlo je od 17,72% do 27,62% poganjkov odvisno od sestave gojišča, saj so bili vsi ostali pogoji *in vitro* gojenja enaki (slika 3).



Slika 4: Množitveni faktor nastalih in preživelih poganjkov pravega kostanja na petih gojiščih za razmnoževanje



Slika 5: Poganjki pravega kostanja nastali na gojišču za razmnoževanje

Množitveni faktor nastalih poganjkov na M1 gojišču je bil 1,3 poganjka v skupku. Vsi nastali poganjki niso bili vitalni oz. niso preživelih. Množitveni faktor samo preživelih oz. primernih za nadaljnje delo na M1 gojišču je bil 1,1. Na M2 gojišču je bil množitveni faktor nastalih poganjkov 1,5 in preživelih 1,1. Na M3 gojišču je bil skupni množitveni faktor kar 1,7 in preživelih 1,4. Na M4 in M5 gojišču je bil množitveni faktor nastalih poganjkov 1,2 in preživelih 0,8 na M4 gojišču ter 0,9 na M5 gojišču (slika 4 in 5).

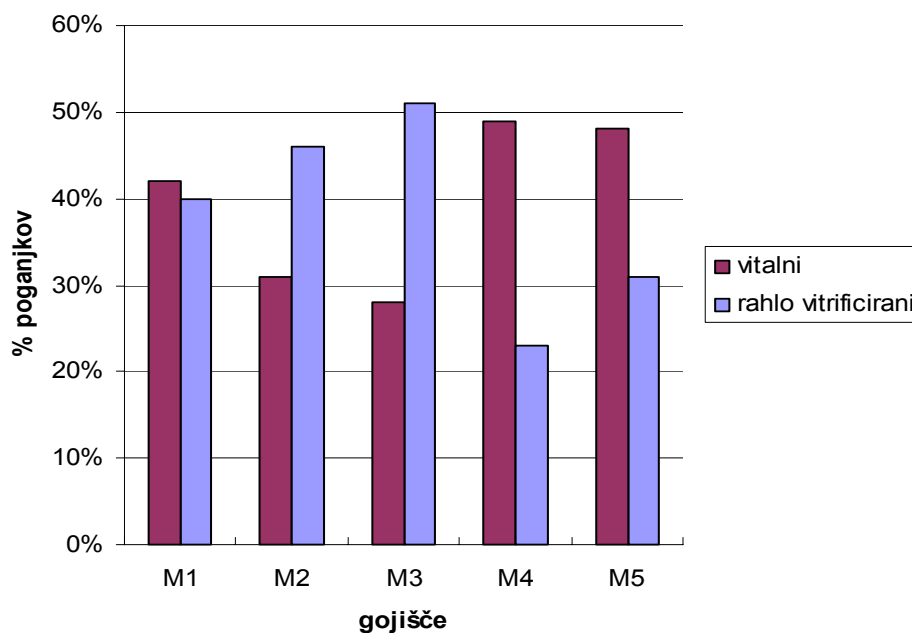
4.1.1 Preživelih poganjki

Na M1, M2 do M5 razmnoževalnih gojiščih smo za preživele poganjke imenovali tiste, kateri so bili vitalni in rahlo vitrificirani. Ti so bili subkultivirani na sveža gojišča za razmnoževanje ali koreninjenje oz. primerni za nadaljnje delo.

Preglednica 4: Število vitalnih in rahlo vitrificiranih poganjkov pravega kostanja na petih gojiščih za razmnoževanje

Gojišče	Poganjki		
	vitalni	rahlo vitrificirani	Σ preživelih
M1	140	134	274
M2	125	190	315
M3	107	189	296
M4	127	59	186
M5	84	55	139

Od 274 preživelih poganjkov na M1 gojišču je bilo 140 vitalnih in 134 rahlo vitrificiranih. Na M2 gojišču je bilo od 315 preživelih poganjkov, 125 vitalnih in 190 rahlo vitrificiranih. Na M3 gojišču je preživelo 296 poganjkov in od teh je bilo 107 vitalnih in 189 rahlo vitrificiranih. 186 poganjkov je preživelo na M4 gojišču in od teh je bilo 127 vitalnih in 59 rahlo vitrificiranih. Na M5 gojišču je bilo od 139 preživelih poganjkov 84 vitalnih in 55 rahlo vitrificiranih (preglednica 4).



Slika 6: Odstotek vitalnih in rahlo vitrificiranih poganjkov pravega kostanja na petih gojiščih za razmnoževanje

Na M1 gojišču je bilo 42,04% vitalnih in 40,24% rahlo vitrificiranih, ostali so propadli. Na M2 gojišču je bilo 30,64% vitalnih in 46,57% rahlo vitrificiranih. Na M3 gojišču je nastalo 28,99% vitalnih in 51,22% rahlo vitrificiranih poganjkov. Na M4 gojišču je bilo največ, kar 49,41% vitalnih ter 22,96% rahlo vitrificiranih. Na M5 gojišču je bilo 47,73% vitalnih in 31,25% rahlo vitrificiranih poganjkov (slika 6).

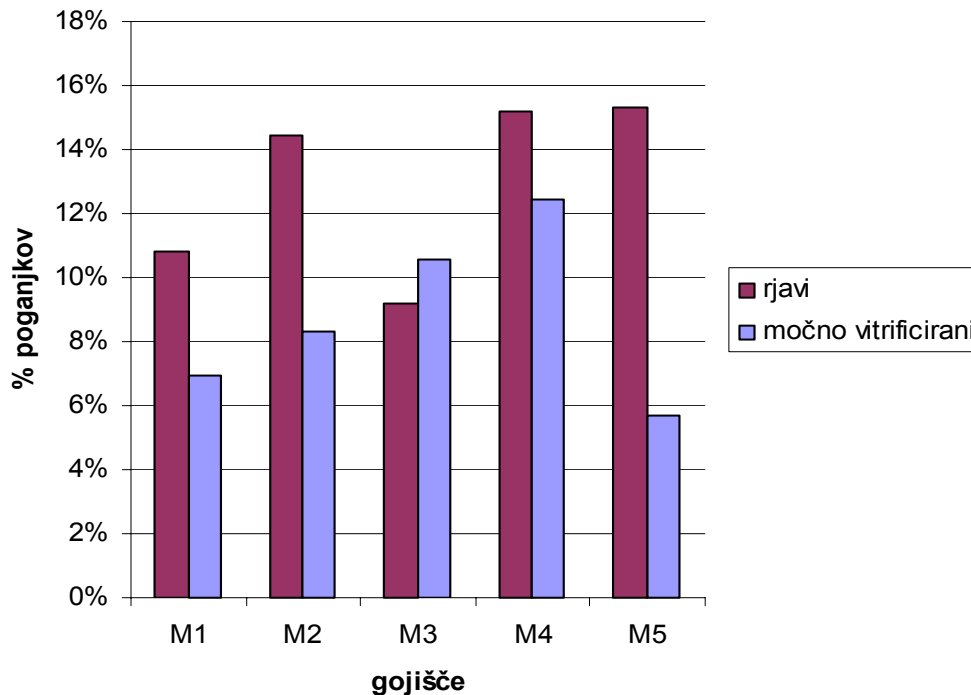
4.1.2 Propadli poganjki

Med propadle poganjke smo uvrstili rjave (odmrle) in močno vitrificirane. Te smo izločili iz nadaljnega dela.

