

METKA ŠIŠKO

MIKROPROPAGACIJA KOŠČIČARJEV



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kmetijstvo
in biosistemske vede

Mikropropagacija koščičarjev

Avtorica
Metka Šiško

Junij 2022

Naslov <i>Title</i>	Mikropropagacija koščičarjev <i>Micropropagation of Stone Fruits</i>
Avtorica <i>Author</i>	Metka Šiško (Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede)
Recenzija <i>Review</i>	Zlata Luthar (Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta)
	Andrej Šušek (Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede)
Lektoriranje <i>Language editing</i>	Mojca Garantini
Tehnični urednik <i>Technical editor</i>	Jan Perša (Univerza v Mariboru, Univerzitetna založba)
Oblikovanje ovitka <i>Cover designer</i>	Jan Perša (Univerza v Mariboru, Univerzitetna založba)
Grafika na ovitku <i>Cover graphics</i>	Fotografije: Metka Šiško, 2022
Grafične priloge <i>Graphics material</i>	Fotografije, Metka Šiško, 2022
Založnik <i>Published by</i>	Univerza v Mariboru Univerzitetna založba Slomškov trg 15, 2000 Maribor, Slovenija https://press.um.si , zalozba@um.si
Izdajatelj <i>Issued by</i>	Univerza v Mariboru Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede Pivola 10, 2311 Hoče, Slovenija https://www.fkbv.um.si , fkbv@um.si
Izdaja <i>Edition</i>	Prva izdaja
Vrsta publikacija <i>Publication type</i>	E-knjiga
Dostopno na <i>Available at</i>	https://press.um.si/index.php/ump/catalog/book/690
Izdano <i>Published</i>	Maribor, Slovenija, junij 2022



© Univerza v Mariboru, Univerzitetna založba
/ University of Maribor, University Press

Besedilo/ Text © Šiško, 2022

To delo je objavljeno pod licenco Creative Commons Priznanje avtorstva 4.0 Mednarodna.
/ *This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License.*

Uporabnikom je dovoljeno tako nekomercialno kot tudi komercialno reproduciranje, distribuiranje, dajanje v najem, javna priobčitev in predelava avtorskega dela, pod pogojem, da navedejo avtorja izvirnega dela.

Vsa gradiva tretjih oseb v tej knjigi so objavljena pod licenco Creative Commons, razen če to ni navedeno drugače. Če želite ponovno uporabiti gradivo tretjih oseb, ki ni zajeto v licenci Creative Commons, boste morali pridobiti dovoljenje neposredno od imetnika avtorskih pravic.

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

CIP - Kataložni zapis o publikaciji
Univerzitetna knjižnica Maribor

581.165.1(075.8)(0.034.2)

ŠIŠKO, Metka, 1970-

Mikropropagacija koščičarjev [Elektronski vir] / avtorica Metka Šiško. - 1. izd. - E-knjiga. - Maribor : Univerza v Mariboru, Univerzitetna založba, 2022

Način dostopa (URL): <https://press.um.si/index.php/ump/catalog/book/690>

ISBN 978-961-286-607-5 (PDF)

doi: 10.18690/um.fkbv.8.2022

COBISS.SI-ID 112057347

ISBN 978-961-286-607-5 (pdf)

DOI <https://doi.org/10.18690/um.fkbv.8.2022>

Cena
Price Brezplačni izvod

Odgovorna oseba založnika prof. dr. Zdravko Kačič,
For publisher rektor Univerze v Mariboru

Citiranje Šiško, M. (2022). *Mikropropagacija koščičarjev*. Maribor:
Attribution Univerzitetna založba. doi: 10.18690/um.fkbv.8.2022

Kazalo

1	Uvodnik.....	1
2	Laboratorij in oprema.....	3
2.1	Komore za aseptično delo.....	3
2.2	Naprave za razkuževanje gojišč, steklovine in orodja	4
2.3	Dozator gojišča.....	7
2.4	Rastne komore.....	7
2.5	Druga oprema.....	8
3	Sestavine in priprava gojišč	9
3.1	Anorganske soli.....	9
3.2	Komercialna osnovna gojišča	12
3.3	Vitamini	13
3.4	Ogljikovi hidrati.....	14
3.5	Sredstva za strjevanje gojišč	14
3.5.1	Agar	14
3.5.2	Agarozna	15
3.5.3	Gerlit	15
3.6	Rastlinski rastni regulatorji	15
3.6.1	Avksini	15
3.6.2	Citokinini	16
3.6.3	Giberelini	16
3.6.4	Abscizinska kislina	17
3.6.5	Etilen	17
3.7	Aminokislina	17
3.8	Aktivno oglje.....	17
3.9	Redkeje uporabljene snovi.....	18
3.10	Vpliv pH gojišča.....	18
3.11	Razkuževanje gojišč	19
3.12	Priprava gojišč.....	19

4	Mikropropagacija	23
4.1	Priprava matičnih rastlin (stopnja 0).....	24
4.2	Iniciacija (uvajanje) rastlinske kulture (stopnja 1).....	25
4.3	Stopnja razmnoževanja poganjkov (stopnja 2).....	27
4.4	Koreninjenje (stopnja 3)	29
4.4.1	Vpliv rastnih regulatorjev	29
4.4.2	Vpliv velikosti posodic na koreninjenje	30
4.4.3	Vpliv makro- in mikroelementov na koreninjenje	30
4.4.4	Vpliv dodanih sladkorjev v gojišče	31
4.4.5	Vpliv svetlobe	31
4.4.6	Temperatura.....	32
4.4.7	Aktivno oglje.....	32
4.5	Aklimatizacija (stopnja 4).....	32
4.5.1	Izguba vode.....	32
4.5.2	Fotosinteza	33
4.6	Problemi in neželeni pojavi pri vzpostavitvi in vzdrževanju kulture	35
4.6.1	Rjavenje kot posledica ranitve tkiva.....	35
4.6.2	Odmiranje vršičkov	36
4.6.3	Vitifikacija	37
5	Mikropropagacija marelice (<i>Prunus armeniaca</i> L.)	41
6	Mikropropagacija češnje (<i>Prunus avium</i> L.)	47
7	Mikropropagacija slive (<i>Prunus domestica</i> L.)	51
	Viri in literatura	57

1 Uvodnik

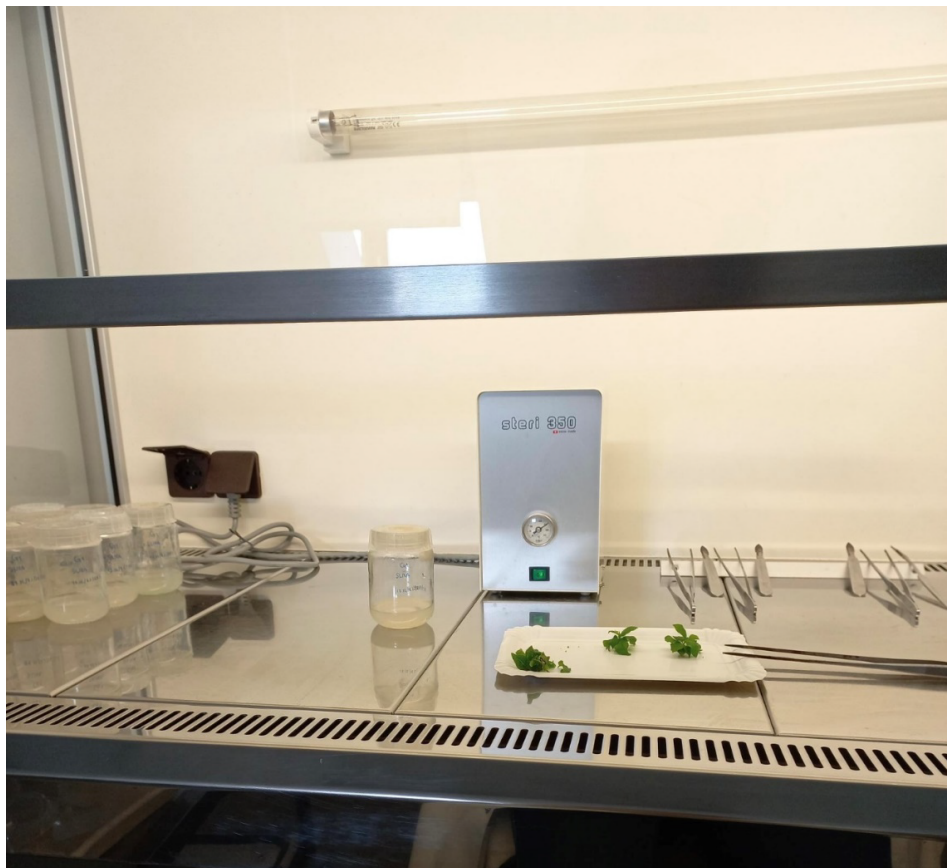
Mikropropagacija je hitro vegetativno razmnoževanje rastlin in vitro. Tehnologijo množično uporabljajo v komercialne namene širom po svetu. Ob uporabnosti za hitro razmnoževanje rastlin tkivne kulture uporabljajo tudi za odstranjevanje patogenov (npr. virusov, viroidov), hranjenje dednine za daljše časovno obdobje in genske manipulacije. V severni Evropi so komercialni laboratoriji najbolj pogosti v Belgiji, na Nizozemskem, v Italiji, Nemčiji in Franciji. Zunaj Evrope so komercialni laboratoriji v ZDA, Avstraliji, Indiji, Južni Afriki, na Kitajskem, v Novi Zelandiji, Argentini in Braziliji.

V monografiji so navedena najnovejša dognanja glede mikropropagacije – natančneje specifične potrebe in problemi razmnoževanja lesnatih rastlin, kamor spadajo koščičarji. Natančneje so opisani rezultati, ki so nastali v laboratoriju za rastlinske tkivne kulture na Fakulteti za kmetijstvo in biosistemske vede Univerze v Mariboru, in sicer mikropropagacija pri marelici, češnjih in slivi.

2 Laboratorij in oprema

2.1 Komore za aseptično delo

Pomemben in nujen del laboratorija za rastlinske tkivne kulture je aseptična delovna miza (brezprašna kmora) ali laminarij (laminar air-flow). To je delovna površina, na katero piha zrak, ki je prefiltriran skozi zračni filter (npr. filtri s propustnostjo 0,03 % delcev velikosti $0,2\ \mu\text{m}$), ki ima tako drobne pore, da v njem ostanejo tako glive kot bakterije, ki bi lahko okužile material (Slika 1). Zrak črpa iz prostora, ga filtrira skozi zelo fine filtre, tako da je zrak v delovnem prostoru komore povsem sterilen. Poznamo različne izvedbe miz, vertikalne komore, kjer zrak piha od zgoraj, in horizontalne komore, kjer zrak piha od zadaj ali s strani. Miza ima vgrajeno tudi ultravijolično svetilko, ki jo lahko pustimo prižgano, kadar v prostoru ne delamo. Z njo lahko dodatno razkužimo aseptično delovno mizo. Delovno površino redno čistimo z 96 % etanolom.



Slika 1: Brezprašna komora ali laminarij

2.2 Naprave za razkuževanje gojišč, steklovine in orodja

Pri delu s tkivnimi kulturami je zelo pomembna sterilnost. V ta namen uporabljamo različno opremo, ki je v laboratoriju nujno potrebna.

Suhi sterilizator

Uporabljamo ga za razkuževanje steklovine in orodja. Priporočajo razkuževanje pri 160 °C za 2 do 3 ure. Deluje kot običajna pečica, kjer lahko nastavimo temperaturo in čas sterilizacije.

Avtoklav

Avtoklav (Slika 2) uporabljamo predvsem za sterilizacijo gojišč, vode in drugih tekočin. V avtoklavu razkužujemo s pomočjo segrete pare, in sicer s povišanim tlakom uspešno uničimo vse mikroorganizme. Postopek poteka 15 minut pri 121 °C. Prednosti avtoklaviranja so enostavnost in hitrost postopka. Znane so tudi nekatere neželene posledice, kot so možna sprememba v pH vrednosti, izguba aktivnosti nekaterih komponent v gojišču.

Pierik (1997) navaja, da se lahko med avtoklaviranjem razgradijo naslednje komponente:

- saharoza lahko razpade na fruktozo in glukozo,
- zeatin,
- giberelinska kislina lahko izgubi 90 % aktivnosti,
- vitamin B₁, vitamin B₁₂, vitamin C, pantotenska kislina,
- antibiotiki,
- rastlinski ekstrakti,
- encimi.

Med avtoklaviranjem se pH vrednost zniža za 0,3–0,5 enote. Če avtoklaviramo dalj časa, lahko depolimeriziramo agar. Prav tako se zgodi, če isto gojišče avtoklaviramo dva krat, da se agar depolimerizira in se gojišče ne strdi. Določiti moramo pravilen čas in temperaturo avtoklaviranja.

Pierik (1997) priporoča sledeče temperature in čas tretiranja:

- posodice z 20–50 ml gojišča: 20 min. 121 °C;
- posodice z 50–500 ml gojišča: 25 min. 121 °C;
- posodice z 500–5000 ml gojišča: 35 min. 121 °C;
- prazna steklovina, filtrirni papir: 30 min. 130 °C.

Steklenice s tekočino med avtoklaviranjem ne smejo biti tesno zaprte, zato pokrovčke vedno nekoliko odvijemo, zrahljamo.



Slika 2: Avtoklav

Priročni namizni sterilizator za sprotno sterilizacijo orodja

Za sprotno razkuževanje orodja med delom v brezprašni komori uporabljamo manjše sterilizatorje. Špiritni gorilniki niso več v uporabi, saj segrevajo delovni prostor, predstavljajo nevarnost požara in ustvarjajo saje na orodju. Nadomestili smo jih z električnimi sterilizatorji – lahko gre za električne grelce, kjer orodje zatakneмо v zelo razgret tulec, ali za srednje temperaturne grelce, ki vsebuje steklene kroglice, segrete na 250 °C (Slika 3).



Slika 3: Namizni sterilizator s steklenimi kroglicami

2.3 Dozator gojišča

Dozator gojišča je naprava, ki nam zelo olajša delo pri razdeljevanju večjih količin gojišča v posodice. Nastavimo volumen, ki ga želimo v posodici, in čas, ki ga imamo, da prestavimo silikonsko cevko v drugo posodico. Po končanem razlivanju gojišča, moramo cevko takoj sprati z vodo, da se agar v njej ne strdi. Aparat je enostaven za uporabo in omogoča natančno dodajanje količin gojišča v posodice (Slika 4).



