

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Barbara OVTAR

**INDUKCIJA HAPLOIDNIH GINOGENETSKIH
REGENERANTOV ČEBULE (*Allium cepa* L.) IZ
KRIŽANJA LINIJ OH-1 x 5225B**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Barbara OVTAR

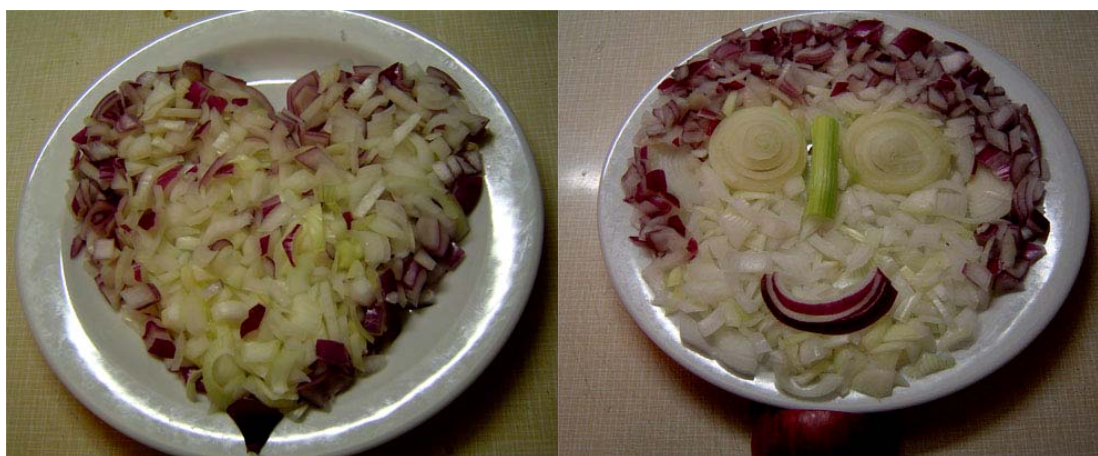
**INDUKCIJA HAPLOIDNIH GINOGENETSKIH REGENERANTOV
ČEBULE (*Allium cepa* L.) IZ KRIŽANJA LINIJ OH-1 x 5225B**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**INDUCTION OF HAPLOID GYNOGENETIC REGENERANTS OF
ONION (*Allium cepa* L.) FROM CROSSING OF LINES OH-1 x 5225B**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2008



Srce že ve
zakaj solze sreče,
ko gledam te.

Foto in besedilo: A. Kralj & B. Ovtar

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija agronomije. Poskus je bil opravljen na Univerzi v Ljubljani, Biotehniški fakulteti, Oddelku za agronomijo, Katedri za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. BOHANEC Boruta.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: akad. prof. dr. Ivan KREFT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Borut BOHANEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Marijana JAKŠE
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

Barbara OVTAR

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 635.25:57.086.83:575.222.7(043.2)
KG indukcija/čebula/*Allium cepa*/haploid/ginogeneza/*in vitro* kulture/kultura cvetov
KK AGRIS F30
AV OVTAR, Barbara
SA BOHANEČ, Borut (mentor)
KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
LI 2008
IN INDUKCIJA HAPLOIDNIH GINOGENETSKIH REGENERANTOV ČEBULE
(*Allium cepa* L.) IZ KRIŽANJA LINIJ OH-1 x 5225B
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 32, [3] str., 7 pregl., 5 sl., 2 pril., 35 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Ginogeneza je metoda pri kateri iz ženskih gametnih celic pridobivamo haploide. Največkrat je namen uporabe podvojenih haploidov – po podvajanju kromosomov – uporabiti jih kot popolnoma homozigotne inbridirane linije za pridobivanje hibridov. V tej študiji pa je bil namen ustvariti heterogeno populacijo genetsko divergentnih staršev za namen genetskega mapiranja čebule. Naša študija je bila usmerjena na pridobitev večjega števila haploidnih ginogenetskih regenerantov čebule iz križanja linij OH-1 x 5225B. Liniji sta bili predhodno testirani in sta genetsko zelo različna starša. Eden od staršev je sintetična linija ('OH-1'; Onion Haploid-1'), drugi ('5225B') pa je dihaploidna linija. Uporabili smo že znan enostopenjski postopek kulture celih cvetov. Cvetove smo pred inokulacijo razkuževali v raztopini dinatrijeve soli dikloroizocianurne kisline (16,6 g/l) z dvema kapljicama Tween-a 20. Za indukcijsko gojišče smo uporabili BDS makro-, mikroelemente in vitamine z 200 mg/l prolina, 400 mg/l mio-inozitola, 2 mg/l 6-benzilamino purina, 2 mg/l 2,4-diklorofenoksiocetne kisline, 100 g/l saharoze in 7 g/l agarja pri pH 6,0. Iz 29 donorskih rastlin smo inokulirali 31.650 cvetov, od katerih se jih je 4.443 (14,0%), zlasti zaradi napada resarjev, okužilo. Preostali neokuženi cvetovi (27.207) so imeli skupno 6,0% ginogenetsko odzivnost in so tvorili 1.638 haploidnih regenerantov. Analiza regenerantov je pokazala, da je bilo 18,1% deformiranih. Nedeformirane (1.342) smo predstavili na gojišče za izdolževanje in koreninjenje, sestavljeno iz polovičnega BDS gojišča z 30 g/l glukoze, 7 g/l agarja pri pH 6,0. Regeneranti so se pojavljali v času od 50 do 129 dni od inokulacije do indukcije, največ (473) v času 90-99 dni. Pridobljeni regeneranti so v fazi aklimatizacije. Ocenjujemo, da smo s poskusom uspeli pripraviti zadostno število regenerantov za nadaljnja genetska mapiranja.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 635.25:57.086.83:575.222.7(043.2)
CX induction/onion/*Allium cepa*/haploid/gynogenesis/*in vitro* culture/flower culture
CC AGRIS F30
AU OVTAR, Barbara
AA BOHANEČ, Borut (supervisor)
PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
PY 2008
TI INDUCTION OF HAPLOID GYNOGENETIC REGENERANTS OF ONION
(*Allium cepa* L.) FROM CROSSING OF LINES OH-1 x 5225B
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 32, [3] p., 7 tab., 5 fig., 2 ann., 35 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Gynogenesis is a method where the haploids are obtained from the female gametic cells. Often the main purpose is to use doubled haploid lines – following chromosome doubling – as completely homozygous inbred lines for production of hybrids, while in this study haploid lines were induced for further genetic mapping in onion. Our studies were focused on obtaining large number of haploid gynogenic onion regenerants of hybrid origin (OH-1 x 5225B). Parents were previously tested as being genetically very different. One of the parents ('OH-1'; 'Onion Haploid-1') is a synthetic line and the other ('5225B') is a doubled haploid line. Previously described one-step procedure of the culture of whole flowers was used. Flowers were sterilized before the inoculation in dichloroisocyanuric acid disodium salt (16,6 g/l) with two drops of Tween 20. Induction medium was composed of BDS macro-, micro elements and vitamins with 200 mg/l proline, 400 mg/l myo-inositol, 2 mg/l benzylaminopurine, 2 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 100 g/l sucrose and 7 g/l agar at pH 6.0. From 29 donor plants 31,650 flowers were inoculated, of which 4,443 (14.0%) were contaminated. The rest uncontaminated flowers (27,207) had the 6.0% gynogenic response and produced 1,638 haploid regenerants. The analysis of regenerants showed that 18.1% of them were deformed. The non-deformed ones (1,342) were transferred to the elongation and rooting medium composed of half strength BDS medium with 30 g/l glucose and 7 g/l agar at pH 6.0. Haploid regenerants were formed between 50 to 129 days in culture, most of them (473) between 90 till 99 day. The produced plantlets are transferred to acclimatization in sufficient number for further genetic mapping analysis.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	IX
Okrajšave in simboli	X
Slovarček	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINA ČEBULE	3
2.2 TAKSONOMSKA UVRSTITEV ČEBULE	3
2.3 BIOLOGIJA ČEBULE	4
2.4 HAPLOIDI	4
2.5 ŽLAHTNJENJE ČEBULE	5
2.6 POSTOPKI GINOGENEZE	6
2.6.1 Izbira organov	6
2.6.2 Izbira primernih cvetov	6
2.6.3 Razkuževanje cvetov	7
2.6.4 Indukcijska gojišča in rastni regulatorji	8
2.6.5 Ginogenetska odzivnost	9
2.6.6 Podvajanje haploidov	10
2.6.7 Ugotavljanje ploidnosti in homozigotnosti	10

3	MATERIALI IN METODE	11
3.1	DONORSKE RASTLINE	11
3.2	NABIRANJE CVETOV	11
3.3	RAZKUŽEVANJE CVETOV	12
3.4	PRIPRAVA IN RAZLIVANJE GOJIŠČA	12
3.4.1	Indukcijsko gojišče	12
3.4.2	Gojišče za izdolževanje in koreninjenje	14
3.5	INOKULACIJA CVETOV NA INDUKCIJSKO GOJIŠČE	14
3.6	SUBKULTIVIRANJE NASTALIH REGENERANTOV	16
4	REZULTATI	17
4.1	INOKULIRANI, OKUŽENI IN CVETOVI S KALUSOM	17
4.2.1	Obravnavo glede na datum	17
4.2.2	Obravnavo glede na donorsko rastlino	19
4.3	GINOGENETSKA ODZIVNOST	21
4.3.1	Vsi haploidni regeneranti	21
4.3.2	Deformirani in subkultivirani regeneranti	24
4.4	ČASOVNA RAZPOREDITEV NASTANKA REGENERANTOV	25
4.5	AKLIMATIZACIJA	25
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	26
6	POVZETEK	28
7	VIRI	30
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Načini razkuževanja cvetov različnih raziskovalcev	7
Preglednica 2: Sestavine BDS gojišča in potrebne količine ostalih dodanih sestavin za indukcijsko gojišče	13
Preglednica 3: Število inokuliranih, neokuženih in okuženih cvetov po datumu	17
Preglednica 4: Število kalusiranih in vitrificiranih cvetov po datumu	18
Preglednica 5: Število inokuliranih cvetov, število okuženih in kalusiranih cvetov glede na donorsko rastlino	20
Preglednica 6: Število vseh nastalih haplodnih regenerantov, deformiranih in število regenerantov v posameznem cvetu	22
Preglednica 7: Število deformiranih in subkultiviranih regenerantov glede na donorsko rastlino	24

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Socvetje čebule in nabrani cvetovi	12
Slika 2: Petrijevka z inokuliranimi cvetovi	15
Slika 3: Haploidna ginogenetska regeneranta in cvet z bazalnim kalusom	16
Slika 4: Vitrificiran cvet	19
Slika 5: Časovna razporeditev nastanka regenerantov	25

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Število okuženih cvetov z resarji (*Thrips tabaci* Lindeman) po datumu in po rastlinah

PRILOGA B: Časovna razporeditev nastanka haploidnih regenerantov po donorskih rastlinah

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2,4-D	2,4-diklorofenoksiocetna kislina (sintetični avksin)
2iP	N 6-(2-izopentil)-adenin (naravni citokinin)
BAP	6-benzilamino purin (sintetični citokinin)
CMS	citoplazemska moška sterilnost
NAA	α -naftalenocetna kislina (sintetični avksin)
NaOCl	natrijev hipoklorit (razkuževalno sredstvo)

SLOVARČEK

dihaploid	podvojeni haploid
heteroza	hibridna bujnost
<i>In vitro</i> razmere	razmere pri katerih procesi potekajo v sterilnih razmerah laboratorija
inbriding depresija	izražanje letalnih in subletalnih genov
inbridirana linija	samooplodna linija
inokulacija	vnos celic ali izsečkov na hranilno gojišče v <i>in vitro</i> razmerah
subkultura, subkultiviranje	prenos na sveže gojišče
Tween 20	polioksietilen-(20)-sorbitanmonolavrat (sredstvo za boljše oprijemanje)
.	

1 UVOD

Čebula (*Allium cepa* L.) je pri nas poznana pod imeni luk, navadna čebula, črnelec, črljenec in žbulj (Osvald in Kogoj-Osvald, 2005). Je vsakodnevno uporabna rastlina in to že zelo dolgo, saj je ena izmed najstarejših kultiviranih rastlin. Njena uporabnost je vsestranska. V kuhinji je nepogrešljiva, saj praktično ne mine dan, da je ne bi zaužili s prehrano. Že v starih časih so opisovali njene medicinske učinke. V zadnjem času pa je uporabna še kot čebulni test ali biološki test *Allium*, s katerim se dokazujejo potencialno genotoksične snovi oziroma splošna toksičnost in raven genotoksičnosti v vodnih, kopenskih in zračnih ekosistemih.

Raziskovanje metod za *in vitro* indukcijo haploidov je zadnjih 20 let eno izmed najbolj intenzivno raziskovanih področij v rastlinski biotehnologiji.

Ginogenetski regeneranti so haploidi pridobljeni iz ženskega gametofita. Ginogeneza je *in vitro* metoda, kjer pridobivamo haploidne rastline iz ženskih delov cvetov. Indukcijo ginogenetskih haploidov lahko pri čebuli izvedemo preko kulture neoprašenih ovul (semenskih zasnov), ovarijev (plodnic) ali celih cvetov (Bohanec, 2002).

Haploidni so tisti organizmi, ki imajo v somatskih celicah le polovično število kromosomov, torej strukturo, kakršno imajo sicer le gametne celice. Največkrat nas zanimajo haploidne rastline, nastale iz predhodno diploidnih organizmov; takšne rastline so torej monoploidne. Največji pomen v žlahtnjenju rastlin imajo monoploidne rastline, saj z naknadnim podvajanjem genoma dobimo diploidni (= dihaploidni) organizem, ki je popolnoma homozigoten. Homozigotnim organizmom pravimo čiste linije, s klasičnimi postopki se pridobivajo vsaj 5 generacij oziroma 10-12, če samoopraševanje ni možno (Bohanec, 1996).

Čisti liniji je pri tujeprašnicah genetsko identična inbridirana ali samooplodna linija. Pri tujeprašnicah se samooplodne linije uporabljajo zaradi inbriding depresije predvsem kot starševske linije za izkoriščanje heterotičnega učinka pri vzgoji hibridov F₁ generacije (Rozman, 2004).

V najširšem smislu pomena besede je hibrid vsak križanec dveh genetsko različnih rastlin. Pri žlahtnjenju rastlin pa z besedo hibrid navadno označujemo potomce dveh čistih linij, torej križamo dve liniji, ki sta genetsko izenačeni (homozigotni), vendar med seboj močno različni. Potomci, tako imenovani F₁ hibridi, so genetsko heterozigotni, vendar so vsi med seboj enaki, ker so bile starševske rastline genetsko izenačene. Heterozni efekt ne nastane s križanjem katerih koli linij, temveč moramo z zapletenim postopkom najprej izmed več tisoč linij najti dve najprimernejši, katerih križanci dajejo ustrezne pridelke. Za taki liniji pravimo, da imata dobro kombinacijsko sposobnost. Pri nekaterih rastlinah še vedno ni možno linij povsem genetsko izenačiti, tako so na primer hibridi čebule križanci le dva do trikrat samooprašenih linij. Ti hibridi niso povsem izenačeni, so pa boljši od nehibridnih vrst, izražen pa je tudi efekt heteroze (Bohanec, 2004).

Hibridni kultivarji se pri čebuli pridobivajo iz elitnih inbridiranih linij že preko 50 let. Pričakovane prednosti hibridnih kultivarjev so: večji pridelek (izražena heteroza), izboljšana izenačenost in za pridelovalce semen – zaščita rastlinskega materiala (Jakše in Bohanec, 2003). V nasprotju z nekaterimi drugimi tujeprašnimi vrstami, kot je koruza, kjer moderne inbridirane linije izražajo le manjšo inbriding depresijo, imajo populacije čebule še zmeraj letalne recesivne gene in inbriding depresija je očitna. Žlahtnjene linije čebule so običajno samooplojene le dva- do trikrat, zato je težko doseči kompletno genetsko in fenotipsko izenačenost v hibridih. Podvojeni haploidi predstavljajo alternativno strategijo, ki prvič pri čebuli omogoča, da dosežemo popolno homozigotnost in fenotipsko izenačenost (Bohanec, 2002). Druga prednost je v občutnem zmanjšanju časa potrebnega za pridobivanje inbridiranih linij. Ker je čebula dvoletna rastlina je v konvencionalnem žlahtnjenju potrebnih vsaj 10 let, da pridobimo skoraj homozigotne inbridirane linije (Jakše in Bohanec, 2003).

Haploidni regeneranti imajo poleg potenciala za uporabnost pri žlahtnjenju novih, hibridnih kultivarjev čebule, še potencial možnosti uporabe v genetskih analizah, pri študijah in razvoju biokemičnih in molekularskih markerjev ter za konstrukcijo genetskih map.

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je bila seznanitev z vsemi fazami postopka potrebnimi za pridobitev haploidnih ginogenetskih regenerantov čebule. Bistveni del raziskave je bil osredotočen na pridobitev večjega števila haploidnih ginogenetskih regenerantov križancev izbranih linij. V ta namen so na Katedri za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin v sodelovanju s prof. dr. Havey J. Michaelom (Univerza v Wisconsin-u, Madison) pripravili izhodiščni material. Ker bodo nastali regeneranti uporabljeni za namen genetskega mapiranja, za katerega je optimalno uporabiti križance genetsko čim bolj divergentnih linij, so izvedli križanje linij OH-1 x 5225B, ki sta genetsko zelo različna starša. Eden od staršev ('5225B') je dihaploidna linija, drug ('OH-1'; 'Onion-Haploid-1') pa sintetična linija predhodno testirana za visoko ginogenetsko odzivnost (Havey in Bohanec, 2007).

V diplomskem delu smo zbrali podatke o vseh cvetovih inokuliranih na gojišče, ovrednotili smo stopnjo ginogenetske odzivnosti oz. število nastalih haploidnih ginogenetskih regenerantov, stopnjo nezaželenih okužb ter stopnjo pojavljanja bazalnega kalusa, ki se tvori pri kulturi celih cvetov. Glede na to, da ima čebula 6 semenskih zasnov in lahko tvori 6 haploidnih ginogenetskih regenerantov, smo zbrali tudi podatke o tem, koliko cvetov je tvorilo koliko regenerantov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA ČEBULE

Čebula je ena najstarejših gojenih zelenjavnic. Najstarejši zapisi prihajajo iz Egipta, kjer se je pridelovala v času starega kraljestva. Pomembnost čebule v prehrani mnogih ljudi nakazuje podobe čebule na stenah piramid in podobe v grobnicah iz tretje in četrte dinastije (2700 p. n. št.). Iz Mezopotamije je poznan dokaz o pridelovanju v Sumeriji na koncu tretjega tisočletja pr. n. št. Zadnje, skupaj z zapisi iz Egipta, nakazuje, da se je začetna domestifikacija začela pred več kot 4.000 leti (Fritsch in Friesen, 2002).

Iz Indije so znani rokopisi iz 6. stoletja pr. n. št., ki omenjajo čebulo. V grškem in rimskem cesarstvu je bila pogosto gojena vrtnina. Njene medicinske lastnosti in podrobnosti o pridelovanju in prepoznavanju različnih kultivarjev so bile opisane že v tistem času. Predvideva se, da so Rimljani, ki so gojili čebulo v posebnih vrtovih (*cepinae*), prenesli čebulo severno od Alp, saj so vsa imena za čebulo v zahodni in centralni Evropi izpeljana iz latinskega. Različni kultivarji čebule so omenjeni v vrtnarskem katalogu iz 9. stoletja, ampak čebula je postala razširjena v Evropi verjetno v srednjem veku in je najverjetneje bila prenesena v Rusijo v 12. in 13. stoletju. Bila je tudi med prvimi kultiviranimi rastlinami, ki so bile prenesene iz Evrope v Ameriko (Fritsch in Friesen, 2002).

2.2 TAKSONOMSKA UVRSTITEV ČEBULE

Luk (*Allium*) je vrstno bogat in taksonomsko zapleten rod. Moderna klasifikacija sprejema več kot 750 vrst in okoli 60 skupin na nižjih podenotah (Fritsch in Friesen, 2002).

Večina literature uvršča čebulo v družino lilijevk (*Liliaceae*). V družino lilijevk spadajo številne rastline z značilno oblikovanimi založnimi organi v obliki čebulic, lažnih stebel ali rizomov. Običajno so to dve- ali večletne rastline. Družina lilijevk se deli v:

- čebulnice (*Allioideae*) in
- špargljevke (*Asparagoideae*) (Osvald in Kogoj-Osvald, 2005).

Fritsch in Friesen (2002) poročata, da je v zadnjem taksonomskem razvrščanju enokaličnic bil rod *Allium* in bližnji sorodniki prepoznaven kot razločna družina *Alliaceae* (lukovke) in da je Takhtajan (1997) povzel naslednjo hierarhijo:

1. Razred: *Liliopsida*. (= *Monocotyledoneae* – enokaličnice)
2. Podrazred: *Liliidae*.
3. Nadred: *Liliiana*.
4. Red: *Amaryllidales*
5. Družina: *Alliaceae* (lukovke)
6. Poddružina: *Allioideae*.
7. Pleme: *Allieae*.
8. Rod: *Allium* (luk)

Ostale klasifikacije imajo še zmeraj svoje zagovornike in so še zmeraj uporabljene v nekateri literaturi.

2.3 BIOLOGIJA ČEBULE

V skupino čebulnic spadajo samo zelenjadnice iz družine *Alliaceae* (lukovke). So enokaličnice in tujeprašnice. Značilna je protandrija (pelod dozori, ko brazda še ni sprejemljiva za pelod).

Čebula je dvoletna, fakultativno troletna. Drugo ali tretje leto poženejo iz čebulice cvetna stebila (1-4), ki so votla in oblikujejo enostaven kobul s 100 ali več belimi cvetovi. Gojimo jo zaradi omesenelih luskolistov, ki izraščajo iz skrajšanega stebila, ki ga imenujemo čebulni krožec. Glavna korenina kmalu po vzniku odmre. Iz čebulnega krožca izraščajo nadomestne ali adventivne korenine. Omeseneli luskolisti so obdani s prozorno ali rahlo obarvano povrhnjico, celotno čebulico pa prekrivajo še suhi luskolisti. Pri vrhu čebulice prehajajo luskolisti preko čebulnega vratu v zelene cevaste prave liste (Jakše, 2002).

Čebulice so različnih oblik, od ovalnih, preko okroglih do močno sploščenih. Ločimo pekoče, pol pekoče in sladke sorte z različno vsebnostjo sladkorja in eteričnih olj. Količina eteričnih olj in pekoč okus sta odvisna tako od rastišča, kjer čebula raste kot od lastnosti sorte. Vsaka sorta ima svoje lastnosti: okus, velikost in maso čebulice (Osvald in Kogoj-Osvald, 2005).

2.4 HAPLOIDI

Velika večina v naravi raslih rastlin je diploidnih, zlasti med gojenimi rastlinami pa je določeno število tudi poliploidnih. Haploidni organizmi so velika izjema, ki pa se vendarle v naravi tudi pojavlja (Bohanec, 1992). Tehnika rastlinske biotehnologije, ki ji pravimo vzgoja haploidov, ponuja povsem drugačen pristop do pridobivanja homozigotnih linij, kot pa klasične metode samoopraševanja oz. vzgoje v ozkem sorodstvu (Bohanec, 2004).

Haploidne rastline lahko pridobimo iz moških ali ženskih gametnih celic; vrste se med seboj razlikujejo po sposobnosti indukcije haploidov preko androgeneze ali ginogeneze. Pri čebuli so poskusi pridobivanja haploidov iz kulture anter bili neuspešni. Uspešna indukcija haploidov s pomočjo ginogeneze pa je bila skoraj sočasno razvita v treh laboratorijih. Champion in Alloni (1990) sta preizkusila kulturo neoprašenih semenskih zasnov (ovul), Muren (1989) je preizkusil neoprašene plodnice (ovarije), Keller (1990) pa je preizkusil kulturo neoprašenih semenskih zasnov, plodnic in celih cvetov. Deset let pozneje je gojišče, ki ga je leta 1989 opredelil Muren, le z nekaj manjšimi modifikacijami, še zmeraj najbolj učinkovito in ga uporabljajo po laboratorijih po celem svetu (Bohanec, 2002).

Poleg žlahtnjenja hibridnih kultivarjev lahko haploide in podvojene haploide uporabimo tudi v druge namene. Genetske analize kompleksnih lastnosti so lahko poenostavljene, če je uporabljena segregacija med podvojenimi haploidi namesto segregacije v standardni F₂ generaciji. V zadnji dekadi so bile populacije podvojenih haploidov pogosto uporabljene pri študijah in razvoju biokemičnih in molekulskih markerjev. Prednost podvojenih haploidov v teh študijah je, da ko obravnavamo dve populaciji, eno, ki ima in eno, ki nima zelenih lastnosti, ni vmesnih fenotipov, ki jih povzroča heterozigotnost. Podvojeni haploidi

se tako uporabljajo pri določitvi markerjev za posamezne gene in za lokuse kvantitativnih lastnosti ter za konstrukcijo genetskih map (Bohanec, 2002).

2.5 ŽLAHTNJENJE ČEBULE

Komercialno žlahtnjenje čebule je dandanes usmerjeno na F₁ hibride pridobljene s pomočjo citoplazemske moške sterilnosti (CMS), saj to zagotavlja zaščito investicij za žlahtnjenje in morebitne dobičke semenskim družbam ter boljši pridelek in izenačenost rastlin za pridelovalce (McCallum, 2007).

CMS je leta 1925 odkril Henry A. Jones v eni od čebul sorte 'Italian Red'. Henry A. Jones je bil eden od velikih pionirjev v agronomiji. Najbolj je poznan po svojih originalnih raziskavah CMS na čebuli in aplikaciji te metode za pridobivanje F₁ hibridnih semen, ki je zdaj uporabna na mnogih rastlinskih vrstah. V letu 1944 je ustvaril 'California Hybrid Red No. 1', kar je bil prvi hibrid, ki je bil pridobljen z uporabo CMS. Zaradi svojega vigorja in izenačenosti so hibridni kultivarji poznani ne le znanstvenikom, ampak tudi širši javnosti (Simon in sod., 1991).

CMS, stanje kjer je rastlina nezmožna proizvesti funkcionalen pelod, je široko razširjena med višjimi rastlinami. Sterilnost povzročajo geni, ki niso v jedru, ampak na mitohondrijih, le-ti pa se dedujejo skupaj s celotno citoplazmo le po materi. Če najdemo rastlino s takšno lastnostjo, pravimo, da je to vir CMS (Bohanec, 2004).

Za pridobivanje hibridov čebule potrebujemo CMS rastlino oz. vir CMS. Moško sterilna je rastlina, ki ima citoplazemski moški sterilni faktor (S) in recesivni jedrni gen (ms; ms kot oznaka za »male sterile«). Če je jedrni gen dominanten (Ms) lahko 'razveljavi' moško sterilnost in 'obnovi' rastlino do normalnega fenotipa. Torej, samo v S citoplazmi in z jedrnim genom v homozigotnem recesivnem stanju (msms) imamo moško sterilno rastlino, vse ostale rastline so fertile: S msms (= sterilna); S Msms (= fertilna); S MsMs (= fertilna); N msms (= fertilna); N Msms (= fertilna); N MsMs (= fertilna) (Rhodes, 2008).

N je oznaka za normalno, torej fertilno citoplazmo. Rastline z N msms so znane kot maintainerske oz. vzdrževalne linije, ki omogočijo razmnoževanje CMS linije.

Z moško sterilno linijo oz. virom CMS večkrat povratno križamo eno od dveh linij (s tem postanejo jedrni geni skoraj enaki naši liniji). Ko takšno moško sterilno linijo posejemo hkrati z drugo linijo, jo ta oprashi, seme ki ga poberemo le na prvi je v celoti hibridno (Bohanec, 2004). Ker pri čebuli uživamo vegetativne dele, restorerskih ali obnovitvenih linij ne potrebujemo (Jakše, 1995).

Poleg normalne moško fertile N-citoplazme, so v žlahtnjenju čebule uporabne tri različne moško sterilne citoplazme:

1. S – identificirala sta jo Jones in Clarke v sorti 'Italian Red',
2. C – identificirala sta jo Banga in Petiet v 'Rijnsburger' čebuli,
3. T – identificiral jo je Beringer v sorti 'Jaune paille des vertus'.
4. G – izvira iz križanja s *Allium galanthum*

Vsi ti viri se razlikujejo glede na genetsko kontrolo in frekvenco maintainerskih oz. vzdrževalnih genotipov. Zaradi tega je znanje o tipu citoplazme zelo pomembno za žlahtnjenje čebule (Szkłarczyk in sod., 2002).

2.6 POSTOPKI GINOGENEZE

2.6.1 Izbira organov

Indukcijo haploidnih ginogenetskih regenerantov čebule lahko dosežemo s kulturo semenskih zasnov, plodnic ali celih cvetov. Poleg tega je lahko postopek eno- ali dvostopenjski, torej z ali brez subkultiviranja.

Kultura semenskih zasnov je delovno najbolj zahtevna. Semenske zasnove lahko izluščimo takoj po sterilizaciji cvetov in inokuliramo na gojišče (Keller, 1990) ali pa na gojišče predhodno inokuliramo cvetove in potem izluščimo semenske zasnove ter subkultiviramo na drugo gojišče (Campion in Alloni, 1990; Bohanec in sod., 1995).

Kulturo plodnic lahko pripravimo na dva načina: (1.) plodnice izoliramo iz cvetov in jih pustimo na gojišču do pojava haploidnih regenerantov (Muren, 1989; Campion in sod., 1992) ali pa (2.) najprej inokuliramo cvetove, potem izoliramo plodnice in jih subkultiviramo na drugo gojišče (Bohanec in sod., 1995; Jakše in sod., 1996). Drugi postopek ima to prednost, da plodnice že nabreknejo in jih lažje izluščimo.

Kultura cvetov je najlažji način indukcije haploidov čebule in je bila uporabljena v mnogih študijah (Geoffriau in sod., 1997; Javornik in sod., 1998; Bohanec in Jakše, 1999; Alan in sod., 2004; Bohanec in sod., 2003).

Primerjava kulture različnih delov cvetov je pokazala, da je kultura semenskih zasnov delovno in časovno najbolj zahtevna, pridelek haploidnih regenerantov pa je najmanjši, zato se ta metoda pri indukciji haploidov čebule ne uporablja več. Za kulturo plodnic iz predhodno inokuliranih cvetov so ocenili, da je v primerjavi s kulturo celih cvetov potrebno trikrat več dela, medtem ko je rezultat pogosto podoben (Bohanec in Jakše, 1999). Do samooprašitve v inokuliranih celih cvetovih ne prihaja, saj se antere ne razpočijo, najverjetneje zaradi visoke vlažnosti. Edina negativna lastnost kulture celih cvetov je nastanek bazalnega kalusa, ki se pogosto tvori iz nektarijev (medovnikov) in časnih listov. Cvetovi, ki formirajo kalus, lahko tvorijo regenerante slabše kakovosti. Negativni vidik kulture celih cvetov je tudi povečana možnosti somatske regeneracije iz kalusa, ki pa je genotipsko odvisna. Bohanec in Jakše (1999) sta ovrednotila razvoj bazalnega kalusa v 39 akcesijah čebule in zaključila, da bi le v eni akcesiji ekstrakcija plodnic opravičila težko in zamudno delo.

2.6.2 Izbira primernih cvetov

Izbira primernih cvetov je pomemben faktor za uspeh. Že v eni izmed prvih študij je Muren (1989) ugotovil, da so najbolj odzivne plodnice izrezane iz cvetov, ki so bili 3 do 5 dni pred odprtjem. Alan in sod. (2004), ki so uporabili kulturo celih cvetov, so razdelili cvetove po velikosti v tri skupine: majhne (<2-2,5mm), srednje (3-4,5mm) in velike

(>4,5mm). Ugotovili so, da so majhni cvetovi zelo neodzivni, medtem ko so pri eni sorti populacije ugotovili, da so srednji cvetovi bolj odzivni, pri več sintetičnih sortah pa so srednji in veliki cvetovi imeli podoben odziv. Podobne ugotovitve je ista skupina imela že pri prejšnjih študijah (Alan in sod., 2003), kjer so ugotavljali ginogenetsko odzivnost čebule in večih generacij križancev med čebulo in *Allium roylei* Stearn, ki je divji sorodnik čebule in je odporen na čebulno plesen (*Peronospora destructor*) in sivo plesen čebulnih listov (*Botrytis squamosa*).

Alan in sod. (2004) so v poskus vključili tudi cvetove velike 3 do 5 mm iz socvetij oz. kobulov, ki so jih shranili v čašah vode pri 10 ° C za 4 do 23 dni in ugotovili, da so takšni cvetovi ostali odzivni in da je bila njihova ginogenetska odzivnost podobna tisti iz svežih cvetov. Poudarili so, da je to lahko pomembna prednost v študijah, kjer je dostop do donorskih rastlin težaven ali kjer so težave z delovno silo.

Za metodo zbiranja celih cvetov iz socvetij čebule obstajata dve možnosti: cvetove izrežemo iz socvetij, ki smo jih prej v celoti odrezali iz rastline in to tedaj, ko se prvi cvetovi že odprejo (Bohanec in sod., 1995; Jakše in sod., 1996) oz. ko je okoli 30% cvetov primerne velikosti (Bohanec in Jakše, 1999) oz. ko je odprtih že 10-20% cvetov (Alan in sod., 2003) ali ko je odprtih že 20-30% cvetov (Alan in sod., 2004). Druga možnost je, da cvetove režemo neposredno iz socvetij rastlin, ki še rastejo in jih tako zbiramo večkrat, ponavadi v dvodnevni intervalih. Slednja metoda ima to prednost, da lahko iz posameznega socvetja pridobimo več cvetov primerne velikosti, brez negativnega učinka in je zato v uporabi zadnjih nekaj let (Bohanec, 2002).

2.6.3 Razkuževanje cvetov

Različne skupine uporabljajo različna razkuževalna sredstva, v različnih koncentracijah in časovno različno dolgo. V preglednici 1 so prikazani načini razkuževanja različnih raziskovalcev.

Preglednica 1: Načini razkuževanja cvetov različnih raziskovalcev

Avtor	Razkuževalno sredstvo in čas razkuževanja
Muren (1989)	Cvetove s socvetja oz. kobula je odstranil in jih steriliziral v 0,5% natrijevem hipokloritu (NaOCl) 10 minut in nato trikrat spral s sterilno vodo.
Keller (1990)	Cvetove je steriliziral v 3% NaOCl 15 minut in nato 3-4 spral s sterilno vodo.
Campion in Alloni (1990) Campion in sod. (1992)	Cvetovi so sterilizirali v 3% NaOCl 10 minut in trikrat sprali s sterilno vodo.
Bohanec in sod. (1995), Jakše in sod. (1996)	Cvetove so sterilizirali v 5% NaOCl z dodatkom nekaj kapljic Tween-a 20 10 minut in trikrat sprali s sterilno vodo.

se nadaljuje

nadaljevanje

Avtor	Razkuževalno sredstvo in čas razkuževanja
Geoffriau in sod. (1997)	Celotno socvetje so najprej pomočili v 96% etanolu za 1 minuto in ga nato sterilizirali v 0,5% NaOCl 15 minut ter trikrat sprali s sterilno vodo.
Javornik in sod. (1998)	Socvetja so sterilizirali v 2% NaOCl 10 minut in nato trikrat sprali s sterilno vodo.
Bohanec in Jakše (1999) Bohanec in sod. (2003)	Uporabila sta dinatrijevo sol dikloroizocianurne kisline (16,6 g/l) z nekaj kapljicami Tween-a 20 ter po 8 minutah trikrat sprala s sterilno vodo.
Alan in sod. (2003)	Socvetja so pomočili v 70% etanol za 3 minute in sterilizirali v 15% Clorox-u (0,9% NaOCl) + 0,1% Tween 20 30 minut in trikrat sprali s sterilno vodo

2.6.4 Indukcijska gojišča in rastni regulatorji

Različne skupine so uporabile različna gojišča in različne rastne regulatorje oz. v različnih koncentracijah ter različno koncentracijo agarja z različnim pH-jem.

Največkrat uporabljena gojišča so B5 (Gamborg in sod., 1968), BDS (Dunstan in Short, 1977) in MS (Murashige in Skoog, 1962). Na voljo ni specifičnih študij, vendar se zdi, da imajo ta tri osnovna gojišča podoben učinek na razvoj in rezultat (Bohanec, 2002). Podrobno je pregled uporabljenih gojišč različnih raziskovalcev do leta 1999 opisal že Slavec (1999) v svoji diplomski nalogi, zato bodo tukaj naštet samo gojišča uporabljena po letu 1999.

Bohanec in sod. (2003) so uporabili osnovno gojišče BDS, 2 mg/l 6-benzilamino purina (BAP), 2 mg/l 2,4-diklorofenoksiocetne kisline (2,4-D) 500 mg/l mio-inozitola, 200 mg/l prolina, 100 g/l saharoze, 7 g/l agarja in umerili pH na 6,0.

Alan in sod. (2003) so uporabili isto gojišče kot Bohanec in sod. (2003) in ga primerjali z B1 gojiščem, katerega so povzeli po Champion in Alloni (1990). To gojišče je vsebovalo osnovno gojišče MS, kateremu so dodali 1 mg/l α -naftalenocetno kislino (NAA) in 2 mg/l N 6-(2-izopentil)-adenina (2iP). To primerjavo so storili v dvostopenjskem postopku, tako da so po 3-7 tednih na BDS gojišču cvetove subkultivirali na B1 gojišče. Ugotovili so, da je dvostopenjski postopek na gojiščih BDS/B1 povečal razvoj somatskih poganjkov, vendar na indukcijo ginogenetskih regenerantov ni imel vpliva.

Alan in sod. (2004) so uporabili isto gojišče kot Bohanec in sod. (2003) in ga pri eni populaciji primerjali z B1 gojiščem. Preizkusili so tako enostopenjski postopek na BDS in B1 gojišču, kot dvostopenjski postopek pri katerem so cvetove sprva inokulirali na BDS gojišče in jih po 15-25 dneh subkultivirali na B1 gojišče. Dobili so rezultate pri katerih je bila indukcija haploidnih regenerantov precej manjša na B1 gojišču, kot na BDS gojišču. Dvostopenjski postopek na BDS/B1 gojišču jim ni dosti povečal indukcije haploidnih

regenerantov. Poleg tega je dvostopenjski postopek delovno, časovno in stroškovno bolj zamuden in kot tak neprimeren za široko proizvodnjo haploidnih ginogenetskih regenerantov.

Kar se tiče uporabe rastnih regulatorjev oz. hormonov v uporabljenih gojiščih, je že Muren (1989) uporabil BAP in 2,4-D, oboje v koncentraciji 2 mg/l in učinkovitost uporabe teh dveh rastnih regulatorjev je od tedaj dokazalo že mnogo raziskovalcev. Ostali rastni regulatorji, kot so α -naftalenocetna kislina (NAA), indol maslena kislina (IBA), N 6-(2-izopentil)-adenin (2iP) in giberelinska kislina (GA_3) so se pokazali kot manj učinkoviti (Bohanec, 2002).

2.6.5 Ginogenetska odzivnost

Že zelo zgodaj je bilo jasno, da imata genotip donorske rastline in njeni rastni pogoji zelo velik vpliv na uspešnosti ginogeneze. Pri čebuli se indukcija haploidov izraža v frekvenci pridobljenih haploidnih regenerantov na 100 cvetov. Ker ima čebula šest semenskih zasnov, je torej lahko teoretični maksimum 600% (Bohanec, 2002).

V prvih poskusih je bil odstotek ginogenetske odzivnosti zelo majhen. Muren (1989) je dosegel z najbolj odzivnim genotipom in pod najboljšimi pogoji 2,2%, Champion in Alloni (1990) sta dosegla 0,28%, Champion in sod. (1992) pa so dosegli 3,55%. Bohanec in sod. (1995) so pri štirih kultivarjih dosegli v povprečju 0,8% s kulturo plodnic in le 0,02% s kulturo semenskih zasnov, vendar so pri enem hibridu dosegli 7,6% odzivnost.

Kasnejše študije so se osredotočile na variabilnost genotipov iz različnih regij sveta (Bohanec, 2002). Geoffriau in sod. (1997) so preučevali klone, inbridirane linije, sintetične sorte in populacije, vsega skupaj 22 genotipov iz vzhodne, severne in južne Evrope ter ZDA. V študiji, ki je potekala 3 leta so odkrili zelo odzivne genotipe (do 17,4% v najboljšem letu) in tudi neodzivne (0%). Ugotovili so, da je zelo težko posebej ovrednotiti faktorje, kot so izvor donorske rastline, rastne pogoje in leto, v povezavi z uspešnostjo ginogeneze. Genotip donorske rastline je vsako leto drugačen, kar je del letnega vpliva. So pa z uporabo dveh klonov ugotovili, da genotip rastline in vpliv leta verjetno nista edina faktorja, ki vplivata na ginogenetsko odzivnost, ampak je pomemben tudi čas inokulacije.

Bohanec in Jakše (1999) sta analizirala 39 akcesij iz Evrope, severne Amerike in Japonske. Dve evropski in tri japonske akcesije so bile neodzivne, medtem ko najboljši uspeh dosegli pri dveh inbridiranih linijah (18,6% in 19,3%) ter pri enem F_1 hibridu (22,6%). V povprečju je 39% akcesij imelo nizko ginogenetsko odzivnost (0-1%), 46% jih je imelo srednjo ginogenetsko odzivnost (1-7,9%) in 15% je imelo visoko ginogenetsko odzivnost (9,1-22,6%). Glede na geografski izvor akcesije so ugotovili, da so najbolj odzivne akcesije iz severne Amerike (največja ginogenetska odzivnost 22,6%, v povprečju 8%), ampak da je med njimi tudi nekaj takih z nizko odzivnostjo (0-0,3%). Evropske in japonske akcesije so bile v povprečju 5- do 9-krat manj odzivne. Ker so 4 najbolj odzivne akcesije preučevali 2 leti, so ugotovili, da ima genetska variabilnosti večji vpliv na ginogenezo, kot pa rastni pogoji donorske rastline.

Bohanec in sod. (2003) so še naprej preučevali dve inbridirani liniji, ki sta v prejšnjih študijah imeli visoko ginogenetsko odzivnost. Križali so jih z linijami z nizko odzivnostjo in ugotovili, da je ginogenetska odzivnost pri hibridih večja, kot tista od nizko odzivnega starša in manjša, kot tista od visoko odzivnega starša. Zato sklepajo, da je ginogenetska odzivnost kvantitativno podedovana. Iz samooprašenih potomcev ene linije so dosegli zelo visoko povprečno ginogenetsko odzivnost (56,8%) in pri eni rastlini celo najvišjo ginogenetsko odzivnost od vseh do sedaj znanih raziskav (82,2%).

2.6.6 Podvajanje haploidov

Ker haploidne rastline niso fertile je potrebna diploidizacija oz. podvojitve genoma haploida, da dobimo diploidni organizem. Nekatere zgodnejše študije (Muren, 1989; Keller, 1990) so poročale, da do spontane podvojitve kromosomov prihaja pri okoli 30% haploidov. Večinoma nedavnih študij pa poroča, da okoli 90% regenerantov ostane haploidov (Bohanec, 2002).

Za razliko od nekaterih drugih hortikulturnih rastlin, se spontana diploidizacija oz. podvojitve genoma pri čebuli pojavlja v manj kot 10%, ploidno stanje haploidnih rastlin pa je zelo stabilno. Problem pri čebuli pa je, da je apikalni meristem odraslih rastlin nedostopen, zato je potrebno postopek podvajanja izvajati že pri *in vitro* regenerantih, kar pa ima kar nekaj slabosti (Jakše in sod., 2003).

Za podvajanje genoma haploidov se uporabljajo snovi, ki preprečujejo mitozo, antimitotiki. Največkrat uporabljena sredstva so kolhicin, orizalin, amiprofos-metil in trifluralin. Podrobno je uporabljena sredstva in metode podvajanja genoma pri čebuli opisal že Kovačič (2006).

2.6.7 Ugotavljanje ploidnosti in homozigotnosti

Za ugotavljanje ploidnosti uporabljamo različne metode. Lahko štejemo kromosome v vršičkih korenin ali pa v vršičkih poganjkov. Slednja tehnika predstavlja bolj realno situacijo, glede na to da se rastline oblikujejo iz vršičkov poganjkov. V večini zadnjih raziskav pa se uporablja metoda pretočne citometrije listnega tkiva. Ta metoda ima več prednosti: je hitra, ne uničuje rastlinskega tkiva, lahko je uporabna za različna tkiva in prikazuje natančno razmerje količin DNA v raziskovanem tkivu. Analiza ploidnosti je nekako komplicirana, saj so lahko v istem tkivu haploidne, diploidne in poliploidne stopnje. Različna ploidna stanja so tako lahko najdena v istem socvetju, vendar le diploidni cvetovi tvorijo semena, medtem ko ostali ostanejo sterilni (Bohanec, 2002).

Homozigotnost regenerantov prav tako lahko določimo z različnimi metodami. Ker je čebula dvoletna rastlina je analiza potomstva pridobljenega po samoopraševanju domnevnih homozigotov razmeroma dolg proces. Alternativna metoda je izoencimska analiza polimorfnihih lokusov z enim izmed elektroforeznih sistemov (Bohanec, 2002).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 DONORSKE RASTLINE

Na Katedri za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin so v sodelovanju s prof. dr. Havey J. Michaelom (Univerza v Wisconsin-u, Madison) pripravili izhodiščni material. Križali so liniji, ki sta bili predhodno testirani in sta genetsko zelo različna starša. Linija '5225B' je dihaploidna linija, linija 'OH-1' ('Onion Haploid-1') pa je sintetična linija, ki je že v predhodnih testiranjih izkazala visoko ginogenetsko odzivnost (Havey in Bohanec, 2007).

'OH-1' sta skupaj izdala Oddelek za kmetijstvo Z.D.A., Kmetijska raziskovalna služba (U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service) in Univerza v Ljubljani, Slovenija. 'OH-1' je dolgodnevna sintetična populacija, ki je namenjena kot odzivna kontrola za ekstrakcijo ginogenetskih haploidov čebule. Naključne rastline iz relativno odzivnih inbridiranih linij 'B2923B' in 'B0223B' so bile ocenjene za ginogenetsko odzivne. Rastline, ki so proizvedle relativno visoko število haploidnih embrijev so bile samooprašene. Pet čebul iz vsake od 10 S₁ družin (devet iz 'B2923' in ena iz 'B0223B') so bile izolirane in skrižane. Rastline tega sintetika proizvedejo povprečno 12 ginogenetskih haploidov na 100 inokuliranih cvetov. Čebule te sintetične populacije so rumene barve z dobro skladiščno sposobnostjo. Vse rastline 'OH-1' naj bi imele N-citoplazmo in bile homozigotno recesivne na *Ms* lokusu, čeprav to ni bilo potrjeno (Havey in Bohanec, 2007).

Sintetična sorta ali sintetik predstavlja skupino več različnih genotipov, katere žlahtnitelj s pomočjo določenih metod (npr. rekurentne selekcije) plansko ustvarja. Predstavlja potomstvo medsebojnega križanja načrtno (včasih tudi nenačrtno) izbranih kultivarjev (križancev, klonov, linij). Uporablja se v glavnem pri tujeprašnicah (Rozman, 2004).

Iz križanja linij OH-1 x 5225B je bilo pridobljenih 29 rastlin. Posajene so bile 13. februarja, cvetele so maja in junija 2008. Takrat smo iz njih nabirali cvetove. Nekaj rastlin je imelo po dva ali celo tri socvetja oz. kobule. Donorske rastline so bile večkrat zalite z raztopino insekticida Confidor (imidaklorpid) v koncentraciji 0,6 ml/l, v 14 do 21 dnevni intervalih, z začetkom 6. marca, enkrat (11. aprila) so bile škropljene z insekticidom Laser (spinosad) v koncentraciji 0,4 ml/l in enkrat (21. aprila) z akaricidom Apollo (klofentezin) v koncentraciji 0,4 ml/l.

3.2 NABIRANJE CVETOV

Nabirali smo cvetove, ki so bili tik pred odprtjem in sicer tako, da smo jih odrezali tik pod cvetno osjo, tako da je cvetnega peclja ostalo zelo malo. Za nabiranje smo uporabljali škarjice in plastične posodice, katere smo predhodno označili s številko rastline. Vsakokrat smo iz socvetja porezali le največje cvetove, tako smo cvetove iz posameznega socvetja pobirali večkrat. Pobiranje cvetov je potekalo od 16. maja do 16. junija 2008 in sicer v različno dolgih intervalih. Dolžina intervalov med posameznim zbiranjem cvetov je bila odvisna od števila cvetov primernih velikosti.

Na sliki 1 so lepo vidni cvetovi primerne velikosti, ki smo jih nabirali za inokulacijo na gojišče za namen indukcije haploidnih ginogenetskih regenerantov.



Slika 1: Socvetje čebule in nabrani cvetovi. Slika A prikazuje socvetje oz. kobul čebule (puščica prikazuje cvet primerne velikosti), slika B prikazuje nabrane cvetove primernih velikosti (foto: Bohanec B.).

3.3 RAZKUŽEVANJE CVETOV

Cvetove iz posameznih rastlin nabrane v plastične posodice smo stresli v 100 ml erlenmajerice, ki so vsebovale 50 ml avtoklavirane vode, v kateri smo pred tem raztopili 0,83 g dinatrijevo sol dikloroizocianurne kisline (16,6 g/l) ter dodali dve kapljici Tween-a 20 (polioksietilen-(20)-sorbitanmonolavrat), ki je sredstvo za boljše oprijemanje. Ob večkratnem ročnem mešanju smo cvetove pustili v raztopini 10 minut. Raztopino smo odlili tako, da smo cvetove zadržali v erlenmajerici s pomočjo pincete, ki smo jo držali na vratu erlenmajerice. Nato smo dolili avtoklavirano vodo, premešali in odlili. Postopek smo ponovili trikrat. Po končanem spiranju smo z avtoklavirano vodo napolnili erlenmajerico, tako da so cvetovi plavali na vrhu in smo jih na ta način lažje prijeli s pinceto ob inokulaciji na gojišče. Do inokulacije smo erlenmajerice s cvetovi pokrili z dvojno aluminijasto folijo. Folijo smo dali na erlenmajerice napolnjene z 50 ml vode že pred avtoklaviranjem in je torej bila sterilna. Na ta način smo se želeli izogniti okužbam že pred inokulacijo cvetov na gojišče.

3.4 PRIPRAVA IN RAZLIVANJE GOJIŠČA

3.4.1 Indukcijsko gojišče

Indukcijsko gojišče je bilo sestavljeno iz naslednjih sestavin: že pripravljena mešanica makroelementov, mikroelementov in vitaminov BDS (po Dunstan in Short, 1977), prolin, mio-inozitol, BAP (6-benzilamino purin), 2,4-D (2,4-diklorofenoksiocetna kislina), saharoza in agar. Sestava že pripravljene mešanice BDS gojišča in potrebna količina ostalih dodanih sestavin za pripravo enega litra gojišča je prikazana v preglednici 2.

Preglednica 2: Sestavine BDS gojišča in potrebne količine ostalih dodanih sestavin za indukcijsko gojišče

Makroelementi	mg/l
KNO ₃	2530
(NH ₄) ₂ SO ₄	134
MgSO ₄ x 7H ₂ O	247
NH ₄ H ₂ PO ₄	230
NH ₄ NO ₃	320
NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	172
CaCl ₂ x 2H ₂ O	150
Mikroelementi	
MnSO ₄ x 4H ₂ O	13,2
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	2
H ₃ BO ₃	3
KJ	0,75
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,039
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025
Vir železa	
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	37,25
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,85
Vitamini	
Nikotinska kislina	1
Pirodoksini - HCl	1
Tiamin-HCl	10
Mio-inozitol	100
Ostale dodane sestavine	
Mio-inozitol	400
Prolin	200
BAP	2
2,4-D	2
saharoza	100 000 (=100 g/l)
agar	7000 (=7 g/l)

Sprva smo pripravljali po 1 liter gojišča, ko pa je bilo cvetov primerne velikosti veliko, smo pripravljali po 2 litra gojišča naenkrat. Opisan je postopek za pripravo enega litra gojišča.

Najprej smo pripravili založne raztopine rastnih regulatorjev (BAP in 2,4-D). Topilo za BAP je HCl, topilo za 2,4-D je KOH. Založne raztopine smo hranili v hladilniku.

Za pripravo 1 l gojišča smo uporabili 1 l plastično čašo v katero smo zatehtali 3,567 g BDS mešanice, 100 g saharoze, 200 mg prolina, 400 mg mio-inozitola ter odpipetirali 20 ml založne raztopine BAP in 20 ml založne raztopine 2,4-D. Čašo smo nato nekje do polovice napolnili z bidestilirano vodo. Vanjo smo dali magnet in jo postavili na magnetno mešalo

ter počakali, da so se vse sestavine raztopile in dobro premešale. Vsebino smo nato prelili v 1 l merilno bučko in dolili bidestilirano vodo do točno 1 litra. Nato smo prelili nazaj v časo in umerili pH na 6,0. Zatehtali smo 6 g agarja in ga stresli v steklenico, kamor smo nato prelili še pripravljeno raztopino. Steklenico z ne popolnoma zatesnjenim pokrovčkom smo postavili v avtoklav in avtoklavirali 20 minut pri 121° C in tlaku 1,1 bar.

Gojišča smo po končanem avtoklaviranju dobro premešali, da se je agar enakomerno razporedil po celotni raztopini gojišča, a zelo previdno, da se ni tvorilo preveč zračnih mehurčkov. Nato smo ga razlili v sterilne plastične petrijevke premera 9 cm. Vse to smo počeli v brezprašni oz. komori za aseptično delo (laminariju), katero smo prižgali že 15 do 20 minut pred pričetkom dela in katere delovno površino smo sterilizirali z 70% etanolom in si z njim razkužili tudi roke, da smo se izognili nepotrebni okužbam. Gojišča smo v petrijevko nalili toliko, da je prekrilo dno in jo pokrili s plastičnim pokrovčkom. Liter gojišča smo razlili v približno 45 petrijevk, tako da je bila količina gojišča v posamezni petrijevki približno 20 ml. Počakali smo, da se je gojišče v petrijevkah strdilo in smo jih ali uporabili takoj ali pa jih do uporabe hranili v hladilniku. V tem primeru smo jih po več skupaj zavili v plastično folijo.

Dne 5. junija se nam je pri delu zgodila neljuba napaka in smo pri pripravi gojišča dodali dvakratno količino agarja (14 g/l namesto 7g/l). Ker smo dne 7. junija cvetove že nabrali in šele pri inokulaciji ugotovili napako, smo te rezultate vrednotili posebej in so v preglednici 3 označeni kot 2A.

3.4.2 Gojišče za izdolževanje in koreninjenje

Gojišče za izdolževanje in koreninjenje smo pripravili iz polovične koncentracije BDS mešanice (torej 1,7835 g/l), 30 g/l glukoze, 7 g/l agarja in umerjeno na pH 6. Pripravili smo ga po istem postopku kot indukcijsko gojišče (glej 3.4.1), razlika je bila samo v tem, da smo v tem primeru po umerjanju pH-ja agar stresli v plastično čašo in ga raztopili v mikrovalovni pečici. Potem smo gojišče s pomočjo avtomatskega dozatorja razlili v steklene 150 ml epruvete po 10 ml gojišča/epruveto. Epruvete smo zatesnili s plastičnim pokrovčkom in avtoklavirali. Po končanem avtoklaviranju smo počakali, da se je gojišče strdilo in ga ali uporabili takoj ali pa ga do uporabe hranili v hladilniku.

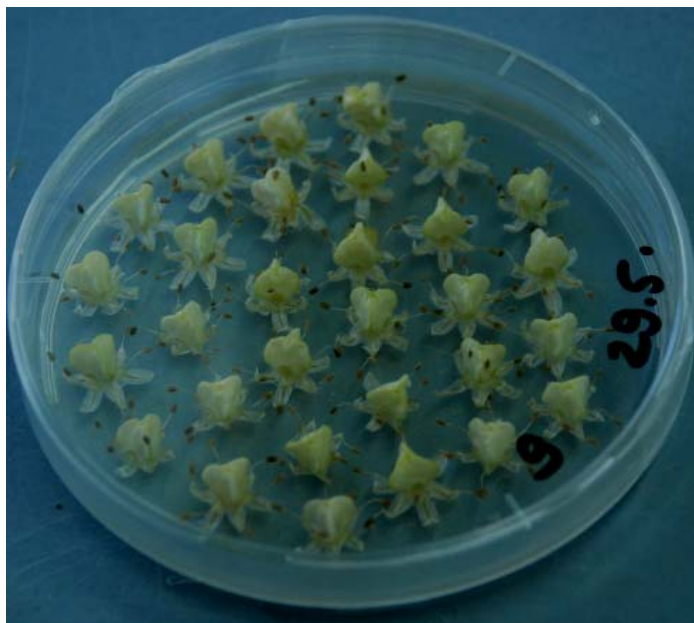
3.5 INOKULACIJA CVETOV NA INDUKCIJSKO GOJIŠČE

Inokulacija je vnos celic ali izsečkov na hranilno gojišče v *in vitro* razmere. Izseček ali eksplant je rastlinski organ ali košček tkiva, ki ga uporabimo za iniciacijo kulture (Štajner, 2008). *In vitro* razmere so razmere pri katerih procesi potekajo v sterilnih pogojih laboratorija (Bohanec, 1992).

Isto kot pri razlivanju gojišča smo tudi tukaj naredili vse potrebno, da je delo potekalo v sterilnih pogojih. Poleg tega smo si 15 do 20 minut pred začetkom dela prižgali še visokotemperaturni grelec, da se je ogrel na delovno temperaturo (800 °C) in nam je služil za razkuževanje pincet, s katerimi smo inokulirali cvetove na indukcijsko gojišče.

Sterilne cvetove smo inokulirali v petrijevke premera 9 cm (Slika 2). V eno petrijevko smo inokulirali različno število cvetov, največkrat po 30. Število inokuliranih cvetov je bilo odvisno od števila cvetov primerne velikosti, ki so bili na posamezni dan na voljo, tako smo v petrijevke inokulirali tudi več ali manj kot 30 cvetov. Po končani inokulaciji smo petrijevko ovili s parafilmom ter nanjo napisali datum inokulacije in oznako donorske rastline. Nato smo jih dali v komoro za gojitev rastlinskega materiala, ki ima fotoperiodo 16/8 (16 ur svetloba, 8 ur tema) in temperaturo 21-23 °C.

Po končani inokulaciji vseh cvetov so bile petrijevke enkrat na teden pregledane zaradi morebitnih bakterijskih in glivičnih okužb. Pri tistih, ki so imele manjše okužbe, smo še neokužene cvetove subkultivirali v druge petrijevke in na ta način rešili nekaj cvetov. Okužbe je povzročal tudi tobakov resar oz. trips (*Thrips tabaci* Lindeman), kljub temu da smo rastline poskušali obvarovati pred napadom resarjev s tem, da smo jih zalivali z raztopino insekticida Confidor (imidaklorprid) in enkrat škropili z raztopino insekticida Laser (spinosad). Resarji so se v času inokulacije nahajali v notranjosti cvetov in nato s svojim sprehajanjem okužili celotno petrijevko. Ker imajo resarji sposobnost pregrizniti parafilm in se preseliti v drugo petrijevko, smo te petrijevke izločili iz poskusa.

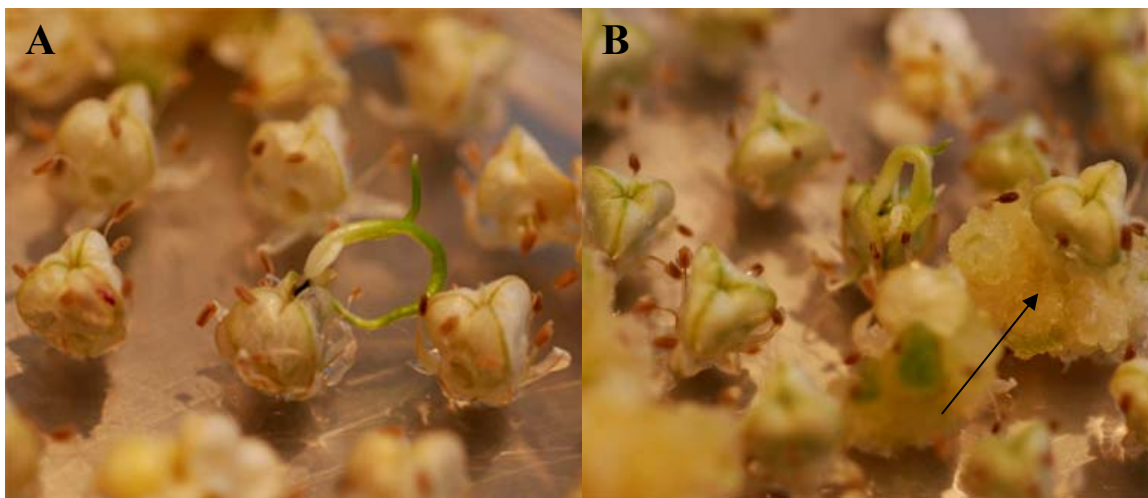


Slika 2: Petrijevka z inokuliranimi cvetovi (foto: Bohanec B.)

3.6 SUBKULTIVIRANJE NASTALIH REGENERANTOV

Dne 28. julija so se začeli pojavljati prvi haploidni ginogenetski regeneranti, ki smo jih prepoznali po zankastem videzu (slika 3B). Od tega časa dalje smo petrijevke enkrat ali dvakrat tedensko pregledovali in nastale haploidne regenerante inokulirali na gojišče za izdolževanje in koreninjenje. Postopek, ki je potekal v komori za aseptično delo je bil naslednji. Iz petrijevke smo odvili parafilm in cvet z regenerantom vzeli ven s sterilno pinceto in ga prenesli na sterilen papirnati pladenj. Iz njega smo s pomočjo še ene pincete vzeli ven regenerant in ga subkultivirali v epruveto z gojiščem za izdolževanje in koreninjenje. Potem smo cvet vrnili v petrijevko in jo zopet ovili s parafilmom. Cvetove smo vračali v petrijevke zato, ker ima čebula šest semenskih zasnov in lahko posamezen cvet razvije šest haploidnih regenerantov. Na epruveto smo vrnili pokrovček in ga ovili s parafilmom ter nanjo napisali datum iz petrijevke, torej datum inokulacije cveta in datum subkultivacije, da smo tako dobili rezultate časovne razporeditve nastanka regenerantov. Epruvete smo postavili na stojalo in jih dali v komore za gojitev rastlinskega materiala.

Nekaj regenerantov ni bilo normalno razvitih, bili so tako ali drugače deformirani, predvsem veliko je bilo nenavadno zadebeljenih. Teh nismo subkultivirali, ampak smo jih le prešteli za namen ugotovitev ginogenetske odzivnosti posameznih rastlin oz. cvetov.



Slika 3: Haploidna ginogenetska regeneranta in cvet z bazalnim kalusom. Na sliki A je lepo viden haploidni ginogenetski regenerant, ki je že precej velik, na sliki B pa tipična zankasta oblika haploidnega ginogenetskega regeneranta in cvet z bazalnim kalusom (označen s puščico) (foto: Bohanec B.).

Pridobljeni haploidni regeneranti bodo uporabljeni za genetske raziskave čebule. Glede na to, da pri čebuli tudi haploidne linije formirajo rastline, ki imajo vigor podoben diploidni čebuli, metode podvajanja genoma v našem primeru niso bile potrebne.

4 REZULTATI

4.1 INOKULIRANI, OKUŽENI IN CVETOVI S KALUSOM

4.2.1 Obravnava glede na datum

Cvetove smo nabirali iz 29 rastlin v času od 16. maja do 16. junija. V preglednici 3 je podano število inokuliranih cvetov po datumu in število okuženih cvetov. Med okužene cvetove smo šteli tako tiste z bakterijskimi in glivičnimi okužbami, kot tiste, katerih okužbe so povzročili resarji. Nekaj okuženih petrijevk smo uspeli rešiti tako, da ko je bila okužba še majhna, smo neokužene cvetove subkultivirali na sveže gojišče in sicer tako, da smo poleg okuženih zavrgli še cvetove, ki so bili okoli okužbe, da bi na ta način preprečili nadaljnje okužbe, vendar se je v nekaterih primerih okužba ponovila.

Preglednica 3: Število inokuliranih, neokuženih in okuženih cvetov po datumu

Datum	Število inokuliranih cvetov	Število neokuženih cvetov	Število okuženih cvetov	Odstotek okuženih cvetov (%)
16.5.	73	73	0	0
18.5.	333	333	0	0
19.5.	508	478	30	5,9
20.5.	321	321	0	0
21.5.	608	550	58	9,5
22.5.	776	746	30	3,9
24.5.	871	812	59	6,8
26.5.	1212	1067	145	12,0
27.5.	1304	1148	156	12,0
28.5.	1903	1730	173	9,1
29.5.	2270	1968	302	13,3
30.5.	2232	1991	241	10,8
31.5.	3062	2716	346	11,3
2.6.	2152	1868	284	13,2
3.6.	1835	1356	479	26,1
4.6.	1014	664	350	34,5
5.6.	1893	1686	207	10,9
7.6.	1200	954	246	20,5
7.6. (2A)*	857	827	30	3,5
10.6.	931	781	150	16,1
11.6.	2197	1937	260	11,8
12.6.	1515	1155	360	23,8
13.6.	652	502	150	23,0
16.6.	1208	1028	180	14,9
Subkultivirani**	723	516	207	28,6
Skupaj	31650	27207	4443	14,0

*gojišče z dvojno količino agarja; ** cvetovi subkultivirani zaradi okužb

Od vsega skupaj 4.443 okuženih cvetov, so resarji povzročili okužbo 2.749 cvetov oz. 61,9% vseh okužb in sicer največ v času od 27. maja do 12. junija. Podrobna analiza okužb zaradi resarjev po datumu in donorskih rastlinah je prikazana v prilogi A. Največ okužb glede na datum smo imeli dne 4. 6., od tega jih je 91,4% bilo zaradi resarjev. V dneh 16. 5, 18. 5. in 20. 5. do okužb sploh ni prišlo. V celoti je bilo okuženih 14% vseh inokuliranih cvetov.

Pri kulturi celih cvetov za indukcijo haploidnih regenerantov čebule se pojavlja bazalni kalus, ki se tvori iz nektarijev (medovnikov) časnih listov. V preglednici 4 je podano število kalusiranih in število vitrificiranih cvetov, glede na datum inokulacije. Odstotke kalusiranih in vitrificiranih cvetov smo računali glede na število neokuženih cvetov.

Preglednica 4: Število kalusiranih in vitrificiranih cvetov po datumu

Datum	Število neokuženih cvetov	Število kalusiranih cvetov	Odstotek kalusiranih cvetov (%)	Število vitrificiranih cvetov	Odstotek vitrificiranih cvetov (%)
16.5.	73	0	0	0	0
18.5.	333	7	2,10	0	0
19.5.	478	33	6,90	0	0
20.5.	321	32	9,97	0	0
21.5.	550	88	16,00	2	0,36
22.5.	746	230	30,83	3	0,40
24.5.	812	107	13,18	8	0,99
26.5.	1067	98	9,18	11	1,03
27.5.	1148	112	9,76	1	0,09
28.5.	1730	123	7,11	8	0,46
29.5.	1968	115	5,84	3	0,15
30.5.	1991	170	8,54	25	1,26
31.5.	2716	55	2,03	5	0,18
2.6.	1868	50	2,68	10	0,54
3.6.	1356	47	3,47	5	0,37
4.6.	664	11	1,66	3	0,45
5.6.	1686	10	0,59	5	0,30
7.6.	954	8	0,84	4	0,42
7.6. (2A)*	827	1	0,12	0	0
10.6.	781	0	0	0	0
11.6.	1937	3	0,15	0	0
12.6.	1155	22	1,90	0	0
13.6.	502	2	0,40	2	0,40
16.6.	1.028	17	1,65	7	0,68
Subkultivirani**	516	5	0,97	0	0
Skupaj	27207	1346	4,95	102	0,37

*gojišče z dvojno količini agarja; ** cvetovi subkultivirani zaradi okužb

Vseh cvetov, ki so tvorili bazalni kalus je bilo 1.346 oz. 4,95% od vseh neokuženih cvetov. Popis kalusiranih cvetov je bil dne 26. septembra, tako da smo vanj zajeli prav vse cvetove, ki so tvorili kalus. Nekateri cvetovi so tvorili manjši kalus in iz tistih se je pojavilo tudi nekaj haploidnih regenerantov, medtem ko je pri nekaterih kalus zrasel toliko, da cvet skoraj ni bil več razpoznaven. Iz preglednice 4 je lepo razvidno, da je odstotek kalusiranih cvetov višji v zgodnejšem datumu nabiranja in inokuliranja cvetov.

Vitrifikacija ali hiperhidracija je ena izmed anomalij pri tkivnih kulturah. To je pojav, ko inokulirani organi sprejemajo iz gojišča prevelike količine vode in tako večino citoplazme v teh organih predstavlja vakuola. Celična stena takšnih organov je zelo tanka in organi dobijo steklasti, prosojni videz (slika 4). Na sliki 4 je poleg vitrificiranega cveta lepo vidno kakšne barve postanejo cvetovi po nekaj mesecih.

V našem poskusu je bilo vsega skupaj vitrificiranih 0,37% oz. 102 cvetova. Glede na datum pri nekaterih dnevih do pojava vitrifkacije ni prišlo, medtem ko pri datumih pri katerih je do pojava vitrifkacije prišlo, ni bistvenih razlik.



Slika 4: Vitrificiran cvet (foto: Bohanec B.)

4.2.2 Obravnava glede na donorsko rastlino

Zanimale so nas tudi razlike glede na donorsko rastlino. V preglednici 5 so prikazani rezultati vseh inokuliranih cvetov, število okuženih cvetov in število cvetov z bazalnim kalusom glede na donorsko rastlino.

Do okužb je prihajalo pri vseh donorskih rastlinah. Glede na odstotek je bilo največ okužb pri donorski rastlini 7 (36%) in najmanj pri donorski rastlini 21 (0,6%). Glede na število okuženih cvetov pa je bilo največ okuženih cvetov pri donorski rastlini 9, kjer smo zaradi okužbe izgubili 330 cvetov, najmanj okužb pa je bilo pri donorski rastlini 21, kjer smo izgubili le 5 cvetov.

Odstotek kalusiranih cvetov je izračunan glede na število neokuženih cvetov. Največji odstotek cvetov, ki so tvorili bazalni kalus je bilo pri donorski rastlini 1, kjer je kalus

tvorilo 21,5% vseh neokuženih cvetov. Najmanj kalusiranih cvetov je bilo pri donorski rastlini 14 (0,6%), kjer je kalus tvorilo 5 cvetov. Upoštevajoč cvetove vseh donorskih rastlin je bazalni kalus tvorilo 1.346 cvetov oz. 4,9% neokuženih cvetov.

Preglednica 5: Število inokuliranih cvetov, število okuženih in kalusiranih cvetov glede na donorsko rastlino

Oznaka donorske rastline	Število inokuliranih cvetov	Število okuženih cvetov	Odstotek okuženih cvetov (%)	Število kalusiranih cvetov	Odstotek kalusiranih cvetov (%)
1	665	70	10,5	128	21,5
2	386	59	15,3	24	7,3
3	1185	81	6,8	33	3,0
4	1186	132	11,1	7	0,7
5	1436	182	12,4	91	7,1
6	808	60	7,4	10	1,3
7	700	252	36,0	12	2,7
8	1115	117	10,5	32	3,2
9	1391	330	23,7	73	6,9
10	865	98	11,3	10	1,3
11	1114	98	8,8	35	3,4
12	1736	127	7,3	29	1,8
13	1568	242	15,4	42	3,2
14	884	33	3,7	5	0,6
15	1151	132	11,5	18	1,8
16	1266	102	8,1	13	1,1
17	996	218	21,9	41	5,3
18	1661	206	12,4	181	12,4
19	1086	122	11,2	21	2,2
20	1066	196	18,4	12	1,4
21	897	5	0,6	38	4,3
22	940	256	27,2	89	13,0
23	1055	215	20,4	54	6,4
24	851	192	22,6	94	14,3
25	1494	243	16,3	39	3,1
26	856	185	21,6	67	10,0
27	728	90	12,4	17	2,7
28	1279	222	17,4	40	3,8
29	1258	178	14,2	91	8,4
Skupaj	31650	4443	14,0	1346	4,9

4.3 GINOGENETSKA ODZIVNOST

4.3.1 Vsi haploidni regeneranti

Haploidni ginogenetski regeneranti so se začeli pojavljati dne 28. julija. Cvetove iz katerih smo vzeli haploidne regenerante smo vračali v petrijevke, tako da se je iz nekaterih cvetov pojavil več kot eden haploidni regenerant. Število nastalih haploidnih regenerantov smo obravnavali glede na donorsko rastlino.

V preglednici 6 je prikazano število vseh nastalih haploidnih regenerantov ter število tako ali drugače deformiranih regenerantov, ki jih nismo inokulirali. V preglednici je prikazano tudi število cvetov, ki so imeli enega, dva ali tri haploidne regenerante ter število kalusiranih cvetov z enim ali dvema regenerantoma. Cvetovi, ki so tvorili bazalni kalus so tvorili le enega ali dva regeneranta, nikoli treh. Ker je le en cvet tvoril 4 haploidne regenerante, smo to v preglednici zapisali kar pod število cvetov, ki so tvorili 3 haploidne regenerante.

V preglednici 6 je ginogenetska odzivnosti izračunana glede na število neokuženih cvetov. Največ haploidnih regenerantov smo pridobili pri donorski rastlini 14, kjer se je tvorilo 141 haploidnih regenerantov in je bila ginogenetska odzivnost 16,6%. Največjo ginogenetsko odzivnost (19,7%) pa smo imeli pri donorski rastlini 24 pri kateri se je tvorilo 130 haploidnih regenerantov. Najmanj haploidnih regenerantov se je tvorilo pri donorski rastlini 2, kjer so se tvorili 4 haploidni regeneranti in je bila tudi odzivnost najnižja (1,2%). Vendar so pri bili donorski rastlini 2 vsi štirje regeneranti lepo razviti in oblikovani, tako da smo najmanjše število regenerantov pridobili iz donorske rastline 22 (2 haploidna regeneranta), ki je imela sicer večjo ginogenetsko odzivnost (1,9%) kot donorska rastlina 2, vendar je bilo pri donorski rastlini 22 tako ali drugače deformiranih 11 (84,6%) od skupno nastalih 13 haploidnih regenerantov, kar je razvidno iz preglednice 7. Ta donorska rastlina je imela največji odstotek deformiranih haploidnih regenerantov, ki jih nismo subkultivirali na gojišče za izdolzovanje in koreninjenje.

Visoko ginogenetsko odzivnost so poleg donorskih rastlin 14 in 24 imele še donorske rastline 1 (14,1%), 11 (12,6%), 23 (12,3%) in 21 (10,4%), ki so tvorile 84, 128, 103 in 93 haploidnih regenerantov.

Nizko ginogenetsko odzivnost pa so imele donorske rastline 2 (1,2%), 17 (1,7%), 22 in 6 (1,9%) ter 8 (2,1%), ki so tvorile 4, 13, 13 in 14 ter 21 haploidnih regenerantov.

Preglednica 6: Število vseh nastalih haploidnih regenerantov, deformiranih in število regenerantov v posameznem cvetu

Oznaka donorske rastline	Št. vseh hapl. regen.	% odzivnosti	Št. deformiranih hapl. regen.	Št. cvet. z enim hapl. regen.	Št. cvet. z dvema hapl. regen.	Št. cvet. s tremi hapl. regen.	Št. kalus. cvet. z enim hapl. regen.	Št. kalus. cvet. z dvema hapl. regen.
1	84	14,1	22	47	12	2	5	1
2	4	1,2	0	4	0	0	0	0
3	56	5,2	6	40	8	0	0	0
4	24	2,3	3	20	2	0	0	0
5	91	7,1	17	71	8	0	2	1
6	14	1,9	3	10	1	0	2	0
7	24	5,4	4	19	2	0	1	0
8	21	2,1	2	18	1	0	1	0
9	36	3,4	12	30	3	0	0	0
10	31	4,0	7	21	5	0	0	0
11	128	12,6	18	81	18	2	5	0
12	77	4,8	20	73	2	0	0	0
13	67	5,1	12	51	6	1	1	0
14	141	16,6	5	101	14	4	0	0
15	95	9,3	24	80	7	0	1	0

se nadaljuje

nadaljevanje

Oznaka donorske rastline	Št. vseh hapl. regen.	% odzivnosti	Št. deformiranih hapl. regen.	Št. cvet. z enim hapl. regen.	Št. cvet. z dvema hapl. regen.	Št. cvet. s tremi hapl. regen.	Št. kalus. cvet. z enim hapl. regen.	Št. kalus. cvet. z dvema hapl. regen.
16	59	5,1	12	36	10	1	0	0
17	13	1,7	4	12	0	0	1	0
18	54	3,7	11	37	3	1	6	1
19	27	2,8	0	25	1	0	0	0
20	36	4,1	9	28	2	1	1	0
21	93	10,4	33	67	9	1	5	0
22	13	1,9	11	12	0	0	1	0
23	103	12,3	10	77	8	eden bil s 4imi	4	1
24	130	19,7	19	77	12	4	13	2
25	77	6,2	5	58	7	1	2	0
26	28	4,2	7	22	0	0	6	0
27	36	5,6	10	23	5	1	0	0
28	50	4,7	5	28	4	3	3	1
29	26	2,4	5	26	0	0	0	0
skupaj	1638	6,0	296	1194	150	22	60	7

4.3.2 Deformirani in subkultivirani regeneranti

V preglednici 7 se vidi, da smo iz donorske rastline 14, ki je imela največji odstotek ginogenetske odzivnosti, pridobili tudi največ haploidnih ginogenetskih regenerantov, saj je bil tudi odstotek deformiranih regenerantov nizek (3,5%).

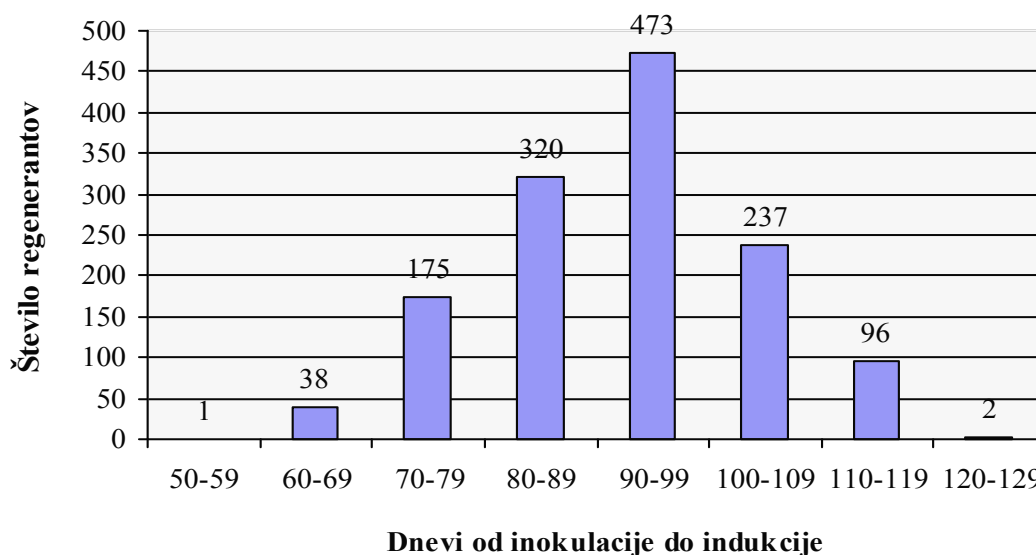
Pri donorski rastlini 2 in 19 so bili vsi nastali haploidni regeneranti lepo razviti in deformiranih regenerantov ni bilo.

Preglednica 7: Število deformiranih in subkultiviranih regenerantov glede na donorsko rastlino

Oznaka donorske rastline	Število vseh nastalih regenerantov	Število deformiranih regenerantov	% deformiranih regenerantov	Število subkultiviranih regenerantov
1	84	22	26,2	62
2	4	0	0	4
3	56	6	10,7	50
4	24	3	12,5	21
5	91	17	18,7	74
6	14	3	21,4	11
7	24	4	16,7	20
8	21	2	9,5	19
9	36	12	33,3	24
10	31	7	22,6	24
11	128	18	14,1	110
12	77	20	26,0	57
13	67	12	17,9	55
14	141	5	3,5	136
15	95	24	25,3	71
16	59	12	20,3	47
17	13	4	30,8	9
18	54	11	20,4	43
19	27	0	0	27
20	36	9	25,0	27
21	93	33	35,5	60
22	13	11	84,6	2
23	103	10	9,7	93
24	130	19	14,6	111
25	77	5	6,5	72
26	28	7	25,0	21
27	36	10	27,8	26
28	50	5	10,0	45
29	26	5	19,2	21
Skupaj:	1638	296	18,1	1342

4.4 ČASOVNA RAZPOREDITEV NASTANKA REGENERANTOV

Analizirali smo čas od inokulacije cvetov do pojava indukcije haploidnih ginogenetskih regenerantov in dobili časovno razporeditev, kot jo prikazuje slika 5.



Slika 5: Časovna razporeditev nastanka regenerantov

Na sliki 5 so upoštevani vsi inokulirani regeneranti, ne glede na donorsko rastlino. Slika ne vsebuje tistih regenerantov, ki so bili tako ali drugače deformirani, temveč upošteva le lepo razvite regenerante, ki smo jih inokulirali na gojišče za izdolževanje in koreninjenje. Vseh skupaj je bilo 1.342. Regeneranti so se začeli pojavljati po 50 dneh, zadnja dva pa sta se pojavila do 129 dneva. Največja intenzivnost indukcije haploidnih ginogenetskih regenerantov je bila med 90 in 99 dnev.

Podrobni rezultati časovne razporeditve nastanka haploidnih ginogenetskih regenerantov po donorskih rastlinah so prikazani v prilogi B.

4.5 AKLIMATIZACIJA

Pridobljeni regeneranti so ostali nekaj tednov na gojišču za izdolževanje in koreninjenje, potem so šli tisti lepo razviti na aklimatizacijo. V postopku aklimatizacije regenerante še nekaj tednov hranimo v pogojih visoke vlažnosti.

Regeneranti, ki smo jih pridobili so trenutno v fazi aklimatizacije. Trenutno (2. oktober 2008) je v fazi aklimatizacije 411 rastlin. Ocenjujemo, da smo s poskusom uspeli pripraviti zadostno število regenerantov za nadaljnja genetska mapiranja.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Za indukcijo haploidnih ginogenetskih regenerantov smo uporabili enostopenjski postopek kulture celih cvetov. Iz skupaj 29 donorskih rastlin, smo nabrali in inokulirali 31.650 cvetov, od tega se nam je 4.443 oz. 14% cvetov okužilo in sicer največ zaradi resarjev (2.749 cvetov oz. 61,9% vseh okuženih cvetov), ostalo so bile glivične in bakterijske okužbe. Nekaj cvetov iz petrijevk, kjer je bila okužba še zelo majhna smo rešili s subkultivacijo na sveže gojišče, vendar se je okužba v nekaterih primerih ponovila. Ocenjujemo, da je bil postopek razkuževanja cvetov gledano v celoti zelo učinkovit, glavni vir okužbe je bila le prisotnost resarjev. V prihodnje bi bilo torej primerno proučiti še druge postopke kontroliranja napada resarjev.

Indukcijo haploidnih ginogenetskih regenerantov smo tako spremljali pri 27.207 cvetovih, ki so ostali neokuženi. Ginogenetska odzivnost je bila upoštevajoč vse donorske rastline 6,0%, največja pri donorski rastlini 14 (16,6%) in najmanjša pri donorski rastlini 2 (1,2%). Glede na to, da je bila ena od starševskih rastlin dihaploid, druga pa sintetična linija, lahko predvidevamo, da izvira genetska variabilnost prav iz slednje. Po drugi strani pa je bila linija 'OH-1' izbrana kot donor zvišane ginogenetske odzivnosti, kar je glede na rezultat – 6,0% povprečna odzivnost, delno tudi potrjeno.

Negativna stran kulture celih cvetov v primerjavi s kulturo plodnic ali semenskih zasnov je tvorba bazalnega kalusa. V našem poskusu je kalus tvorilo 1.346 cvetov oz. 4,9% od vseh neokuženih cvetov. Pri cvetovih, ki tvorijo bazalni kalus lahko tudi pride do indukcije haploidnih regenerantov in sicer je v našem poskusu 60 cvetov s kalusom tvorilo en haploidni regenerant in 7 cvetov s kalusom je tvorilo dva haploidna regeneranta. Vendar smo pri analizi števila haploidnih regenerantov, ki jih je tvoril posamezni cvet, upoštevali vse nastale haploidne regenerante in ne le tiste lepo razvite, ki smo jih subkultivirali na gojišče za izdolževanje in koreninjenje. Tako nismo ovrednotili ali so haploidni regeneranti iz kalusiranih cvetov slabše kakovosti.

Po pričakovanju je med cvetovi, ki so tvorili haploidne regenerante, bilo največ takšnih, ki so tvorili po en haploidni regenerant (1.191), manj takšnih, ki so tvorili po dva (150) in še manj takšnih, ki so tvorili po tri haploidne regenerante (22). Le en cvet je tvoril štiri haploidne regenerante.

Skoraj petina tvorjenih regenerantov je bilo deformiranih, bili so predvsem tako ali drugače zadebeljeni. Pri analizi časovne razporeditve nastanka haploidnih regenerantov smo upoštevali samo lepo razvite, lepo oblikovane, nedeformirane embrije, ki smo jih inokulirali na gojišče za izdolževanje in koreninjenje. Največ haploidnih regenerantov (473) se je razvilo med 90 in 99 dnem, šteto od inokulacije cvetov do indukcije oz. pojava haploidnega regeneranta.

Menimo, da smo izpolnili pričakovanja diplomskega dela in da smo kljub dokaj veliki izgubi cvetov zaradi okužb, dobili dovolj haploidnih regenerantov. Namen dela je bil dosežen, ker smo inokulirali dovolj veliko število cvetov, ker je bila stopnja okuženosti nizka, ker je bila odzivnost zadostna, ker je bila večina regenerantov nedeformirana in ker je bila faza izdolževanja zelo uspešna. Za zdaj tudi kaže, da bo aklimatizacija zelo uspešna,

kar torej ne bo bistveno zmanjšalo števila pridobljenih linij. Pričakujemo, da se bo na gojišču za izdolževanje in koreninjenje razvilo dovolj haploidnih ginogenetskih regenerantov, ki so delno že v postopku aklimatizacije (trenutno – 2. oktober 2008 je število 411) ter bodo kasneje služili namenu genetskega mapiranja.

Genetsko mapiranje pri čebuli z uporabo haploidnih linij še ni bilo izvedeno. Sedanji poskus temelji na križanju dveh genetsko že proučenih linij, za katere vemo, da sta genetsko divergentni (prof. dr. M. J. Havey, Univerza v Wisconsin-u, Madison, osebna komunikacija). S tem poskusom smo torej uspešno zagotovili zadostno število haploidnih linij, ki tvorijo segregirajočo populacijo križancev čebule. S tem je bil opravljen prvi del postopka, ki bo močno olajšal prihodnje delo pri mapiranju genoma čebule.

6 POVZETEK

Indukcija haploidnih ginogenetskih regenerantov je metoda rastlinske biotehnologije, ki prvokrat pri čebuli omogoča pridobitev popolnoma homozigotnih linij. Homozigotne linije omogočajo pridobitev hibridov oz. hibridnih kultivarjev, ki so znani po svoji hibridni bujnosti oz. heteroziji in izenačenosti. Zaradi močno izražene inbriding depresije, lahko čebulo samooprašujemo le dva- do trikrat, zaradi česar pa je težko doseči izenačenost pri hibridnih kultivarjih. Z metodo ginogeneze lahko pridobimo ne le popolnoma homozigotne linije, temveč tudi v občutno krajšem času.

Raziskave na področju ginogeneze čebule potekajo že okoli 20 let. V tem času so raziskovalci zelo izboljšali in poenostavili postopek ter od začetnih zelo nizkih odstotkov ginogenetske odzivnosti oz. pridobljenih haploidnih ginogenetskih regenerantov pridobili pri nekaterih linijah zelo visoko ginogenetsko odzivnost. Največja v vseh dosedanjih raziskavah za posamezno rastlino je bila 82,2% (Bohanec in sod., 2003).

Namen diplomskega dela je bila seznanitev z vsemi fazami postopka potrebnimi za pridobitev haploidnih ginogenetskih regenerantov čebule. Osredotočeni smo bili na pridobitev večjega števila haploidnih ginogenetskih regenerantov, ki bodo uporabni za namen genetskega mapiranja. Uporabili smo kulturo celih cvetov in sicer tako, da smo mesec dni (od 16. maja do 16. junija) zbirali cvetove iz socvetij posameznih rastlin čebule večkrat in jih inokulirali na indukcijsko gojišče. Dolžina intervala med nabiranjem cvetov iz posameznega socvetja je bila odvisna od števila cvetov primerne velikosti.

Po 58 dneh, šteto od dneva inokulacije do dneva indukcije, so se začeli pojavljati prvi haploidni ginogenetski regeneranti, ki smo jih subkultivirali na gojišče za izdolževanje in koreninjenje. Vrh indukcije je bil med 90 in 99 dnevom, ko se je v tej dekadi pojavilo 473 regenerantov. Razmeroma veliko haploidnih regenerantov se je pojavilo tudi med 80 in 89 dnevom (320) ter 100 in 109 dnevom (237).

Imeli smo nekaj dokaj visoko odzivnih rastlin, ki so imele ginogenetsko odzivnost od 10,4 do 19,7% in so torej v povprečju tvorile 10 do 20 haploidnih ginogenetskih regenerantov na 100 cvetov. Imeli pa smo tudi kar nekaj zelo nizko odzivnih rastlin, ki so imele ginogenetsko odzivnost od 1,2 do 2,1%.

Zaradi glivičnih, bakterijskih in okužb s resarji smo tekom poskusa izgubili 14,0% oz. 4.443 cvetov. Ker smo po končanem postopku inokulacije opravljali preglede morebitnih okuženosti enkrat tedensko, smo iz tistih petrijevok, pri katerih so bile okužbe še manjše, neokužene cvetove subkultivirali na sveže gojišče oz. v nove petrijevke. Na tak način smo ravnali z bakterijskimi in glivičnimi okužbami, medtem ko smo tiste okužene s resarji popolnoma izločili iz poskusa, zaradi strahu, da bi resarji pregriznili parafilm ovit na petrijevki in okužili še druge petrijevke.

Haploidni regeneranti so ostali nekaj tednov na gojišču za izdolževanje in koreninjenje, potem so šli v fazo aklimatizacije v rastlinjak, kjer jih še nekaj tednov hranimo v pogojih visoke vlažnosti, kakršna je tudi v epruveh. Na aklimatizacijo smo do sedaj (2. oktober

2008) predstavili 411 regenerantov, nekateri od njih so že uspešno prilagojeni rasti v kontroliranih razmerah.

Ocenjujemo, da smo z opisanim postopkom zagotovili ustrezno število haploidnih linij iz križanja 'OH-1' x '5225B', kar bo omogočilo uspešno nadaljevanje dela pri genetskem mapiranju čebule.

7 VIRI

- Alan A.R., Mutschler M.A., Brants A., Cobb E., Earle E.D. 2003. Production of gynogenic plants from hybrids of *Allium cepa* L. and *A. roylei* Stearn. *Plant Science*, 165: 1201-1211
- Alan A.R., Brants A., Cobb E., Goldschmied P.A., Mutschler M.A., Earle E.D. 2004. Fecund gynogenic lines from onion (*Allium cepa* L.) breeding materials. *Plant Science*, 167: 1055-1066
- Bohanec B. 1992. Tehnike rastlinskih tkivnih kultur. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Center za rastlinsko biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin: 168 str.
- Bohanec B. 1996. Uporaba tehnik tkivnih kultur v žlahtnjenju rastlin. V: *Biotehnologija. Osnovna znanja*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 275-286
- Bohanec B. 2002. Doubled-haploid Onions. V: *Allium Crop Science: Recent Advances*. Rabinowitch H.D., Currah L. (eds.). Wallingford, UK, CAB International: 145-157
- Bohanec B. 2004. Osnove rastlinske biotehnologije. V: *Gensko spremenjena hrana*. Bohanec B., Javornik B., Strel B. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 1-28
- Bohanec B., Jakše M. 1999. Variations in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) accessions. *Plant Cell Reports*, 18: 737-742
- Bohanec B., Jakše M., Ihan A., Javornik B. 1995. Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants. *Plant Science*, 104: 215-224
- Bohanec B., Jakše M., Havey M.J. 2003. Genetic analyses of gynogenetic haploid production in onion. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 128, 4: 571-574
- Campion B., Alloni C. 1990. Induction of haploid plants in onion (*Allium cepa* L.) by *in vitro* culture of unpollinated ovules. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, 20: 1-6
- Campion B., Azzimonti M.T., Vicini E., Schiavi M., Falavigna A. 1992. Advances in haploid plant induction in onion (*Allium cepa* L.) through *in vitro* gynogenesis. *Plant Science*, 86: 97-104
- Dunstan D.I., Short K.C. 1977. Improved growth of tissue cultures of onion, *Allium cepa* L. *Physiologia Plantarum*, 41: 70-72
- Fritsch R.M., Friesen N. 2002. Evolution, domestication and taxonomy. V: *Allium Crop Science: Recent Advances*. Rabinowitch, H.D., Currah L. (eds.). Wallingford, UK, CAB International: 5-30

- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50: 151-158
- Geoffriau E., Kahane R., Rancillac M. 1997. Variations of gynogenesis ability in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica*, 94: 37-44
- Havey M.J., Bohanec B. 2007. Onion Inbred Line 'B8667 A&B' and Synthetic Populations 'Sapporo-Ki-1 A&B' and 'Onion Haploid-1'. *HortScience*, 42: 1731-1732
- Jakše M. 1995. Indukcija ginogenetskih rastlin čebule (*Allium cepa* L.) z *in vitro* tehniko ter genetska analiza regenerantov. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 73 str.
- Jakše M. 2002. Gradivo za vaje iz predmeta vrtnarstvo: 2. letnik visokošolskega strokovnega študija kmetijstva – hortikultura. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 44 str.
- Jakše M., Bohanec B. 2003. Haploid induction in onion *via* gynogenesis. V: Doubled haploid production in crop plants. Maluszynski et al. (eds.). Netherlands, IAEA: 281-285
- Jakše M., Bohanec B., Ihan A. 1996. Effect of media components on the gynogenic regeneration of onion (*Allium cepa* L.) cultivars and analysis of regenerants. *Plant Cell Reports*, 15: 934-938
- Jakše M., Havey M.J., Bohanec B. 2003. Chromosome doubling procedures of onion (*Allium cepa* L.) gynogenic embryos. *Plant Cell Report*, 21: 905-910
- Javornik B., Bohanec B., Campion B. 1998. Studies on the induction of a second cycle gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.) and genetic analysis of the plants. *Plant Breeding*, 117: 275-278
- Keller J. (1990). Culture of unpollinated ovules, ovaries, and flower buds in some species of the genus *Allium* and haploid induction via gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica*, 47: 241-247
- Kovačič M. 2006. Podvajanje haploidnih rastlin čebule (*Allium cepa* L.) in fertilitet dihaploidnih regenerantov. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 26 str.
- McCallum, J. 2007. Onion. V: Genome mapping and molecular breeding in plants, Volume 5, Vegetables. Kole, C. (ed.), Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag: 331-347
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497
- Muren R.C. 1989. Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion. *HortScience*, 24: 883-884

- Osvald J., Kogoj-Osvald M. 2005. Vrtnarstvo: splošno vrtnarstvo in zelenjadarstvo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 591 str.
- Rhodes D. Onion and its Relatives – Notes. Department of Horticulture and Landscape Architecture, Purdue University (1.jun. 2008)
<http://www.hort.purdue.edu/rhodcv/hort410/onions/on00001.htm> (23. sept. 2008)
- Rozman L. 2004. Študijsko gradivo za vaje iz predmeta »Žlahtnjenje rastlin« za študente univerzitetnega študija agronomije Biotehniške fakultete. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 63 str.
- Simon P.W., Gabelman W.H., Franklin D.F. 1991. Henry A. Jones (1889-1981). HortScience, 26, 9: 1115-1118
- Slavec D. 1999. Postopki za pridobivanje haploidnih linij pri čebuli (*Allium cepa* L.): pregled celotne tematike in praktična izvedba del pri vseh fazah postopka. Diplomaska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 41 str.
- Szkarczyk M., Simlat M., Jagosz B., Ba G. 2002. The use of cytoplasmic markers in onion hybrid breeding. Cellular & Molecular Biology Letters, 7: 625 - 634
- Štajner N., Juvančič B. 2008. Rastlinske tkivne kulture: gradivo za vaje pri Univerzitetnem študiju biotehnologije Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 28 str.
- Takhtajan A. 1997. Diversity and classification of flowering plants. New York, Columbia University Press: 643 str.

ZAHVALA

Starša moja, mama Marija in oče Albert hvala, da zaradi vajine ljubezni sem prišla na ta svet ter da podpirata me zmeraj in sta vztrajala ob meni tudi v dneh, ko moje mladostniške neumnosti so imele svoj neizmeren polet. Brat Damjan hvala, da si mi izbral ime in za tvojo vsestransko podporo na mnogih poteh.

Prof. dr. Borut Bohanec Vam posebej hvala, ne le za podano znanje, nasvete in pomoč ampak predvsem, da ste omogočili, da tole diplomsko delo je.

Tudi Vam, prof. dr. Marijana Jakše, posebna zahvala za hitro in učinkovito delo.

Akad. prof. dr. Ivan Kreft hvala Vam za razumevanje ob pomanjkanju časa.

Celotni kolektiv Katedre za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin, hvala za vse kažipote po laboratoriju, pomoč in nasvete ter dobro delovno vzdušje.

Vsem predavateljem hvala za podano znanje v vseh teh študijskih dneh.

Nevijo hvala za računalniško pomoč.

Jerca hvala, da odprla si mi mnoge slikovite poglede na ta svet.

A. Kralj hvala za vse neštete rime in pomoč pri ohranjanju budnosti v teh dolgih nočeh.

Hvala tudi vsem ostalim, ki so kakorkoli sodelovali z mano na mojih življenjskih poteh.

Diplomsko delo posvečam prijateljema, ki jih na žalost med nami več ni: Remzo in Jaka, v veselje mi je bilo z vama dneve svoje preživljati.

Priloga A

Število okuženih cvetov z resarji (*Thrips tabaci* Lindeman) po datumu in po rastlinah

Oznaka rastline	datum																	
	21.5.	22.5.	24.5.	26.5.	27.5.	28.5.	29.5.	30.5.	31.5.	2.6.	3.6.	4.6.	5.6.	7.6.	10.6.	11.6.	12.6.	13.6.
1											30							
2																		
3											29							
4								30	34									
5																30	30	
6																	60	
7											90			90				
8														36			30	
9								30	60		150						30	
10											58					34		
11											30							
12								45	30		30							
13							19											
14											33							
15										30			30					
16													30					
17									35				27			30		
18													30					
19		30		30														30
20										31			60			30		
21																		
22						30	31		34			92				30		
23					30	35	58		32			30						
24					30			30	33			30						
25			30		38		60	30				48						
26						30	31		30	34		30						
27												30			30			
28							34			38		30			90			
29	30											30		90				
Skupaj	30	30	30	30	98	114	214	165	288	133	450	320	177	216	120	154	150	30

Priloga B

Časovna razporeditev nastanka haploidnih regenerantov po donorskih rastlinah

Oznaka rastline	Dnevi od inokulacije do indukcije								vsota po rastlinah
	50-59	60-69	70-79	80-89	90-99	100-109	110-119	120-129	
1			3	14	28	16	1		62
2				1	2	1			4
3			11	9	13	15	2		50
4		1	8	3	7	1	1		21
5		1	11	25	34	2		1	74
6		1	1	5	1	2	1		11
7		1	2	6	7	2	2		20
8		1	4	4	4	4	2		19
9			3	6	8	3	4		24
10			1	4	12	3	4		24
11		4	15	28	38	16	9		110
12			1	16	29	8	3		57
13		3	6	12	11	12	11		55
14		7	25	32	55	11	6		136
15		6	5	17	28	9	6		71
16	1		3	7	17	14	5		47
17			1	1	4	1	2		9
18			4	4	18	12	5		43
19		3	7	10	2	5			27
20				2	9	11	5		27
21		1	5	14	18	20	2		60
22			1		1				2
23			2	21	43	21	6		93
24		2	25	26	28	18	12		111
25		3	21	20	19	8	1		72
26		1	6	7	5	1	1		21
27				1	12	10	2	1	26
28			1	21	10	11	2		45
29		3	3	4	10		1		21
skupaj	1	38	175	320	473	237	96	2	1342