

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Metka SPORIŠ

***IN VITRO* RAZMNOŽEVANJE PRAVEGA
KOSTANJA (*Castanea sativa* Mill.)**

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Metka SPORIŠ

***IN VITRO* RAZMNOŽEVANJE PRAVEGA KOSTANJA (*Castanea sativa* Mill.)**

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij

***IN VITRO* PROPAGATION OF SWEET CHESTNUT (*Castanea sativa* Mill.)**

GRADUATION THESIS
Higher professional studies

Ljubljana, 2014

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

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

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Marijana JAKŠE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

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

Datum zagovora:

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

Metka Sporiš

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Vs
- DK UDK 634.53:631.526.4:631.535:57.085 (043.2)
- KG pravi kostanj/genotip/mikropropagacija/brst/gojišče/poganjek/množitveni indeks
- KK AGRIS F02/F62
- AV SPORIŠ, Metka
- SA LUTHAR, Zlata (mentorica)
- KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- LI 2014
- IN *IN VITRO* RAZMNOŽEVANJE PRAVEGA KOSTANJA (*Castanea sativa* Mill.)
- TD Diplomsko delo (Visokošolski strokovni študij)
- OP IX, 32 str., 10 pregl., 13 sl., 42 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Pravi kostanj (*Castanea sativa* Mill.) se težje razmnožuje tako vegetativno s cepljenjem in potaknjenci, kot generativno s semeni. V poskus *in vitro* razmnoževanja, ki smo ga opravili v treh subkultivacijah v razmaku 1 do 2 meseca smo vključili brste 7 genotipov pravega kostanja. Poimenovali smo jih po krajih nahajališč: Pedrovo 1, Pedrovo 2, Pedrovo 3, Štjak 1, Štjak 2 (Primorska), MS (Prekmurje) in Rožnik (Ljubljana). Brste smo razkužili z 1,6 % dikloroizocianurno kislino in jih inokulirali na indukcijsko WPMi gojišče. Ko so se povečali in začeli razpirati smo jih subkultivirali na regeneracijsko WPMr gojišče. Poganjke, velike približno 1 cm, smo direktno inokulirali na razmnoževalno MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ gojišče z dodatkom hormona BAP 0,5 mg/l. Vitalne poganjke, velike približno 1,5 cm in več, smo samo v prvi subkultivaciji inokulirali na MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ gojišče za koreninjenje z dodatkom hormona IBA 0,5 mg/l in oglja 2 g/l. Noben od poganjkov ni tvoril korenin, zato smo jih pri naslednji subkultivaciji prestavili nazaj na gojišče za razmnoževanje. Gojišče MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ se je izkazalo kot primerno za razmnoževanje, kljub relativno slabi preživelosti, ki je nihala od 41% (genotip Štjak 2) do 64,2 % (genotip Pedrovo 2) ter majhnemu množitvenemu indeksu, ki je v povprečju nihal od 1,1 poganjek (Štjak 2) do 1,6 poganjkov (Rožnik) na izseček.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Vs
- DC UDC 634.53:631.526.4:631.535:57.085 (043.2)
- CX sweet chestnut/genotype/micropropagation/bud/medium/shoot/multiplication index
- CC AGRIS F02/F62
- AU SPORIŠ, Metka
- AA LUTHAR, Zlata (supervisor)
- PP SI – 1000, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
- PY 2014
- TI *IN VITRO* PROPAGATION OF SWEET CHESTNUT (*Castanea sativa* Mill.)
- DT Graduation Thesis (Higher professional studies)
- NO IX, 32 p., 10 tab., 13 fig., 42 ref.
- LA SI
- AL sl/en
- AB Sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) is as difficult to reproduce vegetatively by grafting and cuttings as generatively by seeds. In the *in vitro* propagation experiment, carried out in 3 subcultivations in the interval of 1 to 2 months, buds of 7 sweet chestnut genotypes were included. They were named after their habitat (location, where they were found): Pedrovo 1, Pedrovo 2, Pedrovo 3, Štjak 1, Štjak 2 (Littoral region), Murska Sobota (Prekmurje region in eastern Slovenia) and Rožnik (Ljubljana). The buds were sterilized with 1.6 % dichloroisocyanuric acid and inoculated into a WPMi induction culture medium. When they augmented and started to open, they were subcultivated on a WPMr regeneration medium. Shoots about 1 cm large were directly inoculated on the MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ reproductive medium with the addition of BAP hormone (0.5 mg/l). In the first subcultivation, the vital shoots, about 1.5 cm large and more, were inoculated on MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ rooting medium with the addition of IBA hormone (0.5 mg/l) and carbon (2 g/l). None of the shoots formed roots, consequently in the next subcultivation they were transferred back to the reproductive medium. MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ medium proved to be suitable for reproduction, despite the relatively low survival rate which ranged from 41 % (genotype Štjak 2) to 64.2 % (genotype Pedrovo 2), and a low multiplication index which, on average, ranged from 1.1 shoot (Štjak 2) to 1.6 shoot (Rožnik) per cutting.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI).....	III
Key words documentation (KWD).....	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo preglednic.....	VII
Kazalo slik.....	VIII
Simboli in okrajšave.....	IX
1 UVOD	1
1.1 DELOVNA HIPOTEZA	2
1.2 CILJ NALOGE.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SISTEMATIKA KOSTANJA.....	3
2.2 OPIS IN RAZŠIRJENOST.....	3
2.3 EKOLOŠKE ZAHTEVE.....	4
2.3.1 Klimatske razmere	4
2.3.2 Talne razmere	5
2.4 UPORABNOST	5
2.5 GOJENJE V NASADIH.....	6
2.6 MORFOLOŠKE IN FIZIOLOŠKE LASTNOSTI.....	6
2.7 OBIRANJE, SKLADIŠČENJE IN SORTIMENT.....	8
2.8 RAZMNOŽEVANJE IN MIKORAZMNOŽEVANJE.....	8
2.8.1 Vegetativno razmnoževanje <i>in vivo</i>	9
2.8.2 Vegetativno razmnoževanje <i>in vitro</i>	9
3 MATERIAL IN METODE DELA	11
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	11
3.2 METODE DELA.....	12
3.2.1 Razkuževanje in inokulacija brstov na gojišče	12
3.2.2 Sestava razmnoževalnega MS-$\frac{1}{2}$NO₃ gojišča	13
3.2.3 Priprava razmnoževalnega MS-$\frac{1}{2}$NO₃ gojišča	14
3.2.4 Subkultivacija poganjkov	14
3.2.5 Gojenje	15
3.2.6 Bonitiranje in obdelava podatkov	15
4 REZULTATI	16
4.1 RAZMNOŽEVANJE	16
4.1.1 Genotip Pedrovo	16
4.1.2 Genotip Štjak	19
4.1.3 Genotip MS	21
4.1.4 Genotip Rožnik	22

4.2	MNOŽITVENI INDEKS	23
4.3	KORENINJENJE	24
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	25
5.1	RAZPRAVA.....	25
5.1.1	Razmnoževanje poganjkov	25
5.1.2	Koreninjenje	25
5.2	SKLEPI.....	26
6	POVZETEK	27
7	VIRI	29
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Sestava MS- $\frac{1}{2}$ NO ₃ gojišča za razmnoževanje kostanja	13
Preglednica 2: Število inokuliranih, propadlih, preživelih in nastalih poganjkov pravega kostanja genotip Pedrovo 1 v treh subkultivacijah	16
Preglednica 3: Število inokuliranih, propadlih, preživelih in nastalih poganjkov pravega kostanja genotip Pedrovo 2 v treh subkultivacijah	17
Preglednica 4: Število inokuliranih, propadlih, preživelih in nastalih poganjkov pravega kostanja genotip Pedrovo 3 v treh subkultivacijah	18
Preglednica 5: Število inokuliranih, propadlih, preživelih in nastalih poganjkov pravega kostanja genotipov Štjak 1 v treh subkultivacijah	20
Preglednica 6: Število inokuliranih, propadlih, preživelih in nastalih poganjkov pravega kostanja genotip Štjak 2 v treh subkultivacijah	20
Preglednica 7: Število inokuliranih, propadlih, preživelih in nastalih poganjkov pravega kostanja genotip MS v treh subkultivacijah	21
Preglednica 8: Število inokuliranih, propadlih, preživelih in nastalih poganjkov pravega kostanja genotip Rožnik v treh subkultivacijah	22
Preglednica 9: Množitveni indeks 7 genotipov pravega kostanja	23
Preglednica 10: Število preživelih poganjkov, primernih za koreninjenje in razmnoževanje 7 genotipov pravega kostanja v prvi subkultivaciji	24

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Pogoste bolezni in škodljivci pravega kostanja: A – kostanjev rak; B – črnilovka; C – kostanjeva šiškariča	2
Slika 2: Razširjenost kostanja v Sloveniji (ZGS, 2005)	4
Slika 3: Zimski brsti pravega kostanja, uporabljeni kot izsečki za <i>in vitro</i> razmnoževanje	11
Slika 4: Genotipi pravega kostanja Pedrovo: A – Pedrovo 1; B – Pedrovo 2; C – Pedrovo 3	11
Slika 5: Genotipa pravega kostanja Štjak; A – Štjak 1, B – Štjak 2	12
Slika 6: <i>In vitro</i> razmnoževanje pravega kostanja	16
Slika 7: Odstotek preživelih in propadlih poganjkov pravega kostanja genotip Pedrovo 1 v treh subkultivacijah	17
Slika 8: Odstotek preživelih in propadlih poganjkov pravega kostanja genotip Pedrovo 2 v treh subkultivacijah	18
Slika 9: Odstotek preživelih in propadlih poganjkov pravega kostanja genotip Pedrovo 3	19
Slika 10: Odstotek preživelih in propadlih poganjkov pravega kostanja genotip Štjak 2	21
Slika 11: Odstotek preživelih in propadlih poganjkov pravega kostanja genotip MS	22
Slika 12: Odstotek preživelih in propadlih poganjkov pravega kostanja genotip Rožnik	23
Slika 13: Poganjki pravega kostanja nastali iz nodijskega izsečka na razmnoževalnem gojišču	24

SIMBOLI IN OKRAJŠAVE

BAP – benzilamino purin; citokinin

C. – *Castanea*

IBA – indol maslena kislina; avksin

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

NAA – α -naftalen očetna kislina; avksin

pH – negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov

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

WPMi – indukcijsko gojišče (Lloyd in McCown, 1980)

WPMr – regeneracijsko gojišče

MS – oznaka genotipa pravega kostanja iz Prekmurja

Pedrovo 1, 2 in 3 – oznaka genotipov iz Primorske

Rožnik – oznaka genotipa iz Rožnika, Ljubljana

Štjak 1 in 2 – oznaka genotipov iz Primorske

1 UVOD

Že v času antičnih Grkov in Etruščanov je bil kostanj v posameznih predelih obravnavan kot sadno drevo (Kotar in Brus, 1999). Sedaj ga uvrščamo med gozdne in sadne vrste, med lupinasto sadno drevje (Adamič, 1995). Evropski pravi kostanj (*Castanea sativa* Mill.) izvira iz območij ob Sredozemskem in Črnem morju, od tam so ga Rimljani razširili s širjenjem vinske trte. Razširil se je daleč prek svojih naravnih rastišč oz. gen centrov proti severu. Ljudje so sadili pravi kostanj zaradi plodov, ki so jih uporabljali v prehrani.

