UNIVERZA NA PRIMORSKEM

FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Oddelek za aplikativno naravoslovje

(delovna različica)

PROTOKOLI IN GRADIVO ZA LABORATORIJSKE VAJE PRI PREDMETU ŽLAHTNJENJE IN BIOTEHNOLOGIJA RASTLIN

Agronomija (VS)

Izola, 2026/2027

KAZALO VSEBINE

1. VAJA: UVOD V POLJSKE POSKUSE 3
1.1 VARIABILNOST SEMEN FIŽOLA 8
2. VAJA-I del: VSEBNOST VODE V SEMENIH 10
2. VAJA-II del: GENSKE BANKE RASTLIN 12
3. VAJA: MUTACIJE 15
4. VAJA: PLOIDNOST 19
5. VAJA: BIOLOGIJA IN BIOTEHNOLOGIJA PELODA 25
RASTLINSKE TKIVNE KULTURE 31
i. KALITEV SEMEN V ASEPTIČNEM OKOLJU 31
ii. RAZMNOŽEVANJE RASTLIN Z NEMERISTEMSKIM TKIVOM - LISTI 34
iii. RAZMNOŽEVANJE RASTLIN Z AKSILARNIMI/APIKALNIMI MERISTEMI 36

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Table 3.10 Yield (kg/plot) of Forage Barley Under Various Sources of Nitrogen. 7
Preglednica 2: Summary Statistics for Barley Crop. 7
Preglednica 3: Variance Check. 7
Preglednica 4: Analysis of Variance for Barley Crop - Type III Sums of Squares. 7
Preglednica 5: Multiple Range Tests for Barley Crop by Treatment. 8
Preglednica 6: Tabela za vnos podatkov meritev za vašo rastlinsko vrsto. 11
Preglednica 7: Spletne povezave do genskih bank za rastline. 13
Preglednica 8: Vrste in grafični prikazi točkovnih mutacij. 15
Preglednica 9: Nekatere sorte, ki so nastale s pomočjo mutacijskega žlahtnjenja. 17
Preglednica 10: Meritve dolžine ječmenovih listov (v centrimetrih). 18
Preglednica 11: Preglednica za vnos števila kloroplastov in dolžine listnih rež pri 2n in 4n ajdi. 24
Preglednica 12: Koncentracije spojin v založnih raztopinah in primerna topila zanje. 31
Preglednica 13: Količina spojin za 250 ml gojišča, za I. gojišče. 32
Preglednica 14: Opažanja razvoja kalitve semen v aseptičnem okolju. 33
Preglednica 15: Količina spojin za 100 ml gojišča, za II. gojišče. 34
Preglednica 16: Opažanja razvoja nemeristemskega tkiva (listov) v RTK. 35
Preglednica 17: Količina spojin za 250 ml, za III. gojišče. 36
Preglednica 18: Opažanja razvoja rastlin iz aksilarnih/apikalnih meristemov, v RTK. 37

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz naključne razporeditve. 5
Slika 2: Postavitev blokov glede na gradient. 5
Slika 3: Shema razporeditve v 4x4 latinskem kvadratu. 6
Slika 4: Možni izidi pridelka treh sort in s tremi različnimi odmerki dušika. 6
Slika 5: Tipi kromosomskih mutacij. 16
Slika 6: Shematski prikaz nastanka avtopoliploida in alopoliploida. 20
Slika 7: Rekonstrukcija nastanka heksaploidne pšenice. 21
Slika 8: Možne oblike parjenja kromosomov pri triploidu (a) in avtotetraploidu (b). 21
Slika 9: Potek spolnega razmnoževanja pri semenkah. 26

1. VAJA: UVOD V POLJSKE POSKUSE

Poljski poskus lahko definiramo kot načrtovano proučevanje, katerega namen je odkrivanje novih spoznanj ali potrjevanje oziroma ovrženje rezultatov predhodnih proučevanj. Izraz *zasnova poskusa* označuje nabor pravil za določitev obravnavanj poskusnim enotam, kar omogoča neodvisno primerjavo povprečij obravnavanj in veljaven statistični izračun. Poznane so številne poskusne zasnove, ki se uporabljajo pri različnih poljskih poskusih.

Poljski poskus v kmetijstvu pogosto predstavlja temeljno orodje za pridobivanje novih informacij. S poljskimi poskusi lahko:

- preizkušamo nove sorte, pri čemer nas zanimajo količina in kakovost pridelka ter odpornost na bolezni in škodljivce itd. (*sortni poskusi*);
- ugotavljamo vpliv različnih načinov obdelave, gnojenja, škropljenja, namakanja, čas setve itd. ter na podlagi dobljenih rezultatov določimo optimalno tehnologijo pridelave za doseganje kakovostnega pridelka (*agronomski poskusi*);
- predstavljamo nova znanja pridelovalcem (*demonstracijski poskusi*);
- pridobivamo osnovna spoznanja in razumevanje, kako rastni dejavniki vplivajo na rastline.

Ker so finančna sredstva za raziskave največkrat omejena, je treba poskus zasnovati tako, da so stroški izvedbe čim nižji, informativnost in verodostojnost podatkov pa čim večja.

Napaka poskusa ali eksperimentalna napaka

Ne glede na to, kako pazljivo pripravimo zemljišče pred setvijo, bodo med parcelami vedno ostajale določene razlike, ki so posledica heterogenosti tal, vpliva biotskih in abiotskih dejavnikov ter razlik pri pripravi in vrednotenju poskusa. Tovrstno variabilnost med poskusnimi enotami imenujemo **napaka poskusa ali eksperimentalna napaka**.

Oceno fizikalnih in kemijskih lastnosti posameznih poskusnih enot na celotni poskusni površini lahko dobimo s tako imenovanim uniformnim poskusom, pri katerem je celotna površina posejana z eno sorto. Zemljišče se nato razdeli na več parcelic, na katerih se ugotavlja vpliv različnih dejavnikov na pridelek.

Vire variabilnosti lahko razdelimo na:

- **variabilnost rastlin**: večja variabilnost se pojavlja pri večjih rastlinah (npr. koruza). Večje razlike so tudi pri rastlinah, ki so posejane na večjih razdaljah, kot pri tistih, ki so posejane bolj na gosto;
- **variabilnost zaradi medsebojnega vpliva parcelic**: parcelice, ki so obkrožene s podobnimi parcelicami so navadno manj variabilne kot tiste, ki so ob prehodi ali robovih oziroma obkrožene s parcelicami, na katerih so posejane rastline različnih višin. Ta variabilnost nastane zaradi tekmovalnosti rastlin na robovih parcelic in jo imenujemo *vpliv roba*;
- **variabilnost, ki nastane zaradi različnih abiotskih in biotskih vplivov**: sem sodijo škodljivci, bolezni ter naravni ekstremi, kot so toča, suša ipd. Posamezne rastline so na določene vplive iz okolja bolj tolerantne kot ostale. Zato je za verodostojnost rezultatov poskus potrebno ponoviti vsaj v treh ali več letih;
- **variabilnost zemljišča**: prisotna je tudi na zelo majhni parcelici. Nastane zaradi razlik v teksturi, globini, kapaciteti zadrževanja vlage, dostopnosti hranil ipd. Te razlike se ohranjajo iz leta v leto, in če poznamo vzorec zemljišča, lahko eksperimentalno napako zmanjšamo s pravilno izbiro velikosti, oblike in smeri postavitve parcelic ter z združevanjem le-teh v bloke.

Eksperimentalne napake ne moremo v celoti izničiti, lahko pa jo s pravilno izvedbo poskusa ocenimo in zmanjšamo. Na velikost napake vplivajo velikost in oblika parcelice, izbira poskusne zasnove, uniformnost izvedbe (npr. celotno zemljišče je enako obdelano pred setvijo in po njej, vse parcelice enako velike, vse operacije, ki jih izvajamo, morajo biti končane v enakem obdobju – če ne za celoten

poskus, pa vsaj za posamezen blok) ter upoštevanje dodatnih podatkov pri analizi (npr. razlike v številu rastlin na parcelico).

Poskus mora zato biti zasnovan tako, da lahko ocenimo eksprimentalno napako in pridobimo ustrezne podatke za statistično analizo.

Osnovne zahteve vseh poskusov so:

- **ponovitve**: vsako obravnavanje oziroma poskusni člen se mora v poskusu pojaviti več kot enkrat. Iz ugotovljenih vrednosti med parcelicami z enakimi poskusnimi členi lahko izračunamo oceno eksperimentalne napake.
  Z večanjem števila ponovitev zmanjšamo napako poskusa. Standardna napaka je mera za natančnost vzorčne ocene, kjer je s^2 vzorčna variance, n pa število ponovitev. Z večanjem števila ponovitev se standardna napaka zmanjšuje.

  $$s_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{s^2}{n}}$$

  Varianca je mera variabilnosti, opredeljena na osnovi vsote kvadriranih odklonov od aritmetične sredine. Natančneje, gre za povprečni kvadrirani odklon od aritmetične sredine. Če varianco korenimo, dobimo standardni odklon. Napako lahko zmanjšamo tudi, da vključimo večje število obravnavanj (s tem povečamo stopinje prostosti, s katerimi izračunamo s^2). Na splošno velja, da bi moralo biti število ponovitev takšno, da napako ocenjujemo z vsaj 12 stopinjami prostosti. Z večanjem števila ponovitev povečamo vpliv kontroliranih in nekontroliranih dejavnikov, zaradi česar so rezultati bolj reprezentativni.
- **naključna razporeditev parcelic**: izognemo se pristranskosti – vsako obravnavanje ima enako možnost, da je uvrščeno na določeno parcelico. Takšna razporeditev zagotavlja neodvisnost obravnavanj in s tem izpolnjuje eno od osnovnih zahtev statističnega izračuna.
- **bločna zasnova**: pomeni razvrščanje parcelic oziroma poskusnih enot v homogene skupine oziroma bloke. Obravnavanja nato razporedimo naključno znotraj posameznega bloka. S tem želimo čim bolj odpraviti variabilnost parcelic znotraj blokov, zmanjšati eksperimentalno napako ter povečati variabilnost med bloki.

Zasnova (načrtovanje) poskusa

- Definiranje problema, natančno oblikovanje raziskovalnih vprašanj, postavitev hipoteze ter določitev ciljev.
- Določitev obravnavanj oziroma poskusnih členov (npr. različne sorte, različni odmerki gnojila ipd.): izberemo jih tako, da lahko odgovorimo na zastavljena vprašanja. Poskusni členi ne smejo biti preveč podobni ali preveč različni med seboj. Na primer, pri sortnih poskusih primerjamo sorte s podobno rastno dobo. Pri gnojenju ali škropljenju moramo paziti na različne odmerke gnojila ali število ponovitve škropljenja.
- Določitev mesta izvedbe poljskega poskusa, velikosti parcelice, število ponovitev in poskusne zasnove.
- Določitev meritev in beleženja podatkov, ki jih bomo izvajali med poskusom.
- Izbira ustrezne statistične analize podatkov, ki bo omogočila, da postavljeno hipotezo ovržemo ali sprejmemo ter rezultate pravilno interpretiramo.

