



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kmetijstvo
in biosistemske vede

Urška Modrič

**VPLIV RAZLIČNIH NAČINOV STERILIZACIJE
IN TIPA BRSTOV NA USPEŠNO
VZPOSTAVITEV TKIVNE KULTURE PRI
NAVADNI BODIKI (*Ilex aquifolium* L.)**

Diplomsko delo

Maribor, december 2023



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kmetijstvo
in biosistemske vede

Urška Modrič

**VPLIV RAZLIČNIH NAČINOV STERILIZACIJE IN TIPA
BRSTOV NA USPEŠNO VZPOSTAVITEV TKIVNE
KULTURE PRI NAVADNI BODIKI (*Ilex aquifolium* L.)**

Diplomsko delo

Maribor, december 2023

Popravki

Vpliv različnih načinov sterilizacije in tipa brstov na uspešno vzpostavitev tkivne kulture pri navadni bodiki (*Ilex aquifolium* L.)

Diplomsko delo

Študentka: Urška Modrič
Študijski program: visokošolski strokovni študijski program
Agronomija – okrasne rastline, zelenjava in poljščine
Predsednik: izr. prof. dr. Andrej Šušek
Mentorica: izr. prof. dr. Metka Šiško
Somentorica: Anja Ivanuš, mag. kmet.
Član /
Lektorica: Jasmina Vajda Vrhunec, prof. slov.



Zaključno delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Vpliv različnih načinov sterilizacije in tipa brstov na uspešno vzpostavitev tkivne kulture pri navadni bodiki (*Ilex aquifolium* L.)

Ključne besede: sterilizacija, tkivne kulture, bodika, *in vitro*, brsti

UDK: 631.533.3:582.314.1:57.086.83(043.2)=163.6

Izvleček

V letu 2023 smo na Fakulteti za kmetijstvo in biosistemske vede v Mariboru opravili poskus, v katerem smo proučevali vpliv različnih načinov sterilizacije in vpliv tipa brstov (apikalni in aksilarni) na vzpostavitev tkivne kulture navadne bodike (*Ilex aquifolium* L.). Za razkuževanje smo uporabili dve različni sterilizacijski sredstvi, dikloroizocianurno kislino (DICA) in natrijev hipoklorit (NaClO), v različnih koncentracijah in z različnim časom tretiranja. V raziskavo je bilo vključenih 640 brstov, na katerih smo skupno opravili 7 različnih načinov sterilizacije. Vse brste smo predhodno tretirali v 70-% etanolu za 40 sekund. Razkužene brste smo prenesli na osnovno gojišče McCown Woody Plant in spremljali rast. Ugotovili smo, da tako način sterilizacije kot tudi tip brstov vplivata na pridobljeno število vitalnih poganjkov. Skupno smo uspešno sterilizirali 22 brstov. Za uspešnejše so se izkazali apikalni brsti. Pri primerjavi sterilizacijskih sredstev se je tretiranje z DICA izkazalo za uspešnejše, pridobili smo 18 vitalnih brstov. Najuspešnejša je bila sterilizacija brstov z DICA in časom tretiranja 5 minut, kjer smo pridobili 7 vitalnih brstov.

Effect of Different Sterilisation Techniques and Common Holly (*Ilex aquifolium* L.) Bud Type on the Success of Establishing Tissue Culture

Keywords: **sterilisation, tissue culture, holly, *in vitro*, buds**

UDC: **631.533.3:582.314.1:57.086.83(043.2)=163.6**

Abstract

In 2023, an experiment was conducted at the Faculty of Agriculture and Life Sciences in Maribor, to investigate the effect of different sterilisation techniques and the influence of bud type (apical and axillary) on the establishment of tissue culture of common holly (*Ilex aquifolium* L.). Two different sterilising agents, dichloroisocyanuric acid (DICA) and sodium hypochlorite (NaClO), were used in different concentrations and treatment times for disinfection. The study included 640 buds and seven sterilisation treatments. All buds were first treated in 70 % ethanol for 40 seconds. After disinfection, the buds were placed on McCown Woody Plant Medium and their growth was observed. The results showed that both the method of sterilisation and the type of buds influenced the number of viable shoots obtained. Of the 640 buds, only 22 were successfully sterilised, with the apical buds proved to be more successful. When comparing the sterilisation methods, the DICA treatment proved to be more successful, as 18 viable buds were obtained. The most effective sterilization method was a 5-minute treatment of the buds with DICA, which produced seven viable buds.



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede

(ime članice UM)

IZJAVA O AVTORSTVU ZAKLJUČNEGA DELA

Ime in priimek študenta/-ke: Urška Modrič

Študijski program: AGRONOMIJA - OKRASNE RASTLINE, ZELENJAVA IN POLJŠČINE

Naslov zaključnega dela: Vpliv različnih načinov sterilizacije in tipa brstov na uspešno

vzpostavitev tkivne kulture pri navadni bodiki (Ilex aquifolium L.)

Mentor/-ica: Metka Šiško

Somentor/-ica: Anja Ivanuš

Podpisani/-a študent/-ka Urška Modrič

- izjavljam, da je zaključno delo rezultat mojega samostojnega dela, ki sem ga izdelal/-a ob pomoči mentorja/-ice oz. somentorja/-ice;
- izjavljam, da sem pridobil/-a vsa potrebna soglasja za uporabo podatkov in avtorskih del v zaključnem delu in jih v zaključnem delu jasno in ustrezno označil/-a;
- na Univerzo v Mariboru neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki, pravico reproduciranja ter pravico ponuditi zaključno delo javnosti na svetovnem spletu preko DKUM; sem seznanjen/-a, da bodo dela, deponirana/objavljena v DKUM, dostopna široki javnosti pod pogoji licence Creative Commons BY-NC-ND, kar vključuje tudi avtomatizirano indeksiranje preko spleta in obdelavo besedil za potrebe tekstovnega in podatkovnega rudarjenja in ekstrakcije znanja iz vsebin; uporabnikom se dovoli reproduciranje brez predelave avtorskega dela, distribuiranje, dajanje v najem in priobčitev javnosti samega izvirnega avtorskega dela, in sicer pod pogojem, da navedejo avtorja in da ne gre za komercialno uporabo;
- dovoljujem objavo svojih osebnih podatkov, ki so navedeni v zaključnem delu in tej izjavi, skupaj z objavo zaključnega dela.

Uveljavljam permisivnejšo obliko licence Creative Commons: _____

(navedite obliko)

Kraj in datum:

Maribor, 13.12.2023

Pdpis študenta/-ke:

Urška Modrič

Kazalo vsebine

1	UVOD	10
1.1	Namen diplomskega dela	10
1.2	Cilji diplomskega dela	11
1.3	Hipoteze raziskave	11
2	PREGLED OBJAV	12
2.1	Izvor in botanična klasifikacija navadne bodike (<i>Ilex aquifolium</i> L.)	12
2.2	Splošni opis in gojenje	13
2.3	Razmnoževanje <i>in vitro</i>	15
2.3.1	Mikropropagacija	16
2.3.2	Sterilizacija rastlinskega materiala	19
2.3.3	<i>In vitro</i> razmnoževanje pri navadni bodiki	20
3	MATERIALI IN METODE DELA	22
3.1	Priprava rastlinskega materiala	22
3.2	Priprava indukcijskega gojišča	23
3.3	Sterilizacija brstov	24
3.3.1	Opis sredstev za razkuževanje	28
3.4	Inokulacija brstov	28
3.5	Vrednotenje in statistična obdelava podatkov	30
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	31
4.1	Vpliv tipa brstov na uspešnost sterilizacije	33
4.2	Vpliv sterilizacijskega sredstva	34
4.3	Vpliv časovnega intervala sterilizacije pri DICA in NaClO	34
4.3.1	Sterilizacija z DICA	34
4.3.2	Sterilizacija z NaClO	35
4.3.3	Časovno beleženje propadanja brstov in pojava okužb pri različnih načinih sterilizacije in tipih brstov	36
5	SKLEPI	39
6	VIRI IN LITERATURA	41

Kazalo preglednic

Preglednica 3.1: Sestava indukcijskega gojišča.....	23
Preglednica 3.2: Sestava medija McCown Woody Plant z vitamini.....	24
Preglednica 3.3: Število brstov, vključenih v posamezno obravnavanje.....	26
Preglednica 4.1: Število brstov v poskusu glede na način sterilizacije	32
Preglednica 4.2: Primerjava uspešnosti sterilizacijskega sredstva	34

Kazalo grafikonov

Grafikon 4.1: Odstotek vitalnih, okuženih in propadlih brstov	31
Grafikon 4.2: Primerjava vpliva tipa brstov na uspešnost sterilizacije (AP = apikalni	33
Grafikon 4.3: Delež vitalnih, okuženih in propadlih brstov pri različnem času tretiranja s sterilizacijskim sredstvom DICA	35
Grafikon 4.4: Delež vitalnih, okuženih in propadlih izsečkov pri različnem času tretiranja s sterilizacijskim sredstvom NaClO	36
Grafikon 4.5: Primerjava uspešnosti sterilizacij pri časovnem beleženju pojava sprememb glede na tip brsta.....	38

Kazalo slik

Slika 3.1: Priprava in razrez rastlinskega materiala navadne bodike (<i>I. aquifolium</i> L.) (Modrič, 2023)	22
Slika 3.2: Sterilizacija brstov navadne bodike na teflonskem magnetnem mešalu (Modrič, 2023)	27
Slika 3.3: Inokulirani brsti navadne bodike na indukcijskem gojišču v rastni komori (Modrič, 2023)	29
Slika 4.1: Primeri steriliziranih brstov: vitalni brsti (A), propadli brsti (B), pojav glivične okužbe (C) in pojav bakterijskih okužb (D) (Modrič, 2023)	32

Uporabljeni simboli, kratice, oznake in okrajšave

AX – aksialni brsti

AP – apikalni brsti

BA – 6-benzilaminopurin

DICA – dikloroizocianurna kislina

DKUM – Digitalna knjižnica Univerze v Mariboru

HCl – klorovodikova kislina

NaClO – natrijev hipoklorit

UDK – univerzalna decimalna klasifikacija

1 UVOD

Zanimanje za okrasne lesnate rastline se v zadnjih letih povečuje, postale so pomemben del hortikulture industrije. Okrasni grmi so cenjeni zaradi nešteti krajskih uporab in morajo biti del naše sodobne krajine (Naik, 2018; Swaroop, 2021).

Zaradi naraščajočega povpraševanja po okrasnih grmovnicah potrebujejo drevesnice in vrtnarji nove metode razmnoževanja, da bi temu zadostili. Te vrste rastlin lahko razmnožujemo generativno in tudi vegetativno (Mateescu, 2002). Vse lesnate rastline so sposobne proizvajati cvetove in semena, vendar potrebujejo ugodne okoljske razmere in več let, da se razvijejo (Swaroop, 2021). Večinoma se jih zato razmnožuje vegetativno s potaknjenci, ker je tak način hitrejši, pa tudi zato, ker rastline ohranijo lastnosti matičnih rastlin (Kentelky in sod., 2021). Medtem pa vzgoja iz semen lahko traja več let zaradi dolgega časovnega obdobja kalitve (Zimmerman in Hitchcock, 1929).