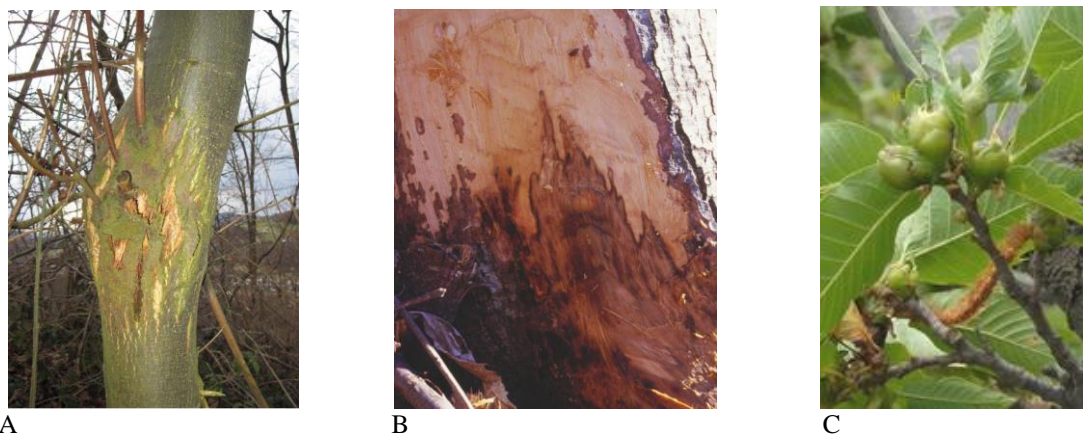
Kostanj ima pomembno vlogo v ekološki, socialni in proizvodnji funkciji. Ekološka funkcija je vezana na izboljševanje rastišč, saj zaradi močnega koreninskega sistema izboljšuje strukturo tal. Plodovi in nektar kostanja so hrana številnim gozdnim živalim. Socialna vloga kostanja je vezana na estetsko vlogo. Kostanj namreč začne cveteti takrat, ko druge vrste že odvetijo. Proizvodnja funkcija ima pomen pri pridobivanju medu in plodov za prehrano ljudi ter pri proizvodnji razmeroma cenjenega in vsestransko uporabnega lesa. Kostanj prispeva k raznovrstnosti prehrane ter ohranja staro prehransko kulturo, ki je del splošne kulture našega naroda (Kotar in Brus, 1999).

Danes razširjenost pravega kostanja pri nas in v Evropi upada. Glavna vzroka sta boleznii kostanjev rak in čnilovka (slika 1). Bolezen kostanjevega raka povzroča gliva *Cryphonectria parasitica* Murr. Lubje napadene drevesa nabrekne, spremeni barvo in napoka (slika 1A). Rumenorjavo ali rdečerjavo listje ostane na drevesu tudi čez zimo. Gliva je prvotno živela kot parazit na sorodnih vrstah evropskega pravega kostanja in ni povzročala velike škode. V začetku 20. stoletja se je najprej pojavila na severnoameriškem kostanju (*Castanea dentata* Borkh.) in v nekaj letih uničila veliko kostanjevih površin. V tridesetih letih se je razširila po vsej Evropi. Po letu 1950 pa so jo odkrili tudi v Sloveniji, kjer so se površine kostanjevih gozdov zmanjšale za več kot polovico (Kotar in Brus, 1999).

Manj nevarna in razširjena v južni Evropi je čnilovka, ki jo povzroča gliva *Phytophthora cambivora* Petri. Bolezenski znaki okužbe so črni madeži na koreninah in deblu ter izločanje črne tekočine (slika 1B), ki je produkt reakcije tanina in železa, trohnenje debel, sušenje vej, rjavenje mladih poganjkov in listov ter prezgodnje odpadanje listov (Ogris, 2010). To so vzroki, da se odporne križance na ti dve bolezni in zanimive genotipe poskuša vegetativno, tudi *in vitro* razmnožiti in jih uporabiti za sajenje.

V zadnjih nekaj letih se je v Sloveniji, predvsem na Primorskem začel pojavljati zelo nevaren škodljivec kostanjeva šiškariča (*Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu), ki domuje izključno na kostanju. Spomladi 2005 je bila s sadilnim materialom iz Italije zanesena v Slovenijo. Povzroča zadebelitve oz. tvorbo šišk na debelejših listnih žilah, mladih poganjkih in pri osnovi moških socvetjih (slika 1C). Prizadeta mesta predčasno venijo in

odmirajo, s tem je močno prizadet letni prirast poganjkov in pridelek plodov (Seljak, 2007; Kos in Trdan, 2010).



Slika 1: Pogoste bolezni in škodljivci pravega kostanja: A – kostanjev rak (Ogris, 2010); B – črnolovka (Vannini in Vettraino, 2011); C – kostanjeva šiškarica (Jurc in Rešičič, 2013)

Pravi kostanj spada med lesnate vrste, ki se težje razmnožujejo tako generativno s semenom in tudi vegetativno s potaknjenci in cepljenjem. Z vegetativnim razmnoževanjem ohranjamo željeni genotip rastline, zato se ta način uporablja v proizvodnji oz. praksi. Na koreninjenje potaknjencev vpliva predvsem starost matične rastline, poleg tega pa tudi genotip in rastne razmere. Kljub temu, da se za potaknjence uporabljajo morfološko mladi poganjki (enoletni ali dvoletni les) pa so ti fiziološko stari in zato je koreninjenje oteženo. S tehnikami tkivnih kultur lahko fiziološko stari material zelo uspešno pomladimo oz. rejuveniziramo.

1.1 DELOVNA HIPOTEZA

Kot izsečke oz. izhodiščni material za zasnovo tkivne kulture smo uporabili zimske brste navadnega kostanja, pobrane iz 7 dreves, ki so se razlikovala v genotipu in starosti. Delovna hipoteza je bila zasnovana na možnih razlikah v razmnoževanju in pridobitvi vitalnih poganjkov med genotipi in starostjo dreves.

1.2 CILJ NALOGE

Cilj naloge je bil v *in vitro* razmerah razmnožiti čim več vitalnih regenerantov izbranih 7 genotipov pravega kostanja, ki bi bili primerni za koreninjenje in gojenje na prostem.

2 PREGLED OBJAV

2.1 SISTEMATIKA KOSTANJA

Pravi kostanj (*Castanea sativa* Mill.) spada v družino bukovk (Fagaceae). To družino sestavlja 8 rodov ter okoli 1000 vrst, predvsem dreves, od katerih so najbolj znani kostanji (*Castanea*), bukve (*Fagus*) in hrasti (*Quercus*). Kostanjevi, bukovi in hrastovi rodovi prevladujejo v listnatih in mešanih gozdovih Severne Amerike in Evrazije (Sancin, 1988).

V rod *Castanea* je poleg evropskega pravega kostanja *Castanea sativa* Mill. uvrščenih tudi nekaj pomembnejših ameriških in azijskih vrst. Pomembnejše ameriške vrste so: *C. dentata* Borkh., *C. americana*, *C. pumila* Mill., *C. aschii* Sudw., *C. floridana* Ashe, *C. alnifolia* Nutt. in *C. ozarkensis* Ashe.. Azijske vrste - kitajske in japonske pa so: *C. mollissima* Bl., *C. crenata* Sieb et Zucc, *C. davidii* Dode. in *C. henryi* Rehd. et Wils; Pomembni so tudi križanci: *C. sativa* x *C. crenata*, *C. sativa* x *C. pumila*, *C. sativa* x *C. dentata* (Sancin, 1988; Podjavoršek, 1999).

2.2 OPIS IN RAZŠIRJENOST

Kitajski pravi kostanj (*Castanea mollissima* Blume) je razširjen na severnem in zahodnem delu Kitajske ter deloma v Koreji. Najdemo ga tudi v predelih Azije, Amerike in Evrope. Doseže višino do 20 metrov (Anić in sod., 1959).

Manjše drevo od kitajskega pravega kostanja, je japonski pravi kostanj (*C. crenata* Sieb et Zucc.), ki zraste do višine 15 metrov, njegovo rastišče pa je na japonskih gorskih predelih (Anić in sod., 1959).

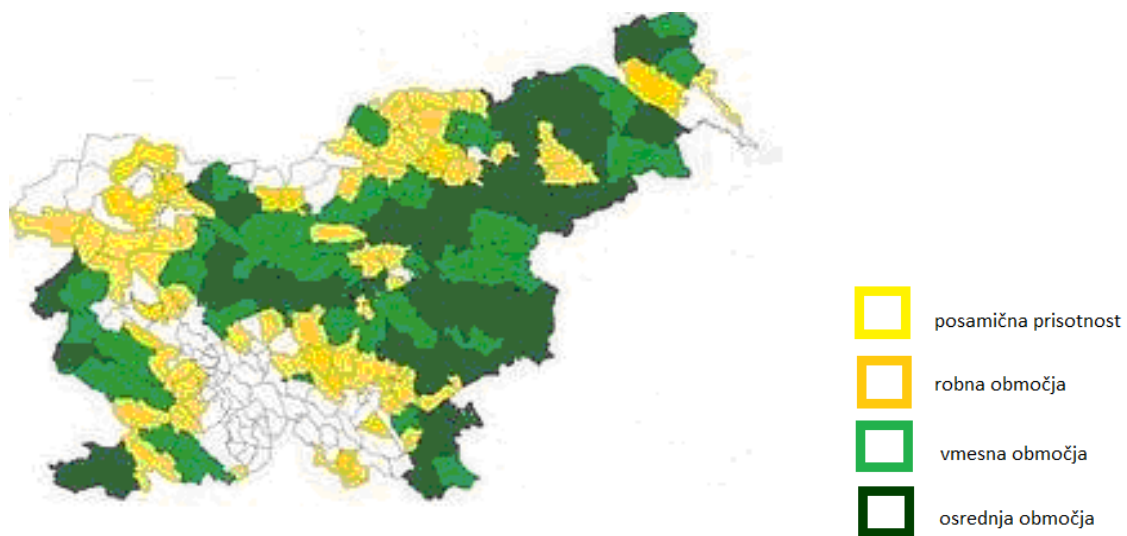
Kitajski in japonski pravi kostanj uporabljajo za križanje z evropskim in ameriškim pravim kostanjem. Namen križanja je, pridobiti čim več križancev odpornih na črnilovko in kostanjev rak, kajti obe vrsti imata naravno odpornost na ti dve bolezni (Sanchez in sod., 1997).

Do 30 metrov zraste ameriški pravi kostanj (*C. dentata* Borkh.). Uspeva na vzhodnem delu Severne Amerike, kjer je bil do leta 1900 prevladujoča gozdna vrsta. V pičlih 50 letih je kostanjev rak uničil približno 25 % teh gozdov (Serres in sod., 1990).

Evropski pravi kostanj (*C. sativa* Mill.) je razširjen v južni Evropi: v Turčiji, na Balkanu, v Italiji, na Portugalskem, v Franciji in Nemčiji; zahodni Aziji in severozahodni Afriki (Anić in sod., 1959; Eleršek, 2001).

Pravi kostanj raste v Sloveniji v vseh toplejših gričevnatih legah, večinoma se pojavlja samoniklo. Večje površine so v jugovzhodnih predelih Slovenije, Beli Krajini in na

primorskem flišu (Kotar in Brus, 1999). Na Primorskem so večje površine kostanja predvsem na območju Koprškega, Goriških brd, dolini Soče in Vipavski dolini. V teh predelih rastejo predvsem debeloplodni maroni. V vzhodni Sloveniji so večje površine vzhodno od črte Dravograd - Maribor - Celje - Trbovlje - Novo mesto - Črnomelj. Tu je celinska klima in tu rastejo avtohtoni tipi domačega kostanja (Solar, 2001a). Manjše površine kostanja so še v okolici Ljubljane, Zasavju, Halozah, na Dolenjskem in Štajerskem, posamezno pa raste povsod razen na Koroškem (slika 2).



Slika 2: Razširjenost kostanja v Sloveniji (Zavod..., 2005)

V Sloveniji je približno 11 ha intenzivnih nasadov kostanja (Štampar, 2004). V sadni izbor za Slovenijo so bile leta 2002 uvrščene 4 sorte evrojaponskega kostanja (*C. castanea* x *C. crenata*): 'Marsol', 'Maraval', 'Bouche de betizac' in 'Precoce migoule (Godec in sod., 2003).

2.3 EKOLOŠKE ZAHTEVE

Kostanj je ekološko zahtevna vrsta, tako za klimatske kot talne razmere.