Osnovna poskusna enota

- Osnovna poskusna enota poljskega poskusa je lahko posamezna rastlina ali del zemljišča oziroma parcelica. Pri določanju velikosti parcelice si lahko pomagamo s podatki uniformnih poskusov ter s podatki o variancah iz predhodnih poskusov.
- V kolikor je parcelica prevelika ali premajhna, lahko pride do večjih napak:
  - izgube pri spravilu, razlike v številu preživelih rastlin, mejni učinki ali napake pri merjenju imajo relativno večji vpliv pri manjših parcelicah;
  - pri večjih parcelicah je večja verjetnost, da bo zemljišče bolj heterogeno.

- Parcelice morajo biti zato dovolj velike, da dopuščajo odstranjevanje mejnih rastlin in hkrati zagotavljajo zadostno količino vzorca. Celotni parcelici rečemo **osnovna parcelica**, medtem ko izraz **obračunska parcelica** označuje del parcelice, na katerem poteka vrednotenje.
- Agrotehnični poskusi navadno zahtevajo večje površine zaradi uporabe mehanizacije. Ko izberemo dovolj veliko parcelo, ki omogoča normalno delo s kmetijsko mehanizacijo, je za večjo natančnost bolje izvesti več ponovitev, kot pa dodatno povečati velikost parcelice.

Osnovne oblike poskusov

➢ Naključna razporeditev

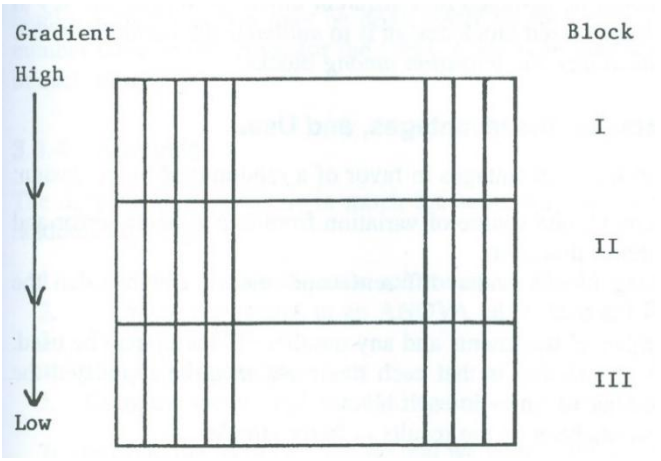
1 A	2 B	3 C	4 B
5 A	6 A	7 C	8 C
9 B	10 C	11 B	12 A

Slika 1: Prikaz naključne razporeditve.

Ena od najenostavnejših razporeditev parcelic je naključna razporeditev. Vsak poskusni člen ima enako možnost, da se uvrsti na katero koli parcelico, kot je prikazano na sliki 1. Tovrstno razporeditev lahko uporabimo tam, kjer je poskusno mesto zelo izenačeno oziroma kjer ni podlage za grupiranje parcelic v bloke. Ker je statistična obdelava pri tej zasnovi zelo preprosta, tudi v primeru manjkajočih podatkov, lahko tovrstno zasnovo poskusa uporabimo tudi takrat, ko obstaja večja verjetnost, da bo med poskusom nekaj parcelic izgubljenih ali da bodo posamezne parcelice propadle. Poskusne člene lahko na parcelice razporedimo s pomočjo tabel naključne razporeditve.

➢ Zasnova naključnih blokov

Gre za poskus, ki je najpogosteje uporabljen. Izenačene parcelice najprej razvrstimo v skupine oziroma bloke. Obravnavanja so znotraj posameznega bloka parcelicam dodeljena naključno, tako da se vsako obravnavanje v bloku pojavi le enkrat.



Slika 2: Postavitev blokov glede na gradient.

Število parcelic v bloku je enako številu obravnavanj, število blokov pa enako številu ponovitev. Namen bločne zasnove je, da čim bolj zmanjšamo variabilnost med parcelicami in povečamo variabilnost med bloki. Če na poskusnem zemljišču obstaja gradient, moramo bloke postaviti pravokotno nanj, kot je prikazano na sliki 2.

Z zmanjšanjem variabilnosti parcelic znotraj blokov zmanjšamo eksperimentalno napako in tako povečamo natančnost dobljenih rezultatov. S postavitvijo blokov na različna zemljišča razširimo vpliv kontroliranih in nekontroliralnih dejavnikov ter s tem pridobimo reprezentativnejše rezultate. Statistična analiza je pri tej zasnovi razmeroma preprosta, čeprav lahko manjkajoči podatki povzročijo določene težave. Če je zemljišče izenačeno, je tovrstna zasnova manj učinkovita od naključne. Skozi celoten poskus obravnavamo blok kot celoto, delo ter meritve pa opravljamo po posameznih blokih. Če bo pri ocenjevanju sodelovalo več ljudi, jih razporedimo tako, da bodo meritve znotraj posameznih blokih vedno opravljale iste osebe.

- **Latinski kvadrat**

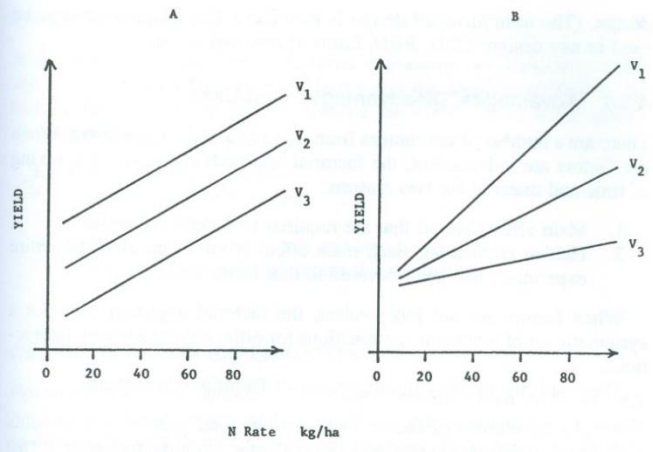
V latinskem kvadratu je število parcelic enako kvadratu števila obravnavanj. Obravnavanja so po vrsticah in stolpcih razporejena tako, da se vsako obravnavanje v posamezni vrstici in stolpcu pojavi le enkrat, kot je prikazano na sliki 3. Ta zasnova je zelo primerna za neizenačeno zemljišče, saj omogoča kontroliranje dveh virov variabilnosti. Slabost te razporeditve pa je omejeno število poskusnih členov. Latinski kvadrat se priporoča pri poskusih z več kot štirimi oziroma z manj kot desetimi obravnavanji.

Row \ Column	1	2	3	4
1	A	B	C	D
2	B	C	D	A
3	C	D	A	B
4	D	A	B	C

Slika 3: Shema razporeditve v 4x4 latinskem kvadratu.

- **Poskusi z več dejavniki oziroma faktorski poskusi**

S tovrstnimi poskusi lahko proučujemo medsebojni vpliv oziroma interakcijo dveh ali več dejavnikov. Če dva dejavnika delujeta neodvisno, v takem poskusu ni interakcije. Faktorski poskus vključuje kombinacijo dveh ali več dejavnikov, pri čemer ima vsak dejavnik vsaj dve različni ravni. Na sliki 4 so prikazani možni izidi pri proučevanje vpliva različnih odmerkov dušika na rodnost treh sort. Iz grafa A lahko razberemo, da se razlike v pridelku med sortami pri različnih odmerkih dušika ohranjajo, kar pomeni, da ni interakcije med količino pridelka in gnojenjem z dušikom. Primer interakcije je prikazan na grafu B, iz katerega je razvidno, da se sorte glede na različne odmerke dušika različno odzivajo.



Slika 4: Možni izidi pridelka treh sort in s tremi različnimi odmerki dušika.

PRIMER - statistične analize poskusa z bločno zasnovo:

Izveden je bil poskus z namenom ugotoviti vpliv različnih dušičnih gnojil na pridelek ječmena. Uporabljenih je bilo pet gnojil: 1) $(NH_4)_2SO_4$, 2) NH_4NO_3, 3) $CO(NH_2)_2$, 4) $Ca(NO_3)_2$, 5) $NaNO_3$, vsako v odmerku 50 kg dušika na hektar, ter kontrola (brez gnojenja). Poskus je bil izveden v štirih ponovitvah, vsaka ponovitev pa na drugem tipu tal.

Preglednica 1: Table 3.10 Yield (kg/plot) of Forage Barley Under Various Sources of Nitrogen.

	Soil type					
Treat.	I	II	III	IV	Total	Mean
1	32.1	35.6	41.9	35.4	145.0	36.25
2	30.1	31.5	37.1	30.8	129.5	32.28
3	25.4	27.1	33.8	31.1	117.7	29.42
4	24.1	33.0	35.6	31.4	124.1	31.02
5	26.1	31.0	33.8	31.9	122.8	30.70
6	23.2	24.8	26.7	26.7	101.4	25.35
Total	161.0	183.3	208.9	187.3	740.5	
Mean	26.83	30.55	34.82	31.22		30.85

Preglednica 2: Summary Statistics for Barley Crop.

Treat.	Count	Average	Variance	Standard deviation
1	4	36,25	16,7633	4,0943
2	4	32,375	10,2492	3,20143
3	4	29,4	14,7533	3,84101
4	4	31,025	24,3092	4,93043
5	4	30,7	10,7667	3,28126
6	4	25,35	2,85667	1,69017
Total	24	30,85	21,507	4,63756

Preglednica 3: Variance Check.

	Test	*P-Value*
Cochran's C	0,305015	**0,786563**
Bartlett's	1,19405	**0,72679**

Preglednica 4: Analysis of Variance for Barley Crop - Type III Sums of Squares.

Source	*Sum of Squares*	*Df*	*Mean Square*	*F-Ratio**	*P-Value*
MAIN EFFECTS					
A:tip_zemlje	192,903	3	64,3011		
B:obravnavanje	255,565	5	51,113	16,60	**0,0000**
RESIDUAL	46,1917	15	3,07944		
TOTAL (CORRECTED)	494,66	23			

*All F-ratios are based on the residual mean square error.

Preglednica 5: Multiple Range Tests for Barley Crop by Treatment.