Slika 4: Dozator gojišča

2.4 Rastne komore

Izsečki, gojeni s tehnikami rastlinskih tkivnih kultur, potrebujejo uravnavano okolje za normalen razvoj. Zagotovljena mora biti možnost uravnavanja temperature in svetlobe (včasih tudi vlage) (Bohanec, 1992). Lahko gre za omaro s policami, kjer lahko uravnavamo (reguliramo) svetlobo in temperaturo (Slika 5). Lahko pa je celoten prostor aklimatiziran in prilagojen kot prostor za gojenje tkivnih kultur. Pomembno je, da lahko uravnavamo temperaturo ($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) in nastavimo interval

svetlobe. Takšne večje rastne prostore najdemo predvsem v komercialnih laboratorijih.



Slika 5: Rastna komora

2.5 Druga oprema

Druga potrebna oprema v laboratoriju za rastlinske tkivne kulture je pH meter, mikrovalovna pečica, mikroskop, hladilnik in zamrzovalnik, omare za hranjenje kemikalij. Potrebujemo tudi naprave za čiščenje vode.

3 Sestavine in priprava gojišč

Gojišča večinoma vsebujejo anorganske soli, ogljikove hidrate, vitamine, aminokisliline, rastne regulatorje, mio-inozitol, vodo in sredstva za strjevanje gojišč.

3.1 Anorganske soli

Soli delimo v dve skupini: makroelemente in mikroelemente. Med makroelemente štejemo: kalcij, fosfor, kalij, magnezij, dušik in žveplo. Mikroelementi, ki jih dodajamo v gojišče, so: železo, baker, mangan, kobalt, molibden, bor, jod, nikelj, klor in aluminij. Delitev se nanaša glede na potrebe rastlin po teh elementih. Potreba po mikroelementih je majhna, zato jih v gojišče dajemo v manjših koncentracijah (mikromolarne koncentracije). Potreba po makroelementih je večja in jih dodajamo v milimolarnih koncentracijah. Kljub temu da so potrebe rastlin po mikroelementih manjše, ne pomeni, da ti elementi niso pomembni. Pomanjkanje železa lahko odločujoče vpliva na rast in razvoj rastlinskih celic. Agar in makroelementi, ki jih dodamo v gojišče, so pogosto toliko nečisti, da njihove primesi zadoščajo za preskrbo z mikroelementi. Pri neustrezni sestavi elementov se tudi v *in vitro* razmerah pojavijo kloroze, rjavenje vršičkov ipd.

Makroelementi

Kalcij (Ca)

Za razliko od ostalih makroelementov je kalcij v veliki meri vezan v celični steni in celični membrani. Takšna edinstvena porazdelitev je zaradi velikega števila veznih mest za vezavo Ca^{2+} v celični steni v omejeni mobilnosti kalcija skozi membrano v citoplazmo. Prav tako je omejen tudi prenos kalcija po floemu. Visoke koncentracije kalcija v membranah prispevajo k moči celičnih sten in uravnavanju (regulaciji) celično membranskih struktur. Pektini v celični steni (v obliki kalcijevega pektinata) se razgradijo z encimom poligalakturonaza in kalcij zavira (inhibira) delovanje tega encima. Kadar kalcija primanjkuje, pride do degradacije celičnih sten, kar povzroči omehčanje rastlinskih tkiv. Prisotnost kalcija tudi močno prispeva k odpornosti na glivične bolezni.

Kalcij je v celičnih membranah nujen zaradi stabilnosti membran, ki brez kalcija lahko tudi razpadejo.

Za razliko od magnezija, ki je vključen v aktivacijo številnih encimov, kalcij aktivira le redke encime, kot so amilaze in adenozin trifosfataze (ATP-aze). Kalcij v glavnem stimulira encime, vezane na membrane, lahko pa zavira (inhibira) nekatere citoplazmatske encime.

Kalcij je potreben pri razmnoževanju celic in korenin.

Rast pelodne cevi je odvisna od kalcija. Pri transportu kalcija sodeluje avksin indol očetna kislina (IAA), inhibitorji avksinov kot npr. trijodobezojeva kislina (TIBA) pa lahko povzročijo znake pomanjkanja kalcija.

Fosfor (P)

Rastline ga sprejemajo v obliki H_2PO_4^- po koreninah. Za razliko od nitratov in sulfatov ni reduciran. Visoko energetske vezi fosforja, vezanega na drugi fosforjev atom (npr. v ATP), so zelo pomembne za metabolizem energije v celici.

Fosfor je esencialen element v deoksiribonukleinski kislini (DNK oz. DNA) in ribonukleinski kislini (RNK oz. RNA). Fosfolipidi v biomembranah vsebujejo velike količine fosforja. Fosfolipidi so sestavljeni iz hidrofobnega repa in hidrofilne glave, ki vsebuje PO_4 . Oba imata pomembno vlogo pri stabilizaciji membrane.

Pomanjkanje fosforja se kaže v slabi rasti in temno zelenih listih, saj zaradi pomanjkanja fosforja razvoj lista poteka počasneje kot sinteza klorofila, kar povzroči višje koncentracije klorofila. Fosfor je prav tako pomemben za regulacijo mnogih encimov. Za optimalno rast je potrebno 0,3 do 0,5 g fosforja na gram suhe mase.

Kalij (K)

Kalij je monovalenten kation, ki je v rastlini zelo mobilni tako na nivoju celice kot po ksilemu in floemu. Od vseh elementov je prisoten v najvišjih koncentracijah. Ima pomembno vlogo kot osmotski regulator celice. Kalij je odgovoren za aktivacijo mnogih encimov. Več kot 50 encimov v celici je odvisnih od kalija.

Magnezij (Mg)

Magnezij je potreben pri mnogih encimskih reakcijah. Pomemben je pri fotosintezi, saj je centralni atom v klorofilni molekuli fotosistema I in II. Če je magnezija dovolj, je 10–20 % magnezija lokaliziranega v kloroplastu. Visoke koncentracije magnezija in kalijevih ionov v kloroplastu in citoplazmi so nujne za vzdrževanje pH vrednosti od 6,5 do 7,5. Večina magnezijevih ionov je vključena v regulacijo pH vrednosti znotraj celice in pravilno kationsko anionsko ravnotežje. Magnezij je pomemben tudi v energetskem metabolizmu rastline, saj ima pomembno vlogo pri sintezi ATP-ja. Deluje kot most med encimom in adenozin difosfatom (ADP).

Dušik (N), nitrat (NO_3^-) in amonij (NH_4^+)

Glavna komponenta vseh gojišč je običajno anorganski dušik v obliki nitrata ali amonija. Soli, ki jih najpogosteje uporabljamo, so kalijev nitrat (KNO_3), amonijev nitrat (NH_4NO_3) in kalcijev nitrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). Te snovi zalagajo rastline z anorganskim dušikom, ki ga le-te potrebujejo za sintezo kompleksnih organskih molekul. Amonij je v glavnem skladiščen v koreninah kot organski dušik. Nitrat se lahko po ksilemu prenese do drugih delov rastline, kjer sodeluje pri asimilaciji dušika.

Nitrat je lahko skladiščen v vakuolah in deluje kot pomemben osmoregulator in pri vzdrževanju anionsko-kationskega ravnotežja.

Nitrat se ne more porabiti za sintezo organskih molekul neposredno, ampak mora biti reduciran. Večina rastlin bolje sprejema NO_3^- obliko, znane pa so tudi izjeme.

Ob anorganskem dušiku lahko gojišče vsebuje tudi organski dušik v obliki aminokislín, zlasti glicina in glutamina.

Žveplo (S)

Rastline sprejemajo žveplo kot SO_4^- preko korenin. Sulfat mora biti najprej reduciran, preden se lahko porabi za sintezo molekul, kot so npr. aminokislíne, proteini, encimi.

3.2 Komerzialna osnovna gojišča

Zlasti v letih od 1940 do 1960 so številni avtorji intenzivno proučevali najprimernejšo sestavo anorganskih soli. Nekaj mešanic anorganskih soli je še danes zelo razširjenih. Gojišča se zlasti razlikujejo po koncentraciji soli.

Nekaj takšnih gojišč:

Gojišče N6 ali Chu gojišče (Chu in sod., 1978) izboljša nastanek rasti in diferenciacijo pelodnega kalusa pri rižu. Koncentracija amonija (7,0 mM) je ključna za razvoj kalusa. Pri višjih koncentracijah amonij zavira (inhibira) rast in diferenciacijo pelodnih zrn pri rižu.

Gamborg B5 gojišče (Gamborg in sod., 1968) je bilo pripravljeno za rast celičnih suspenzij iz koreninskih celic soje ob prisotnosti 2,4-diklorofenoksiocetne kisline (2,4- D). Nitrat je prisoten v koncentraciji 2–30 mM. Dodan 2 mM amonium sulfat je povečal celično rast. Koncentracijo tiamina, ki je nujen za rast celic, so povišali na 10 ml/l.

McCown woody plant gojišče (WPM) (Lloyd in McCown, 1980): je bilo narejeno za komercialno mikropropagacijo *Kalmia latifolia*. Gojišče se je izkazalo kot učinkovito tudi pri tkivnih kulturah koščičarjev.

Murashige in Skoog (MS) gojišče (Murashige in Skoog, 1962): je najbolj pogosto uporabljeno gojišče, za katerega so razvili več različic. Gojišče izvira iz White gojišča (White, 1963), ki je bil v osnovi razvit za gojenje kalusa tobaka. V primerjavi z White gojiščem ima višje koncentracije vseh komponent. MS vsebuje veliko soli, kar je lahko za določene vrste preveč. Zato pogosto uporabljajo različico z mikroelementi v polni koncentraciji in z mikroelementi v polovični ali tričetrtinski koncentraciji. Obstajajo tudi različice s spremenjeno sestavo vitaminov.

Nitsch gojišče (Nitsch in Nitsch, 1969): je bilo izvorno uporabljeno za pridobivanje haploidnih rastlin različnih vrst iz rodu *Nicotiana*, in sicer iz mikrospor (predfaza v razvoju pelodnih zrn).

Ob naštetih gojiščih poznamo tudi številna druga gojišča – npr. gojišče za mikropropagacijo oljk (Rugini, 1984) in orhidej (Lindemann in sod., 1970; Morel, 1965) itd.

3.3 Vitamini

Skoraj vsa gojišča vsebujejo vitamine. Sodelujejo so pri številnih biokemijskih reakcijah. Najpogosteje se dodaja v gojišče:

- tiamin (vitamin B₁) v koncentraciji 0,1–5 mg/l, ta vitamin je odgovoren in pomemben za rast;
- niacin (ali nikotinska kislina): v koncentraciji 0,1–5 mg/l;
- piridoksin (vitamin B₆): v koncentraciji 0,1–1 mg/l.

Redkeje pa:

- folna kislina: v koncentraciji 0,1–0,5 mg/l;
- riboflavin (vitamin B₂): v koncentraciji 0,1–10 mg/l;
- askorbinska kislina (vitamin C): v koncentraciji 1–100 mg/l. – askorbinska kislina, dodana v visoki koncentraciji, služi kot antioksidant;
- biotin: v koncentraciji 0,01–1,00 mg/l;
- tokoferol (vitamin E): v koncentraciji 1–50 mg/l;
- kalcijev pantotemat: v koncentraciji 0,5 –2,5 mg/l.

Vpliv dodanih vitaminov na rast in razvoj celic *in vitro* se razlikuje od vrste do vrste in je lahko tudi škodljiv. Večina rastlin v tkivni kulturi sama sintetizira vitamine, tako da je nujnost dodajanja v gojišče nerazčiščena (diskutabilna).

3.4 Ogljikovi hidrati

Služijo kot vir energije (substrat za dihanje) in vir ogljika. Rastlina v tkivni kulturi nima zadostne fotosinteze, zato je nujno ogljikove hidrate dodati v gojišče. Zaradi slabe izmenjave plinov lahko naraste koncentracija CO₂, kar vpliva na zaviranje fotosinteze in lahko deluje toksično na rastlino (Gibson, 1967). Najpogosteje se uporablja saharoza, ki vpliva tudi na osmotsko stanje gojišča. Dodajamo jo v koncentraciji od 10 do 150 g/l. Večje koncentracije uporabljamo, kadar želimo, da rastlina tvori gomolje ali npr. za rast mladih embrijev. Na splošno se rast in razvoj rastlin poveča pri višji uporabljeni koncentraciji saharoze, pri zelo velikih koncentracijah pa se rast poslabša. Običajna optimalna koncentracija je 30 g/l.

Drugi viri ogljikovih hidratov so še glukoza, fruktoza, sorbitol, manitol, maltoza idr. Mio-inozitol spada po strukturi formuli med ogljikove hidrate, po funkciji ga prištevamo lahko tudi med vitamine. Dodajamo ga skoraj vsem gojiščem v koncentraciji 100–200 mg/l. V naravi je zastopan v številnih rastlinah. V rastlinah je vključen v več procesov sinteze, tudi celičnih sten.

3.5 Sredstva za strjevanje gojišč

3.5.1 Agar

Je izvleček iz različnih rdečih alg, kar pomeni, da izvira iz biotično različnega materiala in kemično različno onesnaženega okolja. Gre za naraven proizvod, ki pa je prečiščen, tako da običajno ne vsebuje toksičnih elementov. Sestavljen je iz 70 % agaroze in 30 % agaropektina. Na trdnost gojišča vpliva njegova reakcija, pri nižji vrednosti pH se agar težje strdi kot pri višji.

Je polisaharid z visoko molekulsko maso in ga najpogosteje uporabljamo za strjevanje gojišč. Pri previsoki koncentraciji agarja rastlina težko tvori stik z gojiščem in je tako oteženo črpanje hranil.

3.5.2 Agaroz

Je sestavina agarja. Ker gre za prečiščen del agarja je najboljša snov za strjevanje gojišč, ki pa se zaradi visoke cene uporablja le izjemoma.