Preglednica 5: Število rjavih in močno vitrificiranih oz. propadlih poganjkov pravega kostanja na petih gojiščih za razmnoževanje

Gojišče	Poganjki		
	rjavi	močno vitrificirani	Σ propadli
M1	36	23	59
M2	59	34	93
M3	34	39	73
M4	39	32	71
M5	27	10	37

Na M1 gojišču je propadlo 59 poganjkov, 36 je bilo rjavih in 23 močno vitrificiranih. Od 93 propadlih poganjkov na M2 gojišču je bilo 59 rjavih in 34 močno vitrificiranih. 73 propadlih poganjkov je bilo na M3 gojišču, od teh je bilo 34 rjavih in 39 močno vitrificiranih. Na M4 gojišču je propadlo 71 poganjkov od teh je bilo 39 rjavih in 32 močno vitrificiranih. Na M5 gojišču je propadlo 37 poganjkov, 27 je bilo rjavih in 10 močno vitrificiranih (preglednica 5).



Slika 7: Odstotek rjavih in močno vitrificiranih poganjkov pravega kostanja na petih gojiščih za razmnoževanje

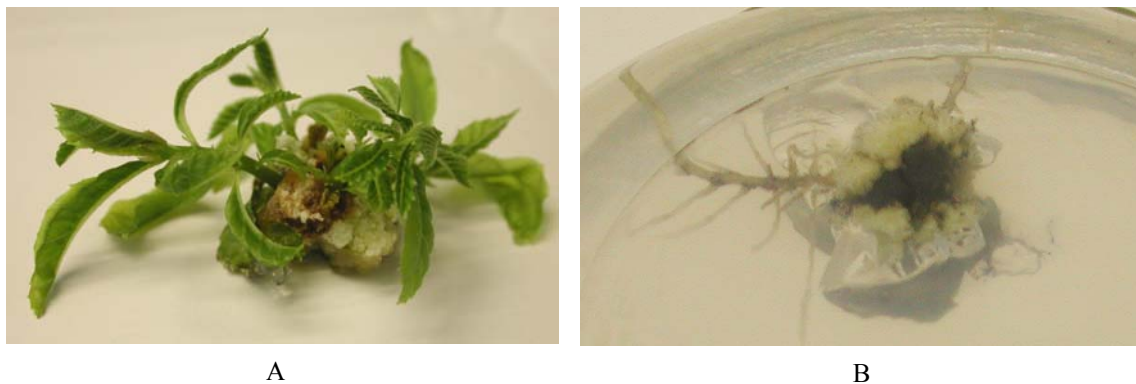
Na M1 gojišču je propadlo oz. bilo izločenih najmanj samo 17,72% poganjkov. Od vseh nastalih poganjkov na tem gojišču je bilo 10,81% rjavih in 6,91% močno vitrificiranih. Nekoliko več 19,79% poganjkov je propadlo na M3 gojišču, na katerem je bilo 9,21% rjavih in 10,57% močno vitrificiranih. Na M5 gojišču je propadlo 21,02% poganjkov. Na tem gojišču je bilo od nastalih poganjkov 15,34% rjavih in 5,68% močno vitrificiranih. Na M2 gojišču je propadlo 22,79% poganjkov. Od vseh nastalih poganjkov na tem gojišču je bilo 14,46% rjavih in 8,33% močno vitrificiranih. Na M4 gojišču je propadlo največ, kar 27,62% poganjkov in od vseh nastalih je bilo 15,17% rjavih in 12,45% močno vitrificiranih (slika 3, 7, 8A in 8B).



Slika 8: Propadli poganjki: A - rjavi; B - močno vitrificirani

4.1.3 Izločki in kalus

Kot negativen pojav, razen vitrifikacije in rjavenja poganjkov, so se pojavljali izločki v gojiščih in kalus pri bazi poganjkov na razmnoževalnih gojiščih (slika 9A) ter na gojiščih za koreninjenje (slika 9B).



Slika 9: Negativni pojav pri razmnoževanju pravega kostanja: A - kalus na bazi razmnoženih poganjkov; B - kalus med poganjkom in koreninami

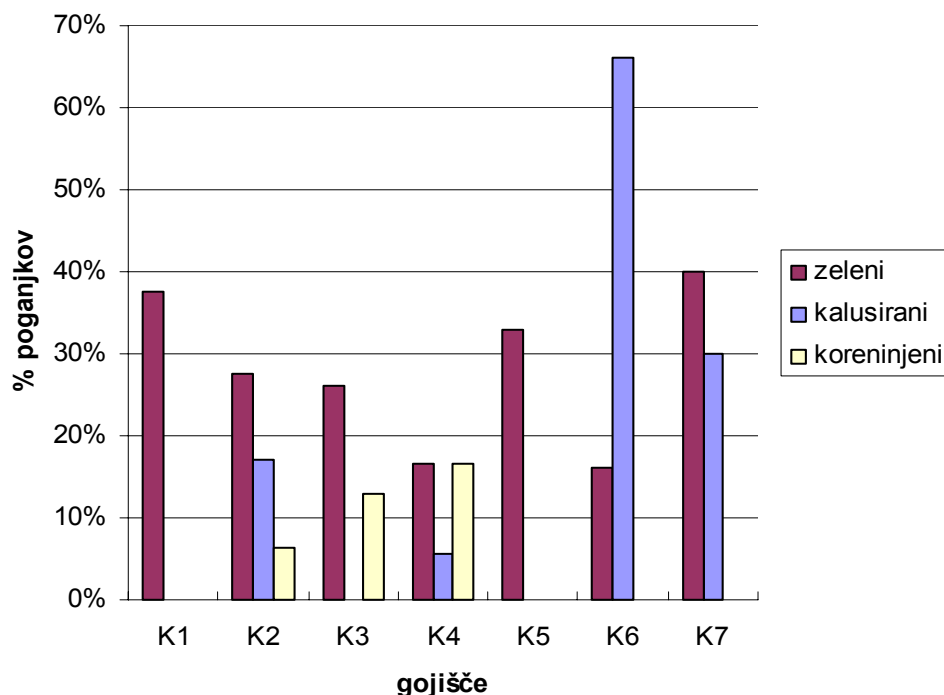
Izločki so negativno vplivali na vitrifikacijo in rjavenje poganjkov ter zmanjševali uspeh razmnoževanja kostanja. Fenolne izločke v gojišče so izločali odrezani poganjki takoj po subkultivaciji. Po 7 do 10 dneh se je izločanje ustavilo. Glede na velikost in intenziteto obarvanja gojišča smo določili potreben čas subkultivacije. Poganjki, ki so bili več kot 30 dni na gojišču z izločki so začeli propadati. Pri njih se je pojavila vitrifikacija, pri drugih rjavenje oz. kombinacija obojega (slika 8A in B).

