

VZGOJA KAKOVOSTNEGA RAZMNOŽEVALNEGA MATERIALA ČESNA SORTE 'PTUJSKI JESENSKI'

Mojca VIRŠČEK MARN¹, Irena MAVRIČ PLEŠKO², Kristina UGRINOVIĆ³,
Mojca ŠKOF⁴, Elizabeta KOMATAR⁵

¹⁻⁵Kmetijski inštitut Slovenije, Ljubljana

IZVLEČEK

Ponudba česna lokalnih sort v Sloveniji ne zadostuje povpraševanju. Še posebno pereča je slaba oskrba s kakovostnim semenskim materialom slovenskih sort. V okviru ciljnega raziskovalnega projekta smo zato preizkušali različne tehnike za vzgojo kakovostnega razmnoževalnega materiala česna sorte 'Ptujski jesenski'. Laboratorijsko testiranje rastlin te sorte s serološkimi testi (DAS- in TAS-ELISA) na OYDV (*Onion yellow dwarf virus*), LYSV (*Leek yellow stripe virus*), GarCLV (*Garlic common latent virus*), SLV (*Shallot latent virus*), GarV-A (*Garlic virus A*), GarV-B (*Garlic virus B*), GarV-C (*Garlic virus C*) in ShVX (*Shallot virus X*) je pokazalo visoko stopnjo okuženosti dveh izvorov razmnoževalnega materiala. Za poskus vzgoje brezvirusnih rastlin sorte 'Ptujski jesenski' smo uvedli *in vitro* razmnoževanje te sorte iz meristemov in to tehniko kombinirali s termoterapijo. Učinkovitost eliminacije virusov je bila izredno nizka, zato je zelo pomembno, da za nadaljnje razmnoževanje ali eliminacijo virusov izberemo rastline, ki so okužene s čim manjšim številom virusov. V ta namen potrebujemo zanesljivo vzorčenje in občutljive metode detekcije. Naše raziskave kažejo, da je za zgodnje preverjanje uspeha eliminacije OYDV, GarCLV in LYSV v tkivni kulturi nujna uporaba molekularnih metod, ki so bolj občutljive od seroloških metod. Na podlagi rezultatov projekta in pridobljenih izkušenj bomo v kratkem izdelali shemo vzdrževalne selekcije za lokalne sorte česna.

Ključne besede: česen, detekcija, lokalne sorte, kultura meristema, termoterapija, virusi

ABSTRACT

PRODUCTION OF HIGH QUALITY PROPAGATION MATERIAL OF GARLIC VARIETY 'PTUJSKI JESENSKI'

¹ dr. agr. znan., znanstvena svetnica, Hacquetova ulica 17, SI-1000 Ljubljana, e-pošta: mojca.marn@kis.si

² dr. mikrobiol., višja znanstvena sodelavka, prav tam

³ dr. agr. znan., višja strokovno raziskovalna sodelavka, prav tam

⁴ univ. dipl. inž. agr., vodilna strokovna sodelavka, prav tam

⁵ inž. kmet., tehnična sodelavka, prav tam

Slovenian production of local garlic varieties does not meet the demand. The supply of high-quality and healthy propagating material of Slovenian varieties is especially critical. Laboratory testing for the presence of OYDV (*Onion yellow dwarf virus*), LYSV (*Leek yellow stripe virus*), GarCLV (*Garlic common latent virus*), SLV (*Shallot latent virus*), GarV-A (*Garlic virus A*), GarV-B (*Garlic virus B*), GarV-C (*Garlic virus C*) and ShV-X (*Shallot virus X*) using serological methods (DAS- and TAS-ELISA) showed high infection rate of plants raised from two propagation material batches of local variety 'Ptujski jesenski'. Meristem culture and *in vitro* multiplication of the variety 'Ptujski jesenski' were introduced and combined with thermotherapy in the attempt to produce virus-free material. Virus elimination rate showed to be very low. The selection of material to be used for further multiplication or elimination of viruses is therefore critical. Reliable sampling and sensitive detection techniques need to be used for this purpose. Our results show that molecular methods need to be used for reliable early detection of OYDV, GarCLV and LYSV in *in vitro* plants after the use of elimination techniques. Based on our experience and project results maintenance selection system for the local varieties will be prepared in near future.