3.5.3 Gerlit

Je zelo prečiščeno sredstvo za strjevanje gojišč, ekstrahiran iz posebnega seva bakterij in je naraven anionski heteropolisaharid, sestavljen iz glukuronske kisline, ramnoze in glukoze. Je veliko bolj izenačen od agarja. Dodajamo ga v koncentraciji 2-3 g/l. Je zelo občutljiv na pH vrednost gojišča (pri večji kislosti se lahko utekočini).

3.6 Rastlinski rastni regulatorji

V tkivnih kulturah uporabljamo rastlinske rastne regulatorje predvsem za stimulacijo rasti adventivnih korenin, poganjkov, embrijev in nastanek kalusa. Avksini in citokinini so potrebni za rast, povečanje števila celic in povečanje njihovega volumna oz. rast.

Dodajamo jih v majhnih koncentracijah 0,1 do 10 μ M.

Najpomembnejši skupini v tkivnih kulturah sta avksini in citokinini.

3.6.1 Avksini

Glavne vloge avksinov v tkivnih kulturah sta odkrila Skoog in Miller (1957). Zračno tkivo v notranjosti stebela pri tobaku je pognalo poganjke pri visoki koncentraciji citokininov in nizki koncentraciji avksinov; korenine pri nizkih koncentracijah citokininov in visokih koncentracijah avksinov in kalus pri srednji koncentraciji obeh. Avksini so potrebni v začetni fazi nastanka adventivnih korenin in somatski embriogenezi. Kasneje imajo lahko inhibitorni učinek. 2,4-D je učinkovit za nastanek kalusa in somatskih embrijev ter zaviralen pri nastanku adventivnih korenin in aksilarnih poganjkov. Indol očetna kislina (IAA) in indol maslena kislina (IBA) nista učinkoviti za nastanek kalusa in somatskih embrijev, sta pa učinkoviti pri stimulaciji nastanka adventivnih korenin in inhibiciji nastanka aksilarnih poganjkov. Avksin, ki ga dodamo v gojišče, rastline hitro porabijo.

Nekateri bolj pogosto uporabljeni avksini:

IAA (indol očetna kislina): naraven rastlinski rastni regulator;

IBA (indol maslena kislina): naraven;

NAA (α -naftalen očetna kislina): sintetični;

2,4-D (2,4-diklorofenoksi očetna kislina): sintetični.

3.6.2 Citokinini

Citokinini stimulirajo celično delitev, torej rast. Pri mikropropagaciji jih dodajamo za stimulacijo nastanka aksilarnih poganjkov. Neželeno razraščanje se lahko nadaljuje po prenosu na polje. Prav tako se citokinini v mikropropagaciji uporabljajo za nastanek adventivnih poganjkov, upočasnitev staranja, preprečujejo koreninjenje, zato jih v gojišča za koreninjenje ne dodajamo. Citokinini lahko povzročijo neželen učinek hiperhidracije oz. vitrifikacije.

Nekateri pogosto uporabljeni citokinini:

zeatin (naraven);

zeatinribozid;

BAP (6-benzil amino purin)(naraven);

kinetin;

TDZ (tidiazuron);

meta-topolin (mT).

Nastanek kalusa lahko spodbujajo različni avksini ali citokinini. Razvoj brstov zahteva v gojišču nižje koncentracije avksinov in višje koncentracije citokininov, vendar je v subkulturi včasih možno avksin tudi izpustiti.

3.6.3 Giberelini

Redkeje se uporablja giberelinska kislina (GA_3), ki pa je zelo občutljiva na višje temperature in po avtoklaviranju izgubi 90 % aktivnosti. Na splošno giberelini spodbujajo podaljševanje internodijev in rast meristemov *in vitro*. Lahko prekinejo dormanco izoliranih embrijev in semen. Zavirajo (inhibirajo) nastanek adventivnih korenin, kot tudi adventivnih poganjkov (Pierik in Steegmans, 1975).

3.6.4 Abscizinska kislina

Večinoma abscizinska kislina (ABA) negativno vpliva na rast in razvoj rastlin v tkivnih kulturah in se zato v praksi ne uporablja.

3.6.5 Etilen

V literaturi najdemo objave o pozitivni vlogi etilena kot tudi objave, da etilen ne vpliva na rast in razvoj rastlin v tkivni kulturi.

3.7 Aminokisliline

Pri večini gojišč aminokislin ne dodajamo. Aminokisliline služijo predvsem kot organski vir dušika. Najpogosteje dodajamo L-glutamin, pa tudi adenin in aspargin. Adenin stimulira nastanek adventivnih poganjkov (Skoog in Tsui, 1948), lahko uporabimo adenin sulfat, ki je bolj topen v vodi.

3.8 Aktivno oglje

Aktivno oglje dodajmo v gojišče v koncentraciji 0,2–3,0 %. Ima zelo fino mrežo por z zelo veliko notranjo površino, na katero se lahko adsorbirajo razne substance. Vloga aktivnega oglja je:

- adsorpcija toksičnih pigmentov (npr. fenolne spojine, melanin);
- potemnitev gojišča, kar lahko stimulira nastanek in rast korenin;
- stimulira somatsko embriogenezo;
- stimulira rast in organogenezo pri lesnatih rastlinah;
- aktivno oglje stabilizira pH.

Slika 6 prikazuje gojišče z dodanim aktivnim ogljem, ki je temno obarvano.



Slika 6: Gojišče z dodanim aktivnim ogljem

3.9 Redkeje uporabljene snovi

Adenin sulfat: nedorečena vloga. Dodajamo ga v koncentraciji 80 mg/l, lahko vpliva na uspešnost regeneracije.

Kokosovo mleko (vsebuje aminokislino, vitamine, sladkorje, tudi hormone) in dobro vpliva na rast in razvoj rastlin v tkivni kulturi.

3.10 Vpliv pH gojišča

Večina postopkov priporoča uravnano pH vrednosti v območju od 5,0 do 6,5 z optimumom 6,0. pH vrednost pod 4,5 in nad 7,0 ustavi rast in razvoj rastlin *in vitro*. Prenizek pH lahko povzroči naslednje posledice:

- avksin IAA in giberelinska kislina postaneta manj stabilna,
- agar se ne strdi in gojišče ima rahlo strukturo,

- nekatere soli lahko precipitirajo (fosfat, železove soli),
- vitamin B₁ in pantotenska kislina postaneta manj stabilni,
- zaostane sprejem amonijevih ionov.

pH vrednost se po avtoklaviranju zniža za 0,3–0,5 enote. Tudi med samo rastjo v tkivni kulturi se s časoma pH gojišča lahko zniža za 0,5 enote pH (Skirvin in sod., 1986).

V območju od 5,0 do 6,0 naj bi bile dodane anorganske snovi najboljše dostopne rastlinskim celicam, kar velja zlasti za dostopnost nitratnega in amonijskega dušika.

3.11 Razkuževanje gojišč

Ko smo pripravili gojišče in mu umerili pH vrednost, ga je potrebno razkužiti.

Največkrat uporabljana metoda je avtoklaviranje, to je razkuževanje gojišča z vročo pregreto paro v avtoklavu. Drugi način, ki se uporablja v primerih, ko vsebujejo gojišča temperaturno občutljive snovi, je filtrska sterilizacija. Pri filtrski sterilizaciji spustimo tekočino (npr. gojišče) skozi filtrsko membrano, ki zadrži delce (mikroorganizme, viruse...), ki so večji od por v membrani, in jih na ta način odstranimo. Slaba stran filtrske sterilizacije je lahko adsorbcija substanc v filter, metoda je zamudna in ne tako enostavna kot avtoklaviranje.

Pogosto uporabljamo kombinirano metodo, tako da večji del gojišča avtoklaviramo in mu, preden se strdi (približno 45–50 °C), dodamo filtrsko sterilizirane termolabilne snovi. Priporoča se uporaba celulozno acetatnega oz. celulozno nitratnega filtra s premerom por 0,22 µm (Pierik, 1997).

3.12 Priprava gojišč

Najprej v dovolj veliko čašo nalijemo prečiščeno vodo (npr. za pripravo 1 l gojišča, približno 600 ml vode). Nato natehtamo posamezne sestavine gojišča, da se izognemo kontaminaciji, uporabimo za vsako kemikalijo drugo spatulo. Koncentracije so lahko podane različno:

- Volumski odstotek: npr. 5 % kokosovo mleko: 50 ml dodamo 950 ml vode.

- Utežni odstotek: npr. 2 %: 20 g dodamo 1000 g (1 l) vode.
- Molarna koncentracija: 0,01 M pomeni 0,01 mol na liter gojišča: 1 mol je toliko gramov kot znaša molekulska teža. Najpogosteje se uporablja pri rastnih regulatorjih.
- Miligram na liter (mg l^{-1}): npr.: 20 mg l^{-1} : natehtamo 20 mg na liter gojišča.
- ppm (parts per milijon): 1 ppm predstavlja 1 mg na 1 liter gojišča.

Rastlinski fiziologi priporočajo za podajanje koncentracij rastnih regulatorjev uporabo molarne koncentracije (μM) in ne v mg l^{-1} . Ne moremo namreč primerjati fiziološke aktivnosti 1 mg l^{-1} IAA in 1 mg l^{-1} IBA, lahko pa primerjamo $1 \mu\text{M}$ IAA in $1 \mu\text{M}$ IBA, saj $1 \mu\text{M}$ IAA vsebuje enako število molekul kot $1 \mu\text{M}$ IBA, kar pa ne drži pri primerjavi 1 mg l^{-1} IAA in 1 mg l^{-1} IBA. Molekulski masi obeh rastnih regulatorjev sta različni, zato se priporoča uporaba molarne koncentracij.

Primer za IAA:

Molekulska masa avksina IAA je 175,18.

1 M raztopina IAA pomeni 175,18 g na liter gojišča.

1 mM raztopina IAA pomeni 0,17518 g na liter oz. 175,18 mg na liter gojišča.

$1 \mu\text{M}$ raztopina IAA pomeni 0,00017518 g na liter oz. 0,17518 mg na liter gojišča.

Pri rastnih regulatorjih in vitaminih pripravimo založne raztopine, kjer natehtamo npr. 100 mg in jih raztopimo v 100 ml vode. Založne raztopine nato hranimo v hladilniku, v temi. Pri pripravi gojišča nato s pipeto dodamo ustrezen volumen založne raztopine.

Primer:

Dodati moramo 1 mg IAA v 1 l gojišča, pripravljeno imamo založno raztopino 100 mg IAA / 100 ml vode. Odpipetirali bomo 1 ml oz. 1000 μl od založne raztopine.

Pripravljeno gojišče hranimo za daljši čas v hladilniku in v temi. Predolgo hranjenje ni priporočljivo, saj lahko pride do evaporacije vode in razgradnje manj stabilnih sestavin (npr. IAA).

Ko smo dodali v gojišče vse sestavine razen agarja, prelijemo gojišče v merilno bučko in dolijemo prečiščeno bidestilirano vodo do 1 litra. Gojišču nato uravnamo želeni pH, prelijemo nazaj v čašo in dodamo agar. Nato imamo dve možnosti. Prva je, da gojišče prelijemo v steklenico in damo v avtoklav, kjer se bo med avtoklaviranjem agar raztopil. Ko vzamemo pripravek iz avtoklava, sterilno gojišče prelijemo v sterilne posodice v brezprašni komori. Druga možnost je, da agar raztopimo s segrevanjem v mikrovalovni pečici do vretja. Gojišče nato razlijemo v posodice, pokrijemo in damo v avtoklav na vlažno razkuževanje. Običajno uporabljamo drugo metodo; prvo uporabimo npr. pri pripravi indukcijskega gojišča, ki ga razlijemo v plastične sterilne posode (petrijevke, epruvete itd.).

Gojitvene posodice z gojiščem moramo zapreti, da preprečimo okužbe in izsuševanje gojišča. Ne smejo pa biti zaprte neprodušno, saj v tem primeru rastlinam lahko zmanjka kisika, akumulirati pa se začne CO₂ in etilen.

4 Mikropropagacija

Rastline lahko razmnožujemo vegetativno ali generativno s semeni. Kadar rastlina ne tvori semen ali želimo ohraniti enak genotip pri potomstvu, jo razmnožujemo vegetativno. Klasično *in vivo* vegetativno razmnoževanje je včasih počasno, težavno in drago, zato so se uveljavili postopki vegetativnega razmnoževanja *in vitro* ali mikropropagacija. Lesnate rastline težje razmnožujemo *in vitro* v primerjavi z zelnatimi. Razlogi za to so (Pierik, 1997):

- lesnate rastline imajo slabšo sposobnost regeneracije v primerjavi z zelnatimi rastlinami;
- pri lesnatih rastlinah je lahko prisotna dormanca, ki prepreči odpiranje in rast brstov;
- lesnate rastline so bolj dovzetne za izločanje toksičnih substanc v gojišče;
- razkuževanje rastlinskega tkiva je pri lesnatih rastlinah težavnejše, kadar le-te rastejo zunaj.

Prednosti *in vitro* razmnoževanja:

- je hitrejša (več razmnoženih rastlin v krajšem času);
- lahko razmnožujemo nekatere vrste, ki jih *in vivo* ne moremo;

- rast *in vitro* razmnoženih rastlin je boljša zaradi rejuvinacije in/ali odsotnosti mikroorganizmov;
- rastline so brez patogenov;
- za vzpostavitev kulture potrebujemo malo materiala, tako lahko z razmnoževanjem začnemo po intenzivni selekciji;
- prihranki pri gorivu in prostoru v rastlinjakih, prostor za hrambo matičnih rastlin je zmanjšan;
- zaradi rasti v kontroliranih pogojih (gojišče, fizikalni pogoji) lahko izločimo vpliv okolja in razmnoževanje razširimo na celo leto.

Za žlahtnitelje so dodatne prednosti takšnega razmnoževanja:

- nove sorte so komercialno prej dostopne;
- hitrejša pridobitev homozigotnih linij za žlahtnjenje ali pridobivanje F_1 hibridov;
- pri regeneraciji rastlin, dobljenih z genetsko manipulacijo;
- nekatere rastline lahko vzdržujemo in razmnožujemo samo vegetativno (haploidi, sterilni mutanti, moške sterilne linije za pridobivanje hibridov, aneuploidi).