Kalus se je začel oblikovati po 7 do 14 dneh na odrezanih mestih. Zelo pogosto na bazi poganjkov, ne glede na gojišče (slika 9A in B). Rast kalusa med poganjkom in koreninami, je veliko bolj moteče kot na bazo poganjka na gojišču za razmnoževanje. Nastali kalus se je razlikoval po hitrosti rasti, velikosti in tipu oz. obliki. Ponekod se je razvil trd, zelen kalus, ki je lahko popolnoma prerasel poganjke. Pri drugih izsečkih se je razvil mehkejši, bel in zelo lomljiv kalus. Ta se je pojavljal tudi na listih, ki so se dotikali gojišča. Med poganjki in koreninami je nastal trd, bel do rahlo zelen kalus (slika 9B).

4.2 KORENINJENJE POGANJKOV

Preglednica 6: Število inokuliranih, preživelih, koreninjenih in propadlih poganjkov pravega kostanja na sedmih gojiščih za koreninjenje

Gojišče	Poganjki				
	inokulirani	preživali			propadli
		zeleni	kalusirani	koreninjeni	
K1	8	3	/	/	5
K2	47	13	8	3	23
K3	15	4	/	2	9
K4	18	3	1	3	11
K5	12	4	/	/	8
K6	6	1	4	/	1
K7	10	4	3	/	3

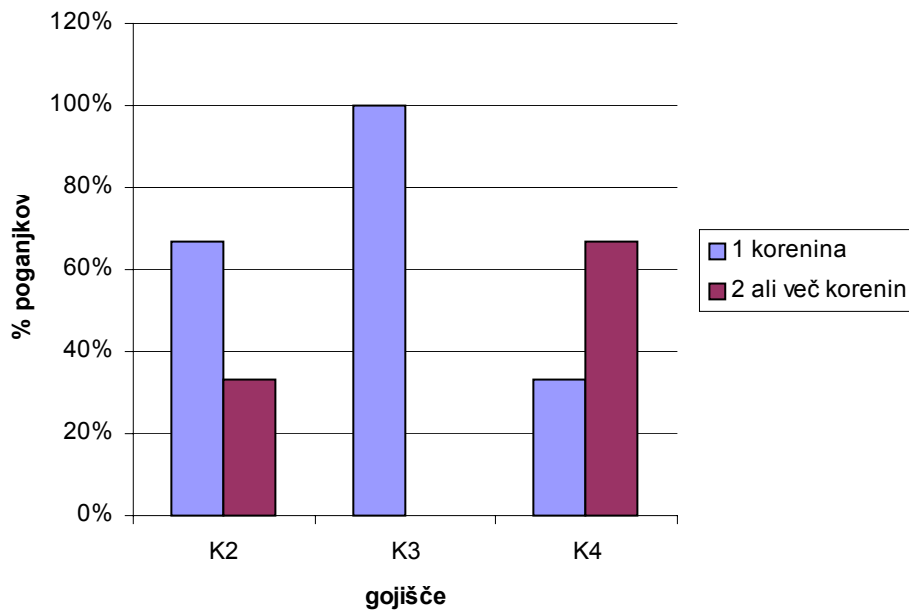


Slika 10: Odstotek nekoreninjenih zelenih, kalusiranih ter koreninjenih poganjkov pravega kostanja

Na K1 gojišče je bilo inokuliranih 8 poganjkov, preživel so trije oz. 37,50%. Ti so ostali zeleni, brez kalusa, vendar niso tvorili korenin. Na K2 gojišče je bilo inokuliranih 47 poganjkov, 13 oz. 27,66% je bilo zelenih, 8 oz. 17,02% je kalusiralo, korenine so oblikovali trije oz. 6,38%, ostali so propadli. Na K3 gojišče je bilo inokuliranih 15 poganjkov, koreninila sta 2 oz. 13% poganjkov, ostalih 26,66% je ostalo zelenih. Na K4 gojišču je od 18 nastavljenih, koreninilo največ poganjkov, kar 16,66% in 5,5% poganjkov je kalusiralo ter 16,66% jih je ostalo zelenih. Na K5 gojišču je od 12 inokuliranih poganjkov samo 33,33% preživelo. Ti so ostali zeleni, a brez korenin. Na K6 gojišče je bilo nastavljenih samo 6 poganjkov, preživelo jih je 83,33%. Od teh je bilo 16,66% zelenih in 66,66% kalusiranih, noben ni tvoril korenin. Na K7 gojišču od 10 nastavljenih poganjkov noben ni tvoril korenin, kar 40% jih je bilo zelenih in 30% jih je tvorilo kalus (preglednica 6, slika 10).

Preglednica 7: Število poganjkov pravega kostanja z eno, dvema ali več koreninami

Gojišče	Poganjki z	
	1 korenino	2 ali več koreninami
K2	2	1
K3	2	/
K4	1	2



Slika 11: Odstotki koreninjenih poganjkov pravega kostanja z eno oz. več koreninami

Najboljši rezultati koreninjenja so bili doseženi na K2, K3 in K4 gojiščih. Na ostalih K1, K5, K6 in K7 gojiščih poganjki niso tvorili korenin (preglednica 6, 7 in slika 10, 11).

Na K2 gojišču je koreninilo 6,38% poganjkov, od teh je imelo 67% eno korenino in 33% dve korenini. Na K3 gojišču je koreninilo 13% poganjkov, vsi so imeli po eno korenino. Na K4 gojišču je koreninilo največ, kar 16,66% poganjkov, od teh je imelo 33% poganjkov eno korenino in 67% dve oz. več korenin (preglednica 7, slika 11 in 12).