2.3.1 Klimatske razmere

Kostanj dobro uspeva le v toplejšem podnebju z daljšo rastno dobo od 6 do 7 mesecev, na območju z vlažno klimo, kjer je obilo padavin in visoka zračna vlaga. Ustrezajo mu topla poletja, mile zime in veliko svetlobe. Slabše prenaša močne vetrove, zgodnje in pozne pozebe ter previsoke temperature in daljša sušna obdobja (Kotar in Brus, 1999).

Pravi kostanj je mogoče uspešno gojiti do 800 metrov nadmorske višine. Do te višine namreč plodovi dozorevajo, v višjih legah pa le v bližini vodnega vira, ki pozitivno vpliva

na nihanja temperature in vlažnost zraka. Idealna klima za dobro rast pravega kostanja je zmerna kontinentalna in mediteranska klima s srednjo letno temperaturo od 11 do 15 °C. Občutljiv je za hitre temperaturne razlike med dnevom in nočjo, daljše nizke zimske temperature in sušo. V zimskem mirovanju ne pozebe tudi do – 26 °C, vendar slabo prenaša daljši mrz pod – 20 °C. Ko cveti mu najbolj ustrezajo temperature med 15 in 18 °C. V tem obdobju je občutljiv za nizke temperature, ker cveti na koncu junija in začetku julija, ga te ne prizadanejo (Sancin, 1988; Solar, 2001a).

2.3.2 Talne razmere

Kostanj dobro uspeva v zmerno svežih, globokih, dobro strukturnih in zračnih tleh z visoko vsebnostjo kalija. Razvije globoke in obsežne korenine, zato potrebuje vsaj do 2 metra globoka tla. Pogosto porašča nekarbonatna ilovnato-peščena tla na silikatni podlagi, pa tudi peščena zemljišča, ki so rodovitna, globoka in zmerno vlažna. Uspeva tudi na flišu. Je kalcifobna rastlina in ne prenaša apna v tleh. Ustrezajo mu kislila tla s pH vrednostjo med 4,0 - 6,0 (Solar, 2001a).

V gozdu je pogosto v združbi s smreko, gradnom in rdečim borom, manj z bukvijo. V podrasti prevladuje borovnica, pri tleh pa mahovi (Mlakar, 1990).

Kljub temu da je velik porabnik vode (1000-1500 mm padavin letno), ne prenaša visoke podtalnice in stalno prevlažnih tal (Solar, 2001a).

2.4 UPORABNOST

Kostanj je drevesna vrsta s široko uporabnostjo, saj ima uporabne vse rastlinske dele. Uporabljajo se cvetovi, plodovi, les, lubje in listje.

Konstanj cveti pozno, ko druge drevesne vrste že odcvetijo in je pomembna čebelja paša (Mlakar, 1990; Bulatović, 1983). Med je svetlo rumen, izrazitega vonja in trpko sladko grenkega okusa. Blagodejno deluje in zdravi bolezni jeter in čire na želodcu (Katalinić, 1973).

Plodovi se uporabljajo za prehrano ljudi in živali. Imajo veliko hranljivo vrednost, saj vsebujejo do 47 % ogljikovih hidratov, vitaminov in mineralov. V 100 g svežih plodov je 530 mg kalija, 93 mg fosforja, 40 mg magnezija, 34 mg kalcija, 34 mg vitamina C. Iz plodov pridobivajo tudi olje, ki ga uporabljajo v zdravstvu. Kostanjeva moka je odlično živilo, saj je lahko prebavljiva in prijetnega okusa (Petauer, 1993; Sancin, 1988).

Les kostanja je srednje trd in precej težak. Je izredno trajen tako na suhem kot v vodi, razmeroma hitro pa propade, če se vlažnost menjava. Les kostanja in les hrasta imata podobno zgradbo. Tako je kostanjev les zelo primeren za pohištvo. Uporabljajo ga tudi za

gradnjo ladij, v rezbarstvu, sodarstvu, ter za pridobivanje celuloze in tanina (Petauer, 1993).

Tako lubje kot listje se uporablja v zdravilstvu, za preprečevanje dihalnih obolenj, oba delujeta tudi blago antidiaroično (Petauer, 1993).

2.5 GOJENJE V NASADIH

Pridelava oz. pobiranje kakovostnih plodov v kostanjevih gozdovih se je preselilo v monokulturne nasade, ki zahtevajo intenzivno oskrbo.

Razporeditev dreves v intenzivnih nasadih je lahko pravokotna, kvadratna ali trikotna. Minimalne razdalje sajenja so 9 x 9 m (Solar, 2001b). Boljše so razdalje 10 x 10 do 10 x 15 m, ker kostanj potrebuje veliko prostora za rast (Štampar, 2002). V kostanjevih drevoredih je razdalja med drevesi 8-10 m, oddaljenost drevoreda od ceste pa minimalno 5 m (Solar, 2001b).

Kostanj pogosto gojimo v obliki izboljšane piramide in kotlaste krone s 3-4 ogrodnimi vejami. Višina debla je v nasadih 80-120 cm, pri drevoredih ali soliternih drevesih minimalno 2 m. V prvih letih po sajenju se obdeluje posamezne sadike in zastira cepilne kolobarje s travo iz nasada. Vzdržuje se negovano ledino, s herbicidi se tretira pasove v vrsti. V nasadih, ki so že v rodnosti, se redči krošnjo, izrezuje se odmrle in polomljene veje, da se izboljša osvetlitev in poveča tvorbo asimilatov (Štampar, 2002). V juvenilni dobi se pospešuje rast z dušikom, ki se ga dodaja dvakrat v letu. V obdobju rodnosti potrebuje kostanj poleg dušika še dognojevanje s kalijem in magnezijem (Solar, 2001b).

2.6 MORFOLOŠKE IN FIZIOLOŠKE LASTNOSTI

V višino zraste 30-40 m. V prvih letih kostanjevo drevo raste počasi, od 10. do 50. leta je rast hitra, potem spet popusti. Je dolgoživa vrsta, in doseže od 200 do 600 let, nekatera drevesa tudi do 1000 let (Sancin, 1988). Če ima dobre razmere doseže prsni premer debla do 3 m. Kot soliterno drevo ima močno, gosto in široko krošnjo ter kratko deblo. Drevesa, ki rastejo v gozdnem sestoju razvijejo dolga in vitka debela z ozko krošnjo (Kotar in Brus, 1999). Deblo je čokato in ravno (Fabčič, 1997).

V mladosti ima drevo gladko, tanko in rdečeolivno skorjo, v starosti postane razbrazdana in rjavosiva (Kotar in Brus, 1999).

Koreninski sistem se močno razvejuje in glavna korenina seže tudi do 6 metrov globoko v tla. Najprej se razvije močna in globoka vertikalna korenina, nato pa še stranske (Kotar in Brus, 1999).

Listi so enostavni, ozki, suličasti in nazobčani, 12-20 cm dolgi in 3-6 cm široki. Listni pecelj meri od 0,5 do 2,5 cm. Zgornja površina lista je gladka in temno zelena, spodnja pa dlakava in zelena do belkasta. Na otip so usnjati (Kotar in Brus, 1999).

Brsti so pokriti z 2-3 temno rdečimi do rjavimi luskolisti, relativno majhni, koničasto jajčasti, goli do rahlo puhasti. Poganjki so bleščeče rdečerjavi in pokriti z lenticelami. Brste imajo izmenično nameščene v 5 vrstah. Poganjki se končajo s posamičnim brstom, ki je večji od stranskih. Odvisno od sorte in vremenskih razmer se začne brstenje proti koncu marca, v začetku aprila. Vegetativni cikel od brstenja do zorenja plodov traja 140 do 190 dni (Sancin, 1988; Mlakar, 1990; Kotar in Brus, 1999).

Kostanj je enodomna rastlina z ločenimi moškimi in ženskimi cvetovi na isti rastlini. Rodni les je enoletni. Cvetovi zrastejo iz pazduhov listov in so pokončni klasi oz. mačice, dolgi 12-20 cm. Enospolni cvetovi v klasu tvorijo neprave kobule in večina klasov je sestavljena iz 7 moških cvetov. Moški cvet ima 8-12 prašnikov in drobno okrnjeno plodnico. Na vrhu enoletnih poganjkov, posamično ali v skupinah do 5 cvetov v klobčku nastanejo ženski cvetovi, ki so obdani z zelenim luskastim ovojem s skledico ali kupulo. V ženskih cvetovih so zakrneli prašniki. Ženski cvet na začetku varuje zeleni luskasti ovoj, ki se spremeni v ježico in se v času dozorelosti razpre v 2, 3 ali 4 dele (Katalinić, 1973; Kotar in Brus, 1999; Solar, 2001a).

V Sloveniji cveti junija in v začetku julija, saj potrebuje za začetek cvetenja 15-18 °C. Kostanj cveti približno 10 dni, lahko tudi sukcesivno do 4 tedne. Je žužkocvetka, cvetni prah pa raznaša veter. Za dobro oprашitev in oploditev je potrebno čim več moških socvetij in lepo, toplo vreme, ki omogoča dober prenos cvetnega prahu. Nekatere novejšje sorte imajo sterilne moške cvetove, zato so potrebne za oploditev ženskih cvetov oprашevalne sorte s kalivim pelodom. Za oprашevanje so zelo primerne divje sorte, te tvorijo veliko cvetnega prahu in pelod je dobro kaliv. V začetku cvetenja kostanj slabše medi in daje le pelod. Medenje se poveča v toplem vremenu z dosti zračne vlage. Od cvetenja do zorenja je potrebno 75-120 dni. Kostanjeve zgodnje sorte zorijo že konec septembra, pozne pa novembra, večina kostanjev pa zori v oktobru (Katalinić, 1973; Sancin, 1988; Kotar in Brus, 1999; Solar, 2001a).

Plodovi pravega kostanja se razvijejo iz enega klobčka ženskih cvetov. V ovoju oz. kupuli (ježici) ostanejo dokler ne dozorejo. V ježici so 2-3 orehi, imenovani kostanji. Kostanji so 2-3 cm dolgi, temno rjave barve in imajo svetlejšje vzdolžne proge. Na spodnji strani imajo svetlejšjo liso. Na tem delu se držijo kupule. Kostanji imajo na vrhu posušen ostanek perigona. Plodovi se razlikujejo po velikosti in obliki hiluma, s katerim je plod povezan z ježico in po katerem poteka prenos hrane, ter dlakavosti oz. gladkosti pokožice perikarpa. Ko so plodovi zreli, se ježica odpre in odpade skupaj s plodovi (Kotar in Brus, 1999; Solar, 2001a).

Semena pravega kostanja kalijo 4-6 tednov in vzkalijo naslednjo pomlad. Njihova kalivost je 60-70 %. Rastlina raste do 10 leta počasi, potem pa hitreje, pri 50-ih letih zraste do 25 m. Zelo dobro odganja iz panjev in korenin ter je primeren za panjevsko gojenje (Mlakar, 1990; Perko, 1995; Kotar in Brus, 1999).

2.7 OBIRANJE, SKLADIŠČENJE IN SORTIMENT

Kostanj obrodi vsako leto, močnejše pa vsake tri leta. Dobro vzdrževano drevo da v povprečju od 100 do 200 kg plodov. Cepljene rastline zarodijo v 2. do 4. letu, kar je mnogo prej kot rastline nastale iz semena. Slednje zarodijo tudi do 10 let pozneje (Babnik, 1992; Kotar in Brus, 1999).

Plodovi so tehnološko zreli, ko ježice porumenijo in popokajo, plodovi pa se temno ali kostanjevo obarvajo. Pri nas je to od konca septembra do konca oktobra. Poznamo sukcesivno dozorevanje, ki zahteva večkratno pobiranje plodov v nekajdnevni presledkih (Solar, 2001b).

Plodove delimo na dva tipa: navadni kostanj in maron. Maroni so pogostejši v toplejših območjih. V ježici nastane en velik okroglast plod, s svetlejšo rjavo lupino in izrazitimi svetlejšimi progami. Divje rastoči - avtohtoni kostanji v ježici razvijejo 2 do 3 manjše temnejše plodove (Solar, 2001b).