Drug način, ki je po definiciji zelo podoben razmnoževanju s potaknjenci, so tkivne kulture. Gre za način vegetativnega razmnoževanja rastlin v nadzorovanem okolju/laboratoriju. Pri tem načinu razmnoževanja prav tako dobimo nove rastline iz ene same matične rastline. Ta način razmnoževanja oz. gojenja rastlin vključuje uporabo majhnih koščkov rastlinskega tkiva (izsečkov), ki jih gojimo v hranilnem mediju v sterilnih pogojih (The American Phytopathological Society [APS], 2023).

1.1 Namen diplomskega dela

Namen diplomskega dela je proučiti vpliv različnih načinov sterilizacijskih sredstev in njihovih koncentracij pri različnih tipih brstov (apikalni in aksilarni) ter določiti časovni interval sterilizacije, s katerim bomo dosegli čim večje število vitalnih rastlin.

1.2 Cilji diplomskega dela

Cilj diplomskega dela je določiti primeren postopek sterilizacije tkivne kulture pri navadni bodiki, ugotoviti najuspešnejši postopek sterilizacije pri apikalnih in aksilarnih brstih ter pridobiti čim večje število razkuženega materiala za nadaljnji postopek mikropropagacije.

1.3 Hipoteze raziskave

V diplomskem delu smo preverjali naslednje delovne hipoteze:

- 1: Izbira sterilizacijskega sredstva bo vplivala na uspešnost sterilizacije.
- 2: Časovni interval sterilizacije bo vplival na uspešnost sterilizacije.
- 3: Uporabljen tip brstov (apikalni, aksilarni) bo vplival na uspešnost sterilizacije.
- 4: Z uporabljenimi načini sterilizacije bomo uspešno vzpostavili sterilno kulturo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 Izvor in botanična klasifikacija navadne bodike (*Ilex aquifolium* L.)

Kraljestvo: Plantae – rastline

Podkraljestvo: Tracheobionta – višje rastline

Deblo: Spermatophyta – semenke

Poddeblo: Magnoliophyta – kritosemenke

Razred: Magnoliopsida – dvokaličnice

Podrazred: Rosidae

Red: Celastrales – trdoleskovci

Družina: Aquifoliaceae – bodikovke

Rod: *Ilex* – bodike

Vrsta: *Ilex aquifolium* L. – navadna bodika

Znotraj družine Aquifoliaceae (bodikovke) uvrščamo dva rodova, in sicer rod *Ilex* L. ter rod *Nemopanthus* Raf. Rod *Nemopanthus* je monospecifičen, predstavlja ga samo ena vrsta (*Nemopanthus mucronatus* Trel., planinska bodika), in je tesno povezan z rodom *Ilex* spp. (Powell in sod, 2000). Vrsta planinska bodika je razširjena na majhnem območju v Apalaških gorah, Severni Ameriki in Kanadi. Je tipična zbirna vrsta, ki ni pomembna za okras, in jo zelo redko opazimo v botaničnih vrtovih (Tumiłowicz in Banaszczak, 2007).

Po drugi strani rod *Ilex* (bodike) obsega približno 700 vrst listavcev, zimzelenih dreves in grmov ter je edini še živeči rod iz družine bodikovk. Je drugi največji rod dvodomnih rastlin na svetu, takoj za rodom *Diospyros* L., ki obsega 730 vrst. Razširjen je na območju Jugovzhodne Azije, Centralne in Severne Amerike, manjše število vrst pa lahko najdemo tudi v Afriki, Avstraliji, na Havajih, Madeiri in Kanarskih otokih (Scientific, b. d.; Manen in sod., 2002). V večjem delu Evrope v naravi obstaja le dve od teh vrst, in sicer *Ilex aquifolium* L. ter *Ilex opaca* Aiton (Batič, 1996; Yao in sod., 2022).

Navadna evropska bodika izvorno prihaja iz atlantskega in subatlantskega območja. V Evropi se je prvotno razraščala čez Zahodno Evropo, od Norveške do Španije, prek Apeninskega in Balkanskega polotoka vse do Kavkaza (Batič, 1996; Guerrero Hue in sod, 2016). Avtohtona nahajališča v Sloveniji so hladna flišna pobočja zahodne Vipavske in Osilniške doline ob Kolpi (INaturalist, b. d.).

Zaradi pomanjkanja in nedostopnosti paše se je navadna bodika od 13. do začetka 18. stoletja v angleškem južnem območju Pennine gojila za zimsko krmo za govedo in ovce. Gozdna paša je bila nato še dolgo časa ključnega pomena za živinorejo v Britaniji, saj so kmetje v obupu pomanjkanja hrane za živali eksperimentirali z vsemi drevesi, ki so bila takrat na voljo (Spray, 1981).

2.2 Splošni opis in gojenje

Navadna bodika ali božje drevce (*Ilex aquifolium* L.) je listnata zimzelena rastlina, ki raste kot grm ali kot drevo. Njena povprečna višina je okoli 10 m, lahko pa zraste tudi čez 20 m visoko. Veje z gladko sivo skorjo oblikujejo krošnjo značilne piramidne oblike. Listi so izrazito zeleno usnjati, jajčaste oblike, z nazobčano belo obrobo, ki prehaja v bodico. Dolgi so 5–12 cm in široki 2–6 cm (Beckett, 1990; Guerrero Hue in sod., 2016).

Navadna bodika je dvodomna rastlina ($2n = 40$) z ženskimi in moškimi cvetovi na različnih rastlinah. Zacveti v aprilu in maju. Cvetovi so rumeni, združeni v goste grozde na vrhu poganjkov. Ženski cvetovi obrodijo okrasne rdeče plodove, ki ostanejo na rastlini celo zimo (Batič, 1996; Rode, 2007; Vlad in sod., 2015).

Plod je majhna jagoda, navadno rdeča, z enim do desetimi semeni. Pojavi se samo na ženskih rastlinah in dozori v jeseni oz. zgodaj pozimi (v mesecu oktobru oz. novembru). V tem času so zaradi vsebnosti ilicina jagode zelo grenke, neokusne in trde. Ko pomrznejo, se omehčajo in postanejo okusnejše. Za številne vrste ptic in manjše sesalce

predstavljajo jagode pozimi izjemno pomembno hrano. Za ljudi veljajo za strupene, saj lahko povzročajo težke prebavne motnje in bruhanje (Grlič in sod., 1980; Scientific, b. d.). Čeprav bodika velja za strupeno, se v ljudskem zdravilstvu uporablja kot zdravilno zelišče. Pomaga pri odvajanju vode in blata, zniževanju povišane telesne temperature, lažšanju kašlja itd. (Rode, 2007).

Semena navadne bodike slabo kalijo zaradi trde in debele ovojnice. Pot skozi prebavni trakt ptic, ki se prehranjujejo s semeni in tako poskrbijo tudi za raznašanje semen, močno skrajša čas kaljenja. Zraven splošnega razmnoževanja s semeni se navadna bodika razmnožuje tudi nespolno, z ukoreninjanjem vej in koreninskimi poganjki (Batič, 1996; Rode, 2007).

Les drevesa je belkast, masiven in trden. Zaradi teh lastnosti je zelo iskan. Uporabljajo ga za manjša lesna dela, kot so struženje, gravure in ročaji. Uporablja se tudi kot nadomestek ebenovine in je odličen za kurjavo (Batič, 1996; Peterken in Lloyd, 1967; Scientific, b. d.).

Navadna bodika je zelo prilagodljiva rastlina, dobro uspeva na zračnih, dobro odcednih, rahlo kislih tleh, slabo pa prenaša apnena tla. Je polsenčna rastlina, ki ima rada vlažne lege, dobro pa prenaša tudi sušo, smog in mraz (Vlad in sod., 2015). Mesečno povprečje zimskih temperatur ne sme pasti pod $-0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, čeprav prenese tudi padce temperatur do $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Batič, 1996; Guerrero Hue in sod., 2016).

Zaradi uničevanja naravnih rastišč in sprememb v podnebjju je v kar nekaj državah uvrščena na listo zaščitene rastlin. Tudi v Sloveniji je zakonsko zaščitena, saj je zaradi izkopavanja mladih dreves postala vedno redkejša. Po drugi strani pa je v Ameriki in Avstraliji zaradi svoje zelo močne sposobnosti prilagajanja okolju označena za invazivno vrsto.

Veliko vrst bodik je dekorativnih in se pogosto uporabljajo kot okrasne rastline na vrtovih in v parkih, bodisi posamezno ali kot rastlina za živo mejo, saj zaradi goste rasti zelo dobro prenašajo intenzivno obrezovanje (Batič, 1996). Za uporabo na vrtu je bilo razvitih več hibridov in številnih kultivarjev. Med bolj priljubljene spadajo *Ilex altaclerensis* (*I. aquifolium* × *I. perado*), ki se je začel gojiti pred več kot 200 leti in ima zdaj že številne kultivarje, *Ilex meserveae* (*I. aquifolium* × *I. rugosa*) in *Ilex koehneana* (*I. aquifolium* × *I. latifolia*). Ti se med seboj razlikujejo po barvi, velikosti, obliki in ukrivljenosti listov, številu in namestitvi listnih bodic, barvi lubja, barvi semenske lupine in še po čem drugem (Guerrero Hue in sod., 2016; Peterken in Lloyd, 1967; Rode, 2007; Yao in sod., 2022).

Vrsta predvsem v zimskem času dodatno skrbi za praznično vzdušje. Nekateri jo uporabljajo kot božično drevo, spet drugi za izdelavo zimzelenih venčkov in šopkov (Euforgen, b. d.; Rode, 2007; Scientific, b. d.). Pridobila je simbolično vlogo, povezano s krščanskimi in predkrščanskimi verovanji. Za kristjane trnasto listje simbolizira Kristusovo trnovo krono, jagode so kot kapljice njegove krvi, zimzeleno listje pa simbol življenja po smrti (Yao in sod., 2022).

2.3 Razmnoževanje *in vitro*

Konvencionalni postopki razmnoževanja predstavljajo dve težavi. Prva težava so semena zaradi nizke stopnje kalitve in dolgega časa kalitve, saj zarodki dozoriijo šele po dveh ali več letih, ter zaradi variabilnosti sadik (Sun in sod., 2010). Drugo težavo pa predstavlja vegetativno razmnoževanje s potaknjenci, kjer so omejujoči dejavniki za vegetativno razmnoževanje lesnatih rastlin predvsem starost rastline, fiziološko stanje matične rastline (npr. čas odvzema poganjkov), posebnost genotipa materine rastline in okoljski pogoji v času koreninjenja (Majada in sod, 2000; Tsaksira in sod., 2021). Iz tega razloga se pridelovalci radi poslužujejo razmnoževanja s tkivnimi kulturami ali tako imenovanega *in vitro* razmnoževanja.

Razmnoževanje rastlin *in vitro* se izvaja v zaprtih prostorih, kjer je mogoče natančno nadzorovati okoljske dejavnike, ki vplivajo na rast, pridelek in kakovost rastlin. Eden izmed pomembnejših okoljskih dejavnikov je svetloba, ki je še posebej zanimiva za takšne pristope, saj ta uravnava izražanje genov, rast rastline, hormone ter fiziologijo in presnovo rastline na različnih stopnjah razvoja. Ker je učinek svetlobe na rastlino specifičen, je pomembno, da jo reguliramo za vsako rastlinsko vrsto posebej (Carvalho in sod., 2021).