Slika 12: Korenjeni poganjki pravega kostanja

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V poskus *in vitro* koreninjenja je bil vključen pomlajen 7 let star kostanj (*Castanea sativa* Mill.) z območja severovzhodne Slovenije. Poimenovan je bil genotip 'Sobota'. Poganjki z brsti so bili nabrali marca in aprila leta 2003. Brsti so bili površinsko sterilizirani in inokulirali na gojišče za indukcijo ter nato na regeneracijo (Zavrl Fras, 2004). Poganjki, ki so nastali na regeneracijskem gojišču so bili razrezani na 0,5 cm segmente in inokulirali na modificirano razmnoževalno gojišče (Vodenik, 2005).

Poganjki, velikosti 0,5 - 1,5 cm so bili v letu 2006 razrezani na segmente in inokulirani na 5 razmnoževalnih gojišč z oznakami M1, M2 do M5 (preglednica 1). Vitalne poganjke, velike približno 1,5 cm smo vključili v poskus koreninjenja na 7 gojišč z oznakami K1, K2 do K7 (preglednica 2). Na vsakih štiri do šest tednov smo manjše poganjke subkultivirali na sveža razmnoževalna gojišča. Približno 1,5 cm poganjke pa na gojišča za koreninjenje. Poskus je bil sestavljen iz 5 subkultivacij, v katerih smo poganjke, glede na velikost inokulirali na gojišča za razmnoževanje oz. koreninjenje ter spremljali uspešnost razmnoževanja in koreninjenja oz. število nastalih poganjkov brez in s koreninami.

5.1.1 Razmnožitev poganjkov

Razmnoževalno MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ (Murashige in Skoog, 1962; Vieitez in sod., 1983) gojišče smo s povečano koncentracijo CaCl₂ hoteli izboljšati in prilagoditi genotipu 'Sobota', da bi dobili čim več vitalnih poganjkov. Znano je, da Fe v kombinaciji s CaCl₂ preprečuje rjavenje poganjkov in izboljšuje koreninjenje, zato smo v razmnoževalna gojišča dodajali večje količine CaCl₂, glede na izhodiščno MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ gojišče. M1, M2 do M5 gojišča so vsebovala od 332,2 - 1328,8 mg/l CaCl₂ in pH 5,7, razen M4 gojišča s pH 5,5 (preglednica 1).

Iz posameznega segmenta z zalistnikom lahko pri kostanju na razmnoževalnem gojišču dobimo več stranskih poganjkov. Propad oz. rjavenje glavnega poganjka lahko povzroči, da se stranski boljše razvijajo in da jih nastane več, zaradi apikalne dominancije in premestitve ter transportiranja hranil v stranske zemetke in poganjke. Rjavenje pa se lahko iz glavnega poganjka širi tudi na stranske.

Skupni množitveni faktor na M1 gojišču, v katerem je bilo najmanj 332,2 mg/l CaCl₂ in pH 5,7, je bil 1,3 poganjka v skupku. Vsi nastali poganjki niso bili vitalni oz. niso preživeli. Množitveni faktor preživelih oz. primernih za nadaljnje razmnoževanje in koreninjenje je bil 1,1. Na M2 gojišču z 664,4 mg/l CaCl₂ je bil skupni množitveni faktor oz. nastalih poganjkov 1,5, preživelih 1,1. Na M3 gojišču z 1328,8 mg/l je bil skupni

množitveni faktor najvišji 1,7, preživelih pa 1,4. Na M4 gojišču z 1328,8 mg/l CaCl₂ in pH 5,5 je bil množitveni faktor nastalih 1,2, preživelih pa 0,87. Na M5 gojišču z enako koncentracijo CaCl₂, kot v M4 gojišču in pH 5,7 je bil množitveni faktor nastalih poganjkov 1,2, preživelih pa 0,9 (slika 4 in 5).

Največ 82,28% poganjkov je preživel na M1 gojišču. Nekoliko manj 80,43% je bilo primernih za nadaljnje delo na M3 gojišču. Na M5 gojišču je preživel 78,97% poganjkov in na M2 77,20% poganjkov ter na M4 72,37% (preglednica 3 in slika 2). Zvišana koncentracija CaCl₂ za 996,6 mg/l ni imela velikega učinka na preživelost poganjkov. Razlika v preživelosti na M1 gojišču z nižjo koncentraciji CaCl₂ je bila za 1,85% boljše kot na M3 gojišču z najvišjo koncentracijo CaCl₂. Pri enaki koncentraciji CaCl₂ in vrednosti pH 5,5 na M4 gojišču je bila preživelost najslabša samo 72,37%. Razlika v preživelosti poganjkov med najboljšim M1 gojiščem in najslabšim M4 gojiščem v razmnoževanju je bila samo 6,91%.

Ker je kostanj zelo zahtevna vrsta za *in vitro* razmnoževanje se je izkazalo modificirano MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ gojišče (Vieitez in sod., 1983) z oznako M3, kot primerno za razmnoževanje, saj je bilo 80,43% preživelih poganjkov, kar ni bilo največ, je pa na tem gojišču bil skupni množitveni faktor 1,7 in preživelih 1,4 (slika 3 in 4).

Avtorji Soyulu in Ertürk (1999) ter Ballester in sod. (2001) so ugotovili, da ni mogoče podati nekega splošnega gojišča za mikropropagacijo kostanja. Poudarjajo, da je uspeh mikropropagacije odvisen od genotipa in starosti matične rastline in da je potrebno prilagoditi gojišče posameznemu genotipu kostanja.

5.1.1.1 Preživelimi poganjki

Med preživelimi poganjki so bili najboljši za nadaljnje razmnoževanje in koreninjenje vitalni poganjki in tudi rahlo vitrificirani. Vitrifikacija, predvsem rahla se lahko ob pogostem subkultiviranju in dodajanju večje količine strjevalca v gojišče izboljša oz. popolnoma izgine, kar smo opazili tudi v našem poskusu. Pojavila se je lahko takoj po inokulaciji kulture ali kasneje, ko so bili poganjki že večji. Vitrifikacija je nezaželen pojav v tkivni kulturi, saj oslabi tkiva in povzroči, da celice sprejemajo preveč vode iz gojišča in okolice, zaradi tega so poganjki steklasti, nabrekli in se slabše ter počasneje razvijajo. Na pojav vitrifkacije lahko vplivajo večje koncentracije rastlinskih hormonov, soli, strjevalci, pH vrednost gojišča ter intenziteta svetlobe in temperatura gojenja.

Od vseh nastalih regenerantov je bilo največ 49,41% vitalnih na M4 gojišču, nekaj manj 47,73% jih je bilo na M5 gojišču, najmanj 28,99% jih je bilo na M3 gojišču. Na M3 gojišču je bilo največ 51,22% rahlo vitrificirani in najmanj 22,96% rahlo vitrificiranih je blo na M4 gojišču (preglednica 4 in slika 6).