Na splošno moramo za uspešen postopek mikropropagacije zagotoviti genetsko stabilnost (odsotnost mutacij), dobro selekcijo matičnega materiala glede zdravih in neokuženih rastlin, enostaven prenos iz tkivne kulture v substrat in ekonomsko upravičenost.

4.1 Priprava matičnih rastlin (stopnja 0)

Rastline, ki jih prenesemo v tkivne kulture, lahko rastejo v kontroliranih pogojih (rastlinjaki) ali na prostem. Če rastline rastejo na prostem, je večja verjetnost pojava okužb. Kadar jemljemo material iz rastlin, raslih na prostem, lahko veje rastlin zaščitimo s prozorno plastično vrečko in za izsečke uporabimo poganjke, ki so se oblikovali (formirali) pod to zaščito. Drugo priporočilo je, da za izsečke uporabimo mlade, novonastale poganjke. Uporabimo lahko brste, zaščitene z luskolisti, ki pa seveda ne smejo biti dormantni. Da zmanjšamo možnost okužb rastlin, ki rastejo na prostem, lahko predčasno pobereimo veje in jih prenesemo v prostor, kjer jih kasneje

damo v vodo, da odženejo poganjke, ki jih nato uporabimo kot izhodiščni material za tkivne kulture.

Kadar uporabimo rastline, ki rastejo v rastlinjakih, pa moramo poskrbeti, da ni prisotnih žuželk, ki bi lahko prenesle določene bolezni, tako da rastline niso okužene z glivami in bakterijami, rastlin ne zalivamo od zgoraj, saj se lahko z vodo prenašajo tudi mikroorganizmi, v rastlinjaku naj bo čim nižja vlaga, saj je pojav bakterij in gliv bolj verjeten pri višji vlažnosti v prostoru.

4.2 Inicijacija (uvajanje) rastlinske kulture (stopnja 1)

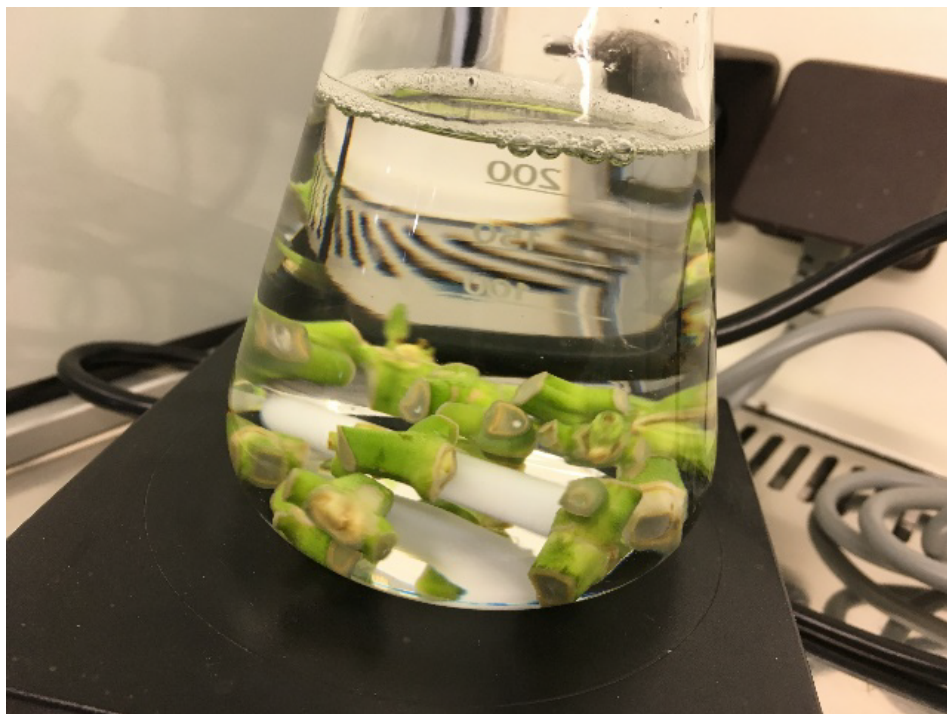
Preden se lotimo razkuževanja rastlinskega materiala, odstranimo ostanke zemlje in mrtvih delov rastlin. Nato rastlinski material operemo pod tekočo vodo, kadar je vidna prisotnost nečistoč (to velja predvsem pri razkuževanju podzemnih delov rastlin). Nato rastlinski material potopimo v 70 % etanol za nekaj sekund, da odstranimo zračne mehurčke. Nato sledi glavno razkuževanje z uporabo različnih kemikalij (Preglednica 1).

Preglednica 1: Sredstva za razkuževanje rastlinskega materiala (Pierik, 1997)

Sredstvo	Koncentracija
Etanol	70 %
Natrijev hipoklorit (NaClO), belilo	1–2 %
Kalcijev hipoklorit ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$)	3–100 g l^{-1}
Živosrebrov klorid (Hg_2Cl_2)	0,01–0,05 %
Dikloroizocianurna kislina (DICA)	1,6 %
Vodikov peroksid	1–10 %
Srebrov nitrat	1 %
Bromova raztopina	0,5–2 %

Natrijev hipoklorit lahko kupimo v večini supermarketov, njegova koncentracija je običajno 10 %. Za razkuževanje rastlinskega materiala uporabimo najpogosteje 1 % raztopino, kar pomeni da 1 delu komercialnega belila dodamo 9 delov vode. Lahko pa uporabimo tudi višje koncentracije (do 5 %). Kalcijev hipoklorit je v obliki prahu, ki ga raztopimo v vodi. Pripravimo svežo raztopino in jo pred uporabo filtriramo. Tretiramo 5–30 minut. V rastlinsko tkivo vstopa bolj počasi kot natrijev hipoklorit. Živosrebrov klorid je izredno strupena snov, tako za rastline in živali kot tudi za človeka. Običajni čas tretiranja je 2–12 minut. Po tretiranju je potrebno temeljito spiranje. Tekočin po uporabi zaradi izjemne toksičnosti (strupenosti) ne smemo zlit

v vodovodni odtok. Sredstvom za razkuževanje dodamo tudi 5 do 6 kapljic sredstva za omočenje (npr. Tween 20 ali 80), kar zmanjša površinsko napetost, in s tem izboljša stik med površino rastlinskega materiala in razkuževalnim sredstvom. Med razkuževanjem (Slika 7) moramo pripravek neprestano mešati, najenostavneje je, da uporabimo magnetno mešalo. Če imamo možnost razkuževati v vakuumu, to naredimo, saj tako lahko preprečimo nastanek zračnih mehurčkov in je proces razkuževanja boljši (Pierik, 1997).



Slika 7: Izsečki med razkuževanjem

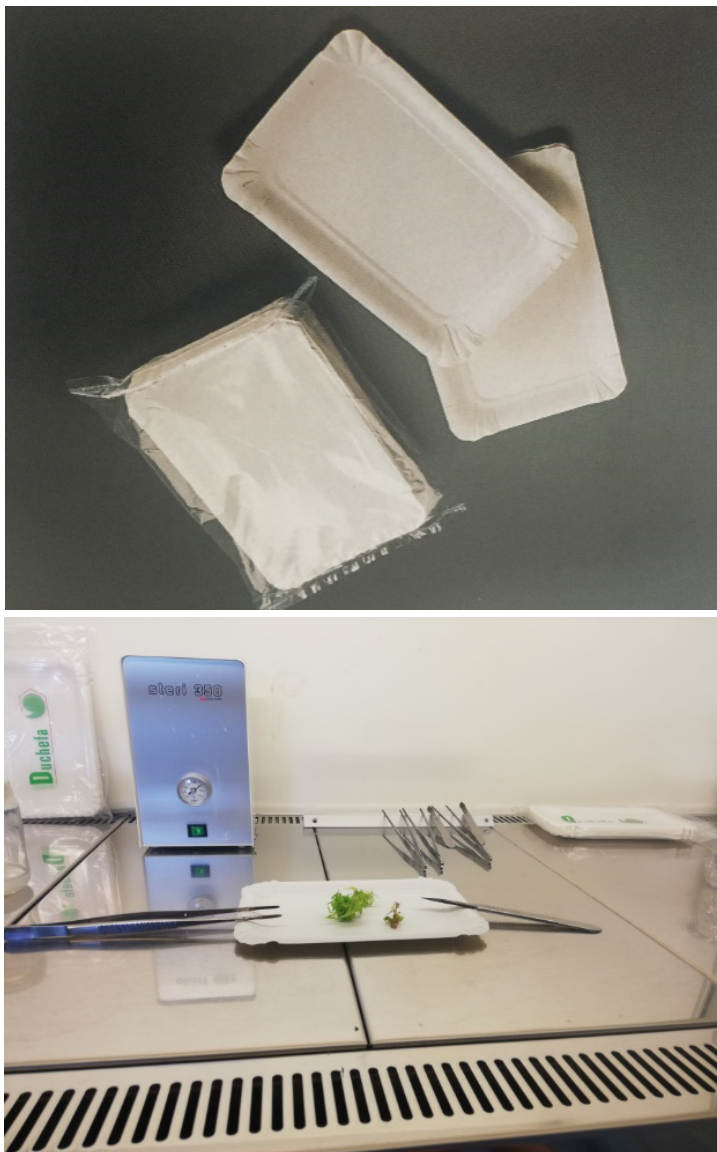
Koncentracijo uporabljenega sredstva in čas tretiranja določimo glede na tkivo, ki ga želimo razkužiti. Pri nežnih delih (list, steblo ...) uporabimo krajši čas in nižje koncentracije. Pri plodovih, semenih, zaprtih brstih oz. tam, kjer bomo izsečke izrezali, lahko uporabimo močnejše razkuževanje (višja koncentracija, daljši čas tretiranja). Za vsak primer posebej moramo eksperimentalno določiti, kateri način razkuževanja je najboljši. Za iniciacijo je priporočljivo uporabiti že v osnovi razkužen rastlinski material (npr. semena, ki so v zdravem plodu so brez patogenov, prav tako rastni vršiček pri radiču, ki je zaščiten z listi). V primeru razkuževanja eksokarpa pri

plodovih, lahko plod razkužimo tudi tako, da ga poškopimo s 96 % etanolom, prižgemo vžigalico, tako da celoten plod objame ogenj. Ko ogenj ugasne je eksokarp ploda razkužen in ga lahko v brezprašni komori razrežemo z razkuženim nožem ter iz njega z razkuženo pinceto pobereemo semena.

Po razkuževanju rastlinskega materiala ni nujno, da so rastline povsem brez mikroorganizmov. Če se mikroorganizmi nahajajo v notranjih tkivih, postanejo okužbe vidne šele po več subkulturah. Slaba rast in/ali kloroze so lahko znak notranjih okužb. Da se prepričamo, ali je kultura resnično razkužena, prerežemo poganjek vzdolžno in ga postavimo s prerezano stranjo na gojišče. Če so prisotne notranje okužbe (običajno bakterijske), se v nekaj dneh pojavijo vidne okužbe na gojišču. Notranje okužbe lahko predstavljajo veliko težavo pri vzpostavitvi neokužene kulture, saj gre za mikroorganizme, ki se nahajajo znotraj rastline in jih z običajnimi postopki razkuževanja ne moremo odstraniti. Proti notranjim okužbam se lahko borimo z meristemskimi kulturami (večinoma v meristemu ni mikroorganizmov) in z dodajanjem antibiotikov v gojišče. Meristemske kulture so zahtevne in uporaba antibiotikov je velikokrat neučinkovita. Antibiotiki lahko negativno vplivajo na rast in razvoj rastlin. Antibiotike dodamo v gojišče po avtoklaviranju, in sicer s filtrsko sterilizacijo.

4.3 Stopnja razmnoževanja poganjkov (stopnja 2)

Po uspešno opravljenem razkuževanju moramo rastline prestaviti na ustrezna gojišča. Od razkuževanja rastlin vse nadaljnje delo poteka v brezprašnih komorah. Pred delom si moramo temeljito umiti roke in nato roke premazati tudi s 96 % etanolom, ni pa to obvezen ukrep za posameznike občutljive na alkohol, ker se dela z razkuženim orodjem. Z etanolom obrišemo tudi delovno površino v brezprašni komori. Rastline režemo na sterilni podlagi, najpogosteje uporabimo kar pladnje iz kartona, razkužene z gama žarki (Duchefa) (Slika 8).



Slika 8: Razkuženi pladnji za razrez rastlin (Duchefa)

Za uspešno delo potrebujemo več pincet, skalpelov in napravo za sprotno razkuževanje orodja. Subkultiviranje pomeni prestavljanje poganjkov na sveže gojišče. To je potrebno, ker se po določenem času hranila v gojišču porabijo, gojišče se izsuši in rastlina nima več prostora za rast in razmnoževanje, v gojišču se lahko

pojavi rjav ali črn madež, ki ga izloči izseček ali rastlina, in je lahko toksičen itd. Pri subkultiviranju odrežemo morebitne mrtve dele rastlin.

4.4 Koreninjenje (stopnja 3)

Za koreninjenje običajno pripravimo posebno gojišče, na katero damo primerno velike poganjke, ki jim odstranimo spodnje liste. Na uspeh koreninjenja vpliva več dejavnikov, in sicer genotip, sestava gojišča, svetloba itd. V procesu koreninjenja ločimo štiri stopnje (Moncousin, 1986):

- indukcijska stopnja (določi se kapaciteta (zmogljivost) za formacijo (tvorbo) korenin),
- iniciacijska stopnja (pojavi se prve vidne citološke spremembe),
- organizacijska stopnja (pojavi se koreninski primordij),
- stopnja rasti, daljšanja korenin (primordij se razvije v korenine).

Indukcijo lahko stimulirajo avksini ali krajša izpostavitve temi.

4.4.1 Vpliv rastnih regulatorjev

Nekatere rastline koreninijo na gojišču brez dodanih rastnih regulatorjev. Citokinini zavirajo nastanek korenin, tako da jih gojišče za koreninjenje ne sme vsebovati. Ugotovili so tudi, da lahko višje koncentracije citokininov v predhodnem gojišču zavirajo nastanek korenin. Ben-Jacov in sod. (1991) so ugotovili, da so se korenine razvile komaj po osmih tednih, kadar je gojišče pred koreninjenjem vsebovalo 1 mg/l BAP. Število poganjkov, ki so tvorili korenine, je bilo bistveno manjše, če je bilo v gojišču za namnožitev 20 mg/l BAP, kot če je bilo v predhodnem gojišču 1,25 mg/l BAP (Hempel in sod., 1985). Zato je priporočljivo zmanjšati količino citokininov v zadnji stopnji namnožitve pred koreninjenjem, in s tem zmanjšati citokinine v poganjkih.