In vitro razmnoževanje poteka iz organa ali dela tkiva (izsečka / eksplantanta) na umetno vzpostavljenem, posebej pripravljenem gojišču, v sterilnih razmerah in z nadzorovanimi rastnimi pogoji. Zahteva veliko pozornosti, natančnosti in previdnosti, predvsem pa vzdrževanje čim bolj sterilnega okolja, kar pomeni, da je okolje brez bakterij, virusov in gliv. Že ena sama glivična spora ali bakterijska celica, ki pride v stik s hranilnim oz. rastnim medijem, se namreč hitro razmnoži in lahko okuži majhen tkivni izseček (APS, 2023).

2.3.1 Mikropropagacija

Mikropropagacija je osnovna tehnika tkivnih kultur. Hkrati je osnova vsem ostalim tehnikam razmnoževanja, saj je končni rezultat rastlina, ki jo na ta način ohranjamo in razmnožujemo (Bohanec, 1992). Temeljni element za mikropropagacijo – tkivno kulturo – dobimo s sterilizacijo rastlinskega tkiva. Lahko gre za seme, zarodek, glavni ali stranski poganjek, meristemski vršiček ali le izseček rastline (George, 2008).

V procesu mikropropagacije imamo več faz, ki si zaporedno sledijo. Za uspešno mikropropagacijo moramo izvesti vse faze, se pa lahko njihova uspešnost razlikuje med rastlinskimi vrstami, saj se rastline različno odzivajo.

Faza 0: stopnja izbire matične rastline

Glavni namen faze 0 je skrb za rastlino in posledično pridobiti vhodni material s čim manj prisotnimi okužbami. Pri odbiri rastlin za vzpostavitev tkivne kulture se držimo določenih priporočil. Zaradi manjše verjetnosti pojava okužb odbiramo raje rastline, ki rastejo v zaprtih prostorih kot pa na prostem. Če odberemo rastlino, ki raste na prostem, jo lahko predhodno primerno zaščitimo, na primer s prozorno plastično vrečko, in za izsečke uporabimo poganjke, ki so se oblikovali pod to zaščito. Pri odbiri rastlinskih tkiv odberemo čim bolj sterilne dele, ki zajemajo mlada tkiva, semena, brste znotraj glavic itd. Pri večletnih lesnatih rastlinah pa lahko pride do težav, saj so pogosto sistemsko okužena vsa tkiva (Bohanec, 1992; Microbiologynote uredniki, 2023; Pierik, 1997).

Faza 1: iniciacija ali vzpostavitev rastlinske kulture

V tej fazi je treba zagotoviti stabilen začetek za ustvarjanje kulture izbrane rastline. Prvi korak te faze je odbira ali izrez tkiva. Običajno odberemo apikalni del rastline, ki je manj dovzeten za pojav okužbe. Naslednji korak, ki je ključen za vzpostavitev tkivne kulture, je razkuževanje rastlinskega materiala. Zadnji korak v tej fazi pa je priprava ustreznega medija za inokulacijo tkiv (Bohanec, 1992; Microbiologynote uredniki, 2023; Pierik, 1997).

Faza 2: mikropropagacija poganjkov

Za to fazo je značilna rast rastlin, ki vodi do razvoja poganjkov. Za stimulacijo rasti poganjkov uporabimo pravo mešanico rastnih hormonov. Še posebej uporaba citokininov uravnava rast rastlin, pomaga pri rasti poganjkov in njegovem vegetativnem podaljševanju (Bohanec, 1992; Microbiologynote uredniki, 2023; Pierik, 1997).

Faza 3: raztezanje poganjkov in rast korenin

To je čas, ko poganjki še naprej rastejo znotraj kulture in ko se začnejo korenine spodbujati v rasti. Za spodbujanje razvoja korenin se uporabljajo avksini in delujejo kot regulator rasti pri rastlini. Nekatere rastlinske vrste same začnejo poganjati korenine in uporaba hormona ni potrebna, spet druge (nekatere okrasne rastline, sadno drevje in

lesnate rastline) pa koreninijo zelo težko in je uporaba hormona nujna. Ukoreninjanje lahko poteka v *in vitro* okolju, lahko pa se odločimo za ukoreninjanje *in vivo*. Majada in sodelavci (2000) navajajo, da lahko z *in vivo* načinom koreninjenja zvišamo uspeh mikropropagacije. Počasnejša rast poganjkov omogoča rast močnejših korenin, kar pa privede do bolj zdrave in odporne rastline (Bohanec, 1992; Microbiologynote uredniki, 2023; Pierik, 1997).

Faza 4: aklimatizacija sadik

V tej fazi rastline prenesemo iz tkivne kulture v zemljo in jo izpostavimo drugačnim pogojem. Počasi jo pripravimo na samostojen, avtotrofni način rasti. Uspeh te faze je odvisen od vseh prejšnjih pogojev in od izbire pogojev rasti. Pod te pogoje oz. dejavnike spadajo izbira substrata, ustrezna moč svetlobe, svetlobni cikel, primerne temperature, prezračevnost in zračna vlaga (Bohanec, 1992; Microbiologynote uredniki, 2023; Pierik, 1997).

Pri razmnoževanju rastlin *in vitro* lahko pride do dveh nezaželenih pojavov, in sicer do vitrifikacije in odmiranja poganjkov.

Vitrifikacijo prepoznamo po spreminjanju poganjkov, ki postanejo napihnjeni in prosojni – »steklasti«. To se lahko zgodi zaradi prevelike dostopnosti vode iz gojišča, prevelike količine rastnih hormonov, spremenjene količine etilena kot odziva na stres in dodanega parafilma okrog pokrovčkov posodic, ki preprečuje menjavo zraka na gojišču. S povečanjem gostote gojišča in manjšim doziranjem hormonov lahko pri nekaterih rastlinah vitrificirane primerke rešimo (Bohanec, 1992; Majada in sod., 2000).

Drug pojav je odmiranje vršičkov. Vršiček poganjka porjavi in odmre, s tem spodbudi rast stranskih poganjkov, vendar se po navadi odmiranje vršičkov ponovi tudi na novo nastalih poganjkih. Vzrok za pojav odmiranja vršičkov je lahko visoka zračna vlaga, ki vpliva na zmanjšano transpiracijo in kasnejše pomanjkanje kalcija. Do tega pojava

pogosteje prihaja pri rastlinicah, gojenih v posodicah, ki so zaprte s parafilmom, saj tam izmenjava plinov ni mogoča (Bohanec, 1992).

Da govorimo o uspešni iniciaciji kulture, ni potrebna 100-% uspešnost pri vzpostavitvi kulture. Dovolj je, da dobimo vsaj en živ, neokužen izseček, ki nam omogoča nadaljnje razmnoževanje (Bohanec, 1992; Pierik, 1997; Šiško, 2022).

2.3.2 Sterilizacija rastlinskega materiala

Način sterilizacije je odvisen od vrste rastlinskega materiala, pri odbiri sterilizacije pa sta pomembna tako koncentracija kot čas tretiranja. Če bo koncentracija previsoka in predolga, lahko pride do poškodb rastlinskega tkiva, v nasprotnem primeru, če je koncentracija prekratka in preblaga, pa z njo ne bomo uspeli uničiti mikroorganizmov (George, 2008; Szewczyk-Taranek in sod., 2020; Sansberro in sod., 2001).

Pri odbiri rastlin za vzpostavitev tkivne kulture je zato pomembno, da so brez znakov bolezni, torej da so rastline žive in zdrave, s čimer prispevamo k uspešnejši sterilizaciji (Kentelky in sod., 2021). Močan negativen vpliv na tkivne kulture ima prisotnost endofitov (notranje okužbe pri rastlinah: bakterije, mikroplazme, nematode, virusi, glive itd.), ki so prisotni v samem tkivu, jih pa s površinsko sterilizacijo ne moremo odstraniti. V *in vitro* razmerah lahko njihova prisotnost negativno vpliva na nadaljnje razmnoževanje in rast rastlin. V primeru prisotnosti bakterij lahko ukrepamo z dodanim antibiotikom v gojišče ali s kultiviranjem meristemov, v nasprotnem primeru lahko pride do odmiranja rastlin (Bohanec, 1992; Szewczyk-Taranek in sod., 2020).

Zdravljenje tkiva z antibiotiki je drag proces, ki upočasni rast poganjkov in sam proces mikropropagacije. Prisotnost endofitov ni nujno, da je jasno vidna, lahko se kaže samo kot šibkejša rast rastlin. Do pojava okužbe lahko pride tudi veliko kasneje, ko je tkivna kultura že vzpostavljena, in sicer kot posledica neravnovesja rastnih razmer, in ni rezultat napak pri mikropropagaciji (Szewczyk-Taranek in sod., 2020).

2.3.3 *In vitro* razmnoževanje pri navadni bodiki

Podatkov o *in vitro* razmnoževanju navadne bodike je do danes zelo malo (Tsaksira in sod., 2021). Hu (1975, 1976) poroča o *in vitro* gojenih zarodkih različnih vrst *Ilex*, ki lahko ostanejo v nezreli fazi še dolgo po tem, ko plodovi dosežejo zrelost. Semena namreč potrebujejo še najmanj eno leto, ob ustreznih pogojih kalitve, da dokončajo svoj embrionalni razvoj in začnejo kaliti. V poskusu mu je uspelo zaobiti fazo mirovanja semen in vzpostaviti tkivno kulturo.

V poskus je bilo vključenih 11 vrst iz rodu *Ilex*. Semena je ločil od sadne pulpe, jih steriliziral z 0,7-% natrijevim hipokloritom (NaClO) za 5 minut in 3-krat spral z vodo. S pomočjo stereomikroskopa je pod aseptičnimi pogoji izrezal majhne zarodke v stadiju srca in jih inokuliral na gojišče. Za indukcijsko gojišče je uporabil Linsmaier and Skoog (1946) brez vitaminov, z dodatkom 4-% saharoze in 0,7-% Bacto-agarja. Pri vrstah *I. crenata*, *I. cornuta*, in *I. longipes* so zabeležili več kot 90-% uspešnost, pri vrstah *I. aquifolium*, *I. glabra*, *I. pedunculosa* in *I. verticillata* navajajo 80–90-% uspešnost, pri *I. serrata* 61-% uspešnost ter pri vrstah *I. cassine*, *I. opaca* in *I. pernyi* manj kot 30-% uspešnost vzpostavitve tkivne kulture (Hu, 1975).

Majada in sod. (2000) so v svojem poskusu testirali dva postopka vzpostavitve tkivne kulture pri *I. aquifolium*, in sicer na trdem in tekočem gojišču. Uporabljene kulture so bile vzgojene iz sadik, pridobljenih s kalitvijo zarodkov v aseptičnih pogojih. Semena so ločili od sadne pulpe in jih uporabili takoj ali pa so jih do uporabe hranili pri 5 °C. Semena so nato površinsko sterilizirali s 70-% etanolom za 5 minut, sledila sta sterilizacija s 40-% komercialno raztopino Cloroxa (katere vsebnost NaClO je bila 2,8 %) za 20 minut in nato 3-kratno spiranje s sterilno vodo. Semensko lupino so strli in nezrele zarodke izrezali s pomočjo stereomikroskopa. Nezrele zarodke so prenesli na gojišče, sestavljeno iz medija Woody Plant, 2-% saharoze in 0,7-% agarja. Po treh mesecih so pridobljene sadike prestavili na dve različni gojišči ter preverjali uspešnost razmnoževanja poganjkov in koreninjenja.