Pri nas so razširjeni različni avtohtoni tipi - sejanci. Domačih sort še ni, saj se je načrtno delo na selekciji avtohtonega materiala začelo pred nekaj leti. Do sedaj je preselekcijiranih 7 najboljših genotipov. Genetske raziskave so bile narejene na 82 izbranih evropskih populacijah iz Velike Britanije, Francije, Grčije, Italije in Španije (Solar, 2001b; Villani in Eriksson, 2004).

Plodove se skladišči v temnih prostorih pri temperaturi 0-4 °C in z relativno zračno vlago 85 % (Solar, 2001b).

2.8 RAZMNOŽEVANJE IN MIKRORAZMNOŽEVANJE

Z vidika ohranitve vrst je primernejše generativno razmnoževanje, saj se tako razmnožene rastline hitreje prilagodijo na rastne spremembe kot vegetativno razmnožene. Pri tujeprašnih rastlinah je večina lokusov heterozigotnih in z generativnim razmnoževanjem dobimo potomce z različnimi lastnostmi. Te in v primerih, kjer so sorte absolutno sterilne ter fiziološko star material razmnožujemo le vegetativno. Vegetativno razmnoževanje lahko poteka *in vivo* na prostem ali *in vitro* v kontroliranih laboratorijskih razmerah (Šiftar, 2001).

2.8.1 Vegetativno razmnoževanje *in vivo*

Lesnate rastline se delijo na tiste, ki jih lažje vegetativno razmnožujemo in ni večjih težav pri razmnoževanju. Poznamo pa tudi tiste, pri katerih se pojavljajo različne težave in jih težje razmnožujemo. Kostanji, rod (*Castanea*) in drugi predstavniki družine bukovk (Fagaceae) so glede razmnoževanja zahtevne lesnate vrste (Šiftar, 1999).

Kostanj se razmnožuje s semenom (generativno). Žlahtne sorte, da se ohrani genotip in s tem lastnosti, se razmnožuje vegetativno, s cepljenjem. V novejšem času se ga razmnožuje z zelenimi potaknjenci. Drevesnice se v zadnjih letih ukvarjajo z *in vitro* tehniko razmnoževanja kostanja (Osterc, 2004).

2.8.2 Vegetativno razmnoževanje *in vitro*

Pri vegetativnem razmnoževanju *in vitro* iz izsečka (organa, tkiva, celice), v sterilnih razmerah na gojišču, vzgojimo rastline. Pri tem se izkorišča totipotentnost oz. sposobnost rastlinske celice, da iz nje na ustreznem gojišču lahko pridobimo celo rastlino. Rastlinske celice, predvsem meristemske, imajo veliko sposobnost regeneracije in diferenciacije. Pri *in vitro* razmnoževanju imamo na razpolago več različnih tehnik tkivnih kultur, med katerimi je tudi mikropropagacija. Sestavljena je iz več faz dela: gojitev in priprava matičnih rastlin, iniciacija kulture, indukcija in regeneracija, razmnoževanje, podaljševanje, koreninjenje in aklimatizacija poganjkov. Vsaka od faz ima specifične zahteve dela in vse je potrebno obvladovati, da dobimo vitalno sadiko (Bohanec, 1992).

Pri lesnatih rastlinah so pogosto težave pri pridobitvi aseptične kulture, regeneraciji in koreninjenju. Vse tri faze so močno povezane s starostjo rastline, ki običajno presega 10 let in več. Čim dalj rastlina raste zunaj, tem večje so možnosti sistemskih, notranjih okužb, ki so lahko zelo trdovratne.

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

Na gojišču s polovično koncentracijo $MS-\frac{1}{2}NO_3$ so Vieitez in sodelavci leta 1983 objavili raziskavo s 73 % koreninjenjem in dokazali, da je možno koreninjenje poganjkov pravega kostanja v *in vitro* razmerah, nastalih iz izsečkov starejših dreves. Zaključili so tudi, da na uspešnost koreninjenja vpliva tudi genotip oz. genetske razlike med kloni in da so potrebne modifikacije glede metod in uporabljenih gojišč za različne genotipe.

Piagnani in Eccher (1988) sta proučevala dejavnike, ki vplivajo na razmnoževanje in koreninjenje kostanja *in vitro*. Med drugimi tudi različne koncentracije dušika in njegov vpliv na vitifikacijo in pojavljanje nekroz. Ugotovila sta, da majhne koncentracije dušika

v gojišču vplivajo na rast kostanja, medtem ko velike koncentracije povzročajo vitifikacijo. Popolna odsotnost dušika v gojišču povzroča klorozo izsečkov. Ugotovila sta tudi velike razlike glede razmnoževanja in koreninjenja med različnimi kloni kostanja in različnimi izsečki.

3 MATERIAL IN METODE DELA

V poskus *in vitro* razmnoževanja pravega kostanja smo vključili zimske brste iz eno- in dvoletnih poganjkov, nabranih marca in aprila 2009 (slika 3).

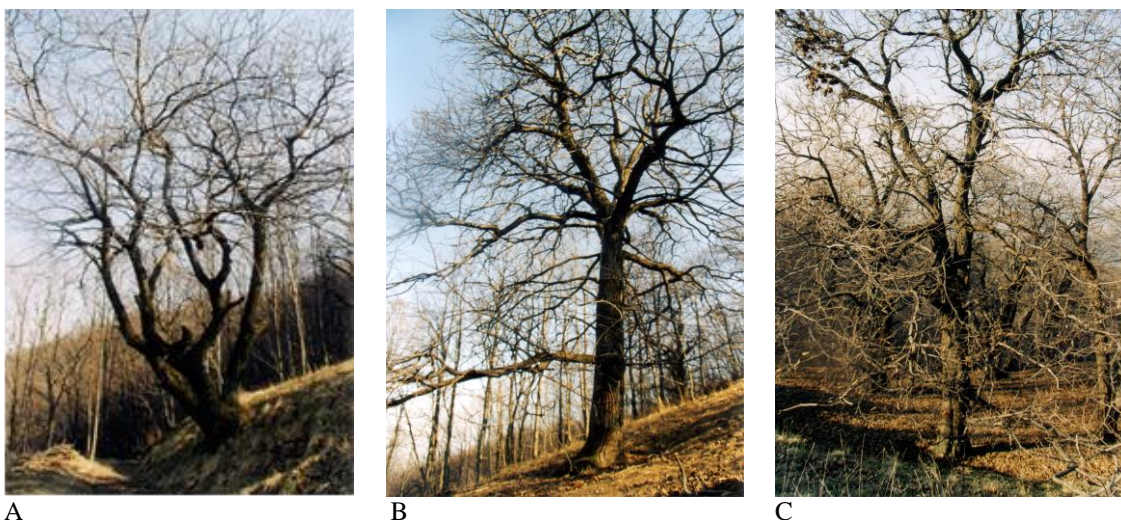


Slika 3: Zimske brsti pravega kostanja, uporabljeni kot izsečki za *in vitro* razmnoževanje

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

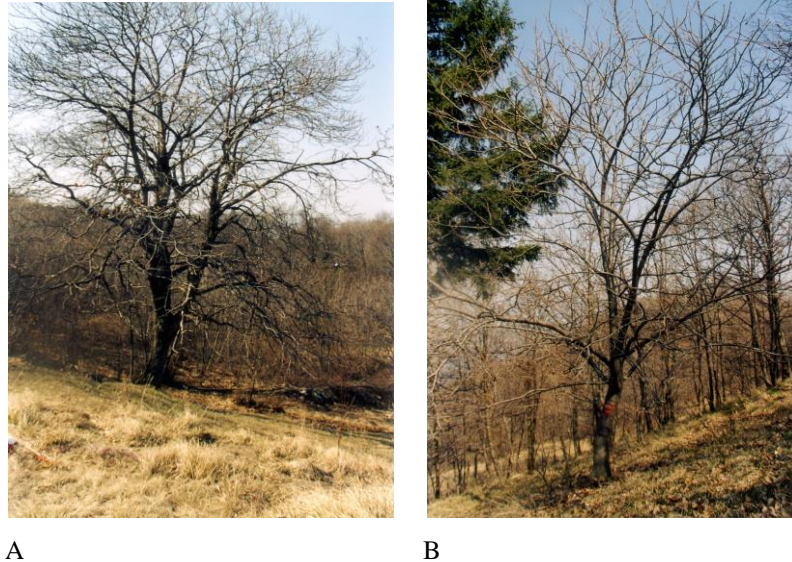
Brsti 7 genotipov pravega kostanja so bili nabrani zgodaj spomladi 2009 v naravnih rastiščih na območju Slovenije: Primorske (5 genotipov), Prekmurja (1 genotip) in Ljubljane (1 genotip). Poimenovali smo jih po krajih rastišč: Pedrovo 1, Pedrovo 2, Pedrovo 3 (slika 4), Štjak 1, Štjak 2 (slika 5), MS in Rožnik.

Vsi trije genotipi Pedrovo (slika 4) so imeli svetlo rjav les s svetlimi lenticelami. Brsti so bili veliki 4-8 mm. Luskolisti so bili svetlo rjavi, brsti pa so bili pod luskolisti svetlo zeleni, najbolj zeleni od vseh genotipov.



Slika 4: Genotipi pravega kostanja Pedrovo: A – Pedrovo 1; B – Pedrovo 2; C – Pedrovo 3

Genotipa Štjak (slika 5) sta imela svetlejši rdeče rjavi les z rumenkastimi lenticelami. Brsti so bili veliki 3-6 mm. Pod luskolisti so bili brsti temno zeleni.



Slika 5: Genotipa pravega kostanja Štjak: A – Štjak 1, B – Štjak 2

Drevesa s Primorske, Pedrovo in Štjak so bila stara več desetletij. Morfološko in fiziološko zelo stara, mogočna drevesa (slika 4 in 5).

Genotip iz Prekmurja z oznako MS je bil vegetativno razmnožen. V času nabiranja brstov je bilo drevo približno staro 10 let, bistveno mlajše od dreves Pedrovo in Štjak. Poganjki genotipa MS so imeli temno rjav les z oker lenticelami. Brsti so bili veliki 5-8 mm. Luskolisti so bili temni in so se tesno prilegali. Brsti so bili pod luskolisti oker zeleni, pri osnovi temnejši.

Genotip Rožnik je sejanec (generativno razmnožen), mlajše drevo iz naravnega rastišča. Po velikosti in izgledu sodeč je približno enako star kot genotip MS. Poganjki genotipa Rožnik so imeli temno rjav do rdečkast les z oker lenticelami. Brsti so bili veliki 4-6 mm. Luskolisti so bili temno rjavi. Brsti so bili pod luskolisti svetlo zeleni.

3.2 METODE DELA

3.2.1 Razkuževanje in inokulacija brstov na gojišče

V laboratoriju smo iz poganjkov odrezali brste, delno odstranili luskoliste in jih površinsko sterilizirali z 1,6 % dikloroizocianurno kislino z dodatkom nekaj kapljic močila Tween 20 in trikrat sprali z destilirano vodo. Podobno metodo v svojem diplomskem delu opiše tudi Zavrl Fras (2004). Po 10 brstov smo inokulirali na indukcijsko WPMi gojišče, ki je bilo sestavljeno iz makro- in mikroelementov ter vitaminov McCown Woody Plant Medium

(Lloyd in McCown, 1980) z dodatkom 20 g/l saharoze, 0,3 mg/ BAP in 0,1 mg/l NAA ter 7 g/l agarja . Približno po 2 do 4 tednih, ko so se brsti povečali in odvisno od razpiranja smo perspektivne brste subkultivirali na regeneracijsko WPMr gojišče, ki je bilo enako kot WPMi gojišče, razen manjše koncentracije BAP 0,1 mg/l in ni vsebovalo hormona NAA.

3.2.2 Sestava razmnoževalnega MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ gojišča

Razmnoževalno MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ gojišče kostanja je vsebovalo posamezne elemente in koncentracije makro- in mikroelementov, inozitola in saharoze enako kot MS gojišče (Murashige in Skoog, 1962) s polovično koncentracijo dveh nitratov (KNO₃ in NH₄NO₃). Koncentracija tiamina in hormona BAP ter pH vrednost so bile enake kot v literaturi Vieitez in sod. (1983). Dodan je bil še agar 7 g/l (preglednica 1).

Preglednica 1: Sestava MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ gojišča za razmnoževanje kostanja (Murashige in Skoog, 1962; Vieitez in sod., 1983)

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

Gojišče za koreninjenje je bilo v sestavinah in koncentracijah enako gojišču MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ razen hormona BAP, ki ga ni vsebovalo, dodan je bil hormon avksin IBA 0,5 mg/l in oglje 2 g/l.

3.2.3 Priprava razmnoževalnega MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ gojišča

Sestavine gojišč (makro- in mikroelemente, saharozo in inozitol) za vegetativno razmnoževanje kostanja smo stehtali in pretresli v čašo in jih prelili z bidestilirano vodo. Sestavine smo raztopili z mešanjem s teflonskim magnetom na električnem mešalniku. Iz založnih raztopin smo s pipetiranjem dodali vitamin, hormone in nekatere mikroelemente. V merilni bučki smo določili končni volumen gojišča, prelili nazaj v čašo ter določili pH vrednost. Gojišča smo prelili v steklenice (Scott-Duran), primerne za avtoklaviranje in dodali v gojišče agar.

Gojišča smo sterilizirali z avtoklaviranjem 20 minut pri temperaturi 121 °C in pritisku 1,1 bar. Ko se je gojišče ohladilo na približno 60 °C smo ga pretresli in v brezprašni komori po približno 25 ml nalili v sterilne plastične petrijevke premera 90 x 20 mm. Gojišče za koreninjenje smo približno 20 ml nalili v sterilne steklene kozarce 75 x 55 mm s polipropilenskim pokrovom. Gojišče se je ohladilo in strdilo pri sobni temperaturi.

Založne raztopine smo pripravili za sestavine, ki so bile dodane v gojišče v nizkih koncentracijah. Natančnost smo ohranili z mnogokratnikom zatehte in tehtanjem z analitsko tehtnico. Pripravili smo založne raztopine hormonov: BAP, NAA in IBA, vitamina tiamin in mikroelementov: kobaltov klorid, bakrov sulfat, kalijev jodid, natrijev molibdad, borova kislina, cinkov sulfat. Potrebno količino sestavine smo stehtali z mnogokratnikom deset ali sto, jo raztopili z vodo ali 1N HCl ter prelili v 100 ml bučko ter dolili destilirano vodo. Ko smo pripravljali gojišča smo preračunali iz koncentracije založne raztopine potrebno količino oz. volumen, ki smo ga dodali v gojišče. Tako smo ohranili natančnost koncentracije sestavin gojišča, ki jo pri običajnem tehtanju z navadno ali analitsko tehtnico ne bi mogli zagotoviti.

3.2.4 Subkultivacija poganjkov

Po regeneraciji poganjkov smo te nad bazo odrezali in jih subkultivirali na razmnoževalno MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ gojišče (preglednica 1) oz. primerne na MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ gojišče za koreninjenje brez hormona BAP in dodatkom 0,5 mg/l IBA ter 2 mg/l oglja (Murashige in Skoog, 1962; Vieitez in sod, 1983).

V obdobju poskusa so bile opravljene tri subkultivacije in bonitiranja na vsake 1-2 meseca. Poganjke velike približno 1 cm smo direktno subkultivirali na razmnoževalno MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ gojišče. Večje poganjke smo v predelu internodijev prerezali na nodijske izsečke in te subkultivirali na razmnoževalno gojišče z namenom pridobiti čim več poganjkov.

Vitalne poganjke velike približno 1,5 cm in več smo samo v prvi subkultivaciji inokulirali na MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ gojišče za koreninjenje.

3.2.5 Gojenje

Brste in poganjke smo gojili v rastni komori na temperaturi 22 ± 1 °C in 16 ur pri svetlobi in 8 ur v temi ter intenziteti svetlobe $40 \mu\text{E}/\text{m}^2 \text{ s}$.

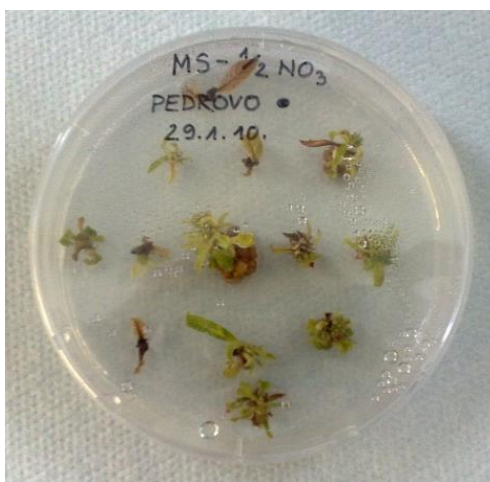
3.2.6 Bonitiranje in obdelava podatkov

Bonitiranje smo opravili pri vsaki subkultivaciji. V obdobju poskusa so bile opravljene tri subkultivacije sedmih genotipov pravega kostanja. Spremljali smo število nastalih poganjkov v skupkih oz. razmnožitev, število propadlih poganjkov, število poganjkov primernih za koreninjenje in nadaljnje razmnoževanje. Zbrane podatke smo uredili tabelarično in grafično ter jih predstavili z opisno statistiko.

4 REZULTATI

4.1 RAZMNOŽEVANJE

Razmnoževanje 7 genotipov pravega kostanja smo opravili v treh subkultivacijah v razmaku enega do dveh mesecev (slika 6).



Slika 6: *In vitro* razmnoževanje pravega kostanja

4.1.1 Genotip Pedrovo

Pri genotipu z oznako Pedrovo so bili brsti pobrani iz treh dreves z oznako 1, 2 in 3 (slika 4).

Genotip Pedrovo 1

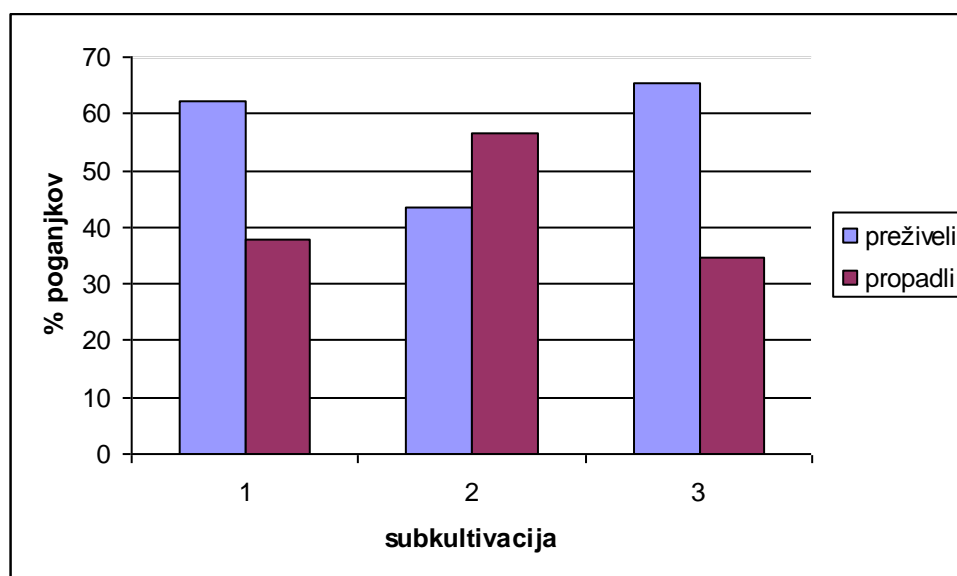
Preglednica 2: Število inokuliranih, propadlih, preživelih in nastalih poganjkov pravega kostanja genotip Pedrovo 1 v treh subkultivacijah

Subkultivacija	Število poganjkov			
	inokuliranih	propadlih	preživelih	nastalih
1	119	45	74	113
2	113	64	49	55
3	55	19	36	39

Pri genotipu Pedrovo 1 je bilo v prvi subkultivaciji inokuliranih 119 poganjkov, od teh je propadlo 45 oz. 37,8 % poganjkov, preživelih jih je 74 oz. 62,2 %. Preživele vitalne poganjke smo v predelu internodija razrezali na 113 nodijskih segmentov oz. izsečkov, ki so bili primerni za nadaljnjo subkultivacijo (preglednica 2, slika 7).

V drugi subkultivaciji je od 113 izsečkov propadlo 64 oz. 56,6 % in preživelih jih je 49 oz. 43,4 %. Preživele poganjke smo razrezali na 55 nodijskih izsečkov in jih subkultivirali na sveže razmnoževalno gojišče (preglednica 2, slika 7).

V zadnji, tretji subkultivaciji je propadlo 19 oz. 34,5 % poganjkov in preživelih jih je 36 oz. 65,5 % iz teh smo dobili 39 nodijskih izsečkov, ki smo jih subkultivirali na razmnoževalno gojišče (preglednica 2, slika 7).



Slika 7: Odstotek preživelih in propadlih poganjkov pravega kostanja genotip Pedrovo 1 v treh subkultivacijah

Največ 65,5 % preživelih poganjkov pri genotipu Pedrovo 1 je bilo v tretji subkultivaciji, nekoliko manj 62,2 % preživelih je bilo v prvi subkultivaciji, v drugi pa najmanj 43,4 %. V treh subkultivacijah je v povprečju propadlo 43 % poganjkov in preživelih jih je 57 % (preglednica 2, slika 7).

Genotip Pedrovo 2

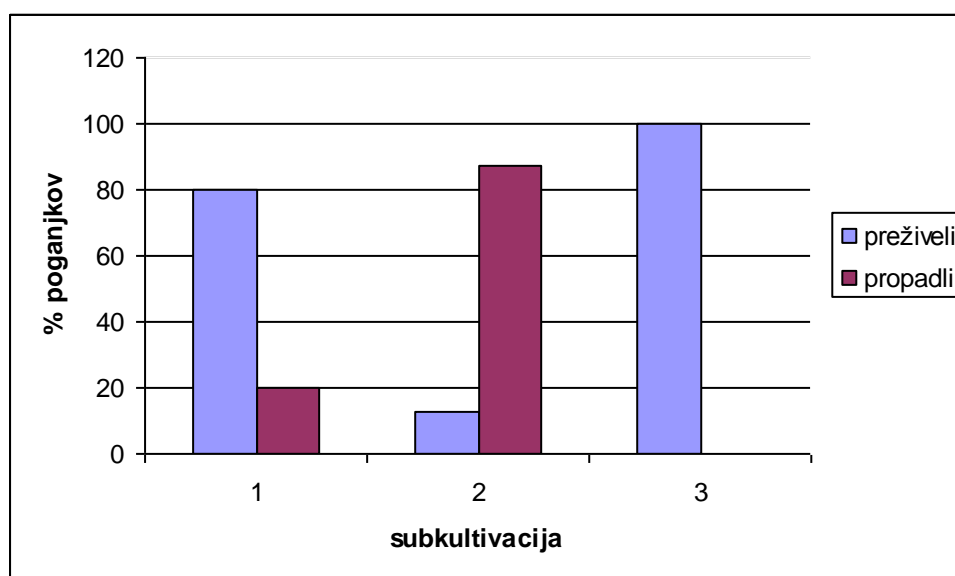
Preglednica 3: Število inokuliranih, propadlih, preživelih in nastalih poganjkov pravega kostanja genotip Pedrovo 2 v treh subkultivacijah

Subkultivacija	Število poganjkov			
	inokuliranih	propadlih	preživelih	nastalih
1	5	1	4	8
2	8	7	1	1
3	1	0	1	4

Pri genotipu Pedrovo 2 je bilo v prvi subkultivaciji inokuliranih 5 poganjkov, od teh je 1 propadel, preživelih pa so 4 oz. 80 %. Preživele poganjke smo razrezali na 8 nodijskih izsečkov in jih subkultivirali na razmnoževalno gojišče (preglednica 3, slika 8).

V drugi subkultivaciji je od 8 izsečkov propadlo 7 oz. 87,5 % poganjkov in 1 je preživel. Preživel poganjek smo odrezali pri bazi in ga direktno subkultivirali na sveže razmnoževalno gojišče (preglednica 3, slika 8).

V zadnji, tretji subkultivaciji je preživel 1 poganjek in noben ni propadel. Od enega preživelega smo dobili štiri nodijske izsečke za nadaljnjo subkultivacijo (preglednica 3, slika 8).



Slika 8: Odstotek preživelih in propadlih poganjkov pravega kostanja genotip Pedrovo 2 v treh subkultivacija

Pri genotipu Pedrovo 2 je v prvi subkultivaciji preživel 80 % poganjkov, v drugi pa od 8 poganjkov samo 1 in ta je v tretji subkultivaciji na razmnoževalnem gojišču oblikoval še 3 poganjke. V treh subkultivacijah je v povprečju propadlo 35,8 % poganjkov, preživel jih je 64,2 % (preglednica 3, slika 8).

Genotip Pedrovo 3

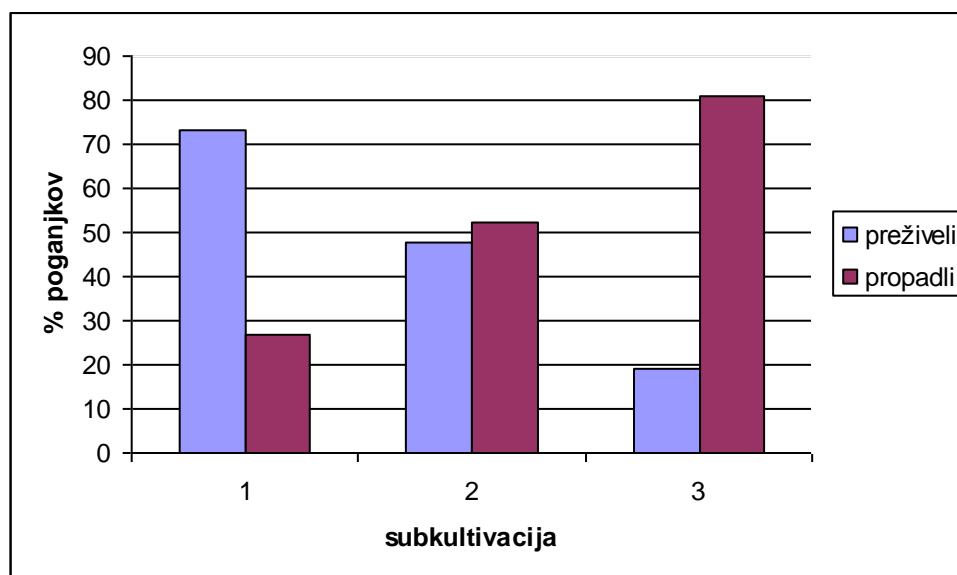
Preglednica 4: Število inokuliranih, propadlih, preživelih in nastalih poganjkov pravega kostanja genotip Pedrovo 3 v treh subkultivacijah

Subkultivacija	Število poganjkov			
	inokuliranih	propadlih	preživelih	nastalih
1	45	12	33	44
2	44	23	21	26
3	26	21	5	7

Pri genotipu Pedrovo 3 je bilo v prvi subkultivaciji inokuliranih 45 poganjkov, od teh je propadlo 12 oz. 26,7 % poganjkov, preživelo jih je 33 oz. 73,3 %. Preživele poganjke smo razrezali na 44 nodijskih izsečkov za nadaljnjo subkultivacijo (preglednica 4, slika 9).

V drugi subkultivaciji je od 44 poganjkov propadlo 23 oz. 52,3 % poganjkov in 21 oz. 47,7 % jih je preživelo. Preživele poganjke smo razrezali na 26 izsečkov in jih subkultivirali na razmnoževalno gojišče (preglednica 4, slika 9).

V zadnji, tretji subkultivaciji je propadlo 21 oz. 80,8 % poganjkov, preživelo jih je 5 oz. 19,2 %. Iz teh smo pripravili 7 izsečkov za nadaljnje razmnoževanje (preglednica 4, slika 9).



Slika 9: Odstotek preživelih in propadlih poganjkov pravega kostanja genotip Pedrovo 3

Pri genotipu Pedrovo 3 je bilo največ 73,3 % preživelih poganjkov v prvi subkultivaciji, v drugi jih je preživelo 47,7 % in v tretji le 19,2 %. V povprečju je v treh subkultivacijah propadlo 53,3 % poganjkov, preživelo jih je 46,7 % (preglednica 4, slika 9).

4.1.2 Genotip Štjak

Pri genotipu z oznako Štjak so bili brsti pobrani iz dveh dreves z oznako 1 in 2 (slika 5).

Pri genotipu Štjak 1 smo imeli zelo malo poganjkov od 2 do 6 in v vseh treh subkultivacijah so vsi preživeli (preglednica 5).

Genotip Štjak 1

Preglednica 5: Število inokuliranih, propadlih, preživelih in nastalih poganjkov pravega kostanja genotipov Štjak 1 v treh subkultivacijah

Subkultivacija	Število poganjkov			
	inokuliranih	propadlih	preživelih	nastalih
1	2	0	2	2
2	2	0	2	4
3	4	0	4	6

Pri genotipu Štjak 1 smo imeli zelo malo poganjkov od 2 do 6 in v vseh treh subkultivacijah so vsi preživeli (preglednica 5).

Genotip Štjak 2

Preglednica 6: Število inokuliranih, propadlih, preživelih in nastalih poganjkov pravega kostanja genotip Štjak 2 v treh subkultivacijah

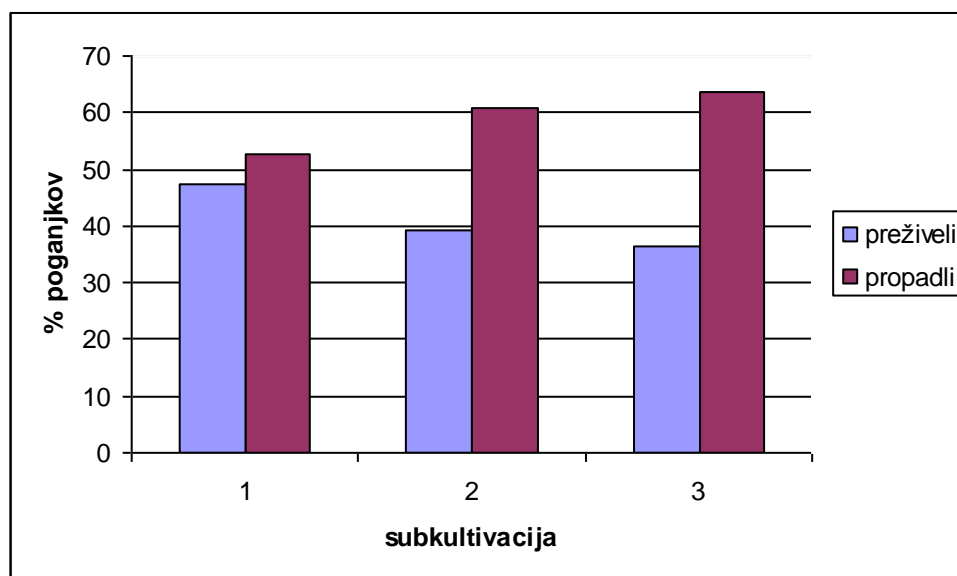
Subkultivacija	Število poganjkov			
	inokuliranih	propadlih	preživelih	nastalih
1	53	28	25	28
2	28	17	11	11
3	11	7	4	5

Pri genotipu Štjak 2 je bilo v prvi subkultivaciji inokuliranih 53 poganjkov, od teh je propadlo 28 oz. 52,8 % poganjkov, preživelo jih je 25 oz. 47,2 %. Vitalne poganjke smo razrezali na 28 nodijskih izsečkov in jih subkultivirali na razmnoževalno gojišče (preglednica 6, slika 10).

V drugi subkultivaciji je od 28 poganjkov propadlo 17 oz. 60,7 %, preživelo jih je 11 oz. 39,3 %. Preživeli poganjki se niso razraščali in se tudi niso bistveno podaljšali, zato smo jih samo nad bazo odrezali in direktno subkultivirali na sveža razmnoževalno gojišče (preglednica 6, slika 10).

V zadnji, tretji subkultivaciji je propadlo 7 oz. 63,6 % poganjkov, preživeli so 4 oz. 36,4 % poganjkov, 5 nodijskih izsečkov je bilo subkultiviranih na razmnoževalno gojišče (preglednica 6, slika 10).

Pri genotipu Štjak 2 je odstotek preživelih poganjkov z vsako subkultivacijo rahlo padal. V prvi subkultivaciji je preživelo največ 47,2 % poganjkov, v drugi 39,2 % in v tretji najmanj 36,4 %. V povprečju je v treh subkultivacijah propadlo 59 % poganjkov, preživelo jih je 41 % (preglednica 6, slika 10).



Slika 10: Odstotek preživelih in propadlih poganjkov pravega kostanja genotip Štjak 2

4.1.3 Genotip MS

Pri genotipu z oznako MS so bili brsti pobrani z enega predhodno že mikropropagiranega drevesa.

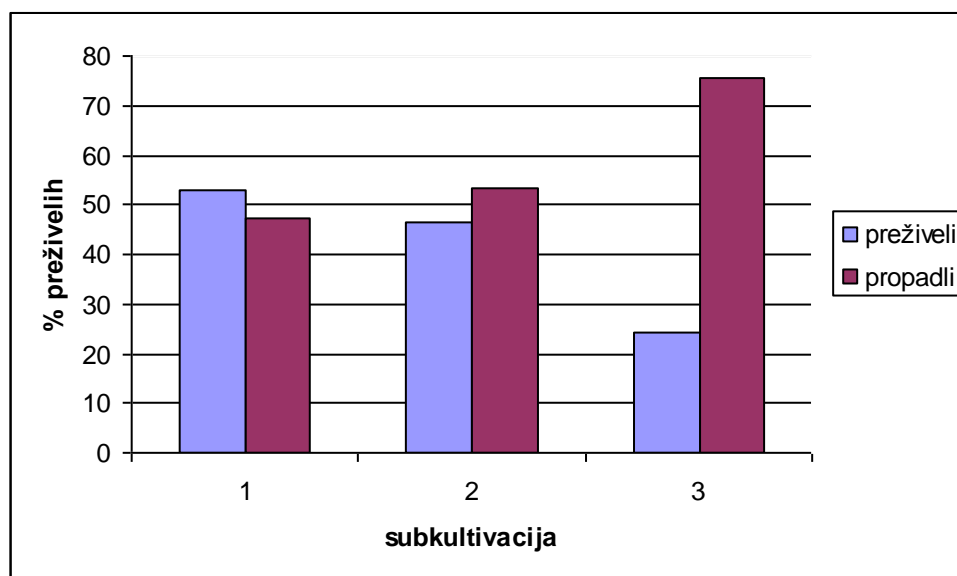
Preglednica 7: Število inokuliranih, propadlih, preživelih in nastalih poganjkov pravega kostanja genotip MS v treh subkultivacijah

Subkultivacija	Število poganjkov			
	inokuliranih	propadlih	preživelih	nastalih
1	106	50	56	60
2	60	32	28	41
3	41	31	10	12

Pri genotipu MS je bilo v prvi subkultivaciji inokuliranih 106 poganjkov, od teh je propadlo 50 oz 47,2 %, preživelo jih je 56 oz. 52,8 %. Preživele vitalne poganjke smo razrezali na 60 nodijskih izsečkov za nadaljnjo subkultivacijo (preglednica 7, slika 11).

V drugi subkultivaciji je od 60 poganjkov propadlo 32 oz. 53,4 %, preživelo jih je 28 oz. 46,6 %. Preživele poganjke smo razrezali na 41 nodijskih izsečkov in jih subkultivirali na razmnoževalno gojišče (preglednica 6, slika 11).

V zadnji, tretji subkultivaciji je propadlo 31 oz. 75,6 % poganjkov, preživelo jih je 10 oz. 24,4 %. Iz teh smo pripravili 12 izsečkov za nadaljnjo subkultivacijo (preglednica 6, slika 11).



Slika 11: Odstotek preživelih in propadlih poganjkov pravega kostanja genotip MS

Ravno tako kot v subkultivacijah genotipa Štjak 2, se upadanje odstotka preživelih poganjkov pojavi tudi pri genotipu MS. V prvi subkultivaciji je preživel največ 52,8 % poganjkov, v drugi 46,6 % in v tretji samo 24,4 %. V povprečju je v treh subkultivacijah propadlo 58,7 % poganjkov, preživel jih je 41,3 % (preglednica 6, slika 11).

4.1.4 Genotip Rožnik

Pri genotipu z oznako Rožnik so bili brsti pobrani z enega mladega generativno razmnoženega drevesa.

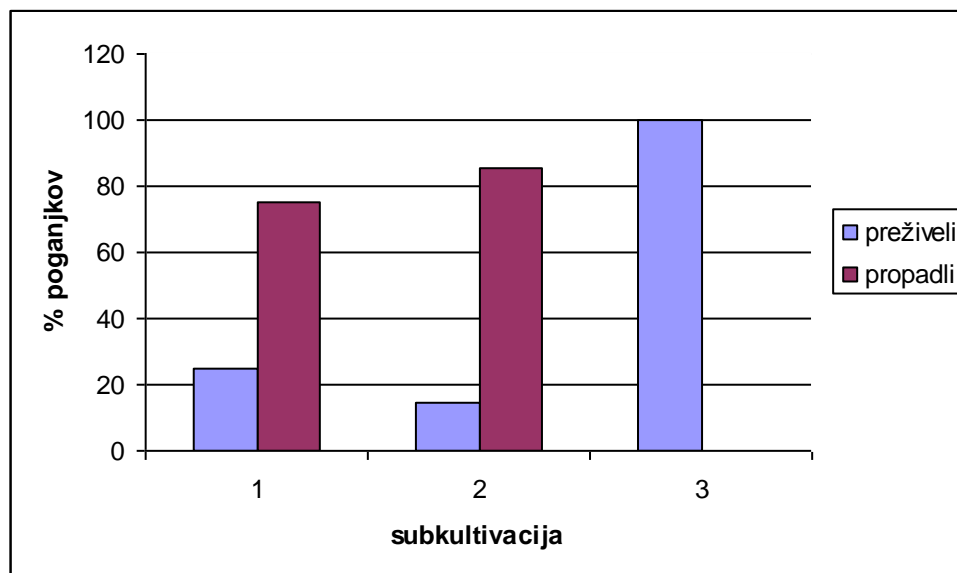
Preglednica 8: Število inokuliranih, propadlih, preživelih in nastalih poganjkov pravega kostanja genotip Rožnik v treh subkultivacijah

Subkultivacija	Število poganjkov			
	inokuliranih	propadlih	preživelih	nastalih
1	16	12	4	7
2	7	6	1	2
3	2	0	2	2

Pri genotipu Rožnik je bilo v prvi subkultivaciji inokuliranih 16 poganjkov, od teh je propadlo 12 oz. 75 %, preživeli so 4 oz. 25 %. Preživele vitalne poganjke smo razrezali na 7 nodijskih izsečkov za nadaljnjo subkultivacijo (preglednica 8, slika 12).

V drugi subkultivaciji je od 7 poganjkov propadlo 6 oz. 85,7 %, en je preživel. Preživeli poganjek smo razrezali na dva nodijska izsečka in ju subkultivirali na sveže razmnoževalno gojišče (preglednica 8, slika 12).

V zadnji, tretji subkultivaciji sta preživela oba poganjka, ki smo ju odrezali nad bazo in ju predstavili na sveže razmnoževalno gojišče (preglednica 8, slika 12).



Slika 12: Odstotek preživelih in propadlih poganjkov pravega kostanja genotip Rožnik

Od vseh proučevanih genotipov je bil pri genotipu Rožnik najmanjši odstotek preživelih poganjkov v treh subkultivacijah. V prvi subkultivaciji je preživelo le 25 % poganjkov in v drugi samo 14,3 %. V tretji subkultivaciji je bil odstotek preživelih poganjkov sicer 100 %, vendar je bil v tretjo subkultivacijo prestavljen le en poganjek iz druge subkultivacije. V povprečju je v treh subkultivacijah propadlo 53,6 % poganjkov, preživelo jih je 46,4 % (preglednica 8, slika 12).

4.2 MNOŽITVENI INDEKS

Preglednica 9: Množitveni indeks 7 genotipov pravega kostanja

Oznaka genotipa	Subkultivacija			Povprečje
	1	2	3	
Pedrovo 1	1,52	1,12	1,08	1,2
Pedrovo 2	2	1	1,33	1,4
Pedrovo 3	1,3	1,2	1,4	1,3
Štjak 1	2	1	1,2	1,4
Štjak 2	1,12	1	1,25	1,1
MS	0,93	1,46	1,2	1,2
Rožnik	1,75	2	1	1,6



Slika 13: Poganjki pravega kostanja nastali iz nodijskega izsečka na razmnoževalnem gojišču

V povprečju se je največ 1,6 poganjkov razvilo pri genotipu Rožnik, nekoliko manj 1,4 poganjki pri genotipu Pedrovo 2 in Štjak 1. Pri genotipu Pedrovo 3 so se razvili 1,3 poganjki in pri genotipih Pedrovo 1 in MS 1,2 poganjka. Najmanj, samo 1,1 poganjek se je razvil pri genotipu Štjak 2 (preglednica 9 in slika 13).

4.3 KORENINJENJE

Preglednica 10: Število preživelih poganjkov, primernih za koreninjenje in razmnoževanje 7 genotipov pravega kostanja v prvi subkultivaciji

Oznaka genotipa	Preživelih	Primerni za	
		koreninjenje	razmnoževanje
Pedrovo 1	74	4	70
Pedrovo 2	4	1	3
Pedrovo 3	33	0	33
Štjak 1	2	0	2
Štjak 2	25	0	25
MS	56	23	33
Rožnik1	4	1	3

Poganjke, ki so bili primerni za koreninjenje smo na gojišče za koreninjenje prestavili le v prvi subkultivaciji, saj je bilo koreninjenje v celoti neuspešno in smo se odločili, da poganjke prestavimo nazaj na gojišča za razmnoževanje.

Največje število poganjkov primernih za koreninjenje je bilo pri genotipu MS in sicer kar 23. Pri ostalih genotipih so bili primerni za koreninjenje le od 1 do 4 poganjki. Pri genotipu Pedrovo 3, Štjak 1 in Štjak 2 noben od nastalih poganjkov ni bil primeren za koreninjenje (preglednica 10).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V poskus *in vitro* razmnoževanja smo vključili 7 genotipov pravega kostanja (*Castanea sativa* Mill.) z oznakami: Pedrovo 1, Pedrovo 2, Pedrovo 3, Štjak 1, Štjak 2, MS in Rožnik. Nabrali smo jih na naravnih rastiščih Primorske (pet genotipov), Prekmurja (en genotip) in Ljubljane-Rožnik (en genotip). Vsi, razen genotipa Rožnik, so ocenjeni kot kakovostni glede plodov. Izbrali smo eno- in dvoletne poganjke ter v laboratoriju odrezali brste, delno odstranili luskoliste in jih površinsko sterilizirali z 1,6 % dikloroizocianurno kislino z dodatkom nekaj kapljic močila Tween 20. Inokulirali smo jih na indukcijsko WPMi gojišče (Lloyd in McCown, 1980) in ko so se povečali in nekateri začeli razpirati smo jih subkultivirali na regeneracijsko WPMr gojišče in razvite poganjke na razmnoževalno MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ gojišče (Murashige in Skoog, 1962; Vietez in sod., 1983) (preglednica 1). Vitalne in dovolj velike poganjke smo v prvi subkultivaciji inokulirali na gojišče za koreninjenje. Spremljali smo preživelost poganjkov in množitveni indeks ter koreninjenje.

5.1.1 Razmnoževanje poganjkov

Med preživeli poganjki so bili najboljši za nadaljnje razmnoževanje vitalni in tudi rahlo vitrificirani poganjki.

Razmnoževalno MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ gojišče se je izkazalo kot primerno za razmnoževanje, kljub majhni preživelosti, ki je nihala od 41 do 64,2 % in majhnemu množitvenemu indeksu, ki je nihal od 1,1 do 1,6 poganjkov na izseček.

Avtorji Soyulu in Ertürk (1999) ter Ballester in sod. (2001) so ugotovili, da ni mogoče podati nekega splošnega gojišča za mikropropagacijo kostanja. Poudarjajo, da je uspeh mikropropagacije odvisen od genotipa in starosti matične rastline in da je potrebno prilagoditi gojišče za posamezni genotip. Tudi v našem poskusu sta preživetje poganjkov in množitveni indeks nihala med genotipi in tudi med posameznimi subkultivacijami.

5.1.2 Koreninjenje poganjkov

Največje in najvitalnejše poganjke genotipov Pedrovo 1 (4 poganjki), Pedrovo 2 (1 poganjek), MS (23 poganjkov) in Rožnik (1 poganjek) smo predstavili na gojišče za koreninjenje, kjer pa smo bili neuspešni. Pri vseh genotipih s primernimi poganjki smo to poskusili le v prvi subkultivaciji, vendar nobeden od poganjkov ni tvoril korenin, zato smo jih pri naslednji subkultivaciji predstavili nazaj na gojišče za razmnoževanje. Genotipi Pedrovo 3, Štjak 1 in Štjak 2 v prvi subkultivaciji niso oblikovali primernih poganjkov za koreninjenje. Evropski kostanj (*Castanea sativa*) se v tkivni kulturi zelo težko korenini. Redke so objave, ki bi poročale o uspešnem *in vitro* koreninjenju evropskega pravega

kostanja. Avtorji Serres in sod. (1990); Congalves in sod. (1998); Carvalho in Amancio (2002); Tetsumura in Yamashita (2004); Concalves in Diogo (2008), ki poročajo o dobrem *in vitro* koreninjenju, navajajo to za japonski kostanj (*Castanea crenata*) in ameriški kostanj (*Castanea dentata*) oz. za križance med japonskim in evropskim kostanjem.

5.2 SKLEPI

Razmnoževalno MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ gojišče z 0,5 mg/l BAP se je izkazalo za kar primerno gojišče za razmnoževanje sedmih genotipov pravega kostanja, saj noben od vključenih genotipov v postopku razmnoževanja ni propadel.

Povprečna preživelost poganjkov je nihala od 41 do 64,2 %, odvisno od genotipa in subkultivacije.

Povprečni množitveni indeks je nihal od 1,1 do 1,6 poganjkov na izseček, kar je za mikrorazmnoževanje lesnatih rastlin povprečni dosežek.

Gojišče MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ z dodanim avksinom IBA 0,5 mg/l in ogljem 2 g/l je neprimerno za koreninjenje, saj na tem gojišču noben poganjek ni odgnal korenin.

6 POVZETEK

Pravi kostanj (*Castanea sativa* Mill.) je gozdna in sadna vrsta, ki je bila nekoč bolj razširjena v Sredozemlju in drugje po Evropi kot v Sloveniji. Leta 1950 so se v Sloveniji površine zmanjšale za polovico, predvsem zaradi gliv *Cryphonetria parasitica*, ki povzroča kostanjev rak in *Phytophthora cambivora*, ki povzroča črnolovko - trohnenje lesa, rjavenje mladih poganjkov in listov. Sedaj pa so kostanji zelo na udaru zaradi škodljivca kostanjeve šiškarice (*Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu), ki je bila odkrita leta 2005 na Primorskem in potrjene že skoraj v vseh večjih sestojih po Sloveniji.

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

Problem pri cepljenju kostanja je neskladje podlage in cepiča. Pri potaknjencih je pogosto velik problem fiziološka starost matičnih rastlin. S tehnikami tkivnih kultur lahko fiziološko stari material pomladimo in s tem dobimo material, ki bi se lahko lažje in hitreje koreninil.

Cilj naloge je bil razmnožiti čim več vitalnih poganjkov, ki bi bili sposobni oblikovati močan koreninski sistem in bi bili primerni za sajenje *in vivo*.

V poskus smo vključili 7 genotipov pravega kostanja z oznakami: Pedrovo 1, Pedrovo 2, Pedrovo 3, Štjak 1, Štjak 2, MS in Rožnik. Genotipi so iz naravnih rastišč in se razlikujejo po starosti. Genotipi Pedrovo in Štjak so stara drevesa več desetletij, medtem ko sta genotipa MS in Rožnik mlajša, v času nabiranja brstov stara približno 10 let. Eno- in dvoletne poganjke z zimskimi brsti smo nabrali zgodaj spomladi marca in aprila 2009. V laboratoriju smo odrezali brste, odstranili zunanje luskoliste in jih razkužili z 1,6 % dikloroizocianurno kislino. Po spiranju smo jih inokulirali na indukcijsko WPMi gojišče (Lloyd in McCown, 1980), ko so se povečali in začeli razpirati smo jih predstavili na regeneracijsko WPMr gojišče. Nastale poganjke smo na vsakih 1 do 2 meseca subkultivirali na razmnoževalno MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ gojišče (Murashige in Skoog, 1962; Vietez in sod., 1983) (preglednica 1). Opravili smo tri subkultivacije, pri prvi tudi koreninjenje.

Poganjke, ki so bili manjši od 0,5 cm, smo odrezali nad bazo in jih direktno subkultivirali na razmnoževalno MS- $\frac{1}{2}$ NO₃ gojišče. Poganjke, ki so bili veliki 0,5-1,5 cm, smo razrezali na nodijske izsečke, z namenom pridobiti čim več poganjkov primernih za nadaljnje razmnoževanje. Poganjke večje kot 1,5 cm smo odrezali nad bazo in jih direktno subkultivirali na gojišče za koreninjenje. Poskus koreninjenja smo opravili pri genotipih Pedrovo1, Pedrovo 2, MS in Rožnik. Nobeden od poganjkov navedenih genotipov ni razvil

korenin, zato smo jih pri naslednji subkultivaciji prenesli nazaj na sveža gojišča za razmnoževanje.

Pri genotipu Pedrovo 1 je v povprečju v treh subkultivacijah na razmnoževalnem gojišču preživel 57 % poganjkov s povprečnim množitvenim indeksom 1,2 poganjka na izseček. Pri genotipu Pedrovo 2 je v povprečju preživel 64,2 % s povprečnim množitvenim indeksom 1,4 poganjka na izseček. Pri genotipu Pedrovo 3 je v povprečju preživel 46,7 % s povprečnim množitvenim indeksom 1,3 poganjka na izseček. Pri genotipu Štjak 1 so preživeli vsi nastali poganjki, ki pa jih je bilo zelo malo od 2 do 6, odvisno od subkultivacije z množitvenim indeksom 1,4. Pri genotipu Štjak 2 je odstotek preživelih poganjkov z vsako subkultivacijo rahlo padal. V povprečju je preživel 41 % poganjkov s povprečnim množitvenim indeksom 1,2 poganjka na izseček. Pri genotipu MS je v povprečju preživel 41,3 % poganjkov s povprečnim množitvenim indeksom 1,2 poganjka na izseček. Pri genotipu Rožnik je v povprečju preživel 46,4 % s povprečnim množitvenim indeksom 1,6 poganjka na izseček.

7 VIRI

- Adamič F. 1995. Kmetijski tehniški slovar. Sadjarstvo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 68 str.
- Anić M., Košanin N., Nikolovski T., Sučić J., Wraber M. 1959. Pitomi kesten. V: Šumarska enciklopedija 1, A-Kos. Horvat I. (ur.) Zagreb, Leksikografski zavod FNRJ: 728-730
- Babnik M. 1992. Sadno drevje: sajenje, gojenje in rez. Ljubljana, Kmečki glas: 118 str.
- Ballester A., Bourrain L., Corredoira E., Gonclves J.C., Le C., Fontaina M.E.M., San Jose M., Sauer U., Vieitez A.M., Wilhelm E. 2001. Improving chestnut micropropagation through axillary shoot development and somatic embryogenesis. *Forest Snow and Landscape Research*, 76, 3: 460–467
- Bohanec B. 1992. Tehnike rastlinskih tkivnih kultur. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 168 str.
- Bulatović S. 1983. Savremeno voćarstvo. Beograd, Nolit: 478 str.
- Carvalho L., Amancio S. 2002. Effect of ex vitro conditions on growth and acquisition of autotrophic behaviour during the acclimatisation of chestnut regenerated in vitro. *Scientia Horticulturae*, 95: 151-164
- Congalves J.C., Diogo G., Amancio S. 1998. In vitro propagation of chestnut (*Castanea sativa* x *C. crenata*): Effects of rooting treatments on plant survival, peroxidase activity and anatomical changes during adventitious root formation. *Scientia Horticulturae*, 72: 265-275
- Concalves J.C., Diogo G. 2008. Quantitation of endogenous levels of IAA, IAAsp and IBA in micro-propagated shoots of hybrid chestnut pre-treated with IBA. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 44: 412-418
- Eleršek L. 2001. Knjiga o gozdu: o njegovem pomenu, lepoti, podrobnosti in sestavi. Ljubljana, samozaložba: 142 str.
- Fabčič S. 1997. Vpliv podlag na uspeh cepljenja pravega kostanja (*Castanea sativa* Mill.). Višješolska diplomska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 46 str.
- Godec B., Hudina M., Ileršič J., Koron D., Solar A., Usenik V., Vesel V. 2003. Kostanj – evrojaponski križanci (*Castanea sativa* x *Castanea crenata*). V: Sadni izbor za Slovenijo 2002. Krško, Revija za sadjarstvo, vinogradništvo in vinarstvo: 126-127

- Jurc M., Reščič M. 2013. Občutljivost sort evrojaponskega kostanja (*Castanea sativa* x *Castanea crenata*) na kostanjev rak (*Cryphonectria parasitica*), ambrozijskega podlubnika (*Xylosandrus germanus*) in kostanjevo šiškario (*Dryocosmus kuriphilus*). Varstvo gozdov Slovenije. Novice iz varstva gozdov, 6: 12-13
<http://www.zdravgozd.si/nvg/prispevek.aspx?idzapis=6-6> (8.9.2014)
- Katalinić J. 1973. Pčelarstvo. Zagreb, Nakladni zavod Znanje: 585 str.
- Kotar M., Brus R. 1999. Naše drevesne vrste. Ljubljana, Slovenska matica: 320 str.
- Kos K., Trdan S. 2010. Biotično zatiranje kostanjeve šiškario (*Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu, Hymenoptera, Cynipidae). Acta agriculture Slovenica, 95: 89-96
- Lloyd G., McCown B. 1980. Commercially feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Combined Proceedings - International Plant Propagator`s Society, 30: 421-427
- Mlakar J. 1990. Dendrologija - drevesa in grmi Slovenije. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 164 str.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497
- Ogris N. 2010. Priročnik za določevanje vzrokov poškodb drevja: medmrežna različica. Gozdarski inštitut Slovenije, <http://www.zdravgozd.si> (6.11.2012)
- Osterc G. 2004. Pomen mikrorazmnoževanja pri masovnem razmnoževanju lesnatih (sadnih) rastlin: vodilna metoda drevesničarske proizvodnje v prihodnje? V: Zbornik referatov 1. slovenskega sadjarskega kongresa z mednarodno udeležbo, Krško, 24. – 26. marec 2004. Hudina M.(ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Katedra za sadjarstvo: 593-599
- Perko F. 1995. Gojenje gozdov: ekologija, nega in varovanje. Ljubljana, Kmečki glas: 226 str.
- Petauer T. 1993. Leksikon rastlinskih bogastev. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 684 str.
- Piagnani C., Eccher T. 1988. Factors affecting the proliferation and rooting of chestnut *in vitro*. Acta Horticulturae, 227: 384-386
- Podjavoršek A. 1999. Pomološka proučitev in vrednotenje genetske variabilnosti pravega kostanja (*Castanea sativa* Mill.) v Sloveniji. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 95 str.

- Sanchez M., Carmen San-Jose M., Ferro E., Ballester A., Vieitez M.A. 1997. Improving micropropagation conditions for adult-phase shoots of chestnut. *Journal of Horticultural Science*, 72, 3: 433-443
- Sancin V. 1988. Sadje z našega vrta. Trst, Založništvo tržaškega tiska: 376 str.
- Seljak G. 2007. Kostanjeva šiškarica (*Dryocosmus kuriphilus* Yasumatsu). *Gozdarski vestnik*, 65, 4: 234-237
- Serres R., Read P., Hackett W., Nissen P. 1990. Rooting of American chestnut microcuttings. *Journal of Environmental Horticulture*, 8, 2: 86-88
- Solar A. 2001a. Lupinarji: kostanj - splošni del. Gradivo za predavanja, strokovni študij, Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 2 str.
- Solar A. 2001b. Lupinarji - tehnologija pridelave: Kostanj. Gradivo za predavanje pri predmetu Sadjarstvo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 5 str.
- Soylu A., Ertürk U. 1999. Researches on micropropagation of chestnut. V: *Proceedings 2nd International Symposium of Chestnut*. Salesses G. (ur.). *Acta Horticulturae*, 494: 247-253
- Šiftar A. 1999. Cepljenje bukovk. *Moj mali svet*, 31, 11: 19
- Šiftar A. 2001. Avtovegetativno razmnoževanje rastlin - gradivo za predavanja pri predmetu Okrasne rastline. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 12 str.
- Štampar F. 2002. Gojitvene oblike in rez sadnih rastlin. Ljubljana, Kmečki glas: 109 str.
- Štampar F. 2004. Sadjarstvo danes in jutri. V: *Zbornik referatov 1. slovenskega sadjarskega kongresa z mednarodno udeležbo*, Hudina M. (ur.), Krško, 24.-26. marec 2004. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Katedra za sadjarstvo: 200-204
- Tetsumura T., Yamashita K. 2004. Micropropagation of Japanese chestnut (*Castanea crenata* Sieb. et Zucc.) seedlings. *HortScience*, 39, 7: 1684-1687
- Vannini A., Vettraino A. 2011. *Phytophthora cambivora*
<http://forestphytophthoras.org/species/cambivora?screen=disease> (2.11.2012)
- Vieitez M.A., Ballester A., Vieitez L.M., Vieitez E. 1983. *In vitro* plantlet regeneration of mature chestnut. *Journal of Horticultural Science*, 58, 4: 457-463
- Villani F., Eriksson G. 2004. CASCADE project on European chestnut (*Castanea sativa*). *IPGRI Newsletter for Europe*, 28: 3

Zavod za gozdove Slovenije. Razširjenost kostanja. 2005.

http://www.zgs.gov.si/fileadmin/zgs/main/img/CE/varstvo/Varstvo_pred_podlubniki/4_Slika_karta_SLO_kostanj.jpg (5.11.2012)

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

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Zlati Luthar za veliko pomoč in strokovnost pri pisanju diplomske naloge, za njeno potrpežljivost in čas ki mi ga je posvetila. Najlepše se zahvaljujem recenzentoma prof. dr. Gregorju Ostercu in prof. dr. Marijani Jakše za pregled naloge.

Zahvaljujem se mojim staršem za podporo in finančno pomoč pri študiju, ter moji sestri za vso pomoč in svetovanje.

Zahvala gre tudi mojemu fantu za vse spodbudne besede in potrpljenje.