Za nastanek adventivnih korenin moramo večini rastlin v gojišče dodati avksine. Število korenin na poganjek se veča z višjo koncentracijo avksina do neke stopnje, nato se začne formirati (tvoriti) kalus in korenine postanejo nenormalne. Visoke koncentracije IBA v gojišču lahko povzročijo odmiranje vršičkov. Kateri avksin in kakšna koncentracija je optimalna za koreninjenje, je zelo odvisno od genotipa, tako da moramo za vsak genotip eksperimentalno ugotoviti optimalno sestavo gojišča.

Avksine lahko dodajamo (dodamo) na dva načina:

- tretiranje za daljši čas, tako da ga damo v gojišče;
- poganjke kratek čas tretiramo z avksini in jih nato damo na brez hormonsko gojišče.

V drugem primeru uporabimo višje koncentracije, kot kadar je avksin vključen v gojišče. Pogosteje avksine dodajamo v gojišče. Koncentracija avksina, pri kateri dobimo največje število korenin na poganjek, ni nujno optimalna. Lahko je kljub večjemu številu korenin na poganjek manj preživelih ukoreninjenih poganjkov po aklimatizaciji. Za določitev optimalne koncentracije moramo tako upoštevati tudi uspeh v zadnji stopnji mikropropagacije, aklimatizaciji (prilaganje organizma) (Johnson in Burchett, 1991).

Za koreninjenje najpogosteje uporabljamo: IAA (0,1–10 mg/l), NAA (0,05–1 mg/l) ali IBA (0,5–3 mg/l). 2,4-D se redko uporablja za indukcijo korenin, pri večini rastlin je neučinkovit ali celo toksičen (George, 1993). Kateri avksin izbrati, je odvisno od genotipa. Izbiramo ne samo glede na to, kateri avksin spodbuja tvorbo korenin, temveč tudi, kakšna je kakovost nastalih korenin in ali povzroča tvorbo kalusa.

Včasih je bolje dodati mešanico več različnih avksinov kot samo enega.

4.4.2 Vpliv velikosti posodic na koreninjenje

Več raziskovalcev (de Fossard in de Fossard (1988); McClelland in Smith (1990)) ugotavlja, da na število korenin vpliva tudi velikost posodic oz. velikost gojišča. Pri gojenju rastlinic v 250 ml gojišča so tako dobili več korenin kot v posodicah s 60 ml gojišča.

4.4.3 Vpliv makro- in mikroelementov na koreninjenje

V večini primerov so rastline bolje koreninile pri nižjih koncentracijah soli. Najpogosteje se koncentracije prepolovijo (npr. 1/2 MS). Predvsem na to pozitivno vpliva znižanje koncentracije dušikovih ionov. Optimalna koncentracija dušika v gojišču za koreninjenje je seveda zelo odvisna od vrste in sorte. Pri nekaterih rastlinah prisotnost amonijevih ionov stimulira rast korenin, pri drugih pa lahko

deluje zaviralno (inhibitorno). Več avtorjev navaja pomen kalcijevih ionov za koreninjenje. Morini in Concetti (1985) navajata, da je pred tretiranje na gojišču z bolj koncentriranimi anorganskimi solmi pozitivno vplivalo na koreninjenje pri podlagah iz rodu *Prunus*. Poganjke so namnožili na osnovnem gojišču WPM (Lloyd in McCown, 1980), jih predstavili na MS (Murashige in Skoog, 1962) gojišče brez citokininov in jih nato uspešno koreninili na WPM gojišču. Od mikroelementov je za rast korenin najpomembnejši bor. Bor je pomemben pri delovanju avksinov in dodana borova kislina v gojišče pozitivno učinkuje na koreninjenje (George, 1993).

4.4.4 Vpliv dodanih sladkorjev v gojišče

Nastanek in rast korenin potrebuje energijo, zato moramo zagotoviti ogljikove hidrate. Po navadi zadostuje koncentracija 20–30 g/l saharoze.

4.4.5 Vpliv svetlobe

Izpostavitve poganjkov temi med induktivno stopnjo koreninjenja na splošno pozitivno vpliva na koreninjenje, vendar je veliko rastlin sposobnih koreniniti brez izpostavitvi temi. Nekaterim poganjkom tema škoduje, oz. bolje koreninijo ,če niso izpostavljene temi (npr. *Rhododendron prinophyllum* (Dai in sod., 1987)). Izpostavitve temi traja nekaj dni (npr. za *Ribes nigrum* je bilo optimalno tretiranje 3 dni (Ma in sod. 1992)). Po 7–10 dneh izpostavitvi teme lahko listi pričnejo rumeneti in poganjki lahko odmrejo. Tretma s temo je učinkovit pri rastlinah, ki na splošno težko koreninijo *in vitro*.

Drugi način stimuliranja (spodbujanja) nastanka korenin je, da temi izpostavimo samo spodnji del poganjka, ki je v gojišču. Gojišče lahko zatemnimo z dodatkom aktivnega oglja, spodnji del posod prebarvamo s črno barvo ali črnim samolepilnim trakom, po vrhu pa gojišča potrosimo razkužene črne polikarbonatne granule (Rugini in sod., 1987). V primerjavi z izpostavitvijo celotnega poganjka temi, so ugotovili, da je pri zatemniti gojišča nastal večji delež ukoreninjenih poganjkov, več korenin na poganjek in boljše kasnejše preživetje ukoreninjenih poganjkov.

4.4.6 Temperatura

Višja temperatura na splošno stimulira (spodbudi) nastanek korenin, kar velja tudi za vrste, prilagojene na hladnejše klimatske razmere. Poganjki pri jablani so tako najboljše koreninili pri 28 °C (dan) in 22 °C (noč) (Lane, 1978); slive so koreninile bolje pri 26 °C kot pri 21 °C (Hammerschlag, 1987). Korenine, nastale pri višjih temperaturah, so bile daljše. Pri nekaterih rastlinah so ugotovili, da bolje koreninijo pri nižjih temperaturah (npr. iglavci, *Digitalis lanata*, itd.). Tako kot pri ostalih dejavnikih moramo tudi pri temperaturi ugotoviti optimalno temperaturo koreninjenja za vsak genotip.

4.4.7 Aktivno oglje

Ugotovili so, da pri mnogih vrstah poganjki bolje koreninijo, če v gojišče dodamo aktivno oglje. Aktivno oglje adsorbira morebitne inhibitorne substance, upočasni adsorbcijo avksinov, in s tem izboljša pogoje za iniciacijo korenin. Hkrati potemni gojišče, kar pozitivno vpliva na nastanek korenin. Pri nekaterih vrstah je dodano aktivno oglje v gojišče preprečilo tvorbo korenin. Norton in Norton (1988) sta na primer ugotovila, da je dodano aktivno oglje v koncentraciji 2 g/l povečalo število korenin pri poganjkih rodu *Prunus* in zmanjšalo število korenin pri poganjkih iz rodu *Spirea*.

4.5 Aklimatizacija (stopnja 4)

Rastline razmnožene z mikropropagacijo, bi propadle, če bi jih prenesli neposredno iz *in vitro* pogojev v naravne razmere na prostem. Propadanje je povezano z izgubo vode in fotosintezo.

4.5.1 Izguba vode

Zgradba lista in listne reže

Rastline, ki rastejo v tkivni kulturi, so izpostavljene slabši osvetlitvi in zelo visoki zračni vlagi, zato je spremenjena tudi anatomija in fiziologija rastlinskih tkiv. Listi rastlin, ki rastejo *in vitro*, tvorijo manj voska na kutikuli. Razlog je predvsem v visoki zračni vlagi, ki ji je rastlina izpostavljena. Zaradi pomanjkanja voska se rastlina, zaradi transpiracije hitro izsuši, ko jo prestavimo v naravno okolje. Drugi razlog za hitro

izgubo vode rastlin iz *in vitro* razmer so listne reže. Število listnih rež je lahko zmanjšano (Brainerd in Fuchigami, 1982), lahko pa tudi povečano (Blanke in Belcher, 1989) ali nespremenjeno (Conner in Conner, 1984). Število listnih rež torej ni razlog za povečano izgubo vode, temveč je razlog v nenormalni obliki listnih rež, ki ne delujejo pravilno in se ne zaprejo po presaditvi rastlin v suho okolje.

Prisotnost korenin

Sposobnost rastlin, da zadržijo vodo, je povezana s prisotnostjo korenin, ki so sposobne sprejeti vodo iz prsti. Včasih se zgodi, da korenine po presaditvi v prst odmrejo. Možen vzrok je, da korenine izraščajo iz kalusa in je tako povezava med prevodnim sistemom korenin in stblom nezadostna ali prekinjena za pretok vode in hranil. Predvsem pri lesnatih rastlinah tvori adventivne korenine samo primarni vaskularni sistem, ki ima slabo prevodnost. Razlog je lahko tudi v tem, da poganjki še niso sposobni asimilacije, kar pomeni, da korenine nimajo dovolj ogljikovih hidratov v prvih dneh po presaditvi v substrat (George, 1993).

4.5.2 Fotosinteza

Rastlinice, ki rastejo na bogatem gojišču s sladkorji, *in vitro* sintetizirajo malo količino ogljikovih hidratov z asimilacijo in morajo preiti na avtotrofno rast po presaditvi. Anatomska zgradba lista je spremenjena, pogosto manjka palisadno tkivo in zračni prostor mezofila. Listi niso sposobni transpiracije in fotosinteze. Grout in Aston (1978) sta proučevala asimilacijo CO₂ pri cvetači po presaditvi rastlin iz *in vitro* razmer. Sedem dni po presaditvi so rastline cvetače začele z aktivno fiksacijo CO₂, vendar se je še vedno več CO₂ sprostito kot pa fiksiralo med fotosintezo. Po 14 dneh sta opazila, da se je fiksiralo več CO₂ kot sprostito. V tem času se je pojavila tudi rast novih listov. Podobne so ugotovitve pri drugih vrstah. Listi, ki nastanejo *in vitro*, služijo po presaditvi bolj kot skladiščni organ, po presaditvi ne zrastejo in imajo slabo fotosintetsko aktivnost, ki se nikoli ne normalizira. V njih so skladiščene organske substance, ki se transportirajo in sodelujejo pri rasti in razvoju novih organov med aklimatizacijo. Listi, ki se pojavijo na novo, pa rastejo hitro in so sposobni za normalno aktivnost fotosinteze.

Aklimatizacija rastlin koreninjenjih *in vitro*

Ko imajo rastlinice dobro razvite korenine, jih lahko presadimo v primeren substrat in jih aklimatiziramo. Za uspešno aklimatizacijo je potrebna visoka vlaga. Ko jih vzamemo iz posod z gojiščem, jih moramo zelo hitro posaditi v primerno okolje. Na suhem in toplen zraku ovenijo v nekaj minutah. Ko vzamemo rastline iz gojišča, jim previdno speremo korenine pod tekočo in mlačno vodo (Slika 9). Potrebna je previdnost, da korenin ne potrgamo. Odstraniti moramo vse ostanke gojišča, saj bi ostanke gojišča, ki vsebuje sladkor, na koreninah služili kot hranilno gojišče za mikroorganizme v substratu in bi uničili rastlino s svojimi toksičnimi metaboliti.

Sestavo substrata prilagodimo rastlinski vrsti, ki jo aklimatiziramo. Običajno uporabimo zračen substrat, ki je mešanica šote, vermikulita, perlita in peska v različnih razmerjih. Pri večini vrst se je izkazalo koristno dodati makro- in mikroelemente (npr. zalijemo z raztopino MS gojišča). Lončki oz. mini rastlinjaki, v katere rastline presadimo, morajo biti novi ali pa dobro oprani in razkuženi.

Po presaditvi moramo rastline prvih nekaj tednov izpostaviti 85 % zračni vlagi in preprečiti neposredne sončne žarke (omogočiti senčenje). Uporabimo lahko prekrivanje s prozornimi plastičnimi pokrovi, rastline lahko zavijemo v plastično folijo ali jih aklimatiziramo v rastlinjaku z uporabo sistema megle.

Najprimernejša temperatura za aklimatizacijo je odvisna od rastlinske vrste in je po navadi nekje od 15 do 25 °C.



Slika 9: Spiranje korenin pred aklimatizacijo

4.6 Problemi in neželeni pojavi pri vzpostavitvi in vzdrževanju kulture

Po vzpostavitvi tkivne kulture, ko izsečke prenesemo na gojišče, se včasih pojavijo neželeni pojavi, ki lahko vodijo tudi do propada kulture, če ne ukrepamo pravočasno.

4.6.1 Rjavenje kot posledica ranitve tkiva

Velikokrat se zgodi, da rastlinsko tkivo na odrezanem mestu po prestavitvi v gojišče potemni. Zaradi mehanske poškodbe tkiva, se rastlina odzove z oblikovanjem fenolov in pigmentov. V gojišče se tako sprostijo temno obarvane substance, ki lahko inhibirajo (zavrejo) rast. Izsečki lahko tvorijo pigmente (roza, rdeče, rjave, črne ali modre) nekaj časa po razrezu (Slika 10). Obseg rjavenja je zelo odvisen od

genotipa in zelo pogost pri rodovih, ki vsebujejo visoke količine taninov ali drugih hidroksifenolov (npr. *Castanea*, *Juglans*, *Quercus*, *Rhododendron* itd.). Različni genotipi se ne razlikujejo samo po količini fenolnih substanc, ki jih izločajo (proizvajajo), temveč tudi po toksičnosti in občutljivosti rastlin na nastale fenole. Mlada tkiva so običajno manj nagnjena k rjavenju kot starejša. Na rjavenje lahko vpliva tudi letni čas oz. mesec, ko iz izvorne rastline pobereмо izsečke. Kadar izločki ne vplivajo na rast in razvoj, ni potrebno ukrepati. V nasprotnem primeru moramo bolj pogosto subkultivirati in dodajati absorbirajočih snovi (aktivno oglje ali polivinilpirolidon-PVP) ali dodajati antioksidante (askorbinska kislina, citronska kislina itd.).