Sansberro in sod. (2001) so v svojem poskusu obravnavali mikropropagacijo bodik iz rastlinskih poganjkov, med njimi tudi navadno bodiko. Raziskava je potekala v spomladanski in poletni sezoni v letih 1994, 1995 in 1996.

Poganjke so 1 minuto sterilizirani v 70-% etanolu, nato 25 minut v 1,5-% raztopini NaClO, v katero so dodali dve kapljici detergenta TRITON, in jih na koncu 5-krat sprali s sterilno destilirano vodo. Poganjke so nato inokulirali na indukcijsko gojišče, sestavljeno iz ¼ medija Murashige and Skoog, 0,5 µM hormona BA (6-Benzilaminopurin) in agarja. Po 45 dnevih je bilo pri vrsti *I. aquifolium*, pri inokulaciji nodalnih segmentov z enim aksilarnim brstom, zabeleženih 70 % vitalnih poganjkov, brez signifikantne dodatne rasti, pri 8 % so zabeležili rast poganjkov (pridobili vsaj dodatnih 0,5 cm), pri 20 % izsečkov so zabeležili pojav glivične in/ali bakterijske okužbe, 2 % izsečkov pa je propadlo.

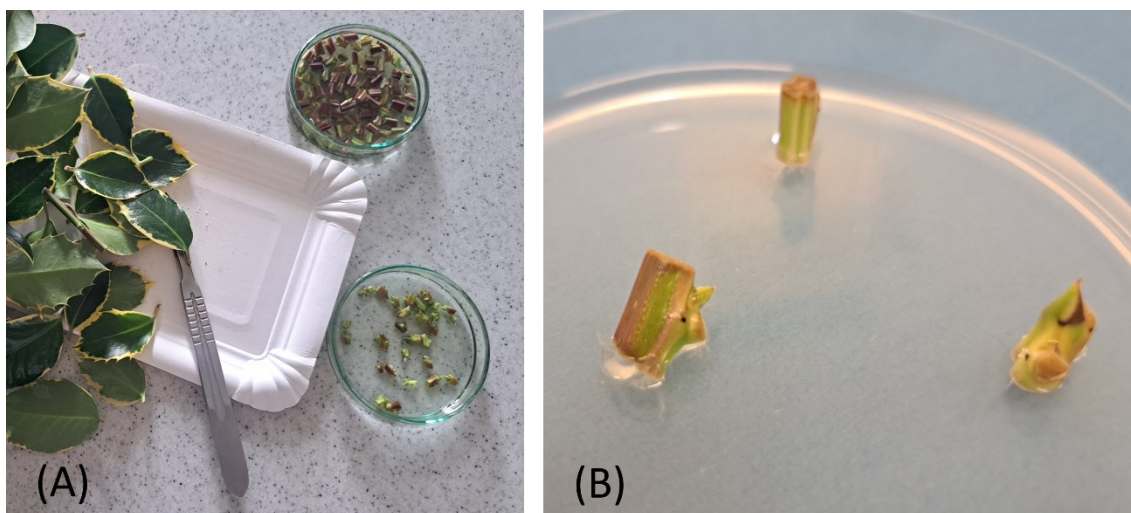
V primerjavi s poganjki, nastalimi iz brsta na apikalnem delu, kjer so zabeležili 65 % vitalnih poganjkov, je bila pri preostalih 35 % prisotna glivična in/ali bakterijska okužba. Zaključili so, da so bili pri vseh obravnavanih vrstah iz rodu *Ilex* nodalni segmenti z enim aksilarnim brstom nagnjeni k hitrejšemu ustvarjanju večjega števila poganjkov.

3 MATERIALI IN METODE DE LA

3.1 Priprava rastlinskega materiala

Poskus je bil izveden spomladi in poleti leta 2023. Enoletne poganjke smo porezali iz rastline, stare okoli 15 let, ki raste na domačem vrtu v Poljčanah. V vseh terminih so se uporabljali zeleni poganjki. Poganjki so bili porezani v jutranjih urah ter v kartonasti škatli pripeljani do laboratorija za tkivne kulture na Fakulteti za kmetijstvo in biosistemske vede, kjer je potekalo vse nadaljnje delo.

V laboratoriju smo na papirnatih podlagah s pomočjo skalpela najprej odstranili liste, nato pa smo iz enoletnih poganjkov odrezali nodalne izsečke, brste z delom veje (internodija) (slika 3.1). Z večjih apikalnih vršičkov smo odstranili tudi odvečne luskoliste. Narezane brste smo sproti dajali v petrijevke, napolnjene z vodo, da se rastlinski material ne bi izsušil. Apikalne in aksialne brste smo na koncu prešteli in jih enakomerno razporedili med posamezne obravnave.



Slika 3.1: Priprava in razrez rastlinskega materiala navadne bodike (*Ilex aquifolium* L.)

(Modrič, 2023)

3.2 Priprava indukcijskega gojišča

Za inokulacijo kulture smo si pripravili gojišče za indukcijo (preglednica 3.2). Vse sestavine (preglednica 3.1) smo stehali, jih presipali v čašo z bidestilirano vodo in jih raztopili s pomočjo teflonskega magnetnega mešala. Dobljeno raztopino smo umerili na končni volumen 1000 mL. S pomočjo pH-metra smo umerili pH-vrednost na 5,65 (+/- 0,05). Če je bila pH-vrednost prenizka, smo si pomagali z dodajanjem baze (1 M NaOH), če je bila pH-vrednost previsoka, pa smo si pomagali z dodajanjem kisline (1 M HCl). Po umerjenem volumnu in pH-vrednosti smo raztopino prelili v steklenice za avtoklaviranje in dodali agar. Tako pripravljeno gojišče smo avtoklavirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in pod pritiskom 1,1 bar.

Po končani sterilizaciji smo gojišče razlili v sterilne petrijevke, velikosti 90 mm x 15 mm, in pustili, da se gojišče strdi. Gojišče je bilo nato pripravljeno za nadaljnje delo.

Preglednica 3.1: Sestava indukcijskega gojišča

Sestavina	Koncentracija (g/l)
McCown Woody Plant Medium Including Vitamins (Duchefa, Nizozemska)	2,46
Saharoza (Duchefa, Nizozemska)	30
Agar (Duchefa, Nizozemska)	7
pH-vrednost	5,65

Preglednica 3.2: Sestava gojišča McCown Woody P z vitamini

Sestavina	Količina (mg/l)
Mikroelementi	
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,25
FeNaEDTA	36,70
H ₃ BO ₃	6,20
MnSO ₄ x H ₂ O	22,30
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,60
Makroelementi	
CaCl ₂	72,50
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	471,26
KH ₂ PO ₄	170,00
Vitamini	
Glicin	2,00
myo-Inositol	100,00
Nikotinska kislina	0,50
Piridoksin	0,50
Tiamin	1,00

3.3 Sterilizacija brstov

Sterilizacija pripravljenih brstov je potekala v laminariju (brezprašni komori). Pred in po končanem delu smo delovno površino očistili in razkužili s 96-% etanolom. Pincete smo sterilizirali v namiznem sterilizatorju, s pomočjo steklenih kroglic, predhodno segrelih na 250 °C. Ves uporabljeni laboratorijski material (steklovina, cedila, voda) je bil predhodno steriliziran v avtoklavu pri 121 °C za 20 minut. Pred začetkom dela smo si roke večkrat sprali z razkužilom in s tem poskrbeli za zmanjšan pojav okužb in hkrati povečali uspešnost nadaljnjih postopkov dela.

Poskus smo izvedli v petih terminih, s sedmimi različnimi načini sterilizacije. Uporabili smo dve različni sterilizacijski sredstvi, dikloroizocianurno kislino (DICA) in NaClO. Preglednica 3 prikazuje število uporabljenih brstov glede na način sterilizacije. Za

pripravo raztopine DICA smo natehtali 4,15 g in jo zmešali v 250 ml sterilne vode. NaClO smo pripravili v dveh različnih koncentracijah, in sicer smo pripravili 1,5- in 2-% raztopino.

S prvim, preliminarnim poskusom smo začeli spomladi, 8. 5. 2023. V poskus smo vključili 28 brstov navadne bodike. Za sterilizacijo smo uporabili DICA. Brste smo tretirali 6 in 10 minut.

Po prvih pridobljenih rezultatih preliminarne poskusa smo s poskusom nadaljevali v juniju, 9. 6. 2023, in sterilizirali 185 brstov. Tokrat smo brste navadne bodike sterilizirali v petih obravnavah. S sterilizacijskim sredstvom DICA smo brste tretirali 3, 5 in 6 minut, z 1,5-% raztopino NaClO 5 minut in z 2-% raztopino NaClO 3 minute.

Naslednjo sterilizacijo smo opravili v juliju, 14. 7. 2023. V poskus smo vključili 190 brstov, ki smo jih sterilizirali v treh obravnavah. Z DICA smo brste tretirali 5 in 6 minut ter z 2-% raztopino NaClO 3 minute.

Tretja sterilizacija je bila opravljena 25. 7. 2023. V poskus smo vključili 129 brstov. Sterilizacija je potekala v dveh obravnavah, in sicer smo za sterilizacijsko sredstvo uporabili DICA, s katerim smo brste tretirali 5 in 6 minut.

Zadnja, četrta sterilizacija je bila izvedena 1. 8. 2023. Vključili smo 108 brstov, ki smo jih tretirali s sterilizacijskim sredstvom DICA za 6 minut.

Načini sterilizacije, ki smo jih uporabili pri brstih navadne bodike, so:

- I) 40 sekund 70-% etanol + 3 minute DICA;
- II) 40 sekund 70-% etanol + 5 minut DICA;
- III) 40 sekund 70-% etanol + 6 minut DICA;
- IV) 40 sekund 70-% etanol + 7 minut DICA;
- V) 40 sekund 70-% etanol + 10 minut DICA;

VI) 40 sekund 70-% etanol + 3 minute 2 % NaClO;

VII) 40 sekund 70-% etanol + 5 minut 1,5-% NaClO.

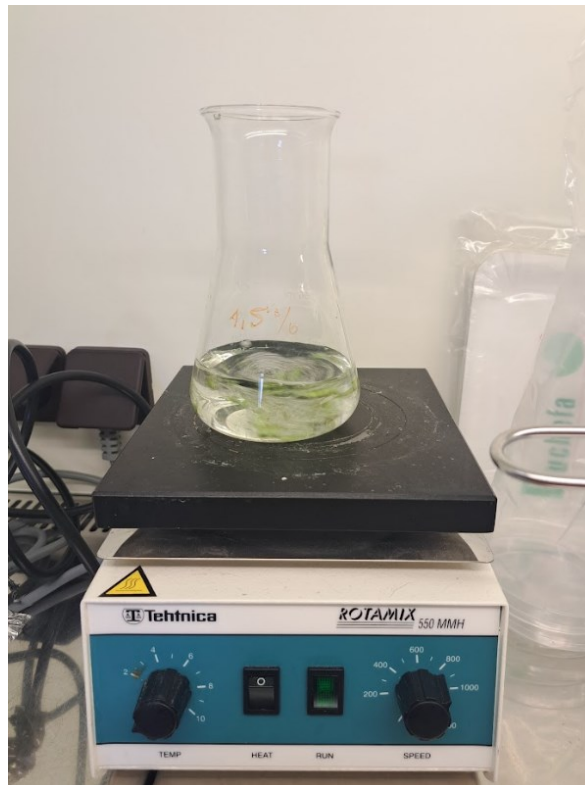
Sterilizacijo brstov smo izvedli tako, da smo brste najprej površinsko sterilizirali v 70-% etanolu, sledila je sterilizacija z DICA oz. NaClO, ki smo mu za boljšo omočljivost dodali 6 kapljic detergenta Tween 20. Med razkuževanjem smo pripravek neprestano mešali s pomočjo teflonskega magnetnega mešala (slika 3.2). Po končanem tretiranju smo brste 3-krat sprali s sterilno vodo in jih inokulirali na pripravljeno gojišče.

Preglednica 3.3: Število brstov, vključenih v posamezno obravnavanje

Način sterilizacije	Poskusna sterilizacija	Prva sterilizacija	Druga sterilizacija	Tretja sterilizacija	Četrta sterilizacija	Skupaj
DICA 10 min	12					12
DICA 5 min		42	58	58		158
1,5-% NaClO 5 min		41				41
2-% NaClO 3 min		41	56			97
DICA 3 min		41				41
DICA 6 min	16	20	76	71		183
DICA 7 min					108	108
Skupaj	28	185	190	129	108	640

Zaradi velikega števila okuženih brstov smo se med poskusom odločili, da okužene brste poskusimo še enkrat dodatno sterilizirati in na ta način pridobimo večje število vitalnih rastlin. Dodatno sterilizacijo smo opravili pri 66 brstih.

Sterilizacija brstov z dodatno sterilizacijo je potekala tako, da smo okuženi brst, ki je bil predhodno tretiran z DICA za 5 minut, ponovno sterilizirali s sterilizacijskim sredstvom DICA za 30 sekund, 4 okužene brste, ki so bili tretirani z 2-% NaClO za 3 minute, smo ponovno sterilizirali z 2-% NaClO za 30 sekund ter 61 okuženih brstov, ki so bili tretirani z DICA za 7 minut, smo ponovno sterilizirali z DICA za 1 minuto. Po končani sterilizaciji smo brste 3-krat sprali s sterilno vodo in jih ponovno inokulirali na gojišče.



Slika 3.2: Sterilizacija brstov navadne bodike na teflonskem magnetnem mešalu
(Modrič, 2023)

3.3.1 Opis sredstev za razkuževanje

Etanol (C₂H₅OH)

Etanol oz. etilalkohol je čista brezbarvna tekočina. Uporablja se v koncentracijah 70–96 % za sterilizacijo pri *in vitro* razmnoževanju. 70-% etanol se uporablja za sterilizacijo rastlinskega materiala. Ker v višjih koncentracijah lahko delujejo toksično na rastlino, se 96-% etanol uporablja za čiščenje delovnih površin. Ker sterilizacija rastlinskega materiala z etanolom ne zadostuje, služi etanol kot predtretiranje, s katerim se znebimo zračnih mehurčkov (Bhatia, 2021). Za glavno sterilizacijo pa se poslužujemo drugih sredstev za razkuževanje.

Dikloroizocianurna kislina – DICA (C₃Cl₂N₃NaO₃)

DICA je v obliki belega kristalnega prahu ali granul in ima močan vonj po kloru. Uporablja se kot razkužilo v bazenih, pri dezinfekciji pitne vode, za preventivno in okoljsko dezinfekcijo, uporabna pa je tudi v kmetijstvu. Učinkovito in hitro uniči različne bakterije, glive, spore, plesen ali viruse, saj ima močan baktericidni učinek. Je visoko stabilna in ne škodi zdravju ljudi (*Natrijev dikloroizocianurat*, 2021; "*Univerzalni Fungicid ...*", 2022).

Natrijev hipoklorit (NaClO)

NaClO je tekoče dezinfekcijsko sredstvo, ki vsebuje približno 13 % aktivnega klora. Uporablja se za dezinfekcijo pitne in bazenske vode, za beljenje, kot analizni reagent itd. V primeru, da je rastlina občutljiva na klor, se pri sterilizaciji raje poslužimo kalcijevega hipoklorita (Pierik, 1997).

3.4 Inokulacija brstov

Inokulacija brstov je potekala pod aseptičnimi pogoji v laminariju. Pincete smo med delom redno razkuževali v namiznem sterilizatorju pri 250 °C, roke večkrat razkužili s pomočjo etanola in skrbeli, da je bila delovna površina čista. Sterilizirane brste smo po

koncu sterilizacije inokulirali na strjeno in ohlajeno indukcijsko gojišče. V vsako petrijevko smo s pomočjo sterilne pincete vstavili 5 brstov. Petrijevke smo zaprli s pokrovi in jih ovili s parafinskim trakom. S tem smo preprečili oz. zmanjšali možnost pojava sekundarnih okužb in zmanjšali izhlapevanje gojišča. Vsako petrijevko smo označili z imenom rastline, datumom inokulacije, načinom sterilizacije in tipom brsta (slika 3.3).



Slika 3.3: Inokulirani brsti navadne bodike na indukcijskem gojišču v rastni komori
(Modrič, 2023)

Brste smo pregledovali vsake tri dni, sproti spremljali njihovo stanje (okuženi, propadli) in si beležili spremembe. V primeru pojava okužbe pri enem ali večjem številu brstov znotraj ene petrijevke smo neokužene/vitalne brste prestavili na novo/sveže gojišče, okužene pa odstranili in zavrgli.

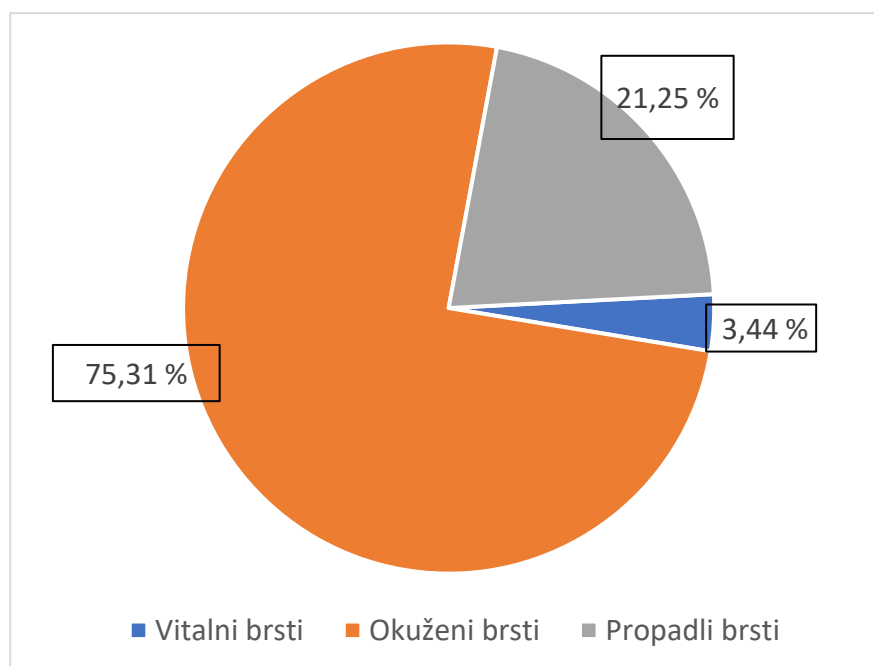
Brste navadne bodike smo gojili v rastni komori "Thermostatic ST 1200" pri temperaturi 22 °C in fotoperiodi 16 ur svetlobe in 8 ur teme.

3.5 Vrednotenje in statistična obdelava podatkov

Pridobljene podatke smo zbrali, jih uredili v preglednici v programu Microsoft Office Word in s pomočjo programa Microsoft Excel izrisali grafikone. Glede na posamezno obravnavanje oz. način sterilizacije smo izračunali odstotek preživelih oz. okuženih brstov ter med sabo primerjali uspešnost posameznega načina sterilizacije.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

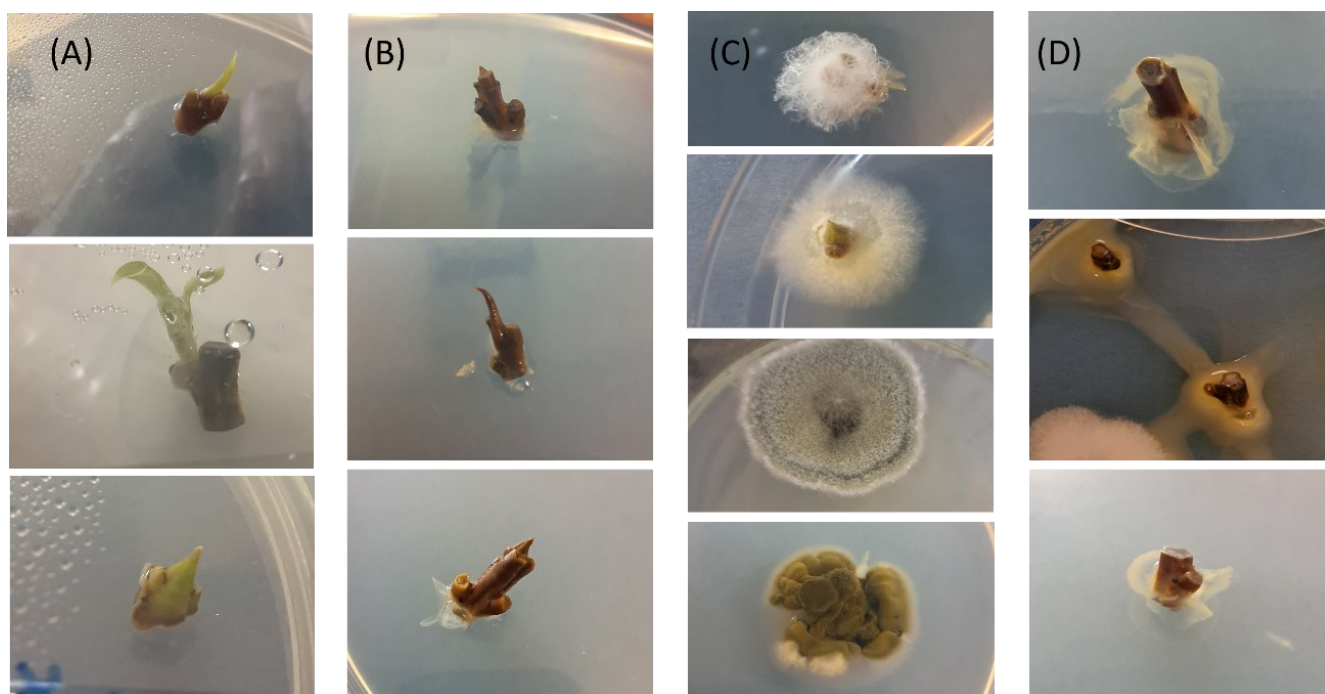
V poskusu smo proučevali tri dejavnike: način sterilizacije, uporabo sterilizacijskega sredstva in tip brsta. Pri sterilizaciji smo imeli sedem različnih načinov, za sterilizacijo smo uporabili dve različni sterilizacijski raztopini in pri tipu brsta smo primerjali uspešnost sterilizacije med apikalnimi in aksilarnimi brsti. Skupaj smo v poskus vključili 640 brstov navadne bodike. Spremljali smo število okuženih (O), število propadlih (P) in število preživelih vitalnih brstov (Ž) (slika 4.1). Iz grafikona 4.1 lahko razberemo, da smo skupno pridobili 22 vitalnih brstov, kar predstavlja 3,44-% uspešnost sterilizacije, okuženih je bilo skupno 482 brstov oz. 75,31 %, propadlo je 21,25 % oz. 136 brstov (preglednica 4.1). Kljub samo 22 sterilnim in vitalnim brstom lahko rečemo, da je bila prva faza mikropropagacije – sterilizacija uspešna, saj rezultati sovpadajo z navedbo Bohanca (1992), da je za uspešno sterilizacijo dovolj že en sam živ, neokužen izseček, s katerim lahko zagotovimo rast kulture in razvoj poganjkov.



