

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Tadej SVETEK

**OPTIMIZACIJA INDUKCIJE ORGANOGENIH  
STRUKTUR NA CVETOVIH IN PLODNICAH ČEBULE**  
*(Allium cepa L.)*

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Tadej SVETEK

**OPTIMIZACIJA INDUKCIJE ORGANOGENIH STRUKTUR NA  
CVETOVIH IN PLODNICAH ČEBULE (*Allium cepa* L.)**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**OPTIMIZATION OF INDUCTION OF ORGANOGENIC STRUCTURES  
USING FLOWER BUDS AND OVARIES OF ONION (*Allium cepa* L.)**

GRADUATION THESIS  
University Studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija agronomije. Delo je bilo opravljeno na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin Biotehniške fakultete, Oddelek za agronomijo.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Boruta BOHANCA in za somentorico prof. dr. Zlato LUTHAR.

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

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

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

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Tadej Svetek

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 635.25:631.528(043.2)  
KG *Allium cepa* / somatska organogeneza / žlahtnjenje / saharoza / glukoza / maltoza / cvet / razrezana plodnica  
AV SVETEK, Tadej  
SA BOHANEČ, Borut (mentor) / LUTHAR, Zlata (somentor)  
KZ SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo  
LI 2016  
IN OPTIMIZACIJA INDUKCIJE ORGANOGENIH STRUKTUR NA CVETOVIH IN PLODNICAH ČEBULE (*Allium cepa* L.)  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP IX, 35 str., 10 pregl., 7 sl., 34 vir.  
IJ sl  
JI sl / en  
AI V nalogi smo poskušali optimizirati somatsko organogenezo pri čebuli (*Allium cepa* L.) z dvema postopkoma: s preučevanjem načina razreza cvetov pri prenosu na diferenciacijsko gojišče in z uporabo različnih vrst in koncentracij sladkorjev v gojiščih. Za izhodiščni material smo uporabili zaprte cvetove štirih genotipov čebule: sort 'Belokranjka', 'Holandska rumena', 'Ptujška rdeča' in "križanca F1", ki smo jih gojili na indukcijskem gojišču. Po šestih dneh smo odprte cvetove, cele plodnice in samo zgornje polovice plodnic postavili na diferenciacijsko gojišče. Kot vir energije smo v indukcijsko in diferenciacijsko gojišče dodali saharozo v koncentraciji 50 in 100 g/l. Poleg saharoze smo uporabili še sladkorja maltozo in glukozo ekvimolarnih koncentracij. Med 6 tedenskim razvojem cvetov in plodnic na regeneracijskem gojišču smo opazovali organogen odziv. Pri celih cvetovih smo dobili 28,5 % organogenezo in pri celih plodnicah 25,4 %, med katerima ni bilo statistično značilnih razlik, medtem ko je bila organogeneza pri zgornjih polovicah plodnic samo 1,3 %. Pri testiranju sladkorjev smo pri vseh šestih kombinacijah (trije sladkorji z dvema koncentracijama) dobili pri vseh genotipih organogen odziv ( $p = 0,0324$ ), razen pri sorti 'Holandska rumena'. "Križanec F1" je imel 21,9 % odzivnost, 'Ptujška rdeča' 16,9 %, med katerima ni bilo statistično značilnih razlik. Najslabše je bila odzivna 'Belokranjka' z 12,7 % odzivnostjo. Glukoza (20,2 %) se je izkazala kot statistično ( $p = 0,0301$ ) enakovredna saharozi (20,1 %) in je v nekaterih primerih tudi močno pospešila rast novonastalih poganjkov, medtem ko je maltoza (11,3 %) dajala slabše rezultate.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Dn  
DC UDC 635.25:631.528(043.2)  
CX *Allium sp* / somatic organogenesis / breeding / sucrose / maltose / glucose / flower bud / cutted ovary  
AU SVETEK, Tadej  
AA BOHANEK, Borut (supervisor) / LUTHAR, Zlata (co-advisor)  
PP SI – 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy  
PY 2016  
TI OPTIMIZATION OF INDUCTION OF ORGANOGENIC STRUCTURES USING FLOWER BUDS AND OVARIES OF ONION (*Allium cepa* L.)  
DT graduation thesis (University studies)  
NO IX, 35 p., 10 tab., 7 fig., 34 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB In the thesis we tried to optimize somatic organogenesis of onion (*Allium cepa* L.) in two ways: with testing different types of cut of flower buds when transferring them to regeneration medium and with testing different types of sugars and their concentrations in medium. For input material closed flower buds of 4 genotypes of onion 'Belokranjka', 'Holandska rumena', 'Ptujška rdeča' and "Hybrid F1" were put onto induction medium. After 6 days the opened buds, whole ovaries or upper halves of ovaries were transferred to regeneration medium. As a source of energy in induction and regeneration medium sucrose with concentrations 50 and 100 g/l was added along with maltose and glucose of equimolar concentrations. During six weeks of growing in regeneration medium organogenic response of ovaries and buds was observed. In case of whole flower buds we got 28.5 % success while in case of whole ovaries there was 25.4 % success rate. Both results were statistically equal. Organogenic result with ovary halves was only 1.3 %. Testing sugars we noticed organogenic response with all 6 possible combinations (3 types of sugars with 2 concentrations) in all used genotypes ( $p = 0.0324$ ) except 'Holandska rumena'. "Hybrid F1" had 21.9 % success rate which was statistically on pair with 'Ptujška rdeča'. 'Belokranjka' was the worst with 12.7 % response. Glucose (20.2 %) was statistically equal ( $p = 0.0301$ ) to sucrose (20.1 %) and did in some cases significantly speed up the growth of newly developed shoots while maltose (11.3 %) was statistically worse than both of them.

## KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	IX
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN NALOGE .....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>4</b>
2.1 ZGODOVINA ČEBULE.....	4
<b>2.1.1 Zgodovina čebule in čebulnic v Sloveniji.....</b>	<b>4</b>
2.2 PRIDELAVA ČEBULE PO SVETU IN V SLOVENIJI .....	4
2.3 ZNAČILNOSTI ČEBULE .....	5
<b>2.3.1 Botanična klasifikacija čebule .....</b>	<b>5</b>
<b>2.3.2 Morfološke lastnosti čebule.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3.3 Razvoj rastline .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3.4 Biološke značilnosti čebule.....</b>	<b>6</b>
2.4 RASTLINSKE TKIVNE KULTURE .....	6
<b>2.4.1 Mikropropagacija .....</b>	<b>7</b>
<b>2.4.2 Postopki v mikropropagaciji .....</b>	<b>8</b>
<b>2.4.3 Faktorji, ki vlivajo na uspeh mikropropagacije .....</b>	<b>8</b>
<b>2.4.4 Hiperhidracija.....</b>	<b>9</b>
<b>2.4.5 Kalus .....</b>	<b>9</b>
<b>2.4.6 Somatska organogeneza .....</b>	<b>10</b>

2.4.6.1	Somatska organogeneza pri čebuli .....	11
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE DELA</b> .....	<b>14</b>
3.1	RASTLINSKI MATERIAL .....	14
3.2	METODE DELA .....	15
<b>3.2.1</b>	<b>Razkuževanje in inokulacija cvetov</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Priprava gojišč</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Prestavljanje cvetov in plodnic iz indukcijskih na diferenciacijska gojišča</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Spremljanje somatske organogeneze</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Statistična obdelava</b> .....	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>20</b>
4.1	VPLIV IZREZA PLODNICE IZ ODPRTEGA CVETA NA ORGANOGENEZO	21
4.2	VPLIV GENOTIPA TER VRSTE IN KONCENTRACIJE SLADKORJEV V GOJIŠČU NA ORGANOGENEZO .....	22
<b>4.2.1</b>	<b>Vpliv kombinacije gojišč na organogenezo pri "križancu F1"</b> .....	<b>24</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Vpliv kombinacije gojišč na organogenezo pri 'Belokranjka'</b> .....	<b>24</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Vpliv kombinacije gojišč na organogenezo pri 'Ptujška rdeča'</b> .....	<b>25</b>
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b> .....	<b>27</b>
5.1	RAZPRAVA.....	27
<b>5.1.1</b>	<b>Optimizacija metode z različnimi načini razreza cveta</b> .....	<b>27</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Optimizacija metode z uporabo različnih sladkorjev v gojišču</b> .....	<b>28</b>
5.2	SKLEPI.....	29
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b> .....	<b>31</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b> .....	<b>33</b>
	ZAHVALA	

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Sestava osnovnega BDS gojišča za <i>in vitro</i> gojenje čebule .....	16
Preglednica 2: Skupne sestavine indukcijskih in diferenciacijskih gojišč.....	17
Preglednica 3: Vrsta in količina sladkorjev v indukcijskih (I) in diferenciacijskih (D) gojiščih.....	18
Preglednica 4: Vpliv izreza plodnice iz odprtega cveta po indukciji na organogeno odzivnost .....	21
Preglednica 5: Analiza variance za genotip, vrsto in koncentracijo sladkorjev vključenih v poskus indukcije organogenih struktur .....	22
Preglednica 6: Duncan-ov test razlik v povprečnem številu nastalih organogenih struktur pri treh genotipih čebule .....	22
Preglednica 7: Duncan-ov test razlik v povprečnem številu nastalih organogenih struktur glede na dodan sladkor v gojišču .....	23
Preglednica 8: Vpliv kombinacije indukcijskega in diferenciacijskega gojišča na nastanek organogenih struktur in hiperhidracijo pri "križancu F1" .....	24
Preglednica 9: Vpliv kombinacije indukcijskega in diferenciacijskega gojišča na nastanek organogenih struktur in hiperhidracijo pri 'Belokranjka' .....	25
Preglednica 10: Vpliv kombinacije indukcijskega in diferenciacijskega gojišča na nastanek organogenih struktur in hiperhidracijo pri 'Ptujška rdeča' .....	25



## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Prerez zrele čebulice (Kacjan-Maršič in Ugrinović, 2001).....	5
Slika 2: Koblj z neodprtimi cvetovi, primernimi za zasnovo <i>in vitro</i> kulture .....	15
Slika 3: Nastanek organogenih struktur in poganjkov pri čebuli .....	20
Slika 4: Delna hiperhidracija poganjka .....	21
Slika 5: Povprečno število nastalih organogenih struktur z mejami zaupanja pri treh genotipih čebule.....	23
Slika 6: Povprečno število nastalih organogenih struktur z mejami zaupanja glede na dodan sladkor v gojišču .....	23
Slika 7: Primerjava rasti poganjkov 'Ptujске rdeče' na gojišču s saharozo (levo) in glukozo (desno) .....	26

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ABA	abscizinska kislina
BAP	6-benzilamino purin
BDS gojišče	mešanica makro- in mikro-elementov ter vitaminov
D	diferenciacijsko gojišče
2,4-D	2,4-diklorofenoksi očetna kislina
I	indukcijsko gojišče
IAA	indolocetna kislina
IBA	indol-3-maslina kislina
KIN	kinetin
TDZ	tidiazuron

## 1 UVOD

Čebula (*Allium cepa* L.) je ena najpomembnejših zelenjadnic na svetu, saj se po količini pridelave uvršča na tretje mesto, takoj za paradižnikom in zeljem (Brewster, 2008: 22). Spada v rod *Allium*, v katerem poznamo več vrst kmetijsko zelo pomembnih rastlin, med drugim česen (*Allium sativum* L.) ter por (*Allium ampeloprasum* L.). Značilnost rodu *Allium* so trajne čebulnice z jedkim vonjem po česnu ali čebuli.

Zaradi velike potrebe po pridelavi čebule je nujno iskati metode in postopke, ki omogočajo zvišanje kakovosti in donosnosti njene pridelave. Žlahtnjenje je postopek, kjer človek izboljšuje genetsko zasnovo posamezne ali večjega števila lastnosti kmetijske rastline.

Čebula je dvoletna, fakultativno triletna rastlina, kar močno upočasni žlahtniteljske postopke. Poznamo več metod žlahtnjenja čebule, in sicer žlahtnjenje sort populacij, ki jih žlahtnimo predvsem z množično selekcijo, žlahtnjenje hibridnih kultivarjev in žlahtnjenje z uporabo metode genskih transformacij. Populacijske sorte in navzkrižno oprašene sorte so prevladovale vse od druge polovice 20. stoletja, v novejših sortnih listah pa tudi pri čebuli močno prevladujejo hibridne sorte. Pridobivanje hibridov pri čebuli je povzročilo odkritje citoplazmatske moške sterilnosti (CMS), ki omogoča pridobivanje hibridov brez ročne emaskulacije cvetov. CMS je vodilna metoda žlahtnjenja hibridnih sort pri mnogih rastlinskih vrstah. Problem pa se pojavi pri vzgoji moško sterilnih linij, ker ne moremo opraševati rastlin med seboj, saj zaradi sterilnosti ne pride do oprašitve. To ni problem samo pri čebuli, temveč pri večini zelenjadnic. V tem primeru je možnost rešitve z *in-vitro* razmnoževanjem posameznih rastlin imenovanim mikropropagacija.

Pri postopkih mikropropagacije razlikujemo tri glavne možnosti regeneracije rastlin:

- iz primarnih ali apikalnih in aksilarnih meristemov,
- iz sekundarnih ali adventivnih meristemov kot so cvetovi, listi in korenine z neposredno organogenezo ali pa posredno organogenezo preko kalusa,
- s somatsko embriogenezo.

Pri klonski mikropropagaciji je zaželeno, da pri razmnoževanju ne prihaja do genetskih ali epigenetskih sprememb ter da je postopek ponovljiv v daljšem časovnem obdobju.

Somatska organogeneza pomeni regeneracijo celice, organa ali tkiva in nastanek enopolarnih zasnov brstov, iz katerih se razvijejo poganjki, ki imajo organom podobne strukture (Struik in Jones, 1991).

Razvoj metod mikropropagacije čebule poteka že od leta 1978, ko je Hussey (1978) induciriral adventivne brste na majhnih koščkih stebela in lista rastlin družin Iridiaceae, Liliaceae ter Amaryllidaceae. Kljub relativno dolgi dobi do nedavnega ni bilo razvite nobene dovolj uspešne metode neposredne somatske regeneracije, ki ne vključuje nastanka kalusa in s tem nezaželenih genetskih sprememb in ki bi bila učinkovita pri širokem spektru genotipov, hkrati pa bi omogočala razvoj velikega števila poganjkov. Taka metoda neposredne somatske organogeneze je uspela Lutharjevi in Bohancu (1999). Avtorja sta iz zaprtih čebulnih cvetov in izrezanih plodnic inducirala razvoj kompaktnih organogenih skupkov iz katerih so se razvili številni poganjki. Predvsem je ta faza mikropropagacije uporabna za genske transformacije, v zadnjem času vzpenjajoče se tehnike žlahtnjenja. Pri tem postopku žlahtnjenja vključujemo posamezne gene v izbrano rastlino. Te metode se pri čebuli šele razvijajo, eden od razlogov za tako počasen razvoj na tem področju je pomanjkanje uspešne metode direktne organogeneze. Iz tega je razvidno, da je za žlahtnjenje čebule z uporabo genskih transformacij nujen razvoj čimbolj optimizirane metode mikropropagacije, kar je tudi namen te naloge.

## 1.1 NAMEN NALOGE

V diplomski nalogi smo poskušali optimizirati metodo neposredne somatske organogeneze. Poglobili smo se v proučevanje vpliva sladkorjev ter različnih načinov priprave izsečkov po indukciji. Na diferenciacijsko gojišče smo predstavili cvetove in plodnice, ki smo jih odrezali pri bazi ali na sredini.

V prvem delu naloge smo preučevali organogeno odzivnost cvetov in različno odrezanih plodnic na diferenciacijskem gojišču. S tem smo poskušali ugotoviti, kje na izbranih izsečkih so locirani odzivni centri za regeneracijo oziroma kateri izsečki so najbolj organogeno odzivni.

V drugem delu naloge smo proučevali, poleg saharoze, vpliv še dveh drugih, pri čebuli redkeje uporabljenih sladkorjev - glukoze in maltoze v dveh koncentracijah, na odzivnost organogeneze.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Med štirimi izbranimi genotipi čebule smo pričakovali statistično značilne razlike v organogeni odzivnosti.
- Domnevali smo, da med različnimi sladkorji in njihovimi koncentracijami v gojišču obstajajo statistično značilne razlike v organogeni odzivnosti.

- Predvidevali smo, da obstajajo statistično značilne razlike v organogeni odzivnosti med različnimi načini priprave čebulnih izsečkov: celih cvetov, izrezanih celih plodnic in zgornjih polovic plodnic.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZGODOVINA ČEBULE

Čebula izvira iz Bližnjega vzhoda ter srednje in vzhodne Azije. Skupaj s porom in česnom se je pred več kot 5000 leti začela njena udomačitev in sicer v starem Egiptu ter na Kitajskem. Je ena najstarejših gojenih zelenjadnic, ker je nezahtevna za gojenje, vsestransko uporabna, uspeva v različnih tleh in vremenskih razmerah in je bila, glede na ostale poljščine iz tistih časov, manj pokvarljiva - še posebej v sušeni obliki. Poleg kulinarčne uporabe je bila čebula v starem Egiptu objekt čaščenja - kot simbol neskončnosti so jo uporabljali pri pogrebnih obredih faraonov (Gomaa Abdel-Maksoud, 2011). V stari Grčiji so atleti jedli velike količine čebule, ker je veljala kot odlična za kri, medtem ko so si jo rimljanski gladiatorji vtirali v kožo za krepitev mišic (History..., 2011).

V današnjem času ima čebula predvsem kulinarčno vlogo, njene sestavine pa se uporabljajo tudi v zdravstvu

#### 2.1.1 Zgodovina čebule in čebulnic v Sloveniji

Čebula in ostale čebulnice so za Slovenijo pomembna skupina vrtnin, ki so jih gojili že naši predniki od leta 1939 dalje. O tem pričajo avtohtone populacije čebule in česna poimenovane po mestu Ptuj, kraju Griblje v Beli krajini in na Dolenjskem. Ptujsko polje je znano po pridelavi čebulnic, kraje v okolici Dornave, vasi Stojnci in Bukovci imenujejo Lukarija, ker so včasih luk uporabljal kot skupno ime za čebulo, česen in por. V Gribljah so čebulo z izdolženo obliko čebulice imenovali Gribelska. Iz avtohtonih populacij čebule so požlahtnili dve sorti, ki sta vpisani v slovensko sortno listo: 'Ptujška rdeča' in 'Belokranjka' (Černe in Kacjan – Maršič, 2001).