5.1.1.2 Propadli poganjki

Propadli poganjki so bili rjavi in močno vitrificirani. Nekroza oz. propad poganjka se je pričel z rjavenjem vršička, stebela in nato listov. Ko je nekroza zajela spodnje liste je poganjek popolnoma propadel (slika 8A). Take smo izločili iz poskusa. Prav tako so bili izločeni iz poskusa močno vitrificirani poganjki (slika 8B). Največ 27,63% poganjkov je propadlo na M4 gojišču in najmanj 17,72% jih je propadlo na M1 gojišču (slika 3).

Od vseh nastalih poganjkov jih je bilo največ 15,43% rjavih na M5 gojišču in največ 12,45% močno vitrificiranih na M4 gojišču. Najmanj 9,21% rjavih poganjkov je bilo na M3 gojišču in najmanj 5,68% močno vitrificiranih je bilo na M5 gojišču (slika 3 in 7). Višja koncentracija CaCl_2 ni imela pozitivnega vpliva na preživetje poganjkov in na uspeh razmnoževanja.

5.1.1.3 Izločki in kalus

Avtorji Vieitez in Vieitez (1980) ter Mullins (1987), ki so se ukvarjali z mikropropagacijo kostanja so omenjali izločke, kot zaviralce rasti in razvoja poganjkov. Tudi v našem poskusu so bili prisotni izločki. Ti so se pojavili, takoj ko smo poganjke inokulirali na gojišča. Izločki so bili rumeni, kasneje pa so potemneli. Čim bolj je bilo gojišče okrog izsečka temno, tem več je bilo izločkov. Poganjke smo v tej fazi subkultivirali na sveža gojišča, ker lahko izločki negativno vplivajo na rast poganjkov, hitrejšo in močnejšo vitrifikacijo ter rjavenje.

Poleg izločkov se je v kulturi kostanja pojavljal kalus, ki je imel tudi negativen vpliv na regeneracijo in razvoj poganjkov (slika 9A in B), vendar v manjšem obsegu kot vitrifikacija. Predvsem, kjer je bila intenzivna rast kalusa, je bilo gojišče močno izčrpano. Hranila so se porabljala za rast in namnoževanje kalusa. V teh primerih se je regeneracija ustavila ali upočasnila. Mullins (1987) poroča o močnem kalusiranju na gojišču z dodatkom 0,1 mg/l BAP. V naših razmnoževalnih gojiščih je bilo 1 mg/l BAP, kar je 10 kratna koncentracija, kot jo navaja Mullins (1987). Kljub povečani koncentraciji BAP v razmnoževalnih gojiščih velikih težav pri razmnoževanju poganjkov zaradi kalusa nismo opazili. Razvoj kalusa je lahko tudi znak, da je kostanj zelo problematična vrsta za razmnoževanje.

Več kalusa se je pojavljalo na bazi poganjkov, kateri so bili na K1, K2 do K7 gojiščih za koreninjenje. Ta gojišča niso vsebovala BAP, ki lahko vpliva na močnejšo rast kalusa, ampak samo avksine in giberelin in kljub temu so poganjki na bazi tvorili zelo veliko kalusa (preglednica 2).

Zaradi izločkov in kalusa smo poganjke pogosteje subkultivirali na sveže gojišče, da bi jim omogočili regeneracijo, rast in razvoj v vitalne poganjke. Kalus se je oblikoval na odrezanem oz. poškodovanem delu izsečka. Celjenje poškodovanih celic, tkiv oz. rast kalusa je težko preprečiti. Za kalus je znano, da je to tkivo, ki nastane iz neorganizirane delitve nediferenciranih in diferenciranih celic (Bohanec, 1992).

5.1.2. Koreninjenje

Za koreninjenje poganjkov smo izbrali bazalno gojišče, ki ima enako sestavo kot gojišče za razmnoževanje MS- $\frac{1}{2}$ NO₃, le povečali smo koncentracijo CaCl₂ in namesto BAP dodali hormon IBA, katerega koncentracije so se spreminjale od 1 do 4 mg/l, 2 mg/l IAA in NAA ter 0,1 mg/l GA₃, pH vrednost je bila 5,5 v K4 in K5 gojišču, v ostalih pa pH 5,7. Poganjki so koreninili na gojiščih K2, K3, in K4, na ostalih gojiščih poganjki niso tvorili korenin. K2 gojišče je vsebovalo 1 mg/l IBA, 332,2 mg/l CaCl₂ ter pH 5,7. Na tem gojišču je 6,38% poganjkov koreninilo, od teh je imelo 67% eno korenino in 33% dve korenini. V gojišču K3 smo povečali koncentracijo IBA na 2 mg/l ter CaCl₂ na 1328,8 mg/l in 13% poganjkov je koreninilo, vsi so imeli po eno korenino. K4 gojišče je vsebovalo 4 mg/l IBA in pH vrednost je bila 5,5, kar 16,66% poganjkov je koreninilo, od teh je imelo 33% poganjkov eno korenino in 67% dve oz. več korenin (preglednica 7, slika 11 in 12).

Povečana koncentracija CaCl₂ v kombinaciji s povišano koncentracijo avksina IBA je ugodno vplivala na koreninjenje. V našem poskusu smo imeli pomlajeno matično rastlino in največ samo 16,66% koreninjenje. Leta 1983 so Vieitez in sodelavci objavili raziskavo v kateri so za koreninjenje uporabili polovično koncentracijo gojišča MS- $\frac{1}{2}$ NO₃. Na tem gojišču so imeli 73% koreninjenje. *In vitro* gojeni poganjki našega genotipa 'Sobota' so na polovični koncentraciji MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ gojišča rjaveli in propadali. O propadanju oz. nekrozi poganjkov poročata Piagnani in Eccher (1988). Ugotovila sta, da nizke koncentracije dušika v gojišču vplivajo na rast kostanja, medtem ko visoke koncentracije dušika povzročajo vitifikacijo. Popolna odsotnost dušika v gojišču pa povzroča klorozo izsečkov. Avtorji Mullins (1987); Piagnani in Eccher (1988); Soylu in Ertürk (1999) poročajo o težavah pri razmnoževanju in koreninjenju kostanja *in vitro* in da na uspeh vplivata starost matičnih rastlin in genotip.

5.2 SKLEPI

Na M1 gojišču za razmnoževanje z 332,2 mg/l CaCl₂ in pH 5,7 je preživelo kar 82,28% poganjkov, nekoliko manj 80,21% poganjkov je preživelo na M3 gojišču z 1328,8 mg/l CaCl₂ in pH 5,7. Najmanj 72,37% poganjkov je preživelo na M4 gojišču z 1328,8 mg/l CaCl₂ in pH 5,5.