Treat.	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
6	4	25,35	0,877417	X
3	4	29,4	0,877417	X
5	4	30,7	0,877417	XX
4	4	31,025	0,877417	XX
2	4	32,375	0,877417	X
1	4	36,25	0,877417	X

Method: 95,0 percent Duncan

1.1 VARIABILNOST SEMEN FIŽOLA

Fižol (*Phaseolus* L.) predstavlja pomemben vir rastlinskih beljakovin v prehrani po svetu. Divji predhodnik navadnega fižola izvira iz Mezoamerike, od koder se je razširil po Južni Ameriki vzdolž Andov. Naravno razširjanje naj bi potekalo med 146.000 in 184.000 leti, medtem ko naj bi se domestikacija hkrati zgodila v Mezoameriki in Andih pred približno 8.000 leti (Trucchi in sod., 2021). Po prenosu fižola v Evropo so se številne prinešene sorte pod vplivom naravne selekcije in človekovega odbiranja oblikovale v domače sorte. Genske vire fižola za Slovenijo imamo zbrane tudi v Slovenski rastlinski genski banki na Kmetijskem inštitutu Slovenije (Meglič in sod., 2018). Sorte navadnega fižola lahko opišemo na podlagi morfoloških in fenoloških parametrov, v sodobnem času pa tudi z genetskimi analizami. Med najpogosteje uporabljene morfometrične parametre (po Meglič in sod., 2018) štejemo:

- kvantiativne (numerične) parametre: dolžina semena, širina semena, višina semena, razmerje dolžina/višina, razmerje višina/širina, masa 100 semen navadnega fižola;

- kvalitativne (opisne) parametre: barva semena, število barv na semenu, primarna barva semena, prevladujoča sekundarna barva semena, razporeditev sekundarne barve semena, ožiljenost semena, oblika semena.

Literatura:

Chahal G.S., Gosal S.S. 2002. Principles and procedures of plant breeding: biotechnological and conventional approaches. Harrow, Alpha science international Ltd.: str. 603.

Košmelj K. 2007. Uporabna statistika. Druga dopolnjena izdaja. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: str. 239.

Meglič, V., Sinkovič, E., Pipan, B., Sinkovič, L. 2018. NAŠ fižol: zbirka navadnega (*Phaseolus vulgaris* L.) in turškega fižola (*Phaseolus coccineus* L.) v Sloveniji. Ljubljana: Kmetijski inštitut Slovenije. ISBN 978-961-6998-24-6.

Petersen G. R. 1994. Agricultural field experiments: design and analysis. New York, Mercel Dekker: str. 409.

Rozman L. 2004. Študijsko gradivo za predmet »Poljski poskus« za študente univerzitetnega študija agronomije Biotehniške fakultete v Ljubljani. Ljubljana: str. 43.

Trucchi, E., Benazzo, A., Lari, M. et al. 2021. Ancient genomes reveal early Andean farmers selected common beans while preserving diversity. Nat. Plants 7, 123–128. https://doi.org/10.1038/s41477-021-00848-7

PROTOKOL ZA PRAKTIČNI DEL VAJE:

1) Zasaditev poskusov

1.1 Ječmen

V naključni razporeditvi posadite semena ječmena, ki predstavljajo:

- kontrolo (semena brez UV-obsevanja),
- semena, obsevana s/z ___ enotami UV-sevanja, in
- semena, obsevana z največ enotami (___ enot) UV-sevanja.

Vsako tretiranja in kontrolo ponovite trikrat (tri biološke ponovitve) v 3 x 3 mreži poljskega poskusa. Semena posadite in jih ustrezno označite. V tabelo zapišite mesto tretiranj, kontrolo in njihove ponovitve. Na koncu zalijte z vodo in postavite pladenj v rastno komoro na 23 °C, z režimom 16 ur svetlobe / 8 ur teme.

1.2 Ajda

V zemljo na pladnju posadite diploidna (2n) in tetraploidna (4n) semena ajde ter ajdo iz semenske vrečke. Posajena semena ustrezno označite, jih zalijte z vodo in postavite pladenj v rastno komoro pri 23 °C, z režimom 16 ur svetlobe / 8 ur teme.

2) Variabilnost semen fižola

Potrebujete: semena štirih sort fižola, kljunasta merila, računalnik z MS Excel/Libre Office Calc programom.

Imate štiri sorte (= S) fižola in __ skupin študentov (=G)

SORTA	SKUPINA
S1	G__
S2	G__
S3	G__
S4	G__

Izmerite dolžino in širino (debelina) 100 semen posamezne sorte fižola s kljunastim merilom. Podatke meritev vnesite v preglednico, naloženo na e-učilnici.

2. VAJA-I del: VSEBNOST VODE V SEMENIH

»VLAGA SEMENA PREDSTAVLJA KOLIČINO VODE V SEMENU, IZRAŽENO V ODSTOTKIH.«

Semena predstavljajo razmnoževalni organ oziroma enoto, ki omogoča razširjanje in nadaljevanje linije. Navadno preidejo v fazo dormance oziroma mirovanja ter nadaljujejo svoj razvojni cikel ob pojavu ugodnih razmer. V času mirovanja so semena lahko izpostavljena številnim abiotskim in biotskim dejavnikom, ki vplivajo na njihovo kakovost in sposobnost uspešnega razvoja. V kmetijstvu se pri pridelovanju rastlin poleg drugih dejavnikov z meritvami pogosto spremlja tudi vsebnost vlage (torej količina vode) v semenih.

Vsebnost vode v semenih se ugotavlja, ker je to dejavnik, ki določa:

- čas žetve,
- pogoje skladiščenja,
- odpornost proti boleznim in škodljivcem,
- življenjsko dobo semena med skladiščenjem,
- kalivost semen.

V Republiki Sloveniji preverbo vsebnosti vlage v semenih izvaja Kmetijski inštitut Slovenije (KIS). V okviru **KIS** deluje **Služba za uradno potrjevanje semenskega in sadilnega materiala**, analize pa opravlja **Laboratorij za kontrolo kakovosti semena v Sloveniji**.

Eno izmed priporočil za shranjevanje semen je, da naj vsebujejo **3-7 %** vode, pri čemer jih hranimo:

- za srednjeročno shranjevanje pri +4 °C;
- za dolgoročno shranjevanje pri -20 °C.

Seme z manjšo vsebnostjo vode je med shranjevanjem manj podvrženo okužbam z bakterijami ali glivami. Poleg tega seme predstavlja del rastline, ki se ohranja za nadaljnjo pridelavo, ohranjanje vrst oziroma genskih skladov ter kot vir za žlahtnjenje. Predstavlja rastlinski genski vir za izboljševanje gojenih rastlin z žlahtnjenjem ali biotehnološkimi postopki ter tudi rezervni vir v primeru nepredvidljivih sprememb v okolju. S tem namenom se različne vrste, sorte ali kultuvarje zbira ter hrani v t.i. genskih bankah.

Literatura:

KIS. 2013. Zgibanka semenski laboratorij po straneh. Kmetijski inštitut Slovenije, Služba za uradno potrjevanje semenskega in sadilnega materiala kmetijskih rastlin. 8 str.

KIS. 2023. Genska banka KIS v okviru JSRGB, Hranjenje in vrednotenje. Kmetijski inštitut Slovenije. https://www.kis.si/Hranjenje_in_vrednotenje_GB/

PROTOKOL ZA PRAKTIČNI DEL VAJE:

NAMEN: Spoznati postopek za ugotavljanje vsebnosti vode v semenih.

MATERIAL:

- seme treh različnih rastlinskih vrst,
- mlinček za mletje semen,
- steklene posodice,
- komora za sušenje (oziroma sušilnik),
- eksikator s silikagelom,
- analitska tehtnica (natančna na štiri decimalna mesta),
- kalkulator/excel.

Postopek – za ugotavljanje vsebnosti vode v semenih:

1. Z mlinčkom zmeljemo semena posamezne rastlinske vrste. Količina semen naj bo tolikšna, da napolni stekleno posodico.*****
2. Na analitski tehtnici stehtamo prazne posodice – z natančnostjo na štiri decimalna mesta.
3. V posodice dodamo zmleto seme in jih ponovno stehtamo.
4. Zmleta semena v posodicah postavimo v sušilnik za 1 uro pri temperaturi 130 °C.
5. Posodice nato ohladimo v večjih steklenih kozarcih, ki vsebujejo silikagel (t.i. eksikatorji).
6. Po pretečenem času, ko so pododice ohlajene, ponovno stehtamo posodice s posušenim zmletim semenom.
7. Izračunamo vsebnost vode v semenih (formula je navedena v nadaljevanju).

** - vsaka skupina naredi 2 ponovitvi/vrsto semena*

[izguba mase, izražena v odstotkih, označuje količino vlage v vzorcu]

PODATKI:

V preglednico 6 vstavite podatke meritev za vašo rastlinsko vrsto.

Preglednica 6: Tabela za vnos podatkov meritev za vašo rastlinsko vrsto.

Rastlinska vrsta: _____			
Ponovitev	Masa prazne posodice	Masa posodice s semeni* (pred sušenjem)	Masa posodice s semeni* (po sušenju)
P1			
P2			

** - semena so zmleta.*

Izračunajte vsebnost vode v semenih:

- FORMULA za izračun vsebnosti vode v semenih:

$$\text{vsebnost vlage} = \frac{((\text{masa posodice s semeni pred sušenjem}) - (\text{masa posodice s semeni po sušenju}))}{((\text{masa posodice s semeni pred sušenjem}) - (\text{masa prazne posodice}))} \times 100 = ___\ \%$$

2. VAJA-II del: GENSKE BANKE RASTLIN

Rastlinski genski viri za prehrano in kmetijstvo

Rastlinski genski viri so nepogrešljiva surovina za izboljšanje gojenih rastlin s klasičnim žlahtnjenjem ali sodobnimi biotehnološkimi postopki. Poleg tega so bistvenega pomena za prilagajanje na nepredvidljive spremembe v okolju ter za zadovoljevanje prihodnjih potreb človeštva. Rastlinski genski viri, še posebej avtohtone, domače in stare sorte kmetijskih rastlin, so tudi del naše kulturne dediščine, ki jo moramo ohraniti.

Zbiranje in ocenjevanje genskih virov se je začelo v šestdesetih letih 20. stoletja na pobudo Organizacije Združenih narodov za prehrano in kmetijstvo (FAO). Pod okriljem CGIAR je bilo ustanovljenih več mednarodnih kmetijskih raziskovalnih centrov (International Agriculture Research Center, IARC), s primarnim ciljem povečati rastlinsko produkcijo. V sklopu teh centrov so nastale tudi genske banke.

CGIAR (A Global Agricultural Research Partnership) je globalno partnerstvo organizacij, ki si prizadevajo za trajnostni razvoj. Ustanovljen je bil leta 1971 z jasnim ciljem zmanjšati revščino in lakoto ter izboljšati zdravstveno stanje prebivalstva. CGIAR upravlja 15 kmetijsko-raziskovalnih centrov in sodeluje z nacionalnimi ter regionalnimi raziskovalnimi centri, civilno družbenimi organizacijami, univerzami in z zasebnim sektorjem.