Key words: garlic, detection, local varieties, meristem culture, thermotherapy, viruses

1 UVOD

111

Zaradi vegetativnega razmnoževanja in neustrezne vzdrževalne selekcije so slovenske sorte česna vse bolj okužene z različnimi virusi in drugimi škodljivimi organizmi, ki zmanjšujejo njihovo kakovost. Česen okužujejo številni virusi. Najpogostejši so virusi iz rodov *Potyvirus* (*Onion yellow dwarf virus* (OYDV) in *Leek yellow stripe virus* (LYSV)), *Carlavirus* (*Garlic common latent virus* (GarCLV) in *Shallot latent virus* (SLV)) in *Allexivirus* (*Garlic virus A* (GarV-A), *Garlic virus B* (GarV-B), *Garlic virus C* (GarV-C) in *Shallot virus X* (ShVX)). Potiviruse in karlaviruse, ki okužujejo česen, prenašajo listne uši, aleksiviruse pa pršice šiškarice. V naravi so rastline česna navadno okužene s kompleksom virusov.

Razni raziskovalci poročajo o do 69 % izgubah pridelka zaradi okužbe z OYDV in do 54 % zaradi okužbe z LYSV (Perotto in sod., 2010). Argentinski raziskovalci (Cafrune in sod., 2006) so pri preučevanju vpliva posamične okužbe z GarV-A ali GarV-C in hkratne okužbe z obema virusoma ugotovili, da se je zaradi okužbe z GarV-A masa čebulic zmanjšala od 14 do 32 %. Zmanjšanje mase čebulic se je razlikovalo med leti in sortami. Masa čebulic rastlin okuženih z GarV-C se je statistično značilno zmanjšala le pri eni sorti in v enem od obeh let preučevanja. Masa čebulic rastlin okuženih z dvema virusoma je bila z izjemo ene sorte v prvem letu preučevanja vedno statistično značilno nižja od brezvirusne kontrole in posamično okuženih rastlin. Največje znižanje mase so opazili pri sorti Blanco-IFFIVE, pri kateri se je masa zmanjšala za 61 %. Podobne rezultate kot Cafrune in sod. (2006) so Lunello in sod. (2007) dobili pri primerjavi rastlin okuženih z LYSV z brezvirusnimi rastlinami in rastlinami, okuženimi s kompleksom petih virusov. Ista skupina raziskovalcev (Perotto in sod., 2010) je tudi ugotovila, da je pridelok česna pri

rastlinah, ki so bile v začetku štiriletnega preučevanja na prostem okužene z vsaj enim aleksivirusom, upadal hitreje kot pri rastlinah, ki so bile ob začetku poskusa zdrave. Za eliminacijo virusov najpogosteje uporabljamo kulturo meristemov, samo ali v kombinaciji s termoterapijo in/ali kemoterapijo (Bohanec, 1992). Nekateri raziskovalci so dosegli dobre uspehe pri eliminaciji virusov, drugi spet ne, saj na uspeh razen uporabljenih postopkov vplivajo še drugi dejavniki, kot so izolat virusa, genotip matične rastline (Katis in sod., 2012), fiziološko stanje gostiteljske rastline, vir in velikost meristema.

V prispevku predstavljamo testiranja in uporabo raznih tehnik za eliminacijo virusov iz slovenske sorte česna 'Ptujski jesenski', ki smo jih opravili v okviru Ciljnega raziskovalnega projekta z naslovom Vzpostavitev sistema vzdrževalne selekcije in pridelave semenskega materiala sort kmetijskih rastlin za sonaravne oblike kmetovanja.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Rastlinski material

Za vzgojo rastlin sorte 'Ptujski jesenski' v rastlinjaku smo uporabili stroke dveh različnih pakiranj iste partije dobavitelja Semenarna Ljubljana d.d. V prvem pakiranju so bile izbrane le velike čebulice s premerom nad 55 mm (v nadaljevanju pakiranje 1), v drugem pakiranju pa so bile čebulice običajne velikosti (v nadaljevanju pakiranje 2). Vsak strok smo posadili v svoj lonček in ob sajenju zabeležili oceno velikosti posameznih strokov (M = majhen strok, S = srednje velik strok, V = velik strok). Stroke posamezne čebulice smo posadili zaporedoma od zunanjega stroka navznoter in zabeležili pripadnost strokov posamezni čebulici in zaporedje sajenja strokov.

2.2 Metode za detekcijo virusov

Vzorci smo testirali s serološko metodo (DAS oz. TAS- ELISA) s protitelesi za OYDV, LYSV, GarCLV, SLV, GarV-A, GarV-B, GarV-C in ShVX po navodilih proizvajalca DSMZ (Braunschweig, Nemčija). Za preverjanje oz. potrditev rezultatov serološkega testiranja in za zelo pomembne vzorce iz tkivne kulture smo uvedli metodo obratne transkripcije in verižne reakcije s polimerazo (RT-PCR) za OYDV, GarCLV, LYSV in za aleksiviruse. V ta namen smo v literaturi poiskali začetne oligonukleotide za pomnoževanje dela nukleotidnega zaporedja posameznih virusov in jih glede na naleganje na izbrana in s programom BioEdit poravnana nukleotidna zaporedja ustreznih virusov iz javno dostopne baze NCBI GenBank po potrebi modificirali. Uspeh pomnoževanja smo preizkusili na pozitivnih kontrolah in na s serološkim testom potrjenih pozitivnih vzorcih ob različnih temperaturah naleganja. RNA smo izolirali s kompletom MagMAX™-96 Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, ZDA) po priporočilih proizvajalca iz ekstraktov za ELISA testiranje. Za izolacijo smo uporabili napravo MagMAX Express (Ambion, Thermo Fisher Scientific, ZDA). Za pomnoževanje z enostopenjsko obratno transkripcijo in verižno reakcijo s polimerazo (RT-PCR) smo uporabili OneStep RT-PCR Kit (Hilden, Nemčija). Preizkusili smo 4 temperature naleganja (50 °C, 53 °C, 56 °C in 59 °C). Za nadaljnje delo smo izbrali začetne oligonukleotide prikazane v preglednici 1 in temperaturo naleganja 50 °C.

Preglednica 1: Začetni oligonukleotidi uporabljeni za detekcijo virusov.

Virus	Začetna oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje	Vir
OYDV	OYDV fw mod OYDV re mod	CRCCARTTGGATAAYGC YTCCGTGTCCCTCWTCGG	modificirano po Mituti in sod., 2015
LYSV	LYS N10 LYS C15	CGCATATGCAGTGATGTTTCGGTT ATCAAATTCAGGCTGCTTATACAC	Nam in sod., 2015
GarCLV	GCL-N30 GCL-C40	GCACCAGTGGTTTGGGAATGA AGCACTCCTAGACAACCATTA	Nam in sod., 2015
aleksivirusi ¹	MbFVUP1 MbFVLO1	TGGMCNGCTACCACAAAYGG CCYTTACAGCRTRRAGCTTAGC	Barg, osebna informacija

¹ GarV-A, GarV-B GarV-C, ShVX

2.3 Termoterapija

Rastline v loncih smo gojili v rastni komori ob fotoperiodi 16/8, relativni zračni vlagi 65 % in stalni temperaturi 30 °C, ki smo jo po enem tednu povišali na 37 °C. Termoterapijo smo izvajali od tri do šest tednov.

2.4 Izolacija izsečkov in *in vitro* razmnoževanje

Izbrane rastline smo očistili pod tekočo vodo. Okrog 3 cm velik spodnji del rastline brez korenin smo sterilizirali 5 sekund v 70 % etanolu in nato 15 minut na magnetnem mešalu v 5 % raztopini razkužila Izosan[®]-G (Pliva, Hrvaška) v destilirani vodi in z dodatkom 2 kapljic močila Tween 20. Po trikratnem spiranju s sterilno destilirano vodo smo izrezali rastni vršiček velikosti 0,5 do 0,7 mm in ga gojili na rastnem gojišču z mikro- in makroelementi ter vitamini po Murashige-in Skoog (1962) z 1 mg/l 2iP, 0,5 mg/l NAA, 30 g/l sladkorja ter 7 g/l agarja Bacto™ (Brecton, Dickinson and Company, ZDA). Rastline smo gojili v rastni komori s fotoperiodo 16/8, dnevno temperaturo 23 °C in nočno temperaturo 21 °C. Neokužene meristeme, ki so odgnali in se razvili, smo po cca. 6 tednih presadili na gojišče za rast in razvoj čebulic z makro- in mikroelementi po Murashige in Skoog (1962) s 100 g/l sladkorja in 8 g/l agarja Bacto™. Za razmnoževanje rastlinic smo uporabili metodo rezanja dobro razvitih rastlinic na 2 enaka dela. Po 4-6 tednih se je razvilo od 2-6 novih rastlinic. Za razmnoževanje smo uporabljali tudi bazalne ploščice iz *in vitro* rastlinic, pri čemer se je po 4-6 tednih razvilo od 2-8 novih rastlinic. Na mediju za razvoj čebulic se razvijejo tudi korenine.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Po približno dveh mesecih gojenja v rastlinjaku smo testirali vse rastline vzgojene iz strokov pakiranja 1 in del rastlin pakiranja 2 (preglednica 2). Vse rastline so kazale bolj ali manj izrazito klorotično črtavost listja, nekatere pa tudi rumenenje in zvijanje listov. Obseg in vrsta znamenj niso bila povezana z velikostjo strokov in prav tako tudi ne z mestom stroka v čebulici.

Vse testirane rastline iz obeh pakiranj so bile okužene z GarCLV. GarCLV je v česnu latenten, a deluje sinergistično z drugimi virusi (Katis in sod., 2012). Vse rastline pakiranja 1 so bile okužene tudi z OYDV, pri pakiranju 2 pa pri posameznih rastlinah s serološkim testom nismo potrdili tega virusa. Poznejše analize so pokazale, da

uporabljen ELISA test ni dovolj občutljiv in da je negativne rezultate seroloških analiz na navzočnost OYDV nujno potrebno potrditi z bolj občutljivimi molekularnimi testi. V nobeni rastlini nismo potrdili LYSV in SLV. Navzočnost aleksivirusov je bila zelo različna. Okužbo z GarV-A smo potrdili samo v pakiranju 2 na 3 rastlinah od skupno 95 testiranih. Samo ena rastlina pakiranja 2 ni bila okužena z nobenim od testiranih aleksivirusov, v pakiranju 1 pa je bilo takšnih rastlin bistveno več. Potomci vseh strokov 7 čebulic pakiranja 1 niso bili okuženi z nobenim aleksivirusom.

Preglednica 2: Rezultati testiranja rastlin vzgojenih iz dveh pakiranj čebulic oz. strokov.

	Števílo okuženih/števílo testiranih			
	čebulic	strokov	čebulic	strokov
	Pakiranje 1		Pakiranje 2	
OYDV	21/21	180/183	6/9	65/95
LYSV	0/21	0/183	0/9	0/95
GarCLV	21/21	183/183	9/9	95/95
SLV	0/21	0/183	0/9	0/95
GarV-A	0/21	0/183	2/9	3/95
GarV-B	14/21	55/183	9/9	62/95
GarV-C	10/21	27/183	9/9	89/95
ShVX	8/21	20/183	9/9	51/95
aleksivirusi	14/21	57/183	9/9	93/95

114

Ker smo želeli oceniti vpliv uporabljenih metod za eliminacijo virusov, smo v prvem poskusu uporabili rastline iz pakiranja 1, in sicer:

- z aleksivirusi neokužene rastline, vzgojene iz strokov čebulic, pri katerih so bile vse iz njih razvite rastline neokužene z aleksivirusi (skupno 61 rastlin),
- z aleksivirusi neokužene rastline, vzgojene iz strokov čebulic, pri katerih je bil del strokov okužen z aleksivirusi (skupno 41 rastlin) in
- rastline, okužene s tremi aleksivirusi (GarV-B, GarV-C in ShVX) (skupno 63 rastlin).

Vse uporabljene rastline so bile okužene z OYDV in GarCLV.

Polovico rastlin smo za približno en mesec izpostavili termoterapiji, iz preživelih izolirali meristeme in jih prenesli v *in vitro* razmere. Preživetje rastlin v postopku termoterapije je bilo zelo slabo zaradi za rast neugodnih temperatur in težav z vzdrževanjem ustrezne vlažnosti substrata. Iz 30 izoliranih meristemov se je razvilo le 10 rastlin. Drugo polovico rastlin, ki niso bile izpostavljene termoterapiji, smo prav tako uporabili za izolacijo meristemov. Po približno dveh mesecih smo *in vitro* rastlinice testirali s serološkimi testi na vseh 8 virusov in ugotovili, da se obseg okužb ni zmanjšal. Nekatere *in vitro* rastlinice, ki so se razvile iz meristemov rastlin pri katerih nismo potrdili okužbe z aleksivirusi, so bile okužene s posameznimi aleksivirusi. Nobena od teh rastlinic ni izvirala iz meristemov rastlin, pri katerih so bile vse rastline iz iste čebulice neokužene z aleksivirusi. Ti rezultati nakazujejo, da je

bila koncentracija virusa v nekaterih izvornih rastlinah prenizka za uspešno detekcijo s serološkimi testi, pri gojenju *in vitro* pa se je virus namnožil v tolikšnimi meri, da smo ga potrdili tudi z manj občutljivimi serološkimi testi.

Naši rezultati kažejo, da bi bilo z laboratorijskim testiranjem na viruse mogoče najti in odbrati rastline sorte 'Ptujski jesenski', ki so okužene z manjšim številom virusom ali celo popolnoma neokužene. Takšne rastline bi lahko uporabili za nadaljnje razmnoževanje v izolaciji, t.j. v mrežnikih, kjer prenašalcev virusov ni (oz. jih je manj), ali v *in vitro* postopkih eliminacije virusov.

Del *in vitro* rastlin pridobljenih s kulturo meristemov smo uporabili za ponovno izolacijo meristemov. Po testiranju se je izkazalo, da so bile vse okužene z GarCLV, posamezne pa tudi z drugimi virusi. Pri našem delu torej z nobenim izmed uporabljenih postopkov nismo uspeli vzgojiti brezvirusnih rastlin sorte 'Ptujski jesenski'. Nasprotno so bili Ravnikar in sod. (1994) bistveno bolj uspešni pri uporabi termoterapije in kulture meristemov za eliminacijo OYDV in karlavirusov iz sorte 'Ptujski jesenski'. Rezultati serološkega testiranja so pokazali, da 88-100 % rastlin iz *in vitro* kulture po prenosu v *in vivo* razmere ni bilo okuženih z OYDV in testiranim karlavirusom. Podobne uspehe pri eliminaciji okužb z OYDV in LYSV s kombinacijo termoterapije in gojenja *in vitro* iz meristemov so Ravnikar in sod. (1996) dobili tudi pri sorti 'Ptujski spomladanski'.

Ne glede na slabe rezultate eliminacije okužb pri sorti 'Ptujski jesenski' smo z vpeljanimi tehnikami v letu 2017 pridobili nekaj brezvirusnih rastlinic neznane sorte, ki smo jo leta 2014 dobili kot sorto 'Ptujski jesenski' in smo jo posadili istočasno s še dvema pakiranjema te sorte. Rastline, ki so se razvile iz teh strokov, so se morfološko razlikovale od rastlin sorte 'Ptujski jesenski' in so torej pripadale drugi sorti, najverjetneje sorti 'Ptujski spomladanski'. Bile so tudi bolj vitalne od rastlin sorte 'Ptujski jesenski', zato smo jih izbrali za nadaljnje delo. Ne glede na boljši videz teh rastlin smo s serološkimi testi pri njih potrdili okužbo z OYDV, GarLCV in LYSV. Te rastline smo za 6 tednov izpostavili termoterapiji, nato pa iz njih izolirali meristeme. Po določenem času gojenja *in vitro* so se pri nekaterih preživelih rastlinicah pokazale tudi okužbe z aleksivirusi. Za nadaljnje razmnoževanje smo izbrali 4 rastline, ki niso bile okužene z aleksivirusi. Z molekularnim testiranjem smo v naslednjem letu ugotovili, da je del rastlin neokužen. Ker se je delež okuženih rastlin pri nadaljnjih testiranjih povečeval, smo jih izpostavili še kemoterapiji z virustatikom Ribavirinom in nato iz njih ponovno izolirali meristeme. Pri delu rastlinic smo na ta način uspešno eliminirali viruse, kar smo potrdili tudi z zadnjimi testiranjimi v letu 2017.

S preizkušanimi tehnikami je torej mogoče vzgojiti zdrave rastline, vendar je proces dolgotrajen, izplen brezvirusnih rastlin pa je lahko slab. Rastlinice po presajanju v *in vivo* razmere potrebujejo še dve do tri leta za tvorbo čebulic ustreznih za trg (Ravnikar in sod., 1994). Za razmnoževanje oz. ohranjanje avtohtonih sort, gojenje katerih je dokaj omejeno, bi morda zato zadostovalo preverjanje okuženosti rastlin in sicer najprej s serološkimi testi, nato pa še potrjevanje negativnih rezultatov z bolj občutljivimi molekularnimi testi. Izbrane neokužene rastline oz. čim manj okužene rastline bi nato uporabili pri nadaljnjem razmnoževanju semenskega materiala.

4 SKLEPI

V okviru projekta smo potrdili visoko stopnjo okuženosti razmnoževalnega materiala sorte 'Ptujski jesenski' z virusi. Uvedli smo metodo termoterapije in *in vitro* razmnoževanje te sorte iz meristemov, vendar nismo uspeli pridobiti popolnoma brezvirusnih rastlin. Za vzpostavitev vzdrževanja čim manj okuženega razmnoževalnega materiala sorte 'Ptujski jesenski' bi bilo za začetek potrebno, z laboratorijskimi testiranjmi na viruse, odbrati čim manj okužen izvorni material.

5 ZAHVALA

Delo je bilo opravljeno v okviru CRP projekta V4-1413 z naslovom Vzpostavitev sistema vzdrževalne selekcije in pridelave semenskega materiala sort kmetijskih rastlin za sonaravne oblike kmetovanja, ki ga financirata Ministrstvo za kmetijstvo gozdarstvo in prehrano in Javna agencija za raziskovalno dejavnost RS. Uporabljena so bila tudi sredstva programske skupine Agrobiodiverziteta (P4-0072), ki jo financira Javna agencija za raziskovalno dejavnost RS.

6 LITERATURA

- Bohanec, B. 1992. Tehnike rastlinskih tkivnih kultur. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Center za rastlinsko biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin: 168 str.
- Cafrune, E. E., Perotto, M. C., Conci, V.C. 2006. Effect of two *Allexivirus* isolates on garlic yield. *Plant Disease*, 90: 898-904. DOI: 10.1094/PD-90-0898
- Lunello, P., Ducasse, D., Conci, V. 2005. Improved PCR detection of potyviruses in *Allium* species. *European Journal of Plant Pathology*, 112: 371. doi:10.1007/s10658-005-6232-3
- Lunello, P., Di Rienzo, J., Conci, V. C. 2007. Yield loss in garlic caused by *Leek yellow stripe virus* Argentinean isolate. *Plant Disease*, 91: 153-158. doi: 10.1094/PDIS-91-2-0153
- Katis, N. I., Maliogka, V. I., Dovas, C. I. 2012. Viruses of the genus *Allium* in the Mediterranean region. *Advances in Virus Research*, 84: 163-208.
- Mituti, T., Moura, M. F., Marubayashi, J. M., Oliveira, M. L., Imaizumi, V. M., Krause-Sakate, R., Pavan, M. A. 2015. Survey of viruses belonging to different genera and species in noble garlic in Brazil. *Scientia Agricola*, 72 (3): 278–281. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0168>
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nam, M., Lee Y-H., Park, C. Y., Lee, M-A., Bae, Y-S., Lim, S., Lee, J. H., Moon, J. S., Lee, S.H. 2015. Development of multiplex RT-PCR for simultaneous detection of garlic viruses and the incidence of garlic viral disease in garlic genetic resources. *The Plant Pathology Journal*, 31: 90-96.
- Perotto, M. C., Cafrune, E. E., Conci, V.C. 2010. The effect of additional viral infections on garlic plants initially infected with *Allexiviruses*. *European Journal of Plant Pathology*, 126: 489–495. DOI 10.1007/s10658-009-9555-7
- Ravnikar, M., Plaper, I., Ucman, R., Žel, J. 1994. Establishment of an efficient method for virus elimination in meristem cultures and regeneration of high quality plants. V: Javornik, B., (ur.), Bohanec, B. (ur.), Krefc, I. (ur.). *Proceedings of the International Colloquium on Impact of Plant Biotechnology on Agriculture*, Rogla, 5.-7. december 1994, Ljubljana, Biotechnical Faculty, Agronomy Department, Centre for Plant Biotechnology and Breeding, 1994: 97-102.
- Ravnikar, M., Mavrič, I., Ucman, R., Ivanovič, S., Kus, M., Žel, J. 1996. Virusi česna (*Allium sativum* L. cv. 'Ptujski spomladanski') in vzgoja zdravih rastlin v tkivni kulturi. V: Šesek, P. (ur.). *Novi izzivi v poljedelstvu '96 : zbornik simpozija*, Radenci, 9. in 10. december 1996, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, 1996:189-193.