Od vseh nastalih poganjkov je bilo največ 49,41% vitalnih na M4 gojišču in na M3 gojišču je bilo največ 51,22% rahlo vitrificiranih. Vitalni in rahlo vitrificirani so bili uporabni za nadaljnje razmnoževanje in koreninjenje.

Najboljši množitveni faktor, v povprečju 1,4 preživelih poganjkov v skupku je nastalo na M3 gojišču. Na ostalih gojiščih za razmnoževanje je bil množitveni faktor preživelih poganjkov med 0,8 in 1,1.

Propadlo je največ 27,63% poganjkov na M4 gojišču in najmanj 17,72% poganjkov na M1 gojišču. Od skupno nastalih poganjkov je bilo največ 15,34% rjavih na M5 gojišču in največ 12,45% poganjkov je bilo močno vitrificiranih na M4 gojišču. Rjave in močno vitrificirane poganjke smo izločili iz nadaljnjega dela.

Na K2 gojišču je koreninilo 6,38% poganjkov, od teh je imelo 67% eno korenino in 33% dve korenini. Na K3 gojišču je koreninilo 13% poganjkov, vsi so imeli po eno korenino. Na K4 gojišču je koreninilo največ, kar 16,66% poganjkov, od teh je imelo 33% poganjkov eno korenino in 67% dve oz. več korenin.

Vsi koreninjeni poganjki so najprej na bazi kalusirali in nato odgnali korenine. Kalus lahko povzroči, da prevodna sistema poganjka in korenin nista spojena in s tem je onemogočen prehod hranil, kar vpliva na preživelost v obdobju aklimatizacije.

Višja koncentracija $CaCa_2$ v gojiščih za razmnoževanje ni imela pozitivnega vpliva na preživetje poganjkov in na uspeh razmnožitve, medtem ko je višja koncentracija 1328,8 mg/l $CaCa_2$ v kombinaciji s povišano koncentracijo avksina IBA (2 in 4 mg/l) ugodno vplivala na koreninjenje.

6 POVZETEK

Pravi kostanj (*Castanea sativa* Mill.) je gozdna in sadna vrsta, ki je bila nekoč bolj razširjena v Sredozemlju in drugje po Evropi kot v Sloveniji. Leta 1950 so se v Sloveniji površine zmanjšale za polovico, predvsem zaradi gliv *Cryphonetria parasitica*, ki povzroča kostanjev rak in *Phytophthora cambivora*, ki povzroča črnilovko - trohnenje lesa, rjavenje mladih poganjkov in listov. Zaradi uporabne vrednosti kostanja, uporabna je cela rastlina, se v zadnjem obdobju vedno bolj obnavljajo prizadeta območja. Za obnovo nasadov in pogozdovanje se uporablja zdrav sadilni material, katerega je, z obstoječimi metodami razmnoževanja, težko razmnožiti v zadostni količini. Zato se iščejo možnosti *in vitro* razmnoževanja.

Kostanj je lesnata vrsta, ki se težje razmnožuje tako s semenom (generativno), kot tudi vegetativno s potaknjenci in cepljenjem. Lesnate rastline za razliko od enoletnih zelnatih s starostjo postajajo ne samo morfološko, ampak tudi fiziološko stare, kar vpliva na njihovo regeneracijsko sposobnost.

Problem pri cepljenju kostanja je neskladje podlage in cepiča. Cepljenje rastline prej zarodijo, vendar jih veliko že v začetnih letih propade. Pri potaknjencih je velik problem fiziološka starost matičnih rastlin. S tehnikami tkivnih kultur lahko fiziološko stari material pomladimo in s tem dobimo material, ki bi se lažje in hitreje koreninil.

Cilj naloge je bil razmnožiti čim več vitalnih regenerantov, ki bi bili sposobni oblikovati močan koreninski sistem in bili primerni za saditev na prostem. Uspešna mikropropagacija kostanja, bi lahko bila ena od metod vegetativnega razmnoževanja zelenih genotipov.

V poskus je bil vključen pomlajen, 7 let star genotip pravega kostanja (*Castanea sativa* Mill.) iz severovzhodne Slovenije. Poimenovan je bil 'Sobota'. Poganjki z brsti so bili nabrani zgodaj spomladi, marca in aprila leta 2003 ter po površinski sterilizaciji inokulirani na gojišče za regeneracijo (Zavr1 Fras, 2004). Poganjki velikosti 0,5 - 1 cm so bili razrezani na segmente in inokulirani na razmnoževalno gojišče v petrijevke 90 × 20 mm (Vodenik, 2005).

Na vsakih štiri do šest tednov smo manjše poganjke subkultivirali na sveža razmnoževalna gojišča z oznakami M1, M2 do M5. Približno 1,5 cm poganjke pa na gojišča za koreninjenje z oznakami K1, K2 do K7. Gojišča so vsebovala makro- in mikroelemente MS (Murashige in Skoog, 1962) gojišča s polovično koncentracijo dveh nitratov KNO₃ in NH₄NO₃ (Vieitez in sod., 1983) ter različne koncentracije CaCl₂, hormonov in pH. Razmnoževalno M1 gojišče je vsebovalo 332,2 mg/l CaCl₂, 1 mg/l BAP in pH vrednost je bila 5,7. M2 gojišče je vsebovalo 664,4 mg/l CaCl₂, vse ostalo je bilo enako kot pri M1 gojišču. M3 gojišče se je od prejšnjih dveh ločilo po povišani koncentraciji CaCl₂, ki je

bila 1328,8 mg/l. Gojišču M4 smo samo znižali pH na 5,5. M5 gojišču smo zvišali pH na 5,7 in dodali 0,1 mg/l GA3 (preglednica 1).

K1 gojišče je vsebovalo 150 mg/l CaCl₂ in 1 mg/l IBA ter pH vrednost je bila 5,7. K2 gojišče se je od K1 razlikovalo samo v koncentraciji CaCl₂ (332,2 mg/l). K3 gojišče je vsebovalo 1328,8 mg/l CaCl₂ in 2 mg/l IBA. K4, K5, K6 in K7 gojišča so imela enako koncentracijo CaCl₂ kot K3 gojišče. V K4 gojišče je bilo poleg ostalih sestavin dodano 4 mg/l IBA in pH vrednost je bila 5,5. K5 gojišče se je od K4 razlikovalo v povečani koncentraciji 6 mg/l IBA. K6 gojišče je vsebovalo 4 mg/l IBA in 0,1 mg/l GA3 ter pH vrednost je bila 5,7. K7 gojišče se je od K6 razlikovalo v vsebnosti 2 mg/l IAA in 2 mg/l NAA (preglednica 2).