Grafikon 4.1: Odstotek vitalnih, okuženih in propadlih brstov

Preglednica 4.1: Število brstov v poskusu glede na način sterilizacije

Način sterilizacije	Število uporabljenih brstov	Število vitalnih brstov	Pojav glivične okužbe	Pojav bakterijske okužbe	Število propadlih brstov
DICA 10 min	12	0	0	0	12
DICA 5 min	158	7	102	4	45
1,5-% NaClO 5 min	41	1	30	0	10
2-% NaClO 3 min	97	3	69	5	20
DICA 3 min	41	3	22	0	16
DICA 6 min	183	6	136	10	31
DICA 7 min	108	2	102	2	2

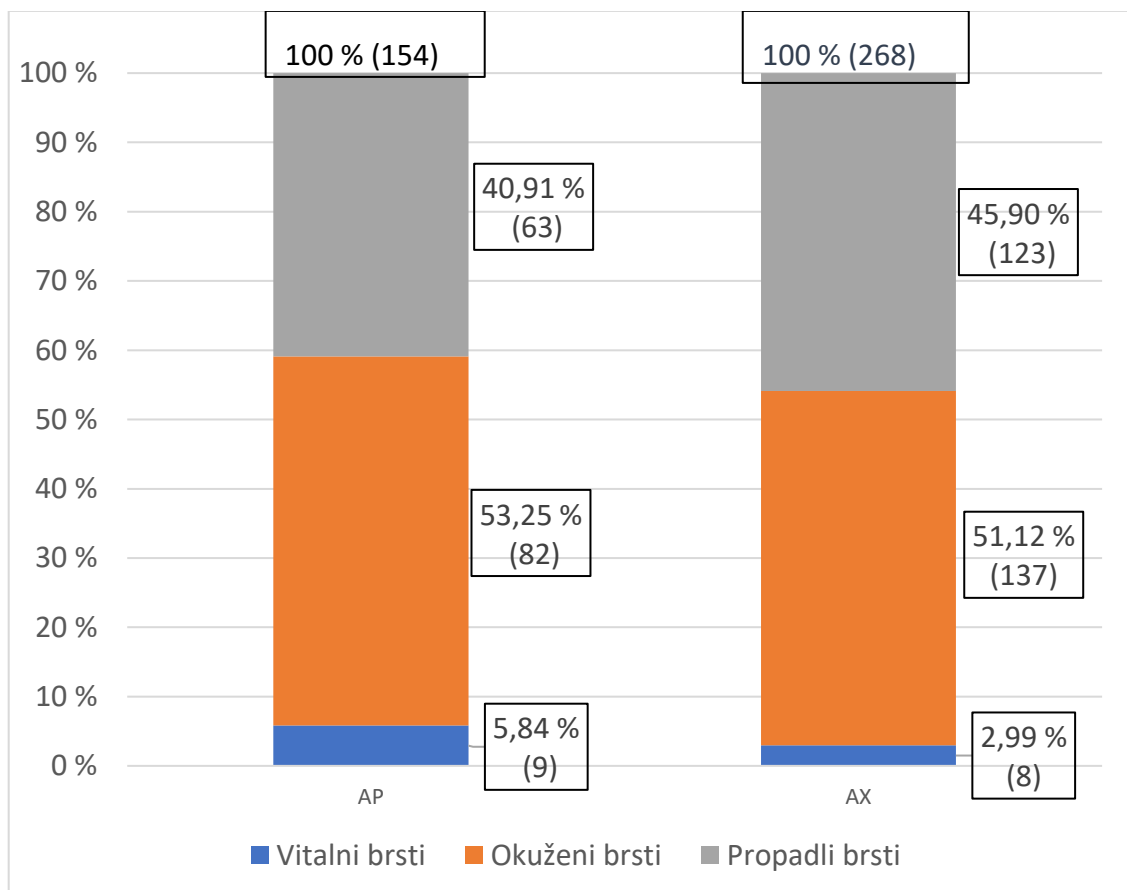


Slika 4.1: Primeri steriliziranih brstov: vitalni brsti (A), propadli brsti (B), pojav glivične okužbe (C) in pojav bakterijskih okužb (D) (Modrič, 2023)

4.1 Vpliv tipa brstov na uspešnost sterilizacije

Spremljali smo odziv tipa brstov (apikalni, aksialni), ne glede na izbran način sterilizacije. Pri sterilizaciji apikalnih brstov smo od skupno 154 brstov zabeležili 9 preživelih oz. 5,84 %, 82 oz. 53,25 % je bilo okuženih, propadlo je 40,91 % oz. 63 brstov. Pri aksilarnih poganjkih se je od skupno 268 brstov okužba pojavila pri 137 oz. 51,12 %, 8 oz. 2,99 % jih je preživelo, 45,90 % oz. 123 brstov je s sterilizacijo propadlo (grafikon 4.2).

Pridobljeni rezultati so primerljivi z rezultati Sansberra in sod. (2001), ki navajajo boljšo uspešnost vzpostavitve kulture pri apikalnih kot aksilarnih poganjkih.



Grafikon 4.2: Primerjava vpliva tipa brstov na uspešnost sterilizacije (AP = apikalni brsti, AX = aksilarni brsti)

4.2 Vpliv sterilizacijskega sredstva

Predpostavljali smo, da bo izbira sterilizacijskega sredstva vplivala na uspešno vzpostavitev tkivne kulture. Med sabo smo zato primerjali vpliv uporabe sterilizacijskih sredstev DICA in NaClO. Iz tabele 4.2 je razvidno, da smo z uporabo DICA pridobili večje število vitalnih brstov, to je 3,59 % oz. 18 primerkov, medtem ko smo pri NaClO pridobili 4 oz. 2,90 % vitalnih brstov. Pri primerjavi propadlih in okuženih brstov med uporabljenima sterilizacijskima sredstvoma ni bilo zaznanih razlik. Glede na pridobljene rezultate lahko rečemo, da smo bili z uporabo obeh sredstev uspešni.

Preglednica 4.2: Primerjava uspešnosti sterilizacijskega sredstva

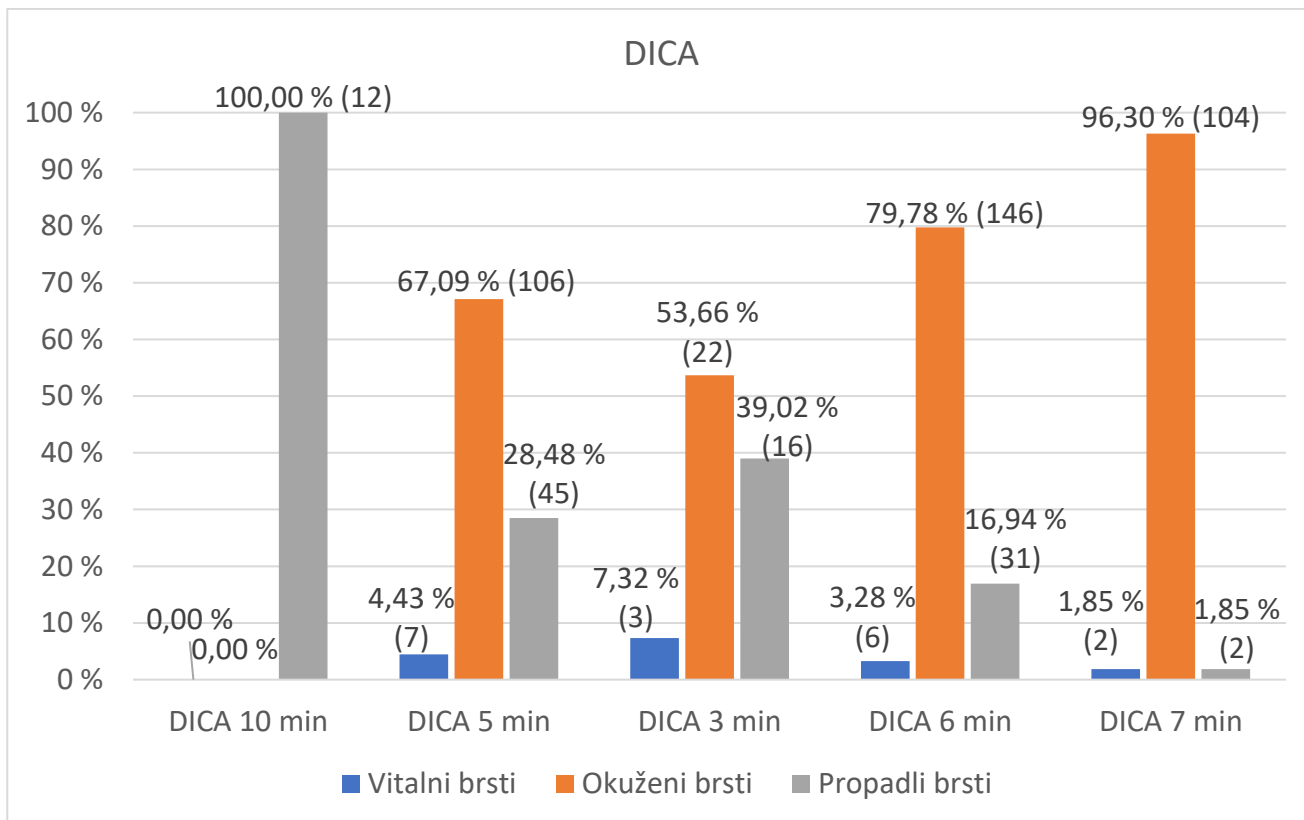
Sterilizacijsko sredstvo	Skupno število brstov	Število vitalnih brstov	Število okuženih brstov	Število propadlih brstov
DICA	502	18 (3,59 %)	378 (75,30 %)	106 (21,12 %)
NaClO	138	4 (2,90 %)	104 (75,36 %)	30 (21,74 %)

4.3 Vpliv časovnega intervala sterilizacije pri DICA in NaClO

4.3.1 Sterilizacija z DICA

Pri sterilizaciji z DICA smo opravili pet različnih tretiranj, in sicer smo brste tretirali za 3, 5, 6, 7 in 10 minut. Po 3-minutnem tretiranju smo zabeležili 3 oz. 7,32 % vitalnih brstov, propadlo je 16 oz. 39,02 % brstov, okuženih je bilo 22 oz. 53,66 % brstov. Pri 5-minutnem tretiranju je preživelo 7 oz. 4,43 % brstov, 106 oz. 67,09 % brstov je bilo okuženih, 45 oz. 28,48 % jih je propadlo. Pri 6-minutnem tretiranju smo dobili 6 oz. 3,28 % vitalnih brstov, 146 oz. 79,78 % brstov je bilo okuženih, 31 oz. 16,94 % jih je propadlo. Pri 7-minutnem tretiranju sta preživela 2 oz. 1,85 % brstov, pri 104 brstih oz. 96,30 % se je pojavila okužba, 2 oz. 1,85 % brstov je propadlo. Pri preliminarnem poskusu z 10-minutnim

tretiranjem z DICA so propadli vsi brsti (grafikon 4.3). Iz pridobljenih rezultatov je razvidno, da se je za najuspešnejše izkazalo 5-minutno tretiranje brstov z DICA, saj smo pri tej obravnavi zabeležili največji odstotek vitalnih brstov.