Slika 10: Izločeni pigmenti v gojišče po indukciji pri *Morinda* sp.

4.6.2 Odmiranje vršičkov

Odmiranje vršičkov je fiziološki pojav, ki ga opazimo pri nekaterih vrstah *in vitro* gojenih rastlin. Pojav je pogost predvsem pri lesnatih rastlinah. Posledično lahko rastlina odmre. Vzrok je velikokrat v pomanjkanju kalcija v vrhu rastline in zaradi nezmožnosti črpanja kalcija iz gojišča, lahko tudi zaradi slabe sposobnosti prenosa

po rastlini. V posodah visoka vlaga omejuje transpiracijo, in s tem je zmanjšan prenos ionov po ksilemu in kalcij ne doseže apikalnega dela rastline. Odmiranje vršičkov (Slika 11) lahko pogosto preprečimo tako, da povišamo koncentracijo kalcija v gojišču ali spremenimo okolje tako, da se poveča transpiracija. Pri *Cydonia oblonga* so odmiranje vršičkov uspešno preprečili z uporabo gojišča iz dveh faz: spodaj trdno gojišče in zgoraj tekoče brez agarja (Vinterhalter in Nešković, 1992). Kataeva in sod. (1991) so ugotovili, da je pri *Malus domestica* prišlo do odmiranja vršičkov, rjavenja in odpadanja listov po prenosu poganjkov na gojišče brez citokininov. Z ELISA analizo vsebnosti endogenih rastnih regulatorjev so ugotovili pomanjkanje naravnih hormonov, kar je povzročilo propadanje tkiva.

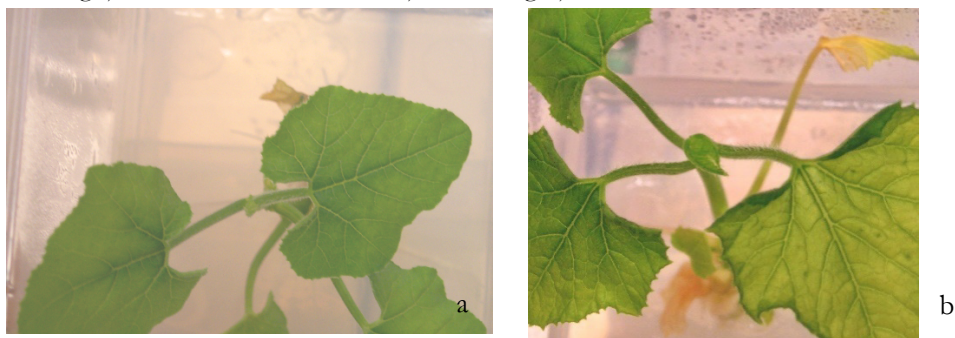


Slika 11: Primer rjavenja vršička pri slivi

4.6.3 Vitifikacija

Vitifikacija ali hiperhidracija je stanje, ko postanejo tkiva nabrekla in dobijo steklast videz (Slika 12). Listi in poganjki imajo tanko kutikulo, tanek epidermis in nenormalne listne reže. Manj je palisadnih celic, včasih so popolnoma odsotne. Kloroplasti imajo nenavadno strukturo in nizko vsebnost klorofila. Vse to povzroči zmanjšano rast in slabšo fotosintezo. Gre za fiziološko motnjo in ne patološko

stanje, torej vitrifikacija ni prenosljiva. Vitrificirane rastline običajno ne preživijo, če jih presadimo v naravno okolje in se zelo težko aklimatizirajo. Vitrifikacijo lahko sproži več dejavnikov. Kadar rastline rastejo hitro, je manjša verjetnost, da pride do vitrifikacije, kar pomeni, da lahko z optimalnimi pogoji rasti zmanjšamo pojav na minimum. Višje temperature in slabša svetloba lahko spodbujajo pojav vitrifikacije. Taji in Williams (1989) sta zmanjšala vitrifikacijo z izpostavitvijo poganjkov na 5 °C za 10 dni. Naslednji dejavnik, ki povzroča vitrifikacijo, je visoka zračna vlaga, tako da lahko z znižanjem vlage znižamo tudi pojav vitrificiranih poganjkov. To lahko naredimo z zračenjem kultur ali s posebnimi pokrovčki, ki omogočajo prehod plinov in zračne vlage, ne pa tudi mikroorganizmov. Slaba stran tega je, da se izgublja tudi voda iz gojišča, kar zviša koncentracijo soli in agarja.



Slika 12: Primer normalnega lista pri buči (a) in primer vitrificiranega lista (b)

Po Pierik (1997) vplivajo na pojav in stopnjo vitrifikacije naslednji dejavniki:

- povišana koncentracija agarja in/ali sladkorja zmanjša vitrifikacijo (npr. pri artičoki, nagelnju);
- izmenjava plinov med posodico in okoljem;
- količina citokininov v gojišču;
- stimulira jo slaba svetloba in visoke temperature;
- povzroči jo lahko intenzivna sterilizacija;
- nekatere vrste agarja;
- spremembe v koncentraciji anorganskih soli (sprememba gojišča iz MS na L&Q gojišče (Quoirin in Lepoivre, 1977) je pri jablani in hruški rešila probleme z vitrifikacijo);
- mlada in mehka rastlinska tkiva so bolj občutljiva za pojav vitrifikacije;
- uporaba dvofaznega gojišča (trda in tekoča faza).

Vitrifikacijo lahko zmanjšamo ali preprečimo z naslednjimi ukrepi:

- znižamo relativno zračno vlago v posodici (npr. uporabimo manj tesno zaprte pokrovčke ali pokrovčke s posebnimi filtri, ki omogočajo boljšo izmenjavo plinov);
- povišamo koncentracijo agarja ali povišamo koncentracijo saharoze;
- uporabimo dvofazno gojišče (spodaj trdno in zgoraj tekoče);
- zmanjšamo koncentracijo amonijevih ionov v gojišču;
- dodamo eno ali več organskih kislin, kot so citrat, sukcinat ali malat v gojišče (asimilacija NH_4^+);
- zmanjšamo koncentracije mikroelementov v gojišču;
- zamenjamo saharozo s fruktozo ali z galaktozo, ali dodatkom reduciranega glutationa v gojišče;
- zmanjšamo citokinine ali jih zamenjamo z drugimi citokinini (problematičen je lahko BAP);
- dodamo floridizin v gojišče.

5 Mikropropagacija marelice (*Prunus armeniaca* L.)

O mikropropagaciji marelice je v primerjavi z ostalimi koščičarji znanih manj podatkov. Nekatere raziskave govorijo o zelo nizki sposobnosti tvorbe aksilarnih poganjkov pri marelici v *in vitro* kulturi (Skirvin in sod., 1986; Kataeva in Kramarenko, 1989), ali o skoraj popolni odsotnosti tvorbe aksilarnih poganjkov (Snir, 1984).

Pri mikropropagaciji marelice je lahko problematična že prva stopnja, to je indukcija oz. razkuževanje brstov. Sam uspeh indukcije je seveda v veliki meri odvisen od sorte, od starosti drevesa, iz katerega vzamemo brste, in od okolja, v katerem drevo raste. V raziskavi, ki smo jo naredili v laboratoriju za rastlinske tkivne kulture na Fakulteti za kmetijstvo in biosistemske vede Univerze v Mariboru (Šenveter, 2018) smo v poskus vključili 600 brstov, od katerih je po indukciji preživel le 9,2 %. Uporabili smo različna sredstva za razkuževanje (dikloroizocianurna kislina (DICA), natrijev hipoklorit, kalcijev hipoklorit), v različnih koncentracijah in z različnim časom tretiranja. Pred glavnim razkuževanjem smo brste za 60 sekund potopili v 70 % etanol in po končanem glavnem razkuževanju trikrat sprali z avtoklavirano vodo. Največ razkuženih in vitalnih brstov (15 %) smo dobili pri dveh obravnavanjih, in sicer po tretiranju z DICA 10 minut in 15 minut. V poskusu smo primerjali tudi,

kako na uspešnost indukcije vpliva razvojni stadij brstov, tako da smo uporabili odprte in zaprte brste (Slika 13). Pri odprtih je bilo več okuženih (50 %) in manj propadlih (40 %), pri zaprtih je bilo okuženih 33 % in propadlih 58,7 %. Na število razkuženih in vitalnih brstov stadij razvoja ni bistveno vplival. Rezultati so pokazali, da je razkuževanje marelice zelo zahtevno, saj so lesnate rastline, ki več let rastejo v naravnem okolju, okužene z različnimi mikroorganizmi. Prav tako so pri lesnatih rastlinah pogosto sistemsko okužena vsa tkiva.



Slika 13: Odprti brsti (zgoraj) in zapri brsti (spodaj) marelice, uporabljeni za indukcijo kulture



Slika 14: Uspešno inducirani sterilni in vitalni poganjki marelice



Slika 15: Poganjki marelice v stopnji razraščanja



Slika 16: Vitalen in dobro razrasel poganjek marelice v tkivni kulturi na gojišču z dodanim meta-topolinom

Na stopnjo razraščanja in podaljševanja poganjkov marelice v *in vitro* razmerah (Slika 15) pomembno vpliva izbira osnovnega gojišča, pri čemer je optimalna sestava makroelementov zelo odvisna od genotipa, ki ga razmnožujemo. V veliko raziskavah so uporabili MS gojišče (Murashige in Skoog, 1962), ki pa se pri marelici ni najbolje izkazalo. Povzroča odmiranje poganjkov in po več subkulturah vitrifikacije. Vzrok bi lahko bil v visoki vsebnosti amonijevega iona, ki ga vsebuje gojišče MS (Pérez-Tornero in Burgos, 2000). Osnovna gojišča, ki imajo nižjo vsebnost amonija, kot npr. WPM (woody plant medium) ali Q&L (Quoirin in Lepoivre, 1977), so pri marelici pokazala boljše rezultate. V raziskavi Pérez-Tornero in Burgos (2000) se je pri večini proučevanih kultivarjev marelice kot najboljše pokazalo gojišče Q&L. Marino in sod. (1993) poročajo o boljših rezultatih razraščanja *in vitro* pri kultivarjih 'Portici' in 'San Castrese', kjer so namesto saharoze uporabili sorbitol.

Znano je, da povečana koncentracija benzil adenina (BA) poveča število nastalih poganjkov. Ta citokinin je največkrat uporabljen pri razmnoževanju poganjkov marelice v tkivnih kulturah. Pri previsoki koncentraciji BA se lahko pojavi vitifikacija. Pérez-Tornero in Burgos (2000) sta preučevala *in vitro* razmnoževanje različnih kultivarjev marelice in ugotovila, da je bil vpliv koncentracije BA v gojišču na razraščanje zelo odvisen od genotipa. Poganjki so najbolje razraščali pri dodanem BA v koncentracijah od 1,78 do 3,11 μM . V laboratoriju za rastlinske tkivne kulture Fakultete za kmetijstvo in biosistemske vede Univerze v Mariboru smo primerjali vpliv tidiazurona (TDZ), BA in meta-topolina v koncentracijah 0,5 mg/l in 1 mg/l na razraščanje poganjkov pri marelici. Osnovno gojišče je bilo WPM (woody plant medium). Vsi trije citokinini so pozitivno vplivali na število nastalih poganjkov in na prirast mase v primerjavi s kontrolo. Največ novih poganjkov se je tvorilo na gojišču z dodanim 1 mg/l BA, vendar je bilo pri tej koncentraciji 63,2 % poganjkov vitificiranih. Tudi pri uporabi tidiazurona je bila prisotna vitifikacija. Najbolje se je izkazala uporaba meta topolina (Slika 16), ki je pozitivno vplival na razraščanje, ni pa povzročal vitifikacije (Hlebš, 2019; Hribernik, 2019 in Frešer, 2019).

Koubouris in Vasilakakis (2006) sta proučevala učinek izpostavitve kratkotrajni (100 do 300 ur) nižji temperaturi 4 °C na sposobnost razraščanja. Ugotovila sta, da se je število poganjkov po tretiranju močno povečalo (iz 10,7 na 17,1).

Čeprav je koreninjenje potaknjencev pri marelici lahko težavno, s koreninjenjem poganjkov v tkivni kulturi ni večjih težav. Seveda je tudi ta stopnja mikropropagacije zelo odvisna od uporabljenega genotipa. Priporočajo nizke koncentracije avksinov v gojišču (Murai in sod., 1997), visoke koncentracije IBA ali NAA lahko povzročijo pojav kalusa in nastanek nenormalnih korenin, kar vpliva kasneje na uspešnost aklimatizacije. Koubouris in Vasilakakis (2006) poročata o več kot 90 % uspešnosti koreninjenja z uporabo IBA in NAA ne glede na uporabljeno koncentracijo.

Pri mikropropagaciji marelice se pogosto zgodi, da ob prenosu poganjkov na gojišče za koreninjenje, ki vsebuje avksine in je brez citokininov, začno odmirati vrhovi poganjkov (odmiranje vršičkov ali apikalna nekroza). Ta neželeni pojav je na splošno opisan v poglavju 4.6.2. Težavo lahko poskušamo rešiti na več načinov. V gojišče lahko dodamo kalcij, in sicer v obliki kalcijevega nitrata ali kalcijevega glukonata. Kot kažejo raziskave (Pérez-Tornero in Burgos, 2000) je učinek dodanega kalcija v gojišče zelo odvisen od genotipa. Pri nekaterih kultivarjih je dodan kalcij močno znižal pojav odmiranja vršičkov, vendar je hkrati negativno vplival na koreninjenje

(manjši odstotek ukoreninjenih poganjkov). Pri drugih kultivarjih dodatek kalcija v gojišče ni vplival na apikalno nekrozo. Drug način reševanja apikalne nekroze je, da v gojišče dodamo citokinine v zelo nizki koncentraciji. Tudi tukaj raziskave kažejo, da s tem rešimo problem odmiranja, vendar hkrati zmanjšamo odstotek ukoreninjenih poganjkov, saj citokinini negativno vplivajo na koreninjenje. Tretji način je neposreden nanos raztopine citokininov na vrh poganjka, tik preden jih prenesemo na gojišče za koreninjenje. Pérez-Tornero in Burgos (2000) sta s kratkim namakanjem vršičkov v raztopino BA v koncentraciji 22,2 μM ali 44,4 μM zelo znižala pojav apikalne nekroze, in sicer tako, da sta potopila apikalne dele v raztopino BA, preden sta jih prestavila na gojišče za koreninjenje.

Zadnja stopnja mikropropagacije, aklimatizacija, ne povzroča večjih težav. Po podatkih Pérez-Tornero in Burgos (2000) so dosegli aklimatizacijo od 71 % do 82 %, odvisno od kultivarja.

6 Mikropropagacija češnje (*Prunus avium* L.)

Tudi za češnjo velja, da je uspeh mikropropagacije odvisen od več dejavnikov, med najpomembnejše sodi sestava gojišča in starost rastline, iz katere odvezamo izsečke. Optimalna sestava gojišča je zelo odvisna od uporabljenega genotipa.

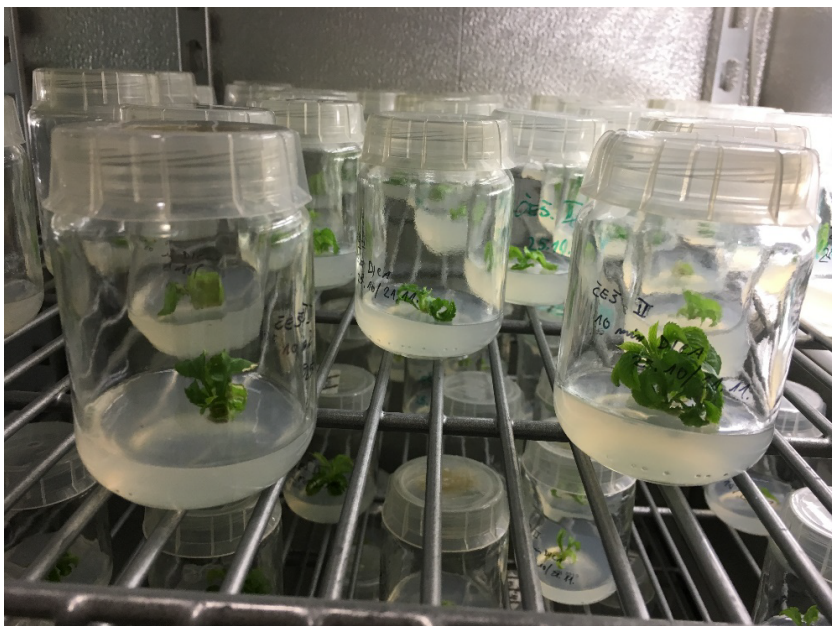
Kot pri vseh lesnatih rastlinah, je prva stopnja mikropropagacije (razkuževanje) težavna. Nekatere raziskave navajajo uspešno razkuževanje izsečkov češnje z uporabo raztopin natrijevega in kalcijevega hipoklorita. Druge raziskave kažejo, da nobeden od omenjenih ni bil uspešen pri razkuževanju (Muna in sod., 1999). Pri starejših drevesih, ki rastejo na prostem, je potrebno bolj agresivno razkuževanje. Muna in sod. (1999) so uspešno razkužili izsečke z uporabo Hg_2Cl_2 raztopine. V laboratoriju za rastlinske tkivne kulture Fakultete za kmetijstvo in biosistemske vede Univerze v Mariboru smo najboljši uspeh razkuževanja dosegli pri uporabi dikloroizocianurne kisline (DICA) in času tretiranja 10 minut. Po tem postopku je bilo sterilnih in vitalnih brstov 20 % (Štamic, 2018).

Večina opisanih postopkov uporablja za razraščanje poganjkov češnje citokinin BA v koncentracijah od 0,2 do 2,0 mg/l. BA velja kot zelo učinkovit hormon v primerjavi s TDZ, 2ip in kinetinom glede tvorbe novih poganjkov. TDZ stimulira endogeno biosintezo citokininov, kar povzroči povečano koncentracijo naravnih citokininov, zato ga lahko uporabljamo v nižjih koncentracijah. Pri mnogih lesnatih rastlinah TDZ deluje učinkovitejše kot derivati purin adenina, vendar pri nekaterih vrstah ni učinkov. Pri kultivarju češnje 'Lapins' sta Ruzic in Vujović (2008) pri uporabi TDZ (2 μ M) dobila multiplikacijski indeks 1,5, medtem ko je bil na gojiščih z BA (2 μ M) bistveno višji, in sicer 2,56. Najboljši multiplikacijski indeks sta dobila pri uporabljeni koncentraciji BA 5 μ M, in sicer 2,83.

Sliki 17 in 18 prikazujeta poganjke češnje v stopnji namnoževanja.

Koreninjenje je lahko težavno, še posebej v primeru, ko je smo v stopnji razmnoževanja uporabili citokinin TDZ. Ruzic in Vujović (2008) poročata, da so se poganjki kultivarja 'Lapins' koreninili že med stopnjo razmnoževanja, ko sta uporabila kinetin in 2ip kot vir citokinina, kar je zelo nenavadno za sadne vrste. Quambusch in sod. (2017) so s 4-dnevno izpostavitvijo temi med indukcijo korenin značilno povečali odstotek koreninjenja poganjkov. Rastline so bile zdrave in se niso vizualno razlikovale od kontrolnih rastlin. Podobne rezultate smo dobili tudi v laboratoriju za rastlinske tkivne kulture Fakultete za kmetijstvo in biosistemske vede Univerze v Mariboru, kjer smo pri koreninjenju poganjkov češnje uporabili avksin IBA (indol maslena kislina) v dveh koncentracijah: 0,3 mg/l in 1 mg/l. Polovico poganjkov smo na začetku tretirali s temo (6 dni), druga polovica je bila ves čas na svetlobi. Pri poganjkih raslih na gojišču z dodanim 1 mg/l IBA in tretiranih s temo, smo dosegli 100 % ukoreninjenost (Slika 19) (Štamic, 2018).

Aklimatizacija je zadnji ključen korak pri uspešnem razmnoževanju *in vitro*. Za uspešno aklimatizacijo je zelo pomembno zadostno število korenin. Naši rezultati kažejo 16 % uspešnost pri aklimatizaciji češnje (Slika 20).



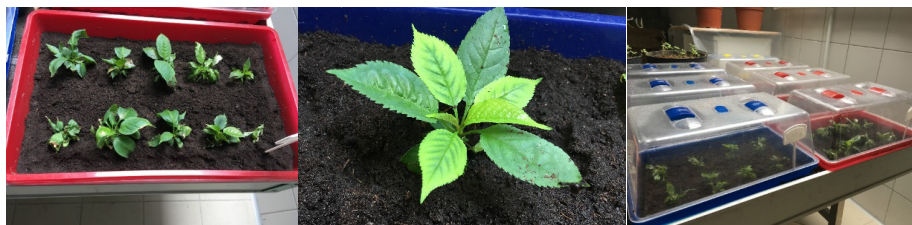
Slika 17: *In vitro* kultura češnje



Slika 18: Namnoževanje in podaljševanje poganjkov pri češnji



Slika 19: Koreninjenje češnje



Slika 20: Aklimatizacija češnje

7 Mikropropagacija slive (*Prunus domestica* L.)

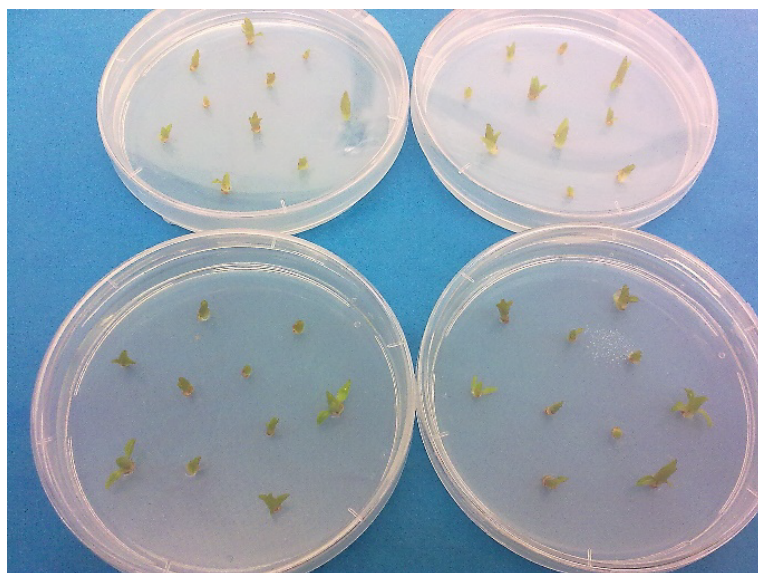
Prva stopnja mikropropagacije je pri lesnatih rastlinah, torej tudi pri slivah, pomembna in zahtevna stopnja.

Wolella (2017) je za razkuževanje brstov pri kultivarju 'Stanley' uporabil različne koncentracije natrijevega hipoklorita (NaOCl) in živosrebrov klorid Hg_2Cl_2 in različne čase tretiranja. Najboljši rezultat je dobil pri kombinaciji 2 % NaOCl 15 minut in 0,1 % Hg_2Cl_2 7 minut, kjer je bilo razkuženih in vitalnih 97 % brstov. Če je uporabil samo 2 % NaOCl 25 minut, je bi odstotek vitalnih brstov samo 2,77 %, pri 0,1 % Hg_2Cl_2 10 minut pa 13 %.

Uğur (2020) je dobil najboljše rezultate (91 % razkuženih in vitalnih brstov) pri razkuževanju slive z 2 % natrijevim hipokloritom (NaOCl).

V raziskavi, opravljeni na Fakulteti za kmetijstvo in biosistemske vede Univerze v Mariboru, je bilo najboljše razkuževanje brstov sliv pri 10 min. v dikloroizocianurni kislini (DICA), kjer smo uspešno inducirali 45 % vitalnih brstov (Potočnik, 2011). Najboljši uspeh smo dosegli pri uporabi brstov v začetni stopnji odpiranja (Slika 21). Več raziskav priporoča uporabo antibiotikov za odstranitev bakterijskih okužb in

zagotovitev zdravih rastlin. Sedlak in sod. (2008) poročajo o uporabi antibiotika Cefotaxim v koncentraciji 200 mg/l, s čimer so uspešno preprečili bakterijske okužbe med razmnoževanjem v tkivni kulturi. Slika 22 prikazuje vpliv dodanega antibiotika na bakterijsko okužbo pri slivah.



Slika 21: Inducirani brsti slive



Slika 22: Poganjki slive pred dodatkom antibiotika v gojišče (levo) in po dodatku (desno)

V drugi stopnji namnožitve in podaljševanja poganjkov je izbira osnovnega gojišča in izbira hormonov zelo odvisna od uporabljenega genotipa.

Tian in Sibbald (2007) za mikropropagacijo sliv priporočata tri osnovna gojišča: MS (Murashige in Skoog, 1962), B5 (Gamborg in sod., 1968) in WPM (Lloyd in McCown, 1980), za namnoževanje poganjkov pa citokinin tidiazuron (TDZ) v koncentraciji 1,66 mg/l.

V laboratoriju za rastlinske tkivne kulture na Fakulteti za kmetijstvo in biosistemske vede Univerze v Mariboru smo spremljali vpliv dodanega meta-topolina v koncentraciji 1 mg/l in BA v dveh koncentracijah 0,5 mg/l in 1 mg/l na tvorbo novih poganjkov v tkivni kulturi. Osnovno gojišče je bilo WPM. Največ poganjkov smo dobili na gojišču z 0,5 mg/l BA, in sicer v povprečju 5,37, vendar to ni statistično značilno odstopalo od števila novonastalih poganjkov pri uporabi meta-topolina in 1 mg/l BA (Šalamun, 2021). Dobre rezultate smo dosegli z zamenjavo saharoze s fruktozo v koncentraciji 16 g/l (neobjavljeni rezultati) (Slika 23), vitrificiranosti nismo opazili. Se je pa na gojišču z 1 mg/l BA pojavljal kalus (Slika 23). Na kontrolnem gojišču brez dodanih hormonov je nekaj poganjkov tvorilo korenine (Slika 25). Ambrožič Turk in sod., (1992) poročajo o dobrih rezultatih namnožitve pri uporabi nizke koncentracije BA. Wolella (2017) je pri kultivarju 'Stanley' najboljše rezultate dobil na MS osnovnem gojišču in dodanem 0,5 mg/l BA, in sicer 3,08 novih poganjkov.



Slika 23: Rast in razraščanje poganjkov slive na gojišču s saharozo in sorbitolom (a), poganjki na gojišču s fruktozo (b)



Slika 24: Pojav kalusa pri poganjkih slive na gojišču z dodanim 1 mg/l BA



Slika 25: Pojav korenin pri slivi na gojišču brez dodanih rastnih regulatorjev

Za koreninjenje poganjkov sliv *in vitro* Tian in Sibbald (2007) priporočata uporabo polovičnega MS osnovnega gojišča in dodanima hormonoma NAA (1 mg/l) in kinetin (0,002 mg/l), ter 10 g saharoze. Korenine so se pojavile po 4 do 8 tednih. Sposobnost koreninjenja je odvisna od uporabljenega genotipa. Pri kultivarju 'Stanley' so poganjki najboljše koreninili na gojišču z dodanim 1 mg/l IBA, kjer je bila ukoreninjenost 100 %, s povprečno 4,25 korenin na poganjek (Wolella, 2017).

Ko poganjki dosežejo velikost 3-5 cm in imajo razvit koreninski sistem, jih presadimo v substrat in aklimatiziramo.

Viri in literatura

- Ambrozic Turk, B., Smole, J. in Šiftar, A. (1992). Micropropagation of a plum ecotype (*Prunus domestica* L.) as rootstock for apricot. *Acta Horticulture*, 300, 111–114.
- Ben-Jaacov, J., Ackerman, A., Tal, E. in Jacobs, G. (1991). Vegetative propagation of *Alberta magna* by tissue culture and grafting. *HortScience*, 26(1), 74. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.26.1.74>
- Blanke, M. M. in Belcher, A. R. (1989). Stomata of apple leaves cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 19(1), 85–89. <https://doi.org/10.1007/BF00037780>
- Bohanec, B. (1992). *Tehnike rastlinskih tkivnih kultur*. Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Center za rastlinsko biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin.
- Brainerd, K. E. in Fuchigami, L. H. (1982). Stomatal functioning of *in vitro* and greenhouse apple leaves in darkness, mannitol, ABA, and CO₂. *Journal of Experimental Botany*, 33(3), 388–392. <https://doi.org/10.1093/jxb/33.3.388>
- Chu, C. C. (1978). The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. V *Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture* (str. 45–50). Science Press.
- Conner, L. N. in Conner, A. J. (1984). Comparative water loss from leaves of *Solanum laciniatum* plants cultured *in vitro* and *in vivo*. *Plant Science Letters*, 36(3), 241–246. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4211\(84\)90176-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4211(84)90176-7)
- Dai, C., Lamberth, V., Taven, R. in Mertz, D. (1987). Micropropagation of *Rhododendron prinophyllum* by ovary culture. *HortScience* 22, 491–493.
- de Fossard, R. A. in de Fossard, H. (1988). Coping with microbial contaminants and other matters in a small commercial micropropagation laboratory. V *Acta Horticulturae* (Vol. 225, str. 167–176). <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1988.225.18>
- Frešer, P. (2019). *Vpliv dodanega citokinina (tidiazurona) na rast in vitifikacijo pri mikropropagaciji marelice: magistrsko delo*. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=73593>
- Gamborg, O. L., Miller, R. A. in Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental cell research*, 50(1), 151–158.
- George, E. F. (1993). *Plant propagation by tissue culture – part 2*. Exegetics Ltd.
- Gibson, A. (1967). Carbon dioxide limitations of plant growth in tube culture, with special reference to legume-nodulation studies. *Australian Journal of Biological Sciences*, 20(4), 837–842. <https://doi.org/https://doi.org/10.1071/BI9670837>

- Grout, B. W. W. in Aston, M. J. (1978). Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. II. Carbon dioxide fixation and the development of photosynthetic ability. *Horticultural Research*, 17(2), 6571.
- Hammerschlag, F. A., Bauchan, G. R. in Scorza, R. (1987). Factors influencing *in vitro* multiplication and rooting of peach cultivars. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 8(3), 235–242. <https://doi.org/10.1007/BF00040950>
- Hempel, M., Petos-Witkowska, B. in Tymoszuk, J. (1985). The influence of cytokinins on multiplication and subsequent rooting of gerbera *in vitro*. V *Acta Horticulturae* (Vol. 167, str. 301–306). <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1985.167.32>
- Hlebŝ, L. (2019). Vpliv v gojišče dodanega meta-topolina na rast in razraščanje marelice (*Prunus armeniaca* L.) v tkivnih kulturah: *diplomsko delo*. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=73835>
- Hribernik, T. (2019). *Vpliv v gojišče dodanega 6-benzilaminopurina (BAP) na rast in razraščanje marelice v tkivni kulturi: diplomsko delo*. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=74156>
- Johnson, K. A. in Burchett, M. (1991). *In vitro* propagation of *Blandfordia grandiflora* (Liliaceae). *Journal of Horticultural Science*, 66(4), 389–394. <https://doi.org/10.1080/00221589.1991.11516166>
- Kataeva, N. V., Alexandrova, I. G., Butenko, R. G. in Dragavtceva, E. V. (1991). Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27(2), 149–154. <https://doi.org/10.1007/BF00041283>
- Kataeva, N. V. in Kramarenko, M. A. (1989). Clonal micropropagation of apricot. *Byulleten Glavnogo Botanicheskogo Sada*, 153, 69–73.
- Koubouris, G. in Vasilakakis, M. (2006). Improvement of *in vitro* propagation of apricot cultivar 'Bebecou'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85(2), 173–180. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-9066-y>
- Lane, W. D. (1978). Regeneration of apple plants from shoot meristem-tips. *Plant Science Letters*, 13(3), 281–285. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4211\(78\)90107-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4211(78)90107-4)
- Lindemann, E., Gunckel, J. in Davidson, O. (1970). Meristem culture of Cattleya. *AmerOrchSoc. Bull.*, 39, 10021004.
- Lloyd, G. in McCown, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Combined Proceedings – International Plant Propagators' Society (USA)*, 30. str. 421–427.
- Ma, F., Zhu, X., Guo, C., Zhang, Q., Song, W., Mei, L. in Hsiao, A. I. (1992). Shoot tip culture of *Ribes nigrum* *in vitro*. *Journal of Horticultural Science*, 67(6), 751759. <https://doi.org/10.1080/00221589.1992.11516306>
- Marino, G., Bertazza, G., Magnanini, E. in Altan, A. D. (1993). Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34(3), 235–244. <https://doi.org/10.1007/BF00029712>
- McClelland, M. T. in Smith, M. A. L. (1990). Vessel type, closure, and explant orientation influence *in vitro* performance of five woody species. *HortScience* 25(7), 797800. <https://doi.org/10.21273/hortsci.25.7.797>
- Moncousin, C. (1986). Peroxidases as a marker for rooting improvement of clones of *Vitis* cultured *in vitro*. V H. Greppin, C. Penel in T. Gaspar (ur.), *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases* (str. 379–385). Univ de Genève Centre de Botanique.
- Morel, G. M. (1965). Clonal propagation of orchids by meristem culture. *Cymb. Soc. News* 20, 3–11.
- Morini, S. in Concetti, S. (1985). *In vitro* propagation of P.S. B2 peach rootstock. V *Acta Horticulturae* (Vol. 173, str. 205–210). <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1985.173.23>
- Muna, A. L. S., Ahmad, A. K., Mahmoud, K. in Abdul-Rahman, K. (1999). *In vitro* propagation of a semi-dwarfing cherry rootstock. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59(3), 203–208. <https://doi.org/10.1023/A:1006444925445>
- Murai, Y., Harada, H. in Yamashita, H. (1997). *In vitro* propagation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cv. 'Bakuoh junkyou'. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 66(3-4), 475–480. <https://doi.org/10.2503/jjshs.66.475>
- Murashige, T. in Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473497.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nitsch, J. P. in Nitsch, C. (1969). Haploid Plants from Pollen Grains. *Science (American Association for the Advancement of Science)*, 163(3862), 85–87. <https://doi.org/10.1126/science.163.3862.85>
- Norton, M. E. in Norton, C. R. (1988). Comparative study of in and ex vitro rhizogenesis on micropropagated shoots in the plant families Rosaceae and Ericaceae. V *Acta Horticulturae* (Vol. 227, str. 504–507).
- Pérez-Tornero, O. in Burgos, L. (2000). Different media requirements for micropropagation of apricot cultivars. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 63, 133141. <https://doi.org/10.1023/A:1006430718024>
- Pierik, R. in Steegmans, H. H. M. (1975). Analysis of adventitious root formation in isolated stem explants of *Rhododendron*. *Scientia Horticulturae*, 3, 1–20.
- Pierik, R. L. M. (1997). *In vitro culture of higher plants*. Kluwer Academic Publishers.
- Pierik, R. L. M. in Steegmans, H. H. M. (1975). Analysis of adventitious root formation in isolated stem explants of *Rhododendron*. *Scientia Horticulturae*, 3(1), 120. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4238\(75\)90031-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4238(75)90031-X)
- Potočnik, B. (2011). Vpliv različnih načinov razkuževanja na regeneracijo brstov sliv 'Mirabolana' (*Prunus cerasifera* Ehrh.): diplomsko delo.
- Quambusch, M., Gruß, S., Pscherer, T., Winkelmann, T. in Bartsch, M. (2017). Improved in vitro rooting of *Prunus avium* microshoots using a dark treatment and an auxin pulse. *Scientia Horticulturae*, 220, 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.03.020>
- Quoirin, M. in Lepoivre, P. (1977). Improved media for in vitro culture of *Prunus* sp. V *Acta Horticulturae* (Vol. 78, str. 437–442). <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1977.78.54>
- Rugini, E. (1984). In vitro propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different rootability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Horticulturae*, 24(2), 123–134. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4238\(84\)90143-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0304-4238(84)90143-2)
- Rugini, E., Tarini, P. in Rossodivita, M. E. (1987). Control of shoot vitrification of almond and olive grown in vitro. V *Acta Horticulturae* (Vol. 212, str. 177–183).
- Ruzic, D. in Vujović, T. (2008). The effects of cytokinin types and their concentration on in vitro multiplication of sweet cherry cv. Lapins (*Prunus avium* L.). *Horticultural Science*, 35(1), 12–21. <https://doi.org/10.17221/646-HORTSCI>
- Sedlak, J., Paprstein, F. in Erbenova, M. (2008). In vitro propagation of the P-HL dwarfing sweet cherry rootstocks. V *Acta Horticulturae* (Vol. 795, str. 395–400). <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2008.795.59>
- Skirvin, R. M., Chu, M. C., Mann, M. L., Young, H., Sullivan, J. in Fermanian, T. (1986). Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. *Plant Cell Reports*, 5(4), 292–294. <https://doi.org/10.1007/BF00269825>
- Skoog, F. in Tsui, C. (1948). Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured in vitro. *American Journal of Botany*, 35(10), 782787. <https://doi.org/10.2307/2438159>
- Skoog, F. in Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol*, 11, 118-130.
- Snir, I. (1984). In vitro propagation of 'Canino' apricot (*Prunus armeniaca*). *Horticultural Science*, 19, 229–230.
- Šalamun, M. (2021). Vpliv dodanih citokininov (meta-topolin in BAP) na rast in razrašanje pri mikropropagaciji sliv (*Prunus domestica* L.): magistrsko delo. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>
- Šenveter, N. (2018). Vplivi različnih načinov sterilizacije na vzpostavitev tkivne kulture marelice (*Prunus armeniaca* L.): diplomsko delo. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=70229>
- Štamic, D. (2018). Razmnoževanje češnje (*Prunus avium* L.) v in vitro pogojih: diplomsko delo. <https://dk.um.si/IzpisGradiva.php?id=72314>
- Taji, A. M. in Williams, R. R. (1989). In vitro propagation of *Ceanothus formosus* (Sturt's desert pea) an Australian native legume. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 16(1), 61–66. <https://doi.org/10.1007/BF00044073>

- Tian, L. in Sibbald, S. I. (2007). Micropropagation of *Prunus domestica* and *Prunus salicina* using mature seeds. V S. M. Jain in H. Häggman (ur.), *Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits* (str. 373–379). Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6352-7_34
- Uğur, R. (2020). Development of *in vitro* sterilization protocol for DO-1 (*Prunus domestica*) rootstock. *Applied Ecology and Environmental Research*, 18, 23392349.
- Vinterhalter, B. in Nešković, M. (1992). Factors affecting *in vitro* propagation of quince (*Cydonia oblonga* Mill.). *Journal of Horticultural Sciences*, 67(1), 3943. <https://doi.org/10.1080/00221589.1992.11516218>
- White, P. R. (1963). *The cultivation of animal and plant cells*. Ronald Press.
- Wolella, E. K. (2017). Surface sterilization and *in vitro* propagation of *Prunus domestica* L. cv. Stanley using axillary buds as explants. *Journal of Biotech Research*, 8, 18–26.

MIKROPROPAGACIJA KOŠČIČARJEV

METKA ŠIŠKO^{1,2}

¹ Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede, Hoče, Slovenija
metka.sisiko@um.si

² Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Maribor, Slovenija
metka.sisiko@um.si

Povzetek Mikropropagacija je osnovna tehnika rastlinskih tkivnih kultur. Je način hitrega vegetativnega razmnoževanja rastlin v laboratoriju. Razmnoževanje lesnatih rastlin z mikropropagacijo je v večini primerov veliko težavnejše kot mikropropagacija zelnatih rastlin. Najbolj težavna je prva stopnja mikropropagacije, kjer razkužujemo rastlinski material. Pri drevesih, ki rastejo na prostem, lahko naletimo tudi na notranje okužbe, ki jih z metodami površinske sterilizacije ne moremo odstraniti. Pri lesnatih rastlinah je lahko težavna tudi stopnja koreninjenja. Vsak genotip ima svoje zahteve, zato moramo optimalni postopek proučiti za vsakega posebej. Na Fakulteti za kmetijstvo in biosistemske vede Univerze v Mariboru že več let raziskujemo postopke za uspešno razmnoževanje koščičarjev *in vitro*. Največ raziskav je narejenih na marelici, češnji in slivi, zato je mikropropagacija teh vrst v monografiji bolj natančno opisana. Prvi del monografije je pregled posameznih stopenj mikropropagacije, vključno z opisom laboratorija in potrebne opreme za delo s tkivnimi kulturami. Monografija bo služila tudi kot učno gradivo za študente pri predmetih iz rastlinske biotehnologije in rastlinskih tkivnih kultur.

Ključne besede
in vitro
razmnoževanje,
Prunus,
rastlinske tkivne
kulture,
koščičarji,
mikropropagacija

MICROPROPAGATION OF STONE FRUITS

METKA ŠIŠKO^{1,2}

¹ University of Maribor, Faculty of Agriculture and Life Science, Maribor, Slovenia
metka.sisiko@um.si

² University of Maribor, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Maribor,
Slovenia
metka.sisiko@um.si

Abstract Micropropagation is the basic technique of plant tissue cultures. It is a method of rapid vegetative propagation of plants in the laboratory. Propagation of woody plants by micropropagation is in most cases much more difficult than micropropagation of herbaceous plants. The most difficult is the first stage of micropropagation, where we disinfect plant material. In the case of trees growing outdoors, we can also encounter internal infections that cannot be removed by surface sterilization methods. For woody plants, the rooting stage can also be difficult. Each genotype has its own requirements, so we need to study the optimal procedure for each one. At the Faculty of agriculture and life sciences at the University of Maribor, we have been working on the successful propagation of stone fruits *in vitro* for several years. Most studies are done on apricots, cherries and plums, so the micropropagation of these species is described in more detail in the publication. The first part of the publication is an overview of the individual stages of micropropagation, including a description of the laboratory and the necessary equipment for working with tissue cultures. The publication will also serve as teaching material for students in subjects of plant biotechnology and plant tissue cultures.

Keywords:

in vitro
propagation,
Prunus,
plant tissue culture,
stone fruits,
micropropagation



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kmetijstvo
in biosistemske vede