Največ 82,28% poganjkov je preživel oz. bilo uporabnih za razmnoževanje in koreninjenje na M1 gojišču. Na M3 gojišču je preživel nekaj manj 80,22% poganjkov. 78,99% poganjkov je preživel na M5 gojišču in 77,21% na M2 gojišču. Najmanj 72,37% poganjkov je preživel oz. bilo uporabnih za nadaljnje delo na M4 gojišču (slika 3).

Množitveni faktor nastalih poganjkov na M1 gojišču je bil 1,3 poganjka v skupku. Vsi nastali poganjki niso bili vitalni oz. niso preživeli. Množitveni faktor samo preživelih oz. primernih za nadaljnje delo na M1 gojišču je bil 1,1. Na M2 gojišču je bil množitveni faktor nastalih poganjkov 1,5 in preživelih 1,1. Na M3 gojišču je bil skupni množitveni faktor kar 1,7 in preživelih 1,4. Na M4 in M5 gojišču je bil množitveni faktor nastalih poganjkov 1,2 in preživelih 0,8 na M4 gojišču ter 0,9 na M5 gojišču (slika 4 in 5).

Med preživeli poganjki so bili primerni za nadaljnje razmnoževanje in koreninjenje vitalni in rahlo vitrificirani poganjki. Vitrificiranost, predvsem rahla se je pri pogosti subkultivaciji izboljšala oz. popolnoma izginila. Vitrifikacija se je pojavljala takoj po inokulaciji kulture in tudi pri večjih poganjkih (slika 8B). Vitrifikacija slabi odpornost tkiv, ki se zaradi tega slabše in počasneje razvijajo. Razmerje vitalnih in rahlo vitrificiranih je bilo ugodnejše za vitalne na M4 gojišču (49,41% vitalnih in 22,96% rahlo vitrificiranih) in M5 gojišču (47,73% vitalnih in 31,25% rahlo vitrificiranih) ter M1 gojišču (42,04% vitalnih in 40,24% rahlo vitrificiranih). Na M2 gojišču je bilo 30,64% vitalnih in 46,57% rahlo vitrificiranih ter na M3 gojišču je bilo 28,99% vitalnih in 51,22% rahlo vitrificiranih (preglednica 4 in slika 6). Ostali poganjki na razmnoževalnih gojiščih so propadli.

Med propadlimi so bili rjavi in močno vitrificirani poganjki. Nekroza oz. propad poganjka se je začelo z rjavenjem vršička, stebela in nato listov. Ko je nekroza zajela spodnje liste je poganjek popolnoma propadel (slika 8A). Te smo izločili iz poskusa. Na M1 gojišču je propadlo oz. bilo izločenih 17,72% poganjkov. Od vseh nastalih poganjkov je bilo na M1 gojišču 10,81% rjavih in 6,91% močno vitrificiranih. Na M2 gojišču je propadlo 22,79% poganjkov oz. od vseh na tem gojišču je bilo 14,46% rjavih in 8,33% močno vitrificiranih.

Na M3 gojišču je propadlo 19,79% poganjkov, 9,21% je bilo rjavih in 10,57% močno vitrificiranih. Na M4 gojišču je propadlo največ, kar 27,62% poganjkov, 15,17% je bilo rjavih in 12,45% močno vitrificiranih. Na M5 gojišču je propadlo 21,02% poganjkov, 15,34% je bilo rjavih in 5,68% močno vitrificiranih (slika 3 in 7). Višja koncentracija CaCl_2 ni imela pozitivnega vpliva na preživetje poganjkov in uspeh razmnožitve.

Poganjki so koreninili na gojišču K2, K3, in K4, na ostalih gojiščih poganjki niso tvorili korenin. K2 gojišče je vsebovalo 1 mg/l IBA, 332,2 mg/l CaCl_2 ter pH 5,7. Na tem gojišču je 6,38% poganjkov koreninilo, od teh je imelo 67% eno korenino in 33% dve korenini. V gojišču K3 smo povečali koncentracijo IBA na 2 mg/l ter CaCl_2 na 1328,8 mg/l in 13% poganjkov je koreninilo, vsi so imeli po eno korenino. K4 gojišče je vsebovalo 4 mg/l IBA in pH vrednost je bila 5,5, kar 16,66% poganjkov je koreninilo, od teh je imelo 33% poganjkov eno korenino in 67% dve oz. več korenin (preglednica 7, slika 11 in 12). Povečana koncentracija CaCl_2 v kombinaciji s povišano koncentracijo avksina IBA je ugodno vplivala na koreninjenje.

Kostanj vsebuje veliko fenolnih snovi, ki so se na odrezanem oz. poškodovanem mestu izločali v gojišča. Avtorji Vieitez in Vieitez (1980) ter Mullins (1987), ki so se ukvarjali z mikropropagacijo kostanja so omenjali izločke, kot zaviralce rasti in razvoja poganjkov. V našem poskusu so bili prisotni tudi izločki. Ti so se pojavili, takoj ko smo poganjke inokulirali na gojišča. Izločki so bili rumeni, kasneje pa so potemneli. Čim bolj je bilo gojišče temno, tem več je bilo izločkov. Poganjke smo v tej fazi subkultivirali na sveže gojišče, da izločki ne bi zaviralno vplivali na rast poganjkov, na hitrejšo in močnejšo vitrifikacijo ter rjavenje.

Poleg izločkov se je v kulturi kostanja pojavljal kalus, ki je imel tudi negativen vpliv na regeneracijo in razvoj poganjkov, vendar veliko manjši kot izločki. Kalus se je oblikoval na odrezanem oz. poškodovanem delu izsečka, tako na gojišču za razmnoževanje kot na gojišču za koreninjenje (slika 9A in B). Več se ga je tvorilo na bazi poganjkov, kateri so bili na gojišču za koreninjenje.

7 VIRI

- Adamič F. 1995. Kmetijski tehniški slovar. Sadjarstvo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 68 str.
- Anić M., Košanin N., Nikolovski T., Sučić J., Wraber M. 1959. Pitomi kesten. V: Šumarska enciklopedija 1, A-Kos. Horvat I. (ur.) Zagreb, Leksikografski zavod FNRJ: 728-730
- Babnik M. 1992. Sadno drevje: sajenje, gojenje in rez. Ljubljana, Kmečki glas: 118 str.
- Ballester A., Bourrain L., Corredoira E., Goncalves J.C., Le C., Fontaina M.E.M., San Jose M., Sauer U., Vieitez A.M., Wilhelm E. 2001. Improving chestnut micropropagation through axillary shoot development and somatic embryogenesis. *Forest Snow and Landscape Research*, 76, 3: 460–467
- Bohanec B. 1992. Tehnike rastlinskih tkivnih kultur. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 168 str.
- Bulatović, S. 1983. Savremeno voćarstvo. Beograd, Nolit: 478 str.
- Eleršek L. 2001. Knjiga o gozdu: o njegovem pomenu, lepoti, podrobnosti in sestavi. Ljubljana, samozaložba: 142 str.
- Fabčič S. 1997. Vpliv podlag na uspeh cepljenja pravega kostanja (*Castanea sativa* Mill.). Višješolska diplomska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 46 str.
- Flora von Deutschland Österreich und der Schweiz (1885). 1999.
http://caliban.mpiz-koeln.mpg.de/.../tafel_001.html (5.8.2008)
- Godec B., Hudina M., Ileršič J., Koron D., Solar A., Usenik V., Vesel V. 2003. Kostanj – evrojaponski križanci (*Castanea sativa* x *Castanea crenata*). V: Sadni izbor za Slovenijo 2002. Krško, Revija za sadjarstvo, vinogradništvo in vinarstvo: 126-127
- Grecs Z. 2002. Razširjenost, rastne značilnosti in gojitvene lastnosti pravega kostanja *Castanea sativa* Mill. v Sloveniji. Specialistično delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo: 145 str.

- Gregorič V., Kalan J., Košir Ž. 1975. Gozdovi na slovenskem. V: Geološka in gozdnovegetacijska podoba. Ljubljana, Založba Borec v sodelovanju s poslovnim združenjem gozdnogospodarskih organizacij v Ljubljani: 26-62
- Gordon, B. 1991. Orchid Seedling Care (with special emphasis on water quality). Running Springs, Laid-Back Publications: 163 str.
- Katalinić J. 1973. Pčelarstvo. Zagreb, Nakladni zavod Znanje: 585 str.
- Kotar M., Brus R. 1999. Naše drevesne vrste. Ljubljana, Slovenska matica: 320 str.
- Lüdders P. 2004. Esskastanie (*Castanea sativa* Mill.): Botanik, Anbau und Verwendung einer alten Obstart. Erwebst - Obstbau, 46: 7-12
- Mlakar J. 1990. Dendrologija - drevesa in grmi Slovenije. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 164 str.
- Mullins K.V. 1987. Micropropagation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). Acta Horticulturae, 212: 525-530
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497
- Osterc G. 2004. Pomen mikrorazmnoževanja pri masovnem razmnoževanju lesnatih (sadnih) rastlin: vodilna metoda drevesničarske proizvodnje v prihodnje? V: Zbornik referatov 1. slovenskega sadjarskega kongresa z mednarodno udeležbo, Krško, 24. – 26. marec 2004. Hudina M.(ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Katedra za sadjarstvo: 593-599
- Perko F. 1995. Gojenje gozdov: ekologija, nega in varovanje. Ljubljana, Kmečki glas: 226 str.
- Petauer T. 1993. Leksikon rastlinskih bogastev. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 684 str.
- Piagnani C., Eccher T. 1988. Factors affecting the proliferation and rooting of chestnut *in vitro*. Acta Horticulturae, 227: 384-386
- Podjavoršek A. 1999. Pomološka proučitev in vrednotenje genetske variabilnosti pravega kostanja (*Castanea sativa* Mill.) v Sloveniji. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 95 str.

- Sanchez M., Carmen San-Jose M., Ferro E., Ballester A., Vieitez M.A. 1997. Improving micropropagation conditions for adult-phase shoots of chestnut. *Journal of Horticultural Science*, 72, 3: 433-443
- Sancin V. 1988. Sadje z našega vrta. Trst, Založništvo tržaškega tiska: 376 str.
- Serres R., Read P., Hackett W., Nissen P. 1990. Rooting of American chestnut microcuttings. *Journal of Environmental Horticulture*, 8, 2: 86-88
- Solar A. 2001a. Lupinarji: kostanj - splošni del. Gradivo za predavanja, strokovni študij, Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 2 str.
- Solar A. 2001b. Lupinarji - tehnologija pridelave: Kostanj. Gradivo za predavanje pri predmetu Sadjarstvo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 5 str.
- Soylu A., Ertürk U. 1999. Researches on micropropagation of chestnut. V: *Proceedings 2nd International Symposium of Chestnut*. Salesses G. (ur.). *Acta Horticulturae*, 494: 247-253
- Šiftar A. 1999. Cepljenje bukovk. *Moj mali svet*, 31, 11: 19
- Šiftar A. 2001. Avtovegetativno razmnoževanje rastlin - gradivo za predavanja pri predmetu Okrasne rastline. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 12 str.
- Šiftar A. 1992. *In vitro* grow rejuvenilized shoots from plants taken with grafting on the germinated seeds of chestnut. *Acta Horticulturae*, 300: 141-143
- Štampar F. 2002. Gojivne oblike in rez sadnih rastlin. Ljubljana, Kmečki glas: 109 str.
- Štampar F. 2004. Sadjarstvo danes in jutri. V: *Zbornik referatov 1. slovenskega sadjarskega kongresa z mednarodno udeležbo*, Hudina M. (ur.), Krško, 24.-26. marec 2004. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Katedra za sadjarstvo: 200-204
- Vieitez A. M., Vieitez M. L. 1980. Culture of chestnut shoots from buds *in vitro*. *Journal of Horticultural Science*, 55, 1: 83-84
- Vieitez A. M., Ballester A., Vieitez M. L., Vieitez E. 1983. *In vitro* plantlet regeneration of mature chestnut. *Journal of Horticultural Science*, 58, 4: 457-463

Vodenik T. 2005. Vegetativno razmnoževanje kostanja (*Castanea Sativa* Mill.) v *in vitro* razmerah. Visokošolska diplomska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 41 str.

Zavrl Fras M. 2004. Mikropropagacija kostanja (*Castanea Sativa* Mill.). Visokošolska diplomska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 60 str.

ZAHVALA

- izr. prof. dr. Zlati LUTHAR za strokovno in vsestransko pomoč pri laboratorijskem delu in pisanju diplomske dela, za njeno potrpežljivost in razumevanje, njene koristne nasvete, za spodbudne besede in za vso zavzetost,
- doc. dr. Gregorju OSTERCU in prof. dr. Ivanu KREFTU za hiter in natančen pregled diplomskega dela,
- sošolcem in prijateljem za vzpodbudo, pomoč in vedno prave besede,
- mojim staršem, ker so mi omogočili študij, da sem sploh lahko študirala ter za vso podporo; tako finančno, kot tudi moralno med študijem, da sem ga lahko končala.