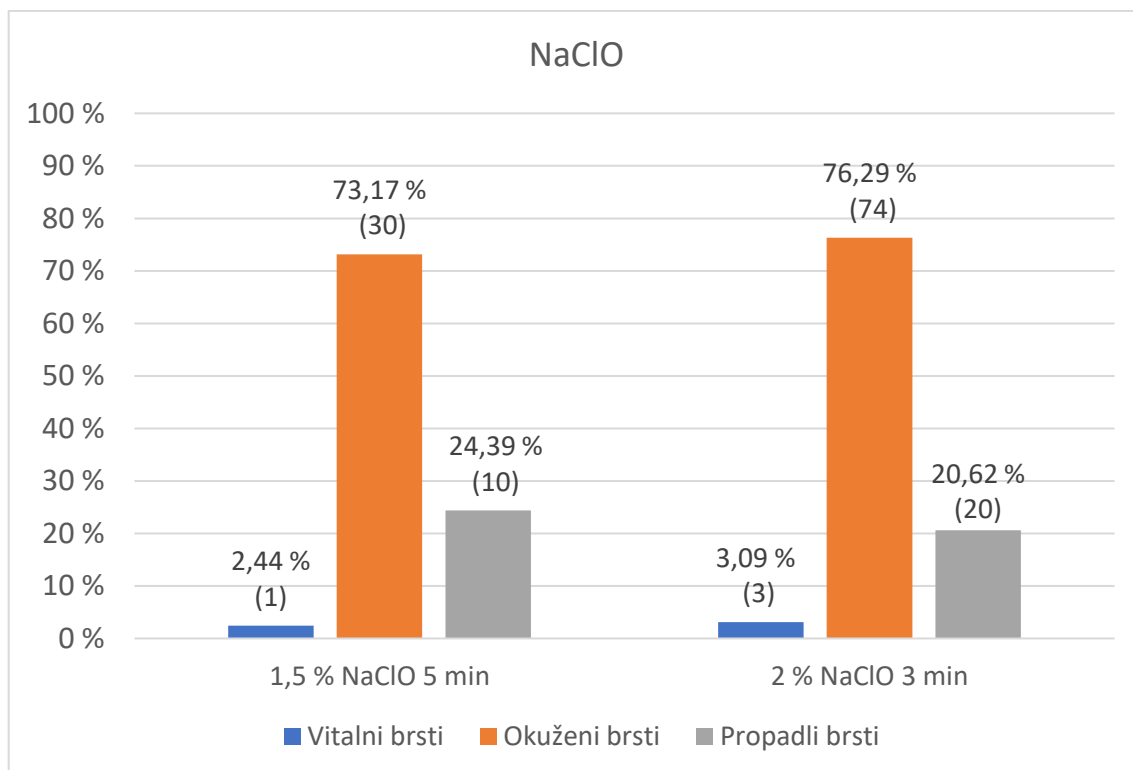


Grafikon 4.3 Delež vitalnih, okuženih in propadlih brstov pri različnem času tretiranja s sterilizacijskim sredstvom DICA

4.3.2 Sterilizacija z NaClO

Pri sterilizaciji z NaClO smo brste tretirali 3 minute z 2-% in 5 minut z 1,5-% raztopino NaClO. Pri tretiranju z 2-% NaClO za 3 minute smo dobili 3 oz. 3,09 % vitalnih brstov, 76,29 % oz. 74 je bilo okuženih, 20 oz. 20,62 % brstov je propadlo. Pri tretiranju z 1,5-% NaClO za 5 minut smo dobili 1 oz. 2,44-% vitalnih brstov, okuženih je bilo 30 oz. 73,17 % brstov, propadlo pa je 10 oz. 24,39 % brstov. Za boljšo primerljivost rezultatov bi morali

uporabiti enako koncentracijo NaClO in različni čas tretiranja. Čeprav je na podlagi pridobljenih rezultatov razvidno, da se je za uspešnejše izkazalo tretiranje z 2-% raztopino NaClO za 3 minute (grafikon 4.4).



Grafikon 4.4: Delež vitalnih, okuženih in propadlih izsečkov pri različnem času tretiranja s sterilizacijskim sredstvom NaClO

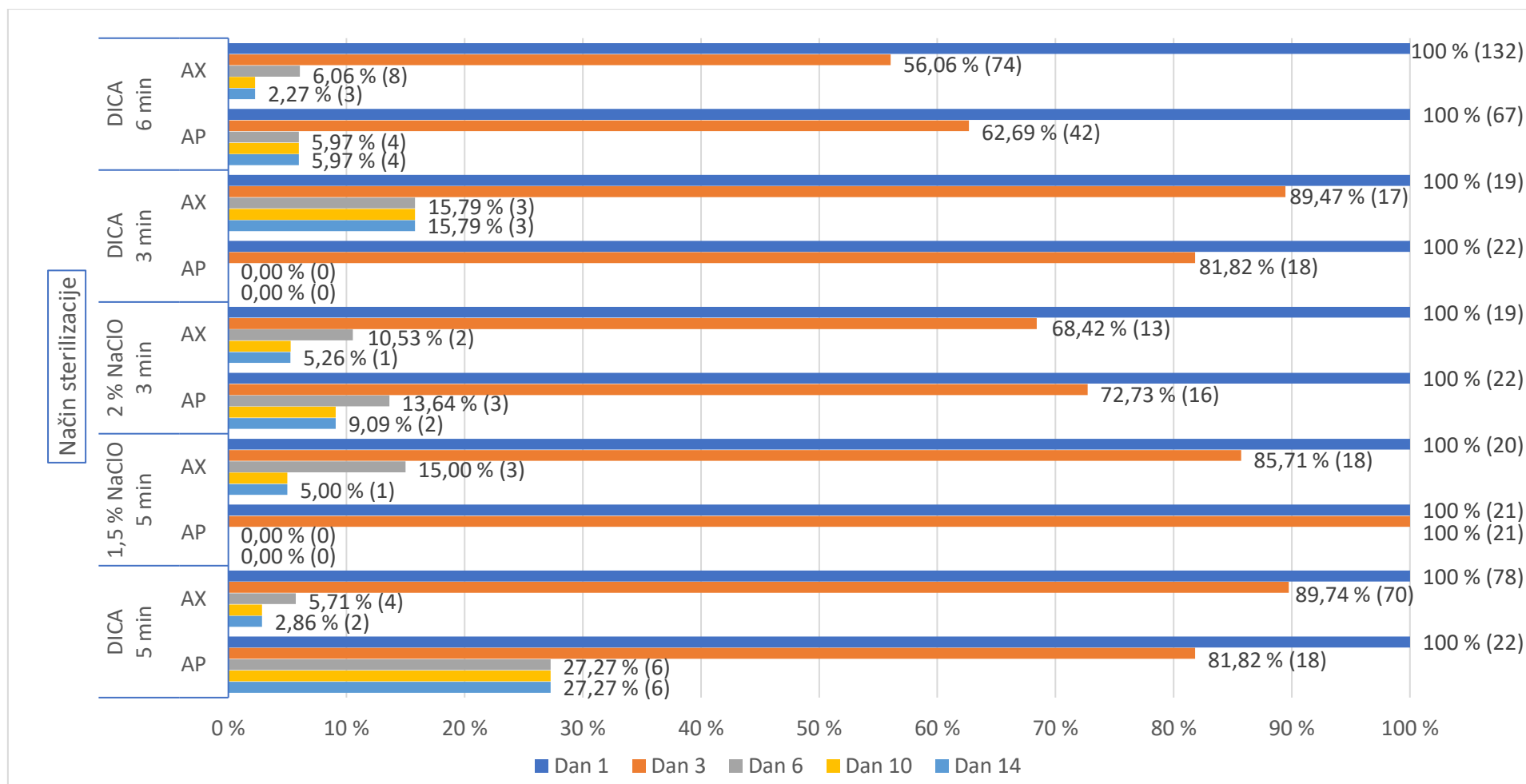
4.3.3 Časovno beleženje propadanja brstov in pojava okužb pri različnih načinih sterilizacije in tipih brstov

Po opravljeni sterilizaciji smo brste vsak dan pregledali in sproti beležili spremembe, število propadlih brstov in pojav okužb. Vzrok upadanja je lahko bil v predolgem času tretiranja oz. v previsoki koncentraciji uporabljenega sterilizacijskega sredstva (propadanje brstov) ali pa v prekratnem času tretiranja oz. v prenizki koncentraciji uporabljenega sredstva (pojav okužb).

Iz grafikona 4.5 je razvidno, da je število vitalnih brstov začelo upadati tretji dan po sterilizaciji. Največji upad vitalnih brstov smo zabeležili po 3 dneh pri tretiranju z DICA za 6 minut, in sicer se je število vitalnih aksilarnih brstov zmanjšalo za 43,94 % in apikalnih brstov za 37,31 %. Najmanjši upad smo zabeležili po 3 dneh pri tretiranju brstov z 1,5-% NaClO za 5 minut, kjer se je število aksilarnih brstov zmanjšalo za 14,29 %, medtem ko je število apikalnih brstov ostalo nespremenjeno.

6. dan po izvedeni sterilizaciji smo zabeležili največje spremembe. Pri obravnavanju z DICA za 3 minute in 1,5-% NaClO za 5 minut so propadli vsi apikalni brsti. Prav tako se je pri teh dveh obravnavanjih zabeležil največji upad aksilarnih brstov, pri obeh obravnavanjih se je namreč število vitalnih brstov zmanjšalo za približno 82 %.

Po 14-dnevnem beleženju je razvidno, da se je sterilizacija apikalnih brstov pri večini obravnavanj izkazala za uspešnejšo. Največje število vitalnih brstov se je ohranilo s tretiranjem brstov za 5 minut z DICA, in sicer je bilo zabeleženih 27,27 % oz. 6 vitalnih brstov. Aksilarni brsti so se pri sterilizaciji izkazali za manj uspešne. Kljub temu pa smo pri obravnavanju z DICA za 3 minute zabeležili 15,79 % oz. 3 vitalne brste.



Grafikon 4.5: Primerjava uspešnosti sterilizacij pri časovnem beleženju pojava sprememb glede na tip brsta

5 SKLEPI

V poskusu, ki smo ga izvajali leta 2023 na Fakulteti za kmetijstvo in biosistemske vede v Hočah, smo proučevali vzpostavitev tkivne kulture pri navadni bodiki (*Ilex aquifolium* L.). Želeli smo odkriti, kateri način sterilizacije je najučinkovitejši in kateri tip brstov je najprimernejši.

Pri preliminarnem poskusu, ki smo ga izvedli spomladi leta 2023, so nastopile težave že v začetni fazi vzpostavitve tkivne kulture. Brste smo tretirali s sterilizacijskim sredstvom DICA za 6 in 10 minut. Vsi brsti pri obeh obravnavanjih so propadli. Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko zaključimo, da je bil čas tretiranja predolg, zato smo se v nadaljevanju poskusa poslužili krajšega časa tretiranja.

Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko zaključimo, katero sterilizacijsko sredstvo je primernejše, in s tem delno potrdimo prvo hipotezo, ki pravi, da bo izbira sterilizacijskega sredstva vplivala na uspešnost sterilizacije. V poskusu smo s tretiranjem brstov z DICA pridobili 18 (3,59 %) vitalnih brstov in z NaClO₄ (2,90 %). Obe sterilizacijski sredstvi sta se izkazali za uspešni, saj je za uspešno sterilizacijo potreben že en sam vitalni brst. Kot učinkovitejše sterilizacijsko sredstvo pa se je na podlagi pridobljenih rezultatov izkazalo tretiranje z DICA, saj smo pridobili večje število vitalnih brstov.

Potrdimo lahko tudi hipotezo 2, ki pravi, da bo čas tretiranja vplival na uspešnost sterilizacije. Kot najuspešnejši način sterilizacije se je v našem poskusu izkazalo 5-minutno tretiranje z DICA, saj smo s tem načinom sterilizacije pridobili največje število vitalnih brstov.

Hipotezo 3, ki pravi, da bo tip brsta vplival na uspešnost sterilizacije, lahko delno potrdimo. Pri obeh tipih brstov smo namreč ne glede na izbran način sterilizacije uspešno pridobili vitalne brste. Kljub temu so se za primernejše izkazali apikalni brsti, kjer smo uspešno pridobili 5,84 % vitalnih brstov, medtem ko je bil ta odstotek pri

aksilarnih brstih nekoliko nižji (2,99 %). Dobljeni rezultat lahko povežemo z dejstvi, da so apikalni deli rastlin že v osnovi manj dovzetni za okužbe.

Poskus smo zaključili z 22 (3,44 %) sterilnimi, vitalnimi brsti, kar pomeni, da je bila prva faza procesa mikropropagacije navadne bodike uspešno opravljena. S tem lahko potrdimo tudi četrto hipotezo, ki pravi, da bomo z uporabljenimi načini sterilizacije vzpostavili sterilno kulturo.

6 VIRI IN LITERATURA

1. APS - The American Phytopathological Society. (b. d.). *Activity 5 - Plant Tissue Culture: Classroom Activities in Plant Biotechnology*.
<https://www.apsnet.org/edcenter/disimpactmngmnt/labexercises/PlantBiotechnology/Pages/Activity5.aspx>
2. Batič, F. (1996). Navadna bodika (*Ilex aquifolium*). *Proteus* 59(4), str. 182–184.
3. Beckett, K. A. (1990). *The Concise Encyclopedia of Garden Plants*. Macdonald illustrated. London.
4. Bhatia, N. (2021). *4 methods of sterilization used in plant tissue culture*.
<https://labassociates.com/4-methods-of-sterilization-used-in-plant-tissue-culture>
5. Bohanec, B. (1992). *Tehnike rastlinskih tkivnih kultur*. Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Center za rastlinsko biotehnologijo in žlahtnjenje, Ljubljana.
6. Carvalho, S. D., Ortega, M., Orellana, M., Rodríguez, M. in Lourdes Torres, M. (2021). In vitro propagation of the Amazonian medicinal plant guayusa (*Ilex guayusa*) and effects of light in the growth and development of this shade tolerant plant. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 147, str. 503–517.
<https://doi.org/10.1007/s11240-021-02142-y>
7. Euforgen. (b. d.). *Ilex aquifolium* – Common holly.
<https://www.euforgen.org/species/ilex-aquifolium/>
8. George, E. F. (Ed.). (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Part 1: The Technology (2nd Edition). Exegetics Limited, Edington.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3>
9. Grljić, L., Vrščaj, D., Gogala, N., Tratnik, B., Lovka, M., Bohinc, P. in Wraber, T. (1980). *Užitne divje rastline*. Cankarjeva založba. Ljubljana.
10. Guerrero Hue, N., Caudullo, G. in de Rigo, D. (2016). *Ilex aquifolium* in Europe: distribution, habitat, usage, and threats. V San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri, A. (Eds.), *European Atlas of Forest Tree Species* (str. e011fbc+). Publications Office of the European Union, Luxembourg.

- https://ies-ows.jrc.ec.europa.eu/efdac/download/Atlas/pdf/Ilex_aquifolium.pdf
[15. 8. 2023].
11. Hu, C. Y. (1975). In Vitro Culture of Rudimentary Embryos of Eleven Ilex Species. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 100(3), str. 221–225.
<https://doi.org/10.21273/JASHS.100.3.221>
 12. Hu, C. Y. (1976). Light-Mediated Inhibition of in vitro Development of Rudimentary Embryos of *Ilex opaca*. *American Journal of Botany*, 63 (5), str. 651–656.
<https://doi.org/10.2307/2441827>
 13. INaturalist. (b. d.). *Navadna Bodika (Ilex aquifolium)*.
<https://www.inaturalist.org/taxa/53856-Ilex-aquifolium>
 14. Kentelky, E., Jucan, D., Cantor, M. in Szekely-Varga, Z. (2021). Efficacy of Different Concentrations of NAA on Selected Ornamental Woody Shrubs Cuttings. *Horticulturae*, 7(11), str. 464.
<https://doi.org/10.3390/horticulturae7110464>
 15. Majada, J. P., Sánchez-Tamés, R., Angeles Revilla, M. in Casares, A. (2000). Micropropagation of *Ilex aquifolium* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 36, str. 521–526.
<https://doi.org/10.1007/s11627-000-0093-4>
 16. Manen, J. F., Boulter, M. C. in Naciri-Graven, Y. (2002). The complex history of the genus *Ilex* L. (Aquifoliaceae): evidence from the comparison of plastid and nuclear DNA sequences and from fossil data. *Plant Systematics and Evolution*, 235(1/4), str. 79–98.
<https://doi.org/10.1007/s00606-002-0225-x>
 17. Mateescu, R. (2002). *Ornamental Tree and Shrubs*; M.A.S.T. Bucharest, Romania.
 18. Microbiologynote uredniki. (2023). Kultura rastlinskega tkiva: definicija, tehnike, sestava medija, vrste, uporaba.
<https://microbiologynote.com/sl/rastlinske-tkivne-kulture-definicija-tehnike-sestava-medijev-vrste-uporaba/>
 19. Naik, E. K. (2018). Success rate of different ornamental cuttings based on different growing media. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7, str. 2479–2482.

- <https://www.phytojournal.com/archives/2018.v7.i6.6647/success-rate-of-different-ornamental-cuttings-based-on-different-growing-media>
20. Natrijev dikloroizocianurat št. CAS: 2893-78-9 (2021). Alfa Chemical.
<https://si.alfachemar.com/pharmaceutical-intermediates/sodium-dichloroisocyanurate-cas-no-2893-78-9.html>
21. Peterken, G. F. in Lloyd, P. S. (1967). *Ilex Aquifolium* L., *Journal of Ecology*, 55(3), str. 841–858.
<https://doi.org/10.2307/2258429>
22. Pierik, R. L. M. (1997). *In vitro culture of higher plants*. Springer science & business media.
<https://doi.org/10.1007/978-94-011-5750-6>
23. Powell, M., Savolainen, V., Cuénoud, P., Manen, J. F. in Andrews, S. (2000). The Mountain Holly (*Nemopanthus mucronatus*: Aquifoliaceae). *Kew Bulletin*, 55(2), str. 341–347.
<https://doi.org/10.2307/4115646>
24. Rode, J. (2007). Navadna bodika. *Moj mali svet*, 32, str. 48.
25. Sansberro, P. A., Rey, H. Y., Mroginski, L. A. in Krivenki, M. A. (2001). Plant Regeneration from *Ilex* spp. (Aquifoliaceae) in vitro. *Biocell*, 25(2), str. 139–146.
https://www.researchgate.net/publication/11758805_Plant_regeneration_from_Ilex_spp_Aquifoliaceae_in_vitro
26. Scientific. (b. d.). *Ilex aquifolium*.
<https://www.scientificlib.com/en/Biology/Plants/Magnoliophyta/IlexAquifolium01.html>
27. Spray, M. (1981). Holly as a fodder in England. *The Agricultural history review*, 29(2), str. 97–110.
https://www.researchgate.net/publication/285597867_Holly_as_a_fodder_in_Engl
28. Sun, Y., Zhang, D. in Smagula, J. (2010). Micropropagation of *Ilex glabra* (L.) A. Gray. *HortScience horts*, 45(5), str. 805–808.
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.5.805>

29. Swaroop, K. (2021). *Unit-1 Woody Ornamentals Trees*, Indira Gandhi National Open University, New Delhi.
<http://egyankosh.ac.in//handle/123456789/73043>
30. Szewczyk-Taranek, B., Jaglarz, A., Palka, P., Supel, P., Kaszycki, P., Mazur, J. in Pawlowsa, B. (2020). Identification and control of endophytic bacteria during in vitro cultures of *Staphylea pinnata* L. *Folia Horticulturae*, 32(1), str. 47–55.
<https://doi.org/10.2478/fhort-2020-0005>
31. Šiško, M. (2022). *Propagacija koščičarjev*. Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede, Maribor.
<https://doi.org/10.18690/um.fkbv.8.2022>
32. Tsaktsira, M., Chavale, E., Kostas, S. in Pipinis, E. (2021). Vegetative Propagation and ISSR-Based Genetic Identification of Genotypes of *Ilex aquifolium* 'Agrifoglio Commune'. *Sustainability* 13(18), 10345
<https://doi.org/10.3390/su131810345>
33. Tumiłowicz, J. in Banaszczak, P. (2007). Trees and shrubs of Aquifoliaceae family in Rogów and Glinna arboreta. *Rocznik dendrologiczny.*, vol 55, str. 41–56.
https://info.botany.pl/roczn_dendrol/artykuly/vol55/tumilowicz.pdf
34. "Univerzalni Fungicid Lahko Uniči Vse Glive, Bakterije, Viruse, Ključ Pa Je Poceni!". (2022). Plant hormones.
<http://si.plant-growth-regulator.com/info/the-universal-fungicide-can-kill-all-fungi-ba-66815867.html>
35. Vlad, M., Vlad, I., Vlad, I. A. in Cheregi, G. (2015). Research on the improvement of propagation technology in *Ilex aquifolium*. *Analele Universității din Oradea, Fascicula Protecția Mediului*, Vol. 15.
https://protmed.uoradea.ro/facultate/publicatii/protectia_mediului/2015B/hort/07.%20Vlad%20Mariana.pdf
36. Yao X., Zhang, F. in Corlett, R. T. (2022). Utilization of the Hollies (*Ilex* L. spp.): A Review. *Forests*, 13(1), str. 94.
<https://doi.org/10.3390/f13010094>

37. Zimmerman, P. W. in Hitchcock, A. E. (1929). Vegetative Propagation of Holly.
American Journal of Botany, 16(7), str. 556—570.

<https://doi.org/10.2307/2435711>

ZAHVALA

Zahvaljujem se svoji mentorici izr. prof. dr. Metki Šiško za strokovno svetovanje, prilagodljivost in koristne napotke pri nastajanju diplomskega dela.

Iskreno se zahvaljujem tudi somentorici Anji Ivanuš, dipl. inž., za pomoč v laboratoriju, vodenje pri pisanju in urejanju diplomskega dela, veliko odzivnost in potrpežljivost.

Posebna zahvala velja moji družini, prijateljem in vsem ostalim, ki so verjeli vame, me podpirali in mi stali ob strani.