### 2.2 PRIDELAVA ČEBULE PO SVETU IN V SLOVENIJI

Leta 2012 je bilo na svetu 3.642.000 ha površin posejanih s čebulo s skupnim pridelkom 74,250,809 ton. Največje površine posejane s čebulo so na Kitajskem, Indiji in v ZDA (Major... 2012). Med letoma 1978 in 2002 se je pridelava čebule povečala za 134 %, medtem ko se je število ljudi v istem časovnem obdobju povečalo za zgolj 45 % (Brewster, 2008: 22). V Evropi pridelajo največ čebule v Italiji, Španiji, na Poljskem in Nizozemskem (Černe in Kacjan-Maršič, 2001).

Tudi v Sloveniji imajo čebulnice pomembno vlogo. Leta 2000 je bilo od vseh površin posejanih z zelenjadnicami 7,6 % površin namenjenih čebulnicam, od tega največji delež

(80 %) čebuli. Po oceni iz leta 1999 se je največ tržne čebule pridelalo v Podravju (28 %) (Černe in Kacjan – Maršič, 2001).

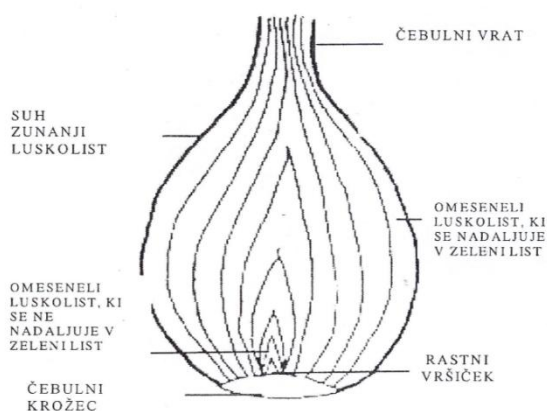
## 2.3 ZNAČILNOSTI ČEBULE

### 2.3.1 Botanična klasifikacija čebule

Čebulnice, med katere spada tudi čebula, so zelo razširjena skupina vrtnin. Spadajo v razred Liliopsida-Monocotyledonae oz. enokaličnice, podrazred Liliidae, družino Alliaceae (lukovke) in rod *Allium*. Rod *Allium* je zelo obširen saj obsega preko 600 vrst z nekaterimi, poleg čebule (*Allium cepa* L. var. *cepa*), zelo pomembnimi kultiviranimi vrstami, kot so: šalotka (*Allium cepa* L. var. *ascalonicum*), zimska čebula (*Allium fistulosum* L.), drobnjak (*Allium schoenoprasum* L.), česen (*Allium sativum* L.), por (*Allium ampeloprasum* L. var. *porrum*). Po obliki listov delimo čebulnice v dve skupini. Prve imajo cevasto votle liste (čebula, šalotka, zimski luk, drobnjak), druge pa podolgovate plane liste (česen in por) (Černe, 1992).

### 2.3.2 Morfološke lastnosti čebule

Vse vrtnine družine Alliaceae spadajo v zelenjadno skupino čebulnic. Značilnost čebulnic je, da tvorijo v zemlji (nekateri v socvetju) čebulico, ki je metamorforiziran podzemni organ, sestavljen iz zelo skrajšanega mesnatega stebela, ki ga imenujemo čebulni oz. bazalni krožec (slika 1.) To steblo nosi rastni vršiček ali cvetni primordij in je obdan z debelimi omesenelimi listi. V njihovih pazduhah so brsti, iz katerih lahko zraste nova čebula. Socvetje je enostaven kobul, plod pa eno do tri predelnati orešek. Seme je trdo, črno, trioglato in nekoliko nagubano, veliko 2-3 mm (Kacjan-Maršič in Ugrinović, 2001).



Slika 1: Prerez zrele čebulice (Kacjan-Maršič in Ugrinović, 2001)

### 2.3.3 Razvoj rastline

Čebula je dvoletna, fakultativno triletna rastlina. Razvojni cikel čebule se začne z iniciacijo meristema in preneha s cvetenjem in tvorbo semena. Razvojno pot delimo na dve fazi rasti: vegetativno in generativno. Vegetativna faza razvoja obsega rast listov in čebulice, kjer doseže svojo največjo težo. Sledi ji generativna faza, ki zajema indukcijo in iniciacijo cveta, diferenciacijo cvetnih delov, podaljšanje cvetnega poganjka in nazadnje cvetenje. Kakovost cveta, kakor tudi njegova velikost, sta neposredno povezani z velikostjo čebulice pri čemer mora čebula doseči minimalno velikost, da je sposobna iniciacije cvetnega primordija (Hartmann in sod., 1997: 177).

Čebula se razvija in s tem veča velikost in težo v obdobju med in po cvetenju ter tako dolgo, dokler ostanejo listi vitalni. Za spodbujanje rasti se uporabljajo gojitveni ukrepi, ki vključujejo namakanje, kontrolo nad pleveli, boleznimi in insekti ter gnojenje. Z nastankom večje čebule se zagotovi tvorba večjega cveta v prihodnjem letu (DeHertog in Le Nard, 1993).

### 2.3.4 Biološke značilnosti čebule

Čebula je začimba, ki se največkrat uporablja za mesne jedi, pa tudi za solate. Bogata je z eteričnimi olji (38 mg/100 g), ki ji dajo bolj ali manj oster in značilen okus. Ker je v čebuli veliko sladkorja, je tudi hranilna. Cenjene so njene dietetične lastnosti, ker draži žleze, ki pospešujejo prebavo. Vsebuje tudi zelo veliko vitaminov (karotin 0,25 mg/100 g), posebno pomembna sta B1 in B2, zlasti pa vitamin C (9 mg/100 g). Mineralnih soli je v njej približno 0,60 %, predvsem kalija ter kalcija. Za prehrano se uporabljajo omeseneli listi, pri mladi čebuli pa tudi listi (zelenina), saj so bogati z vitaminom C in železom.

## 2.4 RASTLINSKE TKIVNE KULTURE

Rastlinske tkivne kulture, ki predstavljajo niz tehnik, v katerih je združeno mnogo znanj različnih znanstvenih disciplin (biokemija, fiziologija, genetika), lahko uporabljamo tudi za tržno množično razmnoževanje rastlinskih vrst (Bohanec, 1992). Običajno jih uporabljamo za (Struik in Jones, 1991):

- odstranjevanje patogenov,
- mikropropagacijo ali klonsko hitro razmnoževanje
- genske banke,
- reševanje embrijev,
- pridobivanje haploidov (mikrospore, antere, ovule) in manipulacije ploidnosti,
- somatsko organogenezo in somatsko embriogenezo,



- *in vitro* selekcijo,
- pridobivanje celičnih substanc v kulturi celic (sekundarni metaboliti),
- spremembe z mutacijami in somaklonsko variabilnostjo,
- prenos genov s fuzijo protoplastov in vključevanje genov s pomočjo različnih tehnik.

Temeljna tehnika tkivnih kultur je mikropropagacija, to je nespolno ali vegetativno razmnoževanje *in vitro*.

#### 2.4.1 Mikropropagacija

Mikropropagacija oziroma klonsko razmnoževanje nam omogoča hitro *in vitro* razmnoževanje določenega osebka v mnogo večjem obsegu kot pri razmnoževanju v naravnih razmerah. Je postopek, pri katerem majhen del rastline, odvzete od odbranih staršev, postavimo na gojišče, ki vsebuje vse potrebne elemente (sladkorje, organska ter anorganska hranila in regulatorje rasti) za idealno rast ter ga predhodno steriliziramo, da odstranimo morebitne okužbe in bolezni. Inicirano kulturo damo v rastne komore, kjer lahko kontroliramo različne parametre, ki so pomembni za uspešen razvoj poganjkov in njihovo nemoteno rast, kot so temperatura, stopnja obsevanja in dolžina osvetlitve (Lumsden in sod., 1994).

Pri mikropropagaciji je zaželeno, da ne prihaja do genetskih in epigenetskih sprememb ter da je postopek ponovljiv v daljšem časovnem obdobju. Za večjo stabilnost genotipa priporočajo izbiro čim hitrejše in učinkovite regeneracije, zmanjšanje števila subkultur ob uporabi večkratne ponovitve iniciacije, uporabo somatske embriogeneze, omejevanje na vzgojo le diploidnih rastlin, čim manjšo vsebnost hormonov v gojiščih ter izogibanje nastanku kalusa (Bohanec, 1992).

Pri mikropropagaciji razlikujemo tri glavne poti regeneracije rastlin:

- **iz primarnih ali apikalnih ter aksilarnih meristemov**, kjer uporabimo vršičke, odvzete z glavnega (apikalnega) ali stranskih (aksilarnih) poganjkov, del poganjka posameznega nodija, del poganjka z nodijem, embrio in seme. Uporabljamo torej tiste dele rastline, kjer se poganjki na rastlini tvorijo tudi v naravi;
- **iz sekundarnih oziroma adventivnih meristemov**, kjer kot regenerativni material uporabimo različne dele rastlin, kot so listi, stebela, cvetovi, korenine, kalus. Nastajanje adventivnih brstov je lahko neposredno, kar imenujemo *neposredna organogeneza*, če pa kot vmesna faza nastaja kalus potem govorimo o *posredni organogenezi* (Caligari in Shohet, 1993);

- **z uporabo somatske embriogeneze**, kjer somatske celice, bodisi celice v celičnih suspenzijah ali celice kalusa, oblikujejo tkiva, ki so po načinu in obliki razvoja podobne *in vivo* nastalim zigotskim embrijem. Kljub genetsko povsem različnemu poreklu jih zaradi morfološke podobnosti imenujemo somatski embrioidi oziroma somatski embriji. Opisanih je več značilnih stopenj razvoja somatskih embrioidov, kar še posebej velja za embrioidne, nastale iz celičnih suspenzij. Najprej so opazne majhne globularne proembrijske oblike, ki nato dobijo srčasto obliko, te kasneje preidejo v podolgovato »torpedo« obliko. Ena od značilnosti embrioidov je zgodnji bipolarni položaj, po zgodnjem nastanku radikule se tudi razlikujejo od načina rasti, pri katerem nastajajo iz kalusa brsti (Bohanec, 1992).