Bolj sistematično delo se je začelo z ustanovitvijo Mednarodnega odbora za rastlinske genske vire (IBPGRI) pod okriljem FAO leta 1974, s sedežem v Rimu. Leta 1991 se je IBPGRI preimenoval v Mednarodni inštitut za rastlinske genske vire (IPGRI), leta 1994 pa je začel delovati neodvisno kot eden izmed centrov CGIAR. Leta 2006 sta se IPGRI in Mednarodna mreža za izboljšanje banan in pisanga (INIBAP) združila in se preimenovala v Bioversity International (http://www.bioversityinternational.org). V okviru Biodiversity International so bili oblikovani mednarodno sprejeti deskriptorji za posamezne rastlinske vrste. V okviru Bioversity deluje tudi Evropski kooperativni program za rastlinske genske vire (ECPGR - European Cooperative Programme for Plant Genetic Resources) (http://www.ecpgr.cgiar.org/), katerega članica je tudi Slovenija. Podatki o nekaterih rastlinskih genskih virih iz Slovenske rastlinskega genske banke (SRGB) so vključeni v evropsko podatkovno zbirko EURISCO.

Skrb za rastlinske genske vire je v domeni posameznih držav, saj vsaka država uveljavlja suverenost nad genskimi viri, ki izvirajo z njenega ozemlja. To zagotavlja Konvencija o biotski raznovrstnosti (http://www.cbd.int), katere podpisnica je tudi Slovenija.

Drug pomemben mednarodni sporazum na tem področju je Mednarodna pogodba o rastlinskih genskih virih za prehrano in kmetijstvo (http://www.planttreaty.org/). Slovenija je pogodbo ratificirala leta 2005. Namen pogodbe je spodbujanje mednarodnega sodelovanja pri ohranjanju in trajnostni rabi rastlinskih genskih virov (RGV) za prehrano in kmetijstvo, ki imajo posebne lastnosti in značilnosti, vendar jim zaradi sprememb tradicionalnega načina kmetovanja grozi zmanjšanje števila ali celo izginotje. Cilji mednarodne pogodbe so ohranjanje in trajnostna raba RGV za prehrano in kmetijstvo ter pravična in enakopravna delitev koristi, ki izhajajo iz njihove uporabe, v skladu s Konvencijo o biološki raznovrstnosti. Vse to prispeva k trajnostnemu kmetijstvu in zagotovljanju prehranske varnosti.

Rastlinski genski viri v Republiki Sloveniji

Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano je leta 1995 imenovalo Komisijo za pripravo in izvajanje programa Slovenska rastlinska genska banka (SRBG), in tako ustanovilo rastlinsko gensko banko. SRGB je programske narave in združuje usklajene programe ohranjanja ter proučevanja RGV, ki potekajo na Kmetijskem inštitutu Slovenije v Ljubljani, Biotehniški fakulteti, Oddelku za agronomijo v Ljubljani, ter na Inštitutu za hmeljarstvo in pivovarstvo Slovenije v Žalcu. Posamezni skrbniki (t.i. kuratorji) iz navedenih organizacij so odgovorni za posamezne vrste kmetijskih rastlin. Izdelana so

bila merila za vrednotenje posameznih del, sprejetih v programu, ki zajema: ohranjanje, proučevanje po deskriptorjih, razmnoževanje, pripravo semena za dolgotrajno hranjenje v centralni genski banki ter v delovni zbirki za srednje- in kratkoročno hranjenje, vnos podatkov v podatkovno zbirko in vodenje registra.

Slovenija je vključena v evropski program ECPGR, v okviru katerega se dejavnosti izvajajo prek rastlinskih omrežij. Del tega programa je tudi podatkovna baza EURISCO, ki vsebuje podatke iz *ex situ* zbirk evropskih genskih bank (http://eurisco.ecpgr.org/static/about_eurisco.html).

Povezava do nekaterih genskih bank za rastline:

Preglednica 7: Spletne povezave do genskih bank za rastline.

Ameriška baza rastlinskih genskih virov	https://www.ars-grin.gov/
Nordijska banka	https://www.nordgen.org/our-work/genebank/
Svalbard Global Seed Vault	http://www.regjeringen.no/en/ https://www.croptrust.org/work/svalbard-global-seed-vault/
Japonska genska banka	https://www.gene.affrc.go.jp/databases-plant_search_en.php
Češka genska banka	https://www.gzr.cz/?lang=en#
Francoska genska banka	http://www.brg.prd.fr/index.php
Kanadska genska banka	http://pgrc3.agr.gc.ca/index_e.html
Nizozemski center genskih virov	https://www.wur.nl/nl/onderzoek-resultaten/kennisonline-onderzoeksprojecten-lvvn/centre-for-genetic-resources-the-netherlands/plant-genetic-resources/genebank.htm
Evropska podatkovna zbirka vinske trte	http://www.eu-vitis.de/index.php

Genesys (http://www.genesys-pgr.org/) je globalni portal, ki združuje podatke stotin genskih bank po svetu. Razvoj portala so podprli sekretariat ITPGRFA, Bioversity International in Svetovna fundacija za raznolikost pridelkov (Global crop diversity trust, GCDT). Vključuje podatke treh večjih zbirk: EURISCO, SINGER in GRIN. Zbirka se stalno nadgrajuje.

WIEWS - Zbirka podatkov o rastlinskih genskih virih (informacijska aplikacija FAO): http://apps3.fao.org/wiews/wiews.jsp

Literatura:

Bioversity International
http://www.bioversityinternational.org/

Chahal G.S., Gosal S.S. 2002. Principles and procedures of plant breeding: biotechnological and conventional approaches. Harrow, Alpha science international Ltd.: str. 603.

Engels J.M.M. in Visser L. 2003. A guide to effective management of germplasm collections. IPGRI handbooks for Genebanks No. 6. IPGRI, Rim.

Grižon P. 2012. Izvajanje Mednarodne pogodbe o rastlinskih genskih virih za prehrano in kmetijstvo v Sloveniji. Acta agriculturae Slovenica, 99-3: str. 295-299.

Slovenska rastlinska genska banka. Rastlinski genski viri za prehrano in kmetijstvo.
http://www.furs.si/svn/seme/RastlGenViri.asp

PROTOKOL ZA PRAKTIČNI DEL VAJE:

1.) V Ameriški podatkovni zbirki rastlinskih genskih virov (GRIN; https://www.ars-grin.gov/) poiščite več akcesij z izbranimi lastnostmi za pet različnih rastlinskih vrst.

2.) Preverite, ali je sorta »Recigla« vnesena v Evropsko podatkovno zbirko vinske trte (http://www.eu-vitis.de/)?

3.) Na spletni strani Kmetijskega inštituta Slovenije (https://www.kis.si/Genska_banka/) preverite, pri kateri temperaturi se hrani seme za srednjeročno in dolgoročno shranjevanje.

3. VAJA: MUTACIJE

Mutacija je dedna sprememba genetskega materiala na genski ali kromosomski ravni. Mutacije so glavni vir nastanka novih genov in v kombinaciji z žlahtnjenjem prispevajo k povečanju genetske variabilnosti.

Glede na mesto nastanka jih delimo na **somatske mutacije** ter **mutacije v spolnih celicah oziroma zarodnih celicah**, iz katerih nastajajo spolne celice. Prve prizadenejo samo nosilca (organizem, v katerem nastanejo) in se ne prenašajo na potomce, medtem ko druge največkrat ne vplivajo neposredno na organizem, v katerem nastanejo, temveč se odrazijo pri potomcih.

Mutacije na ravni genov imenujemo **genske ali točkovne mutacije** (preglednica 8), medtem ko mutacije na ravni kromosomov imenujemo **kromosomske mutacije** (slika 5).

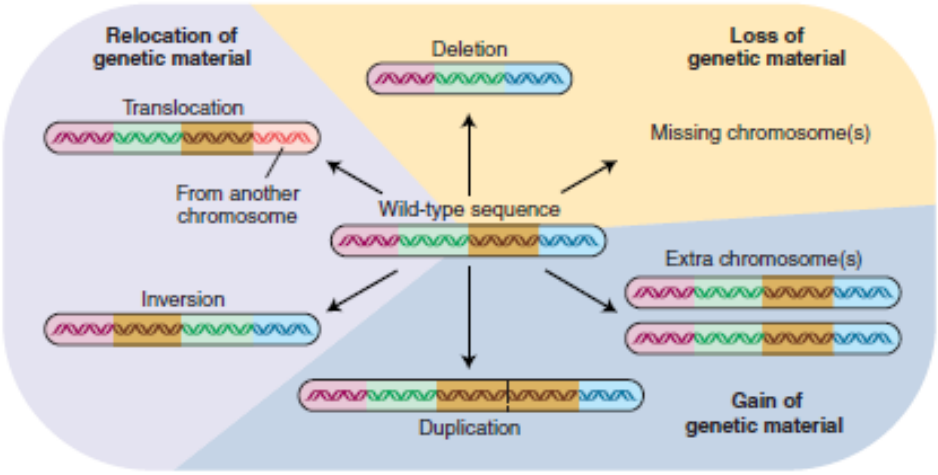
Preglednica 8: Vrste in grafični prikazi točkovnih mutacij.

Type of mutation	Result and examples
At DNA level	
Transition	Purine replaced by a different purine, or pyrimidine replaced by a different pyrimidine: A · T ⟶ G · C ⟶ G · C ⟶ A · T C · G ⟶ T · A T · A ⟶ C · G
Transversion	Purine replaced by a pyrimidine, or pyrimidine replaced by a purine: A · T ⟶ C · G A · T ⟶ T · A G · C ⟶ T · A G · C ⟶ C · G T · A ⟶ G · C T · A ⟶ A · T C · G ⟶ A · T C · G ⟶ G · C
Indel	Addition or deletion of one or more base pairs of DNA (inserted or deleted bases are underlined): AAGACTCCT ⟶ AAGAGCTCCT AAGACTCCT ⟶ AAACTCCT
At protein level	
Synonymous mutation	Codons specify the same amino acid: AGG ⟶ CGG Arg Arg
Missense mutation	Codon specifies a different amino acid
Conservative missense mutation	Codon specifies chemically similar amino acid: AAA ⟶ AGA Lys (basic) Arg (basic) Does not alter protein function in many cases
Nonconservative missense mutation	Codon specifies chemically dissimilar amino acid: UUU ⟶ UCU Hydrophobic phenylalanine Polar serine
Nonsense mutation	Codon signals chain termination: CAG ⟶ UAG Gln Amber termination codon
Frameshift mutation	One base-pair addition (underlined) AAG ACT CCT ⟶ AAG AGC TCC T... One base-pair deletion (underlined) AAG ACT CCT ⟶ AAA CTC CT...

Kromosomske mutacije delimo na dve večji skupini:

- spremembe v številu kromosomov - evploidije, anevploidije;
- spremembe v strukturi kromosomov - delecija, duplikacija, inverzija (paracentrična, pericentrična) in translokacija. Do strukturnih sprememb pride zaradi loma kromosomov.

Glede na izvor delimo mutacije na **spontane** in **inducirane**. Spontane mutacije nastanejo zaradi napak pri podvajanju DNA ali zaradi naravno povzročenih poškodb (npr. oksidativnih procesov, ki jih povzročajo prosti radikali, deaminacija, depurinacija ipd.). Pogostnost spontanih mutacij je zelo nizka - približno 10^{-6}, torej ena na milijon kopij določenega gena.



Slika 5: Tipi kromosomskih mutacij.

Mutacije lahko induciramo s fizikalnimi ali kemijskimi dejavniki, ki jih imenujemo **mutageni**. Način žlahtnjenja, pri katerem se uporablja inducirane mutacije, imenujemo mutacijsko žlahtnjenje.

Fizikalni mutageni

- **UV-sevanje** – pri valovni dolžini 260 nm povzroča dimerizacijo pirimidinskih baz, predvsem med dvema timinoma. Purinski dimeri so redkejši. Dimeri se pri podvajanju DNA ne parijo s komplementarnimi nukleotidi, zato nova veriga ni popolnoma komplementarna; pride do delecije. UV-sevanje ima v primerjavi z ionskim sevanjem manjšo prodorno moč, zato se pri postopkih žlahtnjenja uporablja predvsem za obsevanje peloda in celičnih kultur.
- **Ionsko sevanje** (rentgenski (žarki X) in gama (γ) žarki) lahko povzroči različne mutacije - od manjših točkovnih do večjih kromosomskih sprememb. Sevanje ima lahko neposreden vpliv na DNA ali posreden, z induciranjem reaktivnih molekul.
- **Visoka temperatura** povzroča cepitev β-N-glikozidne vezi, ki povezuje dušikovo bazo s sladkorjem. Sladkor in fosfatna skupina sta brez dušikove baze postaneta zelo nestabilna in hitro razpadeta, zaradi česar v DNA-verigi nastane vrzel. Ta reakcija navadno ni mutagena, saj popravljalni mehanizmi tovrstne napake večinoma uspešno odpravijo.

Kemijski mutageni

- **Bazni analogi** – nekatere kemijske spojine so po strukturi zelo podobne dušikovim bazam in se zato med podvajanjem lahko vgradijo v DNA-verigo. Primer: 5-bromouracil (5-BU) je analog timina, ki ima na petem C-atomu bromin, medtem ko ima timin na tem mestu metilno skupino. 5-BU se lahko pari z gvaninom. Drug primer je 2-aminopurin (2-AP), analog adenina, ki se lahko pari z citozinom.
- **Alkilni agensi** – nekateri mutageni povzročajo spremembe dušikovih baz, zaradi česar se kasneje nepravilno parijo. Primeri: etil metan sulfonat (EMS), dietil sulfonat (DES), nitrozogvanidin (NG). Ti mutageni dodajo alkilno skupino (pri EMS etilno, pri NG metilno). Do mutacije pride, ko se alkilna skupina veže na kisik v gvaninu in tako nastane O-6-aliklgvanin, ki se lahko pari s timinom.
- **Interkalarni mutageni** – planarne molekule (npr. etidijev bromid, akridin), ki se vrinejo med dušikove baze dveh nasprotnih verig DNA.
- **Dušikova kislina** – povzroča deaminacijo. Citozin se pri odstranitivi amino skupine spremeni v uracil.
- **Hidroksilamin** – povzroča spremembo baznega para GC v AT.

Tako fizikalne kot kemijske mutagene uspešno uporabljamo tudi v žlahtniteljske namene. Lastnosti, ki so bile že izboljšane s pomočjo mutacijskega žlahtnjenja, so: čas cvetenja, struktura rastline, oblika cvetov, oblika plodov, spremembe v vsebnosti olja ter izboljašana kakovost beljakovin. Nekaj dejanskih primerov je navedenih v preglednici 9.

Preglednica 9: Nekatere sorte, ki so nastale s pomočjo mutacijskega žlahtnjenja.

Plant species and variety	*Country*	*Important characters*
***Allium cepa* (onion)**		
Brunette	Netherlands	Early, good quality and high yield
Arachis hypogaea	India	Late maturing
TG-1		(130 days)
***Brassica juncea* (raya)**		
RLM 198	India	Higher yield and oil content
RLM 514	India	Early maturity, higher yield, shattering resistance, low erucic acid
***Capsicum annuum* (pepper)**		
Krichimsky ran	Bulgaria	Early maturing, high yield
***Glycine max* (soybean)**		
Raiden	Japan	Earliness
Raiko	Japan	Earliness
KEX-2	Korea	Earliness and high yield
***Gossypium hirsutum* (cotton)**		
MCU7	India	Earliness, high yield
Rasmia	India	Daylength tolerant, high yield, superior quality, wide adaptation
Pusa Ageti	India	Short duration, high ginning, jassid tolerant
***Oryza sativa* (rice)**		
KT 20-74	China	Earlier ripening, higher yield
SH 30-21	China	Earlier ripening, higher yield
Reimei	Japan	Low temperature tolerant
BPI-121-407	Philippines	Early ripening, independent of season, short straw, high tillering, erect leaves
IIT 48	India	Early maturity, day length tolerant
IIT 60	India	Flowers within 65 days, ripens one month earlier
Nucleoryza	Hungary	Earliness, better adapted to cold climate
Kashmir Basmati	Pakistan	Earliness, low temperature tolerant
R.D. 15	Thailand	Earliness, better drought tolerance
Miyanishiki	Japan	Early heading, short culm, improved lodging resistance
CNM 6 CNM 20 CNM 25 CNM 31	India	All early maturing by 10-25 days

Literatura:

Brown T. A. 2007. Genomes 3. New York, Garland Science Publishing: str. 713.

Chahal G.S., Gosal S.S. 2002. Principles and procedures of plant breeding: biotechnological and conventional approaches. Harrow, Alpha science international Ltd.: str. 603.

Griffiths A., Wessler S. R., Lewontin R. C., Gelbart W. M., Suzuki D. T., Miller J. H. 2005. Introduction to genetic analysis, 8th edition. New York, W. H. Greeman: 782 str.

PROTOKOL ZA PRAKTIČNI DEL VAJE

Navodila:

1. Iz vsake parcelice posajenega ječmena vzemite po 10 rastlin – pazite, da vzamete sredinske rastline. Pri tem predposatvljamo, da so imele rastline v sredini parcelice bolj enakomerne pogoje za rast kot tiste, ki so rastle na robu parcelic.

2. Vsaj 10 rastlinam iz posamezne parcelice izmerite dolžino najdaljšega lista rastlin. Merite od mesta, kjer je list pogledal iz zemlje, do konice najdaljšega lista.

3. Meritve zapišite v spodnjo preglednico 10 in v Excel preglednico, ki je naložena na e-učilnici.

4. Statistično analizo bo izvedel asistent, ki bo rezultate razložil na naslednjih vajah.

Preglednica 10: Meritve dolžine ječmenovih listov (v centrimetrih).

Zaporedna rastlina	Kontrola 1	Kontrola 2	Kontrola 3	___ enot 1	___ enot 2	___ enot 3	___ enot 1	___ enot 2	___ enot 3
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									

4. VAJA: PLOIDNOST

(POLI)PLOIDNOST

- Slovar osnovnih pojmov:

Alopoliploid – rastlina, katere genom vsebuje dve kopiji celotnega seta kromosomov dveh ali več bližnje sorodnih vrst; nastane kot posledica križanja.

Anevploid – rastlina s spremenjenim številom le posameznih kromosomov.

Avtopoliploid – rastlina, ki ima večkratnik lastnega osnovnega seta kromosomov.

Diploid – rastlina z dvema osnovnima setoma kromosomov.

Evploid – rastlina, pri kateri je prišlo do spremembe v številu kromosomov za celoten set.

Haploid – samostojna rastlina z gametnim (haploidnim, *n*) številom kromosomov.

Monoploid – organizem z osnovnim številom oziroma osnovnim setom kromosomov.

Ploidnost – nanaša na število kopij osnovnega seta kromosomov v jedru celice.

Poliploid – organizem, ki vsebuje dva ali več osnovnih setov kromosomov; število setov določa raven ploidnosti.

Uvod

Poliploidnost ima pri razvoju rastlinskih vrst pomembno vlogo. Razlog za to je, da ima vsaka vrste svoj optimalen nivo ploidnosti, pri katerem izraža najboljše lastnosti. Nekatere fenotipske značilnosti poliploidov so bujnejša rast, večje celice in večji reproduktivni organi. Dejanslo so številne gojene rastline poliploidi. Preden se posvetimo možnostim uporabe poliploidov v kmetijstvu, si najprej oglejmo, kako in zakaj sploh prihaja do sprememb v številu kromosomov.

Celični cikel

Ko se rastlina razvije, imajo le nekatere celice sposobnost neprestanega deljenja in rasti, medtem ko so druge specializirane za točno določene naloge (npr. shranjevanje hranil, prevajanje spojin, mehanska opora, fotosinteza, zaščita). Izmenjavo mitoze in naslednje interfaze imenujemo **celični cikel**. Pri mitozi se genetski material razdeli v dve novi, genetsko identični hčerinski jedri. Tekom celičnega cikla lahko pride do napak v regulaciji in posledično v poteku delitve celic, kar lahko privede do sprememb v številu kromosomov.

Spremembe v številu kromosomov

Spremembe v številu kromosomov delimo na dva osnovna tipa:

- rastline, pri katerih pride do spremembe v številu kromosomov za celoten set rečemo **evploidi;**
- rastline s spremenjenim številom le posameznih kromosomov pa **anevploidi**.

Poliploid je organizem, ki vsebuje dva ali več osnovnih setov kromosomov. Število setov določa raven ploidnosti. Osnovno število kromosomov oziroma osnovni set označujemo s črko »x« in predstavlja popoln set nehomolognih kromosomov v genomu. Organizem z osnovnim številom kromosomov je **monoploid**, organizem z dvema kompletoma kromosomov (2x) pa **diploid**. Oznaka za somatsko število kromosomov je vedno »2n«, za število kromosomov v spolnih gametah pa »n«. Izraz haploiden označuje polovično število kromosomov, prisotnih v somatskih celicah. Organizmi, ki imajo več kot dva osnovna seta kromosomov (2x), so **poliploidi**.

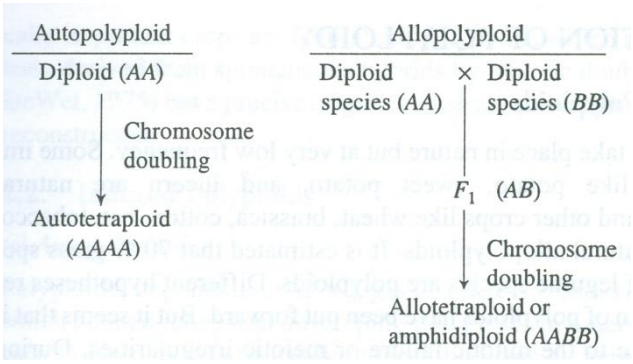
Pri pravem diploidnem organizmu, na primer pri koruzi, je osnovno število kromosomov (x) enako haploidnemu številu kromosomov (n) in znaša 10; diploidno število (2n) je torej 20.

V poliploidih pa se monoploidno in haploidno število razlikujeta. Na primer pšenica (heksaploid) je somatsko število kromosomov (2n) = 42, haploidno število (n) = 21 in monoploidno število (x) = 7, torej velja: x = 7, n = 21, 2n = 42 oziroma n = 3x in 2n = 6x.

Poliploide delimo na:

- **avtopoliploide**, ki imajo večkratnik lastnega osnovnega seta kromosomov, ter
- **alopoliploide**, katerih genom vsebuje dve kopiji celotnega seta kromosomov dveh ali več bližnje sorodnih vrst (kot posledica križanja; prikaz na sliki 6).

Alopoliploidi so lahko, denimo, tetraploidi, heksaploidi ali oktaploidi. Kromosomi različnih vrst so v alopoliploidih homeologni (delno homologni), medtem ko so pri avtopoliploidih homologni.

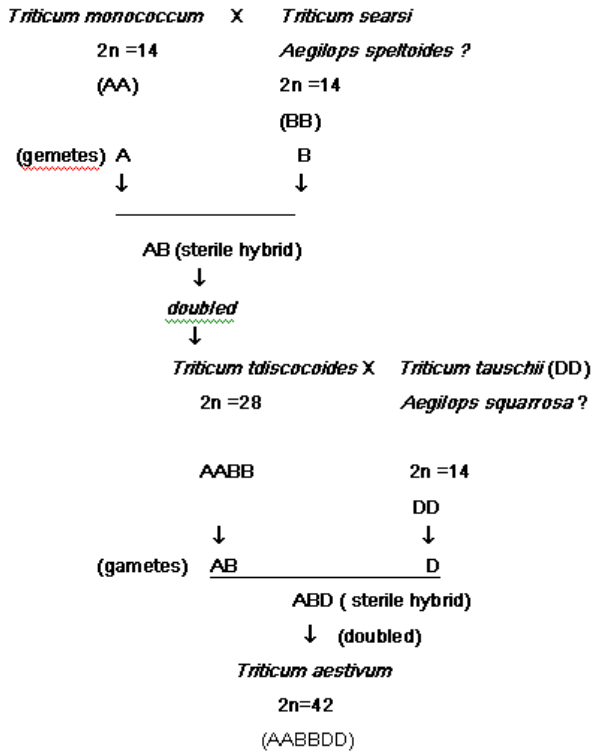


Slika 6: Shematski prikaz nastanka avtopoliploida in alopoliploida.

Do povečanja števila setov kromosomov lahko pride spontano (najpogosteje zaradi združitve nereduciranih gamet) ali z uporabo antimitotskih sredstev. Najpogosteje uporabljen je kolhicin iz jesenskega podleska, ki preprečuje segregacijo kromosomov med celično delitvijo. Z uporabo rastlinskih tkivnih kultur v žlahtnjenju se je pojavila še ena tehnika za povečanje števila setov kromosomov – **adventivna regeneracija** na gojišču z dodanimi rastnimi regulatorji. Prav to so raziskovalci dosegli z dodatkom fuzarične kisline pri rastlinah iz rodu *Cucurbita*.

Aplikativnost evploidov v kmetijstvu

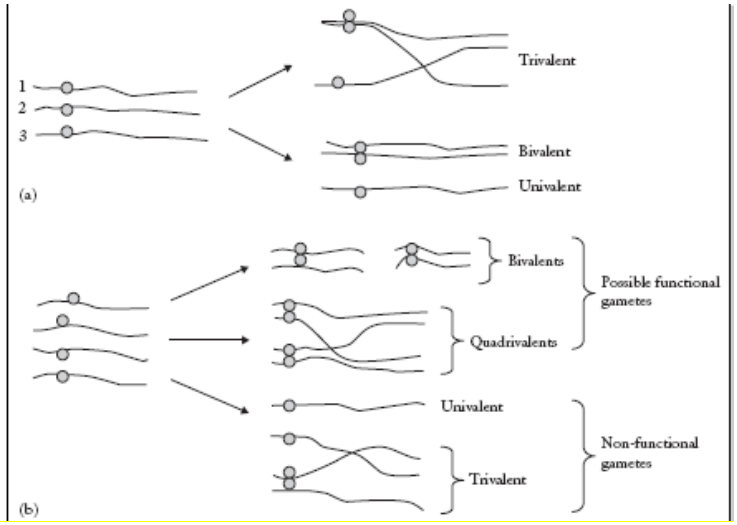
- **Monoploidi** – recesivne lastnosti se v diploidnem organizmu izrazijo le, če je ta homozigoten za ustrezne alele, medtem ko se pri monoploidih vedno izrazijo. Zato se v postopkih žlahtnjenja rastlin uporabljajo za iskanje recesivnih genov z agronomskim pomenom.
- **Avtotriploidi** – primer avtotriploida so banane (x = 11, 2n = 33). Zaradi lihega števila setov kromosomov so triploidne banane sterilne in zato ne vsebujejo semen. Triploidne sorte jablan imajo paviloma večje plodove.
- **Avtotetraploidi** – mednje spadajo lucerna, arašidi, krompir, kava, narcise, tulipani, hijacinte, dalije ipd. Zanje so značilni večji cvetovi, listi in organi.
- **Alopoliploidi** izkazujejo lastnosti starševskih vrst. Bombaž je naraven alopoliploid. Tritikala, križanec med pšenico (2n = 42) in ržjo (2n = 14), je izzvan alopoliploid; njegovo diploidno število kromosomov je 2n = 8x (21 + 7) = 56. Pšenica (*Triticum aestivum*) je prav tako naraven alopoliploid (prikaz na sliki 7). Alopoliploidi se pojavljajo tudi pri vrstah iz rodu *Brassica* ipd.



Slika 7: Rekonstrukcija nastanka heksaploidne pšenice.

Genomi, ki jih alopoliploid vsebuje, si ne smejo biti preveč podobni, da ne bi prihajalo do parjenja med kromosomi različnih genomov (homeologni kromosomi), hkrati pa morajo biti dovolj podobni, da omogočajo usklajeno kontrolo glavnih bioloških procesov. Pri pšenici je parjenje med homeolognimi kromosomi onemogočeno zaradi gena Ph, ki se nahaja na 5B kromosomu. Pri bombažu do parjenja homeolognih kromosomov ne prihaja zaradi strukturnih razlike med kromosomi.

Avtopoliploidi so običajno manj fertilni. Vzrok za to je nepravilno parjenje in razporejanje kromosomov med mejozo (prikaz na sliki 8). Slika 8 prikazuje možne oblike parjenja kromosomov pri a) triploidu in b) avtotetraploidu. Če se med spolno delitvijo homologni kromosomi parijo v bivalente in kvadrivalente, nastanejo fertilne gamete. Kadar pa se homologni kromosomi združijo v trivalente in univalente, se med delitvijo ne razporedijo pravilno, zato so nastale gamete sterilne.



Slika 8: Možne oblike parjenja kromosomov pri triploidu (a) in avtotetraploidu (b).

Metode določanja ploidnosti pri rastlinah so:

- direktne metode:
  - štetje kromosomov v metafaznih jedrih;
- indirektne metode:
  - štetje kloroplastov v celicah zapiralkah,
  - merjenje velikosti celic zapiralk,
  - uporaba pretočne citometrije.

Literatura:

Chahal G.S., Gosal S.S. 2002. Principles and procedures of plant breeding: biotechnological and conventional approaches. Harrow, Alpha science international Ltd.: str. 603.

Hartl D. L., Jones W. E. 1998. Genetics: principles and analysis. 4. izdaja. Sudbury, Jones and Bartlett publishers. Str: 840.

Acquaah G. 2007. Principles of plant genetics and breeding. Malden, Blackwell publishing, 555 str.

Sinkovič, T. 2008. Mitoza in celični cikel pri višjih rastlinah. Acta agriculturae Slovenica, 91, 2, 465-477.

PROTOKOL ZA PRAKTIČNI DEL VAJE

I. Celični cikel

1) Mitoza

Poglejte, narišite in označite mikroskopski preparat »*As116d Mitosis, l.s. from Vicia faba (bean) root tips showing all mitotic stages*«.

2) Mejoza

Poglejte, narišite in označite mikroskopski preparat »*As117f Meiosis, t.s. of Lilium anthers showing different stages of meiotic division*«.

II. Ploidnost ajde

Opazovanje listnih rež oziroma celic zapiralk ter štetje kloroplastov pri diploidni in tetraploidni ajdi.

Pod mikroskopom si oglejte strukturo listnih rež oziroma celic zapiralk na mikroskopskem preparatu z oznako »*As4102d Sedum, epidermis with stomata w.m.*«, nato narišite in označite opaženo strukturo.

Postopek preverjanja ploidnosti ajde:

1. Na predmetno steklo kanite dve kapljici lugola.
2. S skalpelom nežno podrgnite po povrhnjici spodnje strani lista in povrhnjico prenesite na predmetno stekelce.
3. Preštejte kloroplaste v celicah zapiralkah pri diploidni in tetraploidni ajdi ter izmerite njihovo velikost.
4. Izmenjajte si rezultate s sošolci in izračunajte povprečno število kloroplastov.

Preglednica 11: Preglednica za vnos števila kloroplastov in dolžine listnih rež pri 2n in 4n ajdi.

Diploidna ajda (2n)	**Tetraploidna ajda** (4n)
Povprečno število kloroplastov: _____	Povprečno število kloroplastov: _____
Povprečna dolžina listnih rež: _____	Povprečna dolžina listnih rež: _____

5. VAJA: BIOLOGIJA IN BIOTEHNOLOGIJA PELODA

Moške gamete se razvijejo znotraj pelodnih zrn, ta pa nastajajo v moških spolnih organih - v prašnicah oziroma anterah – v procesu mikrosporogeneze. Ženske gamete nastajajo v ženskih spolnih organih, torej v plodnici pestiča, v procesu makrosporogeneze.

Mikrosporogeneza

Vsaka prašnica ima štiri pelodne vrečke, ki vsebujejo številne zarodne celice. Pelodne vrečke obdaja tkivo, imenovano tapetum, ki med zorenjem oskrbuje mikrospore s hranili. Zarodne celice se mejotično delijo in iz njih nastanejo štiri haploidne hčerinske celice oziroma mikrospore, ki se nadalje razvijejo v pelodna zrna. Pred sproščanjem pelodnih zrn iz prašnic se jedro v njih mitotično razdeli na večjo vegetativno in manjšo generativno celico – v tem stadiju poteka oprašitev. Ko pade pelodno zrno na brazdo pestiča, skali tako, da iz intimne plasti zraste pelodna cev. Generativna celica se nato razdeli v dve spermalni celici. Takšno kaleče pelodno zrno predstavlja moški gametofit.

Oprašitev in oploditev

Po oprašitvi dozorela pelodna zrna ob ugodnih klimatskih razmerah kalijo. V času kalitve se oblikuje pelodna cev, ki začne prodirati skozi tkivo brazed, nato po vratu pestiča proti plodnici, kjer se usmeri proti mikropili (mesto, kjer sta ovojnici zarodkovega mešička prekinjeni). Po pelodni cevi potujeta obe spermalni celici skupaj z vegetativno celico. Ko pelodna cev prodre skozi mikropilo, se v notranjost zarodkovega mešička sprostita obe spermalni celici. Pelodna cev in vegetativna celica s tem končata svojo nalogo in se razgradita.

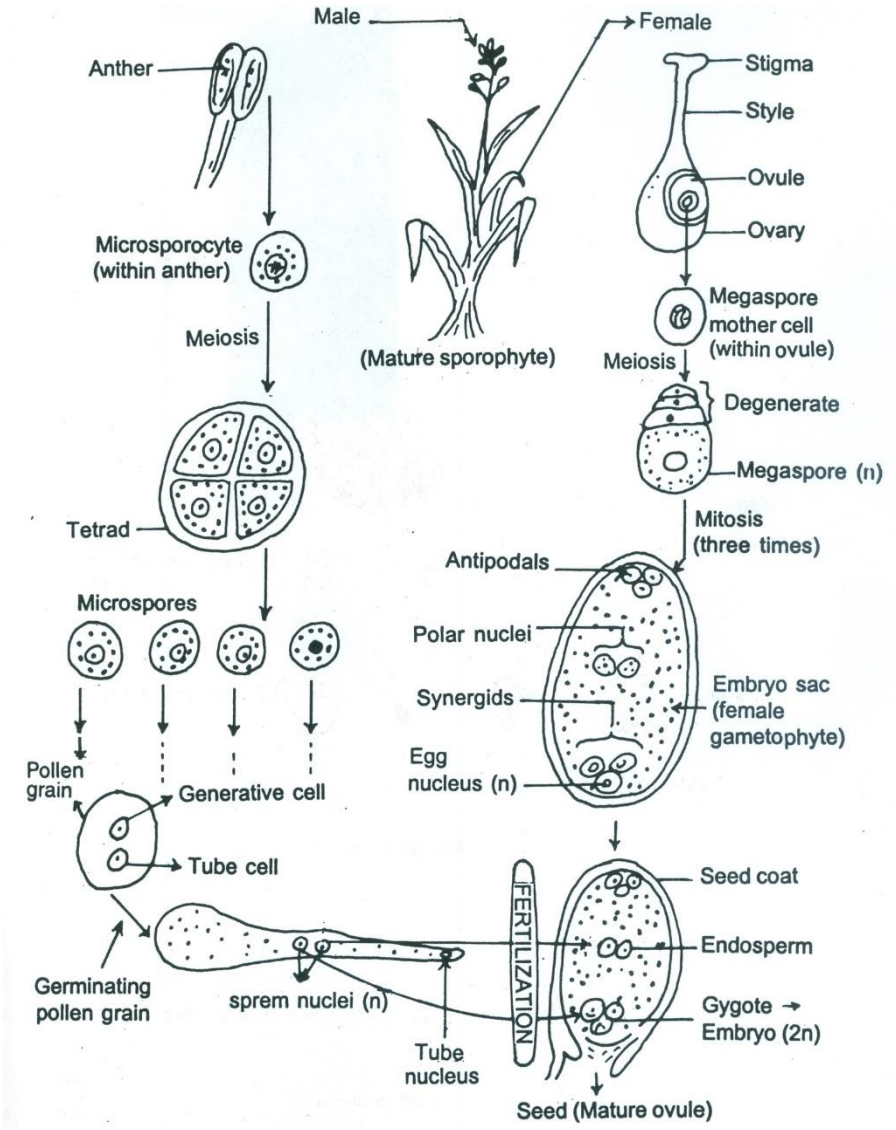
Osnovni sestavni deli razvitega zarodkovega mešička kritosemenk, torej ženskega gametofita, so: jajčna celica, dve sinergidi, dve polarni jedri in tri antipode. Ker pri oploditvi sodelujeta obe spermalni celici, govorimo o dvojni oploditvi (prikazi na sliki 10). Ena spermalna celica se združi z jajčno celico in tvori zigoto, ki se nato večkrat mitotično deli – product teh delitev je embrio oziroma kalček. Druga spermalna celica se združi z dvema polarnima jedroma, ki se nahajata na sredini embrionalne vrečke. Produkt te združitve je triploidno hranilno tkivo, imenovano sekundarni endosperm.

Življenjsko sposoben pelod je tisti, ki je zmožen na receptivni in kompatibilni brazdi vzkliti ter prenesti moške gamete v zarodni mešiček. Časovno obdobje, v katerem pelod ohrani življenjsko sposobnost, se močno razlikuje – odvisno od rastlinske vrste in abiotskih dejavnikov okolja.

Potrebe po ohranjanju živosti peloda za namene klasičnega žlahtnjenja, ki sega daleč v zgodovino (npr. že leta 1885 je William King izrazi potrebo po shranjevanju peloda), je spodbudila mnoge morfološke, genetske in fiziološke raziskave peloda. Shranjeni pelod se lahko uporablja za: opraševanje rastlin, ki cvetijo v različnih časovnih obdobjih ali na različnih lokacijah, izogibanje stalnemu vzdrževanju moških linij v žlahtniteljskih programih, študije pelodnih alergenov, mednarodno izmenjavo genskega materiala ipd.

Z razvojem biotehnologije in molekularne genetike se je uporabnost peloda močno razširila – npr. pri indukciji haploidov.

Tehnike za ugotavljanje živosti in razvojne stopnje peloda ter tehnike za in vitro kalitev in zorenje peloda predstavljajo osnovo za njegovo nadaljnjo uporabo.



Slika 9: Potek spolnega razmnoževanja pri semenkah.

Literatura:

Chahal G.S., Gosal S.S. 2002. Principles and procedures of plant breeding: biotechnological and conventional approaches. Harrow, Alpha science international Ltd.: str. 603.

Kosel J. 2009. Biotehnološki postopki za kalitev in *in vitro* dozorevanje peloda bezga (*Sambucus nigra* L.). Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo.

Sinkovič T. 2010. Uvod v botaniko. 2. izdaja. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo.

Shivanna K.R. in Sawhney V.K. 1997. Pollen biotechnology for crop production and improvement. New York Cambridge University Press: str. 448.

PROTOKOL ZA PRAKTIČNI DEL VAJE

1) Ugotavljanje razvojne stopnje mikrospor

Razvoj peloda lahko razdelimo na tri osnovne stopnje: stopnjo haploidnih tetrad, ko se zarodne celice z mejozo razdelijo na štiri haploidne celice, enojedrno fazo in dvojedrno fazo. Število jeder določamo z barvili, ki se vežejo na jedrno DNA. Uporabimo lahko fluorescentna barvila (npr. DAPI), za katere potrebujemo fluorescentni mikroskop, ali barvila, ki jih lahko opazujemo pod svetlobnim mikroskopom (acetokramin[1], acetoorcein).

Navodilo:

1. Na predmetno stekelce kanite kapljico acetokarmina.
2. V barvilu s skalpelom razrežite 2–3 prašnice. Vse večje ostanke nato odstranite s pinceto.
3. Dodajte še kapljico barvila in preparate pokrijte s krovnim stekelcem.
4. Nad gorilnikom preparat počasi segrevajte, da se barvilo posuši. Učinkovitost barvila je večja pri povišani temperaturi (50–70 °C). Pazite, da barvilo ne zavre!
5. Preparat opazujte pod svetlobnim mikroskopom.

Prostor za skiciranje opazovanih razvojnih stopenj mikrospor:

[1] Priprava acetokarmina: 1 g karmina raztopimo v 100 ml 55 % ocetne kisline. Raztopino nekaj minut kuhamo in nato prefiltriramo, da odstranimo morebitne usedline.

2) Ugotavljanje živosti peloda

2a) Ugotavljanje živosti peloda s pomočjo barvila MTT[2]

Encim dehidrogenaza katalizira pretvorbo MTT v moder ali vijoličen substrat/produkt. Živa pelodna zrna se zato obarvajo modro ali vijolično, neživa ne spremenijo barve.

Navodilo:

1. Na predmetno stekelce kanite kapljico gojišča BK[3].
2. Gojišče posujte s pelodom in dodajte nekaj kapljic barvila[4].
3. Previdno segrevajte stekelce nad gorilnikom, da se preparat posuši.
4. Na posušen preparat kanite nekaj kapljic glicerola in ga pokrijte s krovnim stekelcem.
5. Preštejte vsaj 100 pelodnih zrn.
6. Na podlagi števila živih in neživih pelodnih zrn izračunajte delež živega peloda.

Prostor za opažanja in izračun živosti peloda:

[2] Sinonimi: 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan, tiazol moder formazan

[3] Gojišče, ki sta ga pripravila Brewbaker in Kwack, leta 1963, v katerem uspešno kali več kot 86 vrst. Sestavljeno je iz saharoze, H_3BO_3, $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ in KNO_3.

[4] Priprava MTT barvila: 100 mg MTT raztopimo v 5 ml 5 % saharoze.

2b) In vitro kalitev zrelega peloda: kalitev v kulturi visečih kapljic

Navodilo:

1. Na ožji zgornji del petrijevke kanite nekaj kapljic BK-gojišča, vsako na drugo mesto.
2. Gojišče posujte s pelodom.
3. V širši spodnji del petrijevke nalijte destilirano vodo, ki bo kasneje preprečevala izsušitev gojišča.
4. Posodico s kapljicami previdno obrnite in jo položite čez širši spodnji del petrijevke.
5. Po eni uri lahko kapljice opazujete neposredno pod stereolupo, ali pa jih s Pasteurjevo pipeto prenesete na predmetno stekelce, preparat pokrijete s krovnim stekelcem in ga opazujete pod svetlobnim mikroskopom.
6. Preštejte vsaj 100 pelodnih zrn.
7. Izračunajte delež kalivosti.

Prostor za opažanja in izračun deleža kalivosti peloda:

3) Mikroskopski preparati

Poglejte, narišite in označite mikroskopski preparat »*As531e • Lilium, germinating pollen grains with pollen tubes w.m.«.*

Poglejte, narišite in označite mikroskopski preparat »*As6263b • Helianthus and Cucurbita, pollen grains w.m.*«.

RASTLINSKE TKIVNE KULTURE

6.VAJA: Gojišča in rastni regulatorji

7.VAJA: Inokulacija na gojišča

8.VAJA: Pregled razvoja na gojiščih

Rastlinska tkivna kultura (RTK) – je izraz, s katerim pojmujemo rast rastlinskih celic, tkiv in organov na umetnem gojišču v sterilnem oz. aseptičnem okolju z nadzorovanimi kemijskimi in fizikalnimi dejavniki (Bohanec, 1992).

- **Priprava založnih raztopin:**
  1. Na analitski tehtnici stehtajte želeno spojino.
  2. Nekatere spojine je najprej treba raztopiti v majhni količini kisline (npr. 1M HCl) ali baze (npr. 1M NaOH, 1M KOH).
  3. V merilni bučki razredčite do končnega volumna z destilirano vodo.
  4. Raztopino prelijte v steklenico ali centrifugirko za shranjevanje in označite: spojino, koncentracijo in datum priprave založne raztopine.
  5. Založne raztopine rastnih regulatorjev in vitaminov hranite v hladilniku, po možnosti v temnih steklenicah oziroma ovite v aluminijasto folijo.

Preglednica 12: Koncentracije spojin v založnih raztopinah in primerna topila zanje.

Spojina	Koncentracija v založni raztopini	Topilo
tiamin	4 mg/100 ml	voda
mio-inozitol	1 g/100 ml	voda
NAA (naftalen ocetna kislina)	10 mg/100 ml	95 % etanol, 100 % propanol ali 1 M KOH
KIN (kinetin)	10 mg/100 ml	95 % etanol, 100 % propanol ali 1 M HCl

i. KALITEV SEMEN V ASEPTIČNEM OKOLJU

Namen: seznanitev s tehniko kalitve semen v aseptičnem okolju, pripravo gojišča, inokulacijo semen ter opazovati odzivnost vzpostavljene kulture.

[6LV] – Navodila za pripravo gojišča

1. Za ___ ml gojišča v ___ ml čašo dodajte ~___ ml destilirane vode. Čašo z vodo postavite na magnetno mešalo.
2. Po navodilih na embalaži stehtajte ustrezno količino Murashige&Skoog gojišča in 3 % saharozo, glede na končni volumen gojišča.
3. Raztopino prelijte v merilno bučko in dopolnite z destilirano vodo do končnega volumna.
4. Prelijte nazaj v čašo in uravnajte pH na 5,8 ± 0,1. Če je pH previsok, dodajte po kapljicah 1M HCl, če je pH prenizek, dodajte po kapljicah 1M NaOH.
5. Prelijte nazaj v čašo in dodajte 0,8 % agar.
6. Čašo z dodanim agarjem postavite v mikrovalovno pečico, dokler se agar popolnoma ne raztopi.
7. Raztopino prelijte v večjo steklenico (npr. 500 ml), zamašite, vendar pokrovček rahlo odvijte (za približno dva zavoja) in pokrijte zamašek z aluminijasto folijo. Tako pripravljeno steklenico z gojiščem postavite v avtoklav.
8. Avtoklavirate pri 121 °C, pri tlaku 1 bar, za 20 min.
9. Po avtoklaviranju v laminariju razdelite gojišče v petrijevke in pustite, da se gojišče strdi.

Preglednica 13: Količina spojin za 250 ml gojišča, za I. gojišče.

Spojina	**za ___ ml gojišča**
MS gojišče	
saharoza	
agar	
pH	*5,8 ± 0,1*

Prostor za izračune:

[7LV] - Sterilizacija in inokulacija semen na gojišče

Rastlinski material: _____

Navodila:

1. Semena stresitev erlenmajerico, napolnjeno s sterilno vodo.
2. Vodo odlijte in semena namakajte v 70 % etanolu, ki ga po 1 minuti odlijte.
3. Erlenmajerico postavite na magnetno mešalo in dodajte 10 % raztopino natrijevega hipoklorita s tremi kapljicami omočila Tween20. Mešajte 10 min.
4. Delo nadaljujte v laminarij, kjer semena trikrat po 3 minute spirajte s sterilno vodo.
5. S sterilno pinceto semena prenesite na gojišča v petrijevkah.
6. Petrijevke ovijte s parafilmom in jih ustrezno označite.
7. Petrijevke postavite v rastno komoro pri 24 °C, z nastavljeno 16:8-urno fotoperiodo.

[8LV] - Rezultati

Moja opažanja:

-

-

-

-

-

-

Preglednica 14: Opažanja razvoja kalitve semen v aseptičnem okolju.

Petrijevka	**Razvoj/Ni razvoja**	**Ni/Je kontaminacija**

Vir protokola:

Pant, B. in Manandhar, S. 2007. In vitro propagation of carrot (*Daucus carota* L.). Scientific World, vol. 5, no. 5, 52-53.

ii. RAZMNOŽEVANJE RASTLIN Z NEMERISTEMSKIM TKIVOM - LISTI

[6LV] – Navodila za pripravo gojišča

1. Za ___ ml gojišča v ____ ml čašo dodajte ~___ ml destilirane vode. Čašo z vodo postavite na magnetno mešalo.
2. Po navodilih na embalaži stehtajte ustrezno količino Murashige&Skoog gojišča, dodajte 0,5 mg tiamina (iz založne raztopine), 10 mg mio-inozitola (iz založne raztopine) in 3 % saharoze, glede na končni volumen gojišča.
3. Raztopino prelijte v merilno bučko in dopolnite z destilirano vodo do končnega volumna.
4. Prelijte nazaj v čašo in uravnajte pH na 5,7 ± 0,1. Če je pH previsok, dodajte po kapljicah 1M HCl., če je pH prenizek, dodajte po kapljicah 1M NaOH.
5. Prelijte nazaj v čašo in dodajte 0,8 % agarja.
6. Čašo z dodanim agarjem postavite v mikrovalovno pečico, dokler se agar popolnoma ne raztopi.
7. Raztopino prelijte v »baby jars« (npr. ~25 ml na posodico) in jih pokrijte s pokrovčkom.
8. Avtoklavirajte pri 121 °C, pri tlaku 1 bar, za 20 min.
9. Po avtoklaviranju pustite, da se gojišče v “baby jars” strdi.

Preglednica 15: Količina spojin za 100 ml gojišča, za II. gojišče.

Spojina	**za ___ ml gojišča**
MS gojišče	
tiamin	
mio-inozitol	
saharoza	
agar	
pH	*5,7 ± 0,1*

Prostor za izračune:

[7LV] – Sterilizacija in inokulacija listov na gojišče

❖ Rastlinski material: *Saintpaulica ionantha* (afriška vijolica)

Navodila:

1. Izberite zdrave, nepoškodovane liste afriške vijolice, velikosti 4-6 cm.
2. Liste 5 min spirajte v erlenmajerici s sterilno vodo.
3. Erlenmajerico postavite na magnetno mešelo ali stresalnik in liste 10 min namakajte v 10 % raztopini natrijevega hipoklorita z dvema kapljicama omočila Tween20.
4. V laminariju liste trikrat po 3 minute spirajte s sterilno vodo.
5. Liste prenesite na sterilni papir in s steriliziranim skalpelom razrežite listno ploskev na koščke velikosti 1cm x 1cm.
6. Na vsako gojišče v »baby jars« položite po en izseček lista; pazite da je zgornja stran lista (temnejša in poraščena s trihomi) obrnjena navzgor.
7. »Baby jars« postavite v rastno komoro pri 24 °C, z nastavljeno 16:8-urno fotoperiodo.

[8LV] - Rezultati

Moja opažanja:

-

-

-

-

-

-

Preglednica 16: Opažanja razvoja nemeristemskega tkiva (listov) v RTK.

»Baby jars«	**Razvoj/Ni razvoja**	**Ni/Je kontaminacija**

iii. RAZMNOŽEVANJE RASTLIN Z AKSILARNIMI/APIKALNIMI MERISTEMI

[6LV] – Navodila za pripravo gojišča

1. Za ___ ml gojišča v ___ ml čašo dodajte ~___ ml destilirane vode. Čašo z vodo postavite na magnetno mešalo.
2. Po navodilih na embalaži stehtajte ustrezno količino Murashige&Skoog gojišča, dodajte 1,34 µM NAA (iz založne raztopine 10 mg/100 ml), 2,32 µM KIN (iz založne raztopine 10 mg/100 ml) in 3 % saharoze, glede na končni volumen gojišča.
3. Raztopino prelijte v merilno bučko in dopolnite z destilirano vodo do končnega volumna.
4. Prelijemo nazaj v čašo in uravnajte pH na 5,8 ± 0,1. Če je pH previsok, dodajte po kapljicah 1M HCl, če je pH prenizek, dodajte po kapljicah 1M NaOH.
5. Prelijte nazaj v čašo in dodajte 0,8 % agarja.
6. Čašo z dodanim agarjem postavite v mikrovalovno pečico, dokler se agar popolnoma ne raztopi.
7. Raztopino prelijte v »baby jars« (npr. ~25 ml na posodico) in jih pokrijte s pokrovčkom.
8. Avtoklavirajte pri 121 °C, pri tlaku 1 bar, za 20 min.
9. Po avtoklaviranju pustite, da se gojišče v “baby jars” strdi.

Preglednica 17: Količina spojin za 250 ml, za III. gojišče.

Spojina	**za ___ ml gojišča**
MS gojišče	
NAA	
KIN	
saharoza	
agar	
pH	*5,8 ± 0,1*

Prostor za izračune:

[7LV] – Sterilizacija in inokulacija poganjkov na gojišče

❖ Rastlinski material: *Dianthus* L. (nagelj) – nabrani poganjki nageljna

Navodila:

1. Poganjke nageljna trikrat po 3 min spirajte v erlenmajerici s sterilno vodo.
2. V laminariju poganjke 10 min namakajte v 10 % raztopini natrijevega hipoklorita z dvema kapljicama omočila Tween20.
3. Nato jih trikrat po 3 minute spirajte s sterilno vodo.
4. Po zadnjem spiranju do inokulacije na gojišče, pustite poganjke v sterilni vodi.
5. Poganjke prenesite na sterilni papir in jih oluuščite listov, tako da pridete do notranjega dela poganjka.
6. Inokulirajte pripravljene poganjke na gojišče v »baby jars«.
7. »Baby jars« postavite v rastno komoro pri 24 °C, z nastavljeno 16:8-urno fotoperiodo.

[8LV] - Rezultati

Moja opažanja:

-

-

-

-

-

-

Preglednica 18: Opažanja razvoja rastlin iz aksilarnih/apikalnih meristemov, v RTK.

»Baby jars«	**Razvoj/Ni razvoja**	**Ni/Je kontaminacija**

Vir protokola:

Yadav M.K., Gaur A.K., Garg G.K. 2003. Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 72. 153-156.