#### 2.4.2 Postopki v mikropropagaciji

V procesu mikropropagacije ločimo več faz:

- priprava materinih rastlin in izbira izsečka,
- iniciacija kulture,
- razmnoževanje poganjkov in subkultiviranje,
- podaljševanje poganjkov in koreninjenje,
- aklimatizacija.

V nalogi smo končali mikropropagacijo na začetku tretje faze, ko so se poganjki začeli razvijati.

#### 2.4.3 Faktorji, ki vlivajo na uspeh mikropropagacije

Uspeh v tehnologiji, ki se ukvarja z rastjo rastlinskih celic, tkiv ali rastlinskih organov je odvisen od relativno veliko faktorjev. Za izdelavo dobre metode mikropropagacije moramo upoštevati čimveč le teh, jih pravilno ovrednotiti ter izbrati optimalna sredstva za zadovoljitev potreb določene metode. Že neoptimalna izbira nekega sredstva (npr. sestava gojišča, izbira in koncentracija hormona) lahko močno poslabša ali pa sploh izniči regenerativni koeficient.

Pomembnejši faktorji, ki določajo uspeh mikropropagacije so (Bohanec, 1992):

- hranila v gojišču,
- rastni hormoni v gojišču,
- strjevalci gojišča,
- pH gojišča,
- genotip okulirane rastline.

#### 2.4.4 Hiperhidracija

Hiperhidracija ali vitrifikacija oziroma steklavost je nenormalen razvoj tkiva *in vitro*, ko postane tkivo (listi, poganjki) steklasto. Pojavi se lahko takoj po inokulaciji ali šele pri subkultiviranju. Pojav je pri mikropropagaciji nezaželen in slabo vpliva na njen uspeh, saj ima hiperhidrirano tkivo motnje v zgradbi in delovanju.

Pri čebuli se v začetni fazi razraščanja izsečka hiperhidracija opazi tako, da so novo nastale globularne strukture prozorne in nimajo bele barve kot ostale novotvorbe. V kasnejši fazi je značilno da se hiperhidrirani poganjki rozetasto razraščajo, so odebeljeni in imajo krajše internodije. Listi postanejo steklasti, podaljšani, odebeljeni, nagubani, zviti in krhki, otežen je tudi nastanek adventivnih korenin.

Pri hiperhidraciji pline v medceličnih prostorih nadomesti voda, zato le ti tudi nabreknejo. Listi imajo manj palisadnega tkiva, tanko povrhnjico z manj kutina, voska, pektina in celuloze (Debergh in sod., 1992). V listih je porušen mehanizem regulacije osmotskega tlaka, ker vsebujejo premalo inozitola (Bohanec, 1992). Kloroplasti imajo spremenjeno zgradbo in manj klorofila. Korenine in poganjki so slabo povezani (Debergh in sod., 1992). Pri hiperhidriranih rastlinah je spremenjeno delovanje encimov.

Vzrokov za nastanek hiperhidracije je veliko. Lahko je neprimerno gojišče (na gojišču stoji voda, neprimerna količina ali vrsta strjevalca gojišča, preobilje citokininov ali določenih makroelementov, samo mikrookolje v posodi (neprimerna prepustnost posode in s tem kopičenje etilena) ter zunanje okolje (temperatura, osvetljenost, zračna vlažnost) (Debergh in sod., 1992).

#### 2.4.5 Kalus

Kalus imenujemo skupek delečih se neorganiziranih celic in ga namesto tkivo imenujemo kar celičje. Je raznobarven in različnih sestav. Pri večini rastlin ga izzovemo *in vitro* z uporabo večjih količin rastlinskih hormonov - tako avksinov (npr. 2,4-D) kot tudi citokininov.

Nastali kalus je lahko kompakten ali rahel. Sčasoma lahko postane neodvisen od dodanih hormonov in lahko raste tudi na brezhormonskem gojišču. Oblikovanje kalusa je izhodiščna točka za nastanek celičnih suspenzij. Tako na kalusu kot iz celičnih suspenzij lahko nastajajo tako imenovani somatski embrioidi kakor tudi somatski embriji, ki so po obliki in načinu razvoja podobni *in vivo* nastalim zigotskim embrijem, vendar so genetsko povsem različnega porekla. Somatska embriogeneza je prav tako eden od načinov *in vitro*

razmnoževanja, ki ima prednost potencialnega razmnoževanja velikega števila individualnih rastlin z manjšim številom subkultiviranj (Bohanec, 1992).

Kalus, ki nastane *in vitro*, je po obliki podoben ranitvenemu kalusu, ki nastane na ranah *in vivo* (Jelaska, 1994). Kalusne kulture uporabljajo za proučevanje potreb rastlin *in vitro* (sestava gojišč), za posredno regeneracijo rastlin (iz embriogenega kalusa preko organogeneze ali somatske embriogeneze), oblikovanja sekundarnih metabolitov (iz neembriogenega kalusa) ter za izzivanje mutacij oz. somaklonske variabilnosti. Zaradi slednjega je pri somatski organogenezi, kjer želimo razmnožiti določen genotip, ki bo dal enak izhodni material kot vhodni, kalus kot vmesna faza organogeneze zelo nezaželen.

S postopkom neposredne organogeneze, kakršen je bil razvit pri čebuli (Luthar in Bohanec, 1999) se je možno izogniti fazi kalusa ter regenerirati poganjke neposredno iz tkiva ovarija. Tovrstna regeneracija je zelo pomembna kot način mikropropagacije, možna pa je tudi uporaba te metode za poskuse genetskih transformacij.

#### **2.4.6 Somatska organogeneza**

Somatska organogeneza je regeneracija celic, organov ali tkiv in nastanek enopolnih zasnov brstov, iz katerih se razvijejo poganjki, ki imajo organom podobne strukture (Struik in Jones, 1991). Organogeneza vključuje *de novo* tvorbo adventivnih poganjkov na izsečku, ki je lahko iz različnih delov rastline. Ta tehnika tkivnih kultur se v veliki meri uporablja v hortikulturi in gozdarstvu za proizvodnjo okrasnih rastlin in lesnatih vrst iz več razlogov:

- Organogeneza se lahko uporablja za klonsko razmnoževanje rastlin. Pri okrasnih vrstah se uporablja mnogo sort, ki se razmnožujejo zaradi ene ali več unikatnih lastnosti. Rastline, proizvedene z neposredno somatsko organogenezo, ohranijo lastnosti starševske rastline.
- Razmerje reprodukcije je dosti večje kot pri aksilarnem razmnoževanju (Chun, 1993).
- Uporaba organogeneze omogoča premagovanje ovir pri razmnoževanju rastlin zaradi moške ali ženske sterilnosti, zaradi težav pri razmnoževanju rastlin s semeni, zaradi težav pri konvencionalnem aksilarnem razmnoževanju ter pri skrajševanju časa cvetenja nekaterih rastlin.
- Uporablja se kot pripomoček pri številnih načinih znanstvenega raziskovanja, vključno z rastlinsko morfologijo ali poskusih genetskega inženiringa pri okrasnih rastlinah. Genske transformacije potrebujejo tehniko rastlinskega razmnoževanja,

ki omogoča tvorjenje velikega števila poganjkov, ki izvirajo samo iz ene ali le nekaj celic (James in sod., 1989).

Organogeneza je tristopenjski proces. Prva stopnja vključuje zasnovo brsta, v drugi stopnji se iz brsta razvije poganjek, tretja stopnja pa je koreninjenje poganjka (Thorpe, 1994). Najbolj kritičen del procesa predstavlja prva stopnja, medtem ko sta ostali dve stopnji večinoma manj težavni. Na iniciacijo poganjka vpliva mnogo dejavnikov, ki lahko delujejo samostojno ali v kombinaciji z ostalimi dejavniki in tako povzročajo neprestane spremembe v morfologenetskih sposobnostih celice.

Prva stopnja organogeneze, ki vključuje zasnovo brsta, se začne s spreminjanjem morfologenetskih sposobnosti celic, ki reagirajo tako, da dajo signal za indukcijo. Ta signal sproži mirno ali aktivno proliferacijo celic, ki začne spreminjati pot diferenciacije. Diferencirane celice morajo biti sposobne dediferenciacije, da so lahko ponovno redeterminirane (Pierik, 1987). Celice sledijo natančnemu modelu deljenja, kar vodi do nastanka meristema brsta oziroma poganjka. Če ima adventivni poganjek multicelični izvor morajo imeti celice nekakšno medsebojno interakcijo medtem ko se delijo; kasneje tvorijo odgovarjajoč meristem (Thorpe, 1994). Ko se tvori meristem in kasneje brst, se adventivni poganjki pri večini vrst tvorijo brez težav in jih lahko multipliciramo pred ukoreninjenjem.

#### 2.4.6.1 Somatska organogeneza pri čebuli

Večina dosedanjih metod somatske organogeneze pri različnih rastlinskih vrstah slonijo predvsem na posrednem razmnoževanju preko kalusa (Sreelatha in sod., 1998).

Objavljenih je bilo več študij, ki so proučevale *in vivo* odzive pri čebuli, večina od teh temelječih na aksilarnem razmnoževanju. Mikropropagacija čebule je precej zahtevna. Za začetek je pomembna pravilna izbira izhodiščnega tkiva, ki ga lahko uporabljamo kot inokulant. Pri delu proučevanj za mikropropagacijo čebule so za izsečke uporabljali dele čebule oziroma čebulic, nastalih *in vivo*. Kot najprimernejše tkivo so se izkazali deli bazalnih ploščic s skrajšanimi osnovami listov. O tovrstnem načinu poročajo:

- Hussey (1978) je izvedel direktno organogenezo iz dela čebulnega krožca z adventivnimi brsti v pazduhi omesenelega lista čebule. Iz ene čebule premera 25 mm je po treh mesecih subkultiviranja dobil do 150 poganjkov.
- Fujieda in sod. (1979) so kot inokulant uporabili omesenele liste čebule z delom čebulnega krožca;

- Hussey in Falavigna (1980) sta z direktno organogenezo izzvala rast adventivnih brstov iz pazduhe omesenelega lista čebule s kosom čebulnega krožca;
- Kahane in sod. (1992) so razvili metodo nepretrganega (cikličnega) razmnoževanja čebule. Metoda je sestavljena iz treh delov; v prvem so dosegli rast poganjkov s pomočjo citokininov, v drugi fazi so posamezne poganjke osamili ter njihove bazalne dele odebelili na gojišču brez hormonov; v zadnjem delu cikla so razrezali dobljene *in vitro* čebulice na več delov, sestojčih iz rastnega vršička in dela čebulnega krožca ter jih inokulirali na gojišče s citokinini.
- Mohamed Yasseen in sod. (1994) so regenerirali poganjke in čebulice *in vitro* z visoko učinkovitostjo iz omesenelega lista z delom čebulnega krožca čebulice šalotke in česna. Namnoževanje je potekalo z metodo direktne in indirektno somatske organogeneze. Razvoj preko kalusa (indirektna organogeneza) je bil počasnejši, a bolj uspešen.

Nekateri raziskovalci so za izsečke uporabljali dele nezrelih socvetij:

- Matsubara in Hihara (1978) sta iz nedozorelih cvetov komaj odprtih kobulov tvorila čebulice in rastline čebule. Uspeh sta dosegla že z uporabo osnovnega MS gojišča (Murashige in Skoog, 1962) brez dodatnih hormonov. Z dodatkom NAA in BAP se je odstotek regenerantov statistično značilno povečal.
- Dunstan in Short (1979) sta kultivirala čebulne kobule v različnih razvojnih fazah bodisi cela ali pa razrezana na manjše kose. Največ uspeha sta dosegla pri uporabi BDS gojišča z dodatkom 1 mg/l BA. Polovica poganjkov je zrasla v odrasle rastline.
- Mohamed Yasseen in sod. (1993) so uporabili na četrtine razrezane nezrele kobule za direktno in indirektno organogenezo. Za gojišče so uporabili MS gojišče z dodatkom hormonov TDZ in BAP. Večje število poganjkov so dobili pri indirektni metodi.

Značilnost objavljenih metod je dokaj nizka učinkovitost tvorbe poganjkov iz ene matične rastline. Metode, osnovane na indukciji poganjkov iz delov čebul in čebulic, so dale do 10 poganjkov na izseček, pri tem pa je potrebno upoštevati da je število možnih izsečkov, pridobljenih iz ene čebule, omejeno (Fujieda in sod., 1979). Uspešnost metod osnovani na inokulaciji nezrelih cvetov ali delov nezrelih socvetij je bila raznolika. Pike in Yoo (1990) poročata o 11 % indukciji cvetov na katerih je nastalo povprečno 5 poganjkov, medtem ko so Mohamed-Yasseen in sod. (1993) uspeli izzvati do 10,6 poganjkov na izseček, kar pomeni 42 na socvetje.

*In vivo* gojene poganjke je možno ciklično razmnoževati z metodo, ki so jo razvili Kahane in sod. (1992), vendar je postopek zamuden, saj traja en cikel 3-4 mesece. Objavljena je tudi metoda za nastanek somatske embriogeneze s katero sta Phillips in Luteyn (1983) inducirala nastanek kalusa iz meristemov vršičkov in korenin sejancev, zrelih embrijev ter iz zrelih bazalnih plošč.

O razvoju metode neposredne somatske regeneracije, ki je učinkovita pri večini testiranih kultivarjev in temelji na postopku, ki vodi, preko nastanka organogenih skupkov, v razvoj velikega števila poganjkov, poročata Luthar in Bohanec (1999). Metoda omogoča indukcijo kompaktnih organogenih skupkov, ki se lahko razvijejo v številne poganjke iz zaprtih čebulnih cvetov in plodnic. Indukcijski postopki in sestavine gojišča so zelo podobni kot pri ginogenetski regeneraciji haploidnih rastlin čebule (Bohanec in sod., 1995). Glavne razlike med postopkoma so uporaba BDS (Dunstan in Short, 1977) indukcijskega gojišča, povečana vsebnost vitaminov in inositola, zamenjava agarja z Gellan-gum strjevalcem gojišča in krajša indukcijska faza. Kljub temu, da so opisane spremembe relativno majhne, povzročijo povsem drugačen odziv istih čebulnih organov ob gojenju *in vitro* (Luthar in Bohanec, 1999). Metoda neposredne somatske organogeneze je bila sestavljena iz indukcijske faze, v kateri so bili cvetovi čebule nameščeni na osnovnem gojišču z dodatkom 2,4-D in BAP hormonoma, medtem ko so bili v diferenciacijski fazi izolirani ovariji prestavljeni v gojišče z dodatkom hormona BAP. V indukcijskem gojišču so bili uporabljeni tudi drugi hormoni; avksina pikloram in NAA ter citokinina 2iP in TDZ, ki pa niso dali enako uspešnih rezultatov. Regeneracija poganjkov je bila večja na gojišču, strjenim z Gellum-gum, kot pri agarju ali mešanici le-tega z Gellan-gum. Optimalna indukcijska doba je bila 6 dni. V gojišču je bila kot vir ogljikovih hidratov uporabljena saharoza v različnih koncentracijah; kot najbolj optimalna se je izkazala koncentracija 50 mg/l. Pri preizkušanju vpliva različnih vsebnosti avksinov in citokininov na neposredno somatsko organogenezo avtorja ugotavljata, da so za optimalno indukcijo potrebni oboji. Avksina NAA in pikloram, za katera je značilno, da ugodno vplivata na indukcijo kalusa ali diferenciacijo, sta pri direktni somatski organogenezi v celoti (NAA) ali delno (pikloram) nevpilivna.

### 3 MATERIAL IN METODE DELA

V diplomski nalogi smo raziskovali možnost optimizacije metode neposredne somatske organogeneze pri čebuli in vključili dva postopka:

- a) vpliv vrste in koncentracije sladkorjev v gojišču na somatsko organogenezo
- b) vpliv razreza cveta na somatsko organogenezo

Pri obeh postopkih dela smo uporabili enako metodo neposredne somatske organogeneze, ki sta jo razvila Luthar in Bohanec (1999) in jo poskušali optimizirati z uporabo omenjenih postopkov.

#### 3.1 RASTLINSKI MATERIAL

V nalogi smo vključili štiri genotipe čebule:

- 'Belokranjka',
- 'Ptujška rdeča',
- 'Holandska rumena' – originalna sorta je 'Stuttgarter Riessen' iz Nemčije,
- križanec eksperimentalnih inbridiranih linij B2371C in B2923B (v nadaljevanju "križanec F1").

Čebulice za sajenje sort 'Ptujška rdeča' ter 'Holandska rumena' smo dobili pri lokalnem pridelovalcu Svetek Francetu iz Slap pri Ljubljani, medtem ko smo za sajenje sorte 'Belokranjka' ter "križanca F1" posegli po sadilnem materialu uporabljenem pri poskusu Lutharjeve in Bohanca (1999), ki je potekal sočasno. "Hibrid F1" je bil dobljen iz ameriškega javnega žlahtniteljskega programa pri Dr. M.J.Havey-u, USDA, Madison, Wisconsin, ZDA.

Čebulice vseh omenjenih genotipov smo začetek marca 1998 posadili v lonce in jih postavili v ogrevan rastlinjak. Za vsakega od genotipov smo posadili 5 čebulic. Med rastjo smo rastline primerno zalivali, dognojevali in škropili, tako da so se prvi kobuli (socvetja) oblikovali začetek junija (slika 2).

Razvite, vendar še neodprte cvetove, smo posamično odstranjevali s kobulov s pomočjo škarij. Zaprte cvetove smo postopoma rezali in sproti inokulirali na gojišča, dokler nismo dobili zadosti vhodnega materiala. Pri vsakem genotipu smo za vsako obravnavo uporabili 6 petrijevok s 25-35 cvetovi, kar je bilo približno 800 cvetov na kultivar, skupaj približno 2500 cvetov.





Slika 2: Kobul z neodprtimi cvetovi, primernimi za zasnovo *in vitro* kulture

## 3.2 METODE DELA

### 3.2.1 Razkuževanje in inokulacija cvetov

Posamezne cvetove iz različnih kobulov enega genotipa smo v brezprašni komori dali v 100 ml erlenmajerice, ki so vsebovale 50 ml raztopine soli dikloroizocianurne kisline s koncentracijo 16,6 g/l, pripravljene z avtoklavirano vodo. V raztopino smo dodali nekaj kapljic sredstva za boljše oprijemanje Tween 20 (Sigma-Aldrich Co.), vse skupaj rahlo premešali in pustili stati 10 minut. Cvetove smo trikrat sprali s 50-80 ml avtoklavirane vode in jih nato položili v 100 mm petrijevke s približno 25 ml indukcijskega gojišča. V vsako petrijevko smo postavili povprečno 30 cvetov.

Za preprečevanje izhlapevanja smo pokrov in dno petrijevke pritrdili skupaj s Parafilm-om (American National Can, Greenwich, CT, ZDA). Inokulirani cvetovi so bili gojeni v 600 litrskih rastnih komorah s 16/8 urno osvetlitvijo pri 21–23°C.

### 3.2.2 Priprava gojišč

Po potrebi smo ciklično pripravljali indukcijska (I) in diferenciacijska (D) gojišča, ki smo jih zlili v petrijevke, kamor smo inokulirali ali pa prestavili cvetove, plodnice oziroma polovice plodnic. Za indukcijo cvetov smo uporabili že pripravljeno komercialno BDS mešanico anorganskih soli (Dunstan in Short, 1977). Sestava gojišča, količina soli in organskih sestavin potrebnih za pripravo enega litra gojišča, so prikazani v preglednici 1:

Preglednica 1: Sestava osnovnega BDS gojišča za *in vitro* gojenje čebule

Sestavine	Količina (mg/l)
<b>Makroelementi</b>	
KNO <sub>3</sub> (K-nitrat)	2530
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (amonijev nitrat)	320,16
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O (amonijev fosfat)	230,06
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (diamonijev sulfat)	134
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O (Mg-sulfat 7-hidrat)	247
CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O (Ca-klorid 2-hidrat)	150
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O (Na-fosfat 2-hidrat)	172
<b>Mikroelementi</b>	
MnSO <sub>4</sub> *4H <sub>2</sub> O (Mn-sulfat 4-hidrat)	13,2
KJ (K jodid)	0,75
H <sub>3</sub> B <sub>3</sub> O <sub>3</sub> (B-kislina)	3
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O (Zn-sulfat 7-hidrat)	2
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O (Cu-sulfat 5-hidrat)	0,039
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O (Na <sub>2</sub> -molibdat 2-hidrat)	0,25
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O (Co-klorid 6-hidrat)	0,025
<b>Železo v dveh oblikah</b>	
C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O (Na <sub>2</sub> EDTA 2-hidrat)	37,25
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O (Fe-sulfat 7-hidrat)	27,85
<b>Organske snovi</b>	
C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>5</sub> *HCl (tiamin-HCl)	10
C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> (piridoksin-HCl)	1
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> (m-inositol)	100
C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NSO <sub>2</sub> (niacin)	1

Za pripravo gojišča smo zatehtali predpisano količino mešanice BDS soli in jo raztopili v destilirani vodi. Iz predhodno pripravljenih založnih raztopin rastnih regulatorjev smo odpipetirali potrebne količine ter dodali preostale organske spojine ter strjevalec gojišča Gelrite® Gellan-gum (preglednica 2). Dodali smo destilirano vodo do končnega volumna, dobro premešali in s pH metrom uravnali pH na vrednost 6,0. Dobljeno raztopino smo prelili v 250 ml erlenmajerice in avtoklavirali 15 minut pri 120 °C ob pritisku 1,1 bara.

Preglednica 2: Skupne sestavine indukcijskih in diferenciacijskih gojišč

<b>Gojišče</b>	<b>Indukcijsko (I)</b>	<b>Diferenciacijsko (D)</b>
<b>Makro in mikroelementi</b>	<b>BDS (preglednica 1)</b>	<b>BDS(preglednica 1)</b>
<b>Organske snovi (mg/l)</b>		
m-inozitol	400	400
L-prolin	200	200
<b>Rastni regulatorji (mg/l)</b>		
BAP	2	/
2,4 D	2	/
TDZ	/	2
<b>Strjevalec gojišča (g/l)</b>		
Gellan-gum	1	1
<b>pH vrednost</b>	6,0	6,0

a) vpliv razreza cveta in plodnic na somatsko organogenezo

Pri testiranju vpliva razreza na organogenezo smo uporabili samo eno indukcijsko in eno diferenciacijsko gojišče (I1 – D1), ki sta se kot najboljša izkazala v predhodni raziskavi in to je bilo obakrat gojišče s saharozo koncentracije 50 g/l (Luthar in Bohanec, 1999). Za inokulacijo smo uporabili cvetove sorte 'Belokranjka'.

b) vpliv vrste in koncentracije sladkorjev v gojišču na somatsko organogenezo

V tem delu poskusa smo uporabili šest indukcijskih (I) in šest diferenciacijskih (D) gojišč. Indukcijska gojišča so se med seboj razlikovala le po vrsti in vsebnosti sladkorjev. Enake razlike so bile tudi v skupini diferenciacijskih gojišč (preglednica 3). Poleg saharoze v koncentracijah 50 in 100 g/l smo uporabili še dve vrsti sladkorja enakih ekvimolarnih količin:

- maltozo – 52 in 105 g/l,
- glukozo – 26 in 52 g/l.

Preglednica 3: Vrsta in količina sladkorjev v indukcijskih (I) in diferenciacijskih (D) gojiščih

Gojišče	Vrsta in koncentracija sladkorjev (g/l)		
	saharoza	maltoza	glukoza
I1, D1	50	/	/
I2, D2	100	/	/
I3, D3	/	52	/
I4, D4	/	105	/
I5, D5	/	/	26
I6, D6	/	/	52

### 3.2.3 Prestavljanje cvetov in plodnic iz indukcijskih na diferenciacijska gojišča

Zaprti cvetovi, nastavljeni na indukcijskih gojiščih, so se po nekaj dneh gojitve odprli, plodnice so nabrekle in se močno povečale. Po šestih dneh smo iz indukcijskega gojišča prestavili rastlinski material v pripadajoča (enaka vrsta in količina sladkorja) diferenciacijska gojišča na tri načine:

1. cel cvet – cvetove smo samo prestavili,
2. pol plodnice – zgornje polovice plodnic smo odrezali in prestavili,
3. cela plodnica – cvetovom smo odstranili cvetno odevalo in prestavili plodnico.

V drugem delu naloge, kjer smo testirali vpliv sladkorja, smo uporabili samo 3. način razreza, in sicer celo plodnico, medtem ko smo pri testiranju razreza uporabili vse tri načine razreza.

### 3.2.4 Spremljanje somatske organogeneze

V primeru, da je v indukcijski ali diferenciacijski petrijevki prišlo do okužbe zaradi slabe razkužitve cvetov ali sekundarne okužbe, smo petrijevko izločili. Po približno 30-tih dneh so se pojavile prve vidne tvorbe na bazi plodnic. Te tvorbe so imele v začetni fazi embriogen videz in so bile popolnoma bele barve.

V nadaljnjem tednu so se globularne strukture povečale, tako da so že bili vidni posamični zametki poganjkov. Čez 1-2 tedna so se zametki razvili v poganjke velike nekaj centimetrov, ponekod pa precej več - tudi do 15 cm. V tej fazi bi lahko poganjke oddvojili in nadaljevali njihov razvoj z izdolževanjem poganjkov, vendar bi to že presehalo okvir naše naloge.

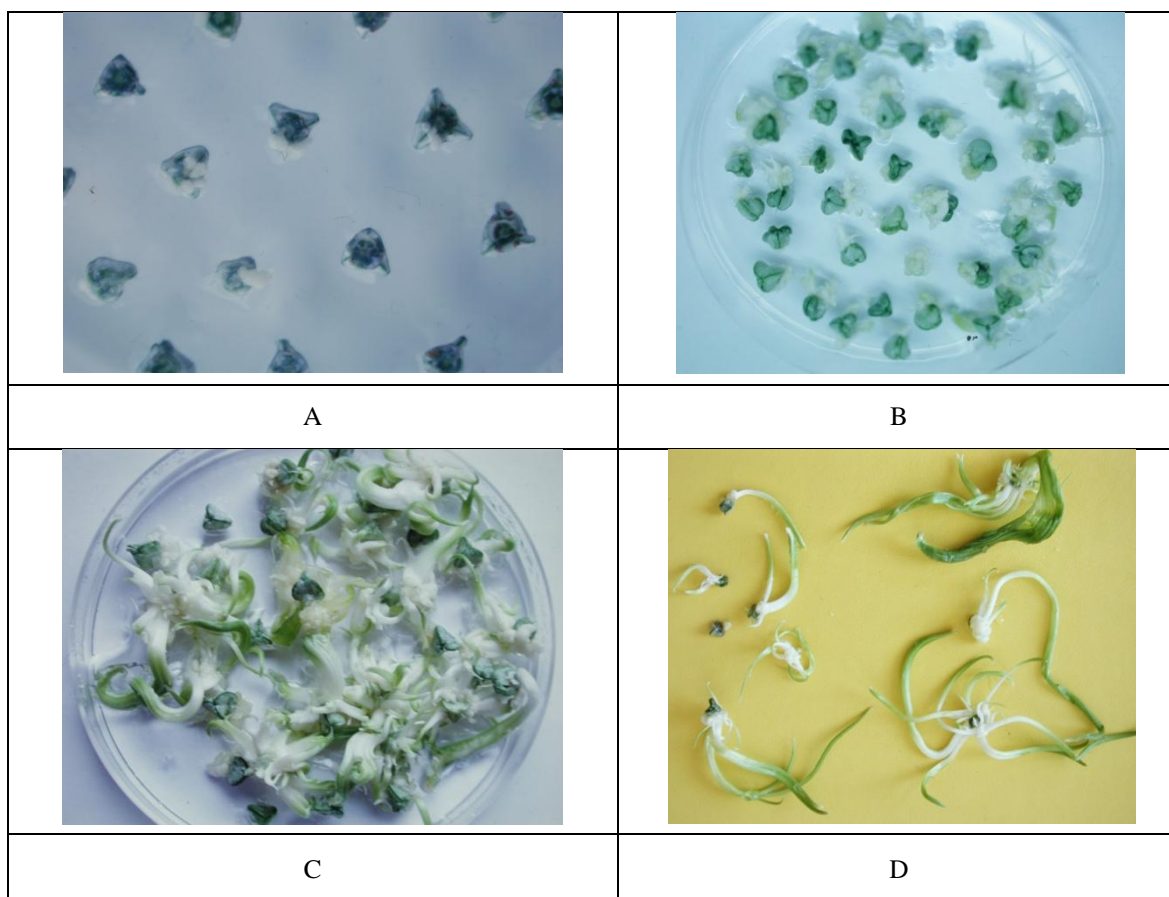
### 3.2.5 Statistična obdelava

Rezultate smo statistično obdelali s programom Statgraphics XV. Statistično značilne razlike pri vseh narejenih primerjavah različnih obravnavanj smo preverili z enosmerno analizo variance ('One-Way' ANOVA) in razlike potrdili z Duncan-ovim testom mnogoterih primerjav pri 5 % stopnji tveganja, ki izraža skladnost dobljenih podatkov z zastavljeno ničelno hipotezo. Če je bila vrednost  $p \leq 0,05$  smo ničelno hipotezo zavrnili, če je bila vrednost  $p \geq 0,05$  pa smo ničelno hipotezo obdržali. Statistično značilnost smo označili z zvezdico (\*) in statistično značilne razlike z različnimi črkami (a,b,c,...).

## 4 REZULTATI

Pri obeh delih naloge smo po šestih tednih razvoja izsečkov na diferenciacijskem gojišču zbrali podatke nastalih organogenih struktur in poganjkov ter preverili prisotnost hiperhidracije.

Po približno 30 dneh po subkultivaciji na diferenciacijsko gojišče so se pojavile prve vidne organogene strukture na bazi plodnic. Te strukture so imele v začetni fazi embriogen videz in so bile popolnoma bele barve (slika 3A). V nadaljnjem tednu oziroma tednih so se globularne strukture povečale in začeli so nastajati poganjki (slika 3B), ki so se hitro večali in postajali zeleni (slika 3C). Povprečni nastali skupek je bil ob koncu gojenja na diferenciacijskem gojišču sestavljen iz 3-5 izdolženih poganjkov in preostalega kompaktnega tkiva. V nobenem primeru se ni tvorilo kalusno tkivo (slika 3D). Povprečni nastali skupek je bil ob koncu gojenja na diferenciacijskem gojišču sestavljen iz 3-5 izdolženih poganjkov in preostalega kompaktnega tkiva.



Slika 3: Nastanek organogenih struktur in poganjkov pri čebuli: A –indukcija organogenih struktur na bazi plodnic; B –nastanek poganjkov; C – poganjki dolgi do 5cm; D – skupki poganjkov po 40 dneh razvoja v diferenciacijskem gojišču

#### 4.1 VPLIV IZREZA PLODNICE IZ ODPRTEGA CVETA NA ORGANOGENEZO

V prvem delu naloge smo iz indukcijskega na diferenciacijsko gojišče prestavili: 1) cele odprte cvetove, 2) izrezane cele plodnice in 3) izrezan zgornji del plodnice. Namen prvega dela naloge je bil ugotoviti, kje na cvetu oziroma plodnici je organogen center, kjer nastajajo organogene strukture.

Preglednica 4: Vpliv izreza plodnice iz odprtega cveta po indukciji na organogeno odzivnost

Način razreza odprtega cveta 'Belokranjka'	Št. cvetov oz. izrezanih plodnic	Cvetovi oz. plodnice z organogenimi skupki			Hiperhidracija skupkov	
		število	odstotek	s.z.	število	odstotek
cel cvet	191	54	28,7	a	15	27,8
cela plodnica	185	47	25,4	a	12	25,5
pol. plodnice	177	2	1,3	b	1	50,0

Kot je razvidno iz preglednice 4 je bil način oz. postopek, pri katerem smo v drugi, diferenciacijski fazi regeneracije, uporabili zgornje polovice plodnic, neuspešen. Od 177 inokuliranih zgornjih polovic plodnic sta bili le 2 organogeno odzivni. Dosti večji uspeh smo dobili pri ostalih dveh načinih, in sicer 28,7 % regenerativno uspešnost pri uporabi celega cveta in 25,4 % pri uporabi cele plodnice. Med tema obravnavama ni bilo statistično značilnih razlik v nastanku organogenih skupkov. S tem smo tudi potrdili hipotezo, da obstaja razlika v organogeni odzivnosti glede na izrez plodnice iz cveta.

Delež hiperhidriranih skupkov je bil pri obeh primerih okoli četrtnine, kar je primerljivo z rezultati iz drugega dela naloge.



Slika 4: Delna hiperhidracija poganjka

#### 4.2 VPLIV GENOTIPA TER VRSTE IN KONCENTRACIJE SLADKORJEV V GOJIŠČU NA ORGANOGENEZO

Pri genotipu 'Holandska rumena' sta od 750 inokuliranih cvetov le 2 tvorila poganjke, kar je samo 0,26 %. Na ostalih uporabljenih gojiščih niso nastali organogeni skupki. Zaradi splošne neodzivnosti na vseh uporabljenih gojiščih smo genotip 'Holandska rumena' izločili iz vseh nadaljnjih statističnih analiz.

V drugem delu naloge smo statistično obdelali vse tri opazovane dejavnike:

- tri preostale genotipe ( "križanec F1", 'Belokranjka' in 'Ptujška rdeča'),
- tri sladkorje (saharoza, maltoza, glukoza),
- dve koncentraciji vsakega sladkorja.

Preglednica 5: Analiza variance za genotip, vrsto in koncentracijo sladkorjev vključenih v poskus indukcije organogenih struktur

Vir variabilnosti	VKO	SP	SKO	F-vrednost	p-vrednost
A:genotip	1638,41	2	819,21	3,58	0,0324 *
B:ponovitev	852,91	5	170,58	0,75	0,5920
C:sladkor	1673,97	2	836,98	3,66	0,0301 *
D:koncentracija	64,70	1	64,70	0,28	0,5965
Ostanek	18774,50	82	228,96		
Skupaj	23004,50	92			

Med genotipi čebule vključenimi v poskus indukcije organogenih struktur obstajajo statistično značilne razlike ( $p = 0,0324$ ) v regeneracijski odzivnosti. Prav tako obstajajo značilne razlike ( $p = 0,0301$ ) v regeneracijski odzivnosti med uporabljenimi sladkorji. Med različnima koncentracijama sladkorjev ni značilnih razlik, prav tako ni razlik med ponovitvami (preglednica 5).

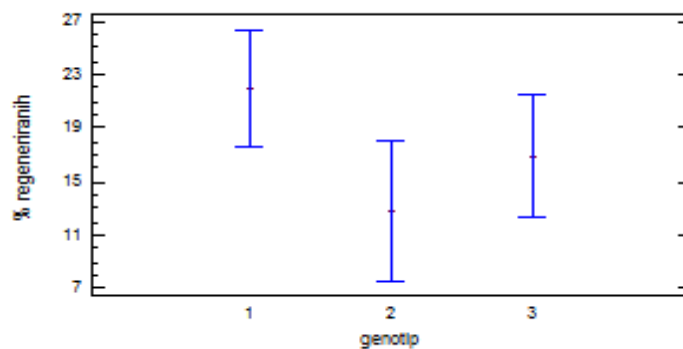
Preglednica 6: Duncan-ov test razlik v povprečnem številu nastalih organogenih struktur pri treh genotipih čebule

Genotip	Organogen odziv (%)	Homogene skupine
"križanec F1"	21,9	a
'Ptujška rdeča'	16,9	ab
'Belokranjka'	12,7	b

V povprečju je bila največja odzivnost pri "križancu F1" (21,9 %), vendar se statistično značilno ni razlikovala od sorte 'Ptujška rdeča' z 16,9 % odzivnostjo. Najslabše je bil z



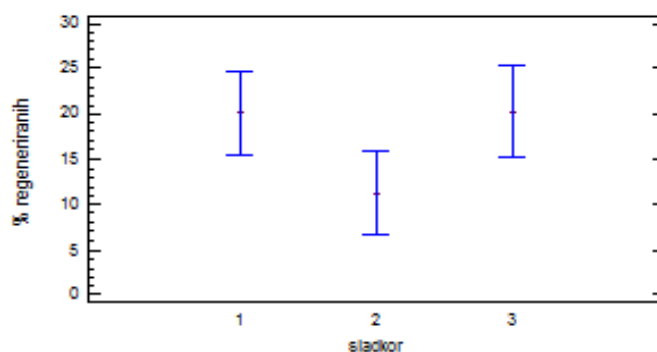
12,7 % odziven genotip 'Belokranjka', ki se je statistično značilno ( $p = 0,0324$ ) razlikoval od "križanca F1" (preglednica 6 in slika 5).



Slika 5: Povprečno število nastalih organogenih struktur z mejami zaupanja pri treh genotipih čebule  
 1 = "križanec F1", 2 = 'Belokranjka' 3 = 'Ptujaska rdeča'

Preglednica 7: Duncan-ov test razlik v povprečnem številu nastalih organogenih struktur glede na dodan sladkor v gojišču

Sladkor	Organogen odziv (%)	Homogene skupine
glukoza	20,2	a
saharoza	20,1	a
maltoza	11,3	b



Slika 6: Povprečno število nastalih organogenih struktur z mejami zaupanja glede na dodan sladkor v gojišču  
 1 = saharoza, 2 = maltoza, 3 = glukoza

Pri glukozi in saharozi smo dobili statistično značilno identični rezultat ( $p = 0,0301$ ), odzivnost plodnic je bila približno 20 %, Medtem ko je bila regeneracija plodnic na gojišču z maltozo statistično značilno slabša, 11,3 % (preglednica 7 in slika 6).

V nadaljnji analizi smo primerjali vpliv gojišča na organogeno odzivnost in hiperhidracijo pri posameznih genotipih čebule. Zanimalo nas je, katera od kombinacij sladkorja in njegove koncentracije je najboljša pri vsakem od treh genotipov.

#### 4.2.1 Vpliv kombinacije gojišč na organogenezo pri "križancu F1"

Kot najboljši sladkor pri "križancu F1" se je pokazala glukoza, saj smo pri obeh koncentracijah, 26 in 52 g/l, dosegli zelo dobro odzivnost. Daleč največji uspeh je bil pri uporabi večje koncentracije omenjenega sladkorja, in sicer 46,2 %, kar je za 64 % boljše od saharoze koncentracije 100 g/l. Razlika je bila tudi statistično značilna. Najslabša odzivnost je bila pri uporabi maltoze. Glukoza obeh koncentracij je imela pri tem genotipu tudi najmanjšo hiperhidracijo (12,5 % in 7,4 %), kar daje gojišču z glukozo (I5 – D5 in I6 – D6) pri tem genotipu še dodatno prednost pred ostalimi sladkorji (preglednica 8).

Preglednica 8: Vpliv kombinacije indukcijskega in diferenciacijskega gojišča na nastanek organogenih struktur in hiperhidracijo pri "križancu F1"

Genotip	Gojišče	Št. izoliranih ovarijev	Ovariji, ki so tvorili organogene skupke			Odstotek hiperhidriranih skupkov	
			število	odstotek	s.z.	število	odstotek
"križanec F1"	I1 – D1	177	34	19,2	b	6	16,0
	I2 – D2	145	41	28,2	a	12	29,3
	I3 – D3	180	29	16,1	b	6	16,0
	I4 – D4	177	17	9,6	b	7	41,1
	I5 – D5	174	40	23,0	a	5	12,5
	I6 – D6	145	67	46,2	c	4	7,4
povprečje				19,87			20,38

#### 4.2.2 Vpliv kombinacije gojišč na organogenezo pri 'Belokranjka'

Za najbolj uspešen sladkor v gojišču se je pri genotipu 'Belokranjka' izkazala saharoza. Z 18,2 % uspešnostjo pri manjši (50 g/l) ter 15,3 % pri visoki (100 g/l) koncentraciji je bila občutno boljše od ostalih uporabljenih sladkorjev, kar je bilo videti tudi statistično značilno. Pri glukozi smo dobili skoraj 50 % slabše rezultate, pri maltozi pa okoli 65 %. Hiperhidracija je bila največja pri gojiščih s saharozo (I1 – D1 in I2 – D2), najmanjša pa pri maltozi z manjšo koncentracijo (I3 – D3).

Preglednica 9: Vpliv kombinacije indukcijskega in diferencijskega gojišča na nastanek organogenih struktur in hiperhidracijo pri 'Belokranjka'

Genotip	Gojišče	Št. izoliranih ovarijev	Ovariji, ki so tvorili organogene skupke			Odstotek hiperhidriranih skupkov	
			število	odstotek	s.z.	število	odstotek
'Belokranjka'	I1 – D1	154	28	18,2	a	7	25,0
	I2 – D2	150	23	15,3	b	8	34,8
	I3 – D3	138	11	8,0	b	1	9,1
	I4 – D4	126	5	4,0	c	1	20,0
	I5 – D5	119	12	10,1	b	2	16,6
	I6 – D6	121	9	7,4	b	1	11,1
povprečje				10,50			19,43

#### 4.2.3 Vpliv kombinacije gojišč na organogenezo pri 'Ptujška rdeča'

Pri sorti Ptujška rdeča se noben od uporabljenih sladkorjev ni izkazal za superiornega. Tako smo pri vseh treh sladkorjih, ponekod pri manjši, drugje pa pri večji koncentraciji, kot najboljše dobili podobne, statistično ne dovolj različne rezultate, da bi lahko trdili, da je uporaba nekega sladkorja z določeno koncentracijo boljša od drugih. Najboljši trije rezultati, ki so bili tudi v svojem statističnem razredu, so bili: saharoza večje koncentracije (22,6 %), maltoza manjše koncentracije (21,3 %) ter glukoza manjše koncentracije (25,2 %), ki je, ob upoštevanju najnižjega deleža hiperhidracije (10,3 %) med omenjenimi tremi, najboljša izbira pri tem genotipu. Ob tem velja še omeniti, da je smo pri tej kombinaciji zaznali tudi nadpovprečno hitro rast poganjkov in to v vseh petrijevkah. Medtem ko so pri ostalih sladkorjih pri tej sorti poganjki v šestih tednih zrastle v povprečju 3-5 cm, je bila v tem primeru dolžina poganjkov tudi do 15 cm (slika 7).

Preglednica 10: Vpliv kombinacije indukcijskega in diferencijskega gojišča na nastanek organogenih struktur in hiperhidracijo pri 'Ptujška rdeča'

Genotip	Gojišče	Št. izoliranih ovarijev	Ovariji, ki so tvorili organogene skupke			Odstotek hiperhidriranih skupkov	
			število	odstotek	s.z.	število	odstotek
'Ptujška rdeča'	I1 – D1	173	27	15,6	a	3	11,1
	I2 – D2	181	41	22,6	b	10	24,4
	I3 – D3	155	33	21,3	b	5	15,1
	I4 – D4	177	10	5,6	c	0	0,0
	I5 – D5	155	40	25,2	b	4	10,3
	I6 – D6	121	7	5,7	c	0	0,0
povprečje				16,0			19,87



Slika 7: Primerjava rasti poganjkov 'Ptujске rdeče' na gojišču s saharozo (levo) in glukozo (desno)

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Gojišče je pri *in vitro* kulturah sestavljeno iz številnih elementov, kot so anorganske sestavine, vitamini, sladkorji, rastni hormoni, ipd. Spreminjanje sestave, koncentracije ali celo proizvajalca posameznih sestavin gojišča lahko vpliva na rast in razvoj. Zato je raziskav in možnosti spreminjanja gojišča veliko.

Metoda neposredne somatske organogeneze, ki sta jo razvila Luthar in Bohanec (1999) je rezultat vse večjih potreb po razvoju neposredne, brezkalusne metode mikropropagacije čebule, predvsem potreb po pridobivanju materiala za genske transformacije. Omenjeno metodo smo poskušali optimizirati in sicer z uporabo različnih sladkorjev v gojišču ter z različno pripravo izsečkov.

#### 5.1.1 Optimizacija metode z različnimi načini razreza cveta

Iz pridobljenih rezultatov, skoraj ničnem uspehu ob uporabi zgornjih polovic plodnic in izenačenemu uspehu pri celih plodnicah in celih cvetovih, se poraja sklep, da je glavno regeneracijsko mesto pri čebulnem cvetu v bazalnem (spodnjem) delu plodnice. Čeprav smo pri tem delu naloge uporabili samo sorto 'Belokranjka', bi z uporabo ostalih genotipov najverjetneje dosegli podoben neuspeh, glede na to, da smo s to sorto pri ostalih načinih razreza dobili dober organogen odziv. Predvidevamo, da slab organogen odziv pri uporabi polovic plodnic ni odvisen od genotipa.

Najverjetneje je bila 1,3 % organogeneza pri uporabi zgornjih polovic plodnic povzročena s prevelikim odrezom plodnice, pri čemer je bil odrezan tudi del spodnjega dela plodnice, ki omogoča organogen odziv.

Statistično značilno izenačen uspeh smo dobili pri ostalih dveh metodah, in sicer 28,7 % regenerativno uspešnost pri uporabi celega cveta in 25,4 % pri uporabi cele plodnice, kar je primerljivo z rezultati Lutharjeve in Bohanca (1999).

S tem smo tudi potrdili hipotezo, da obstaja razlika v organogeni odzivnosti glede na razrez cveta, ki smo jo postavili pred začetkom naloge.

Pri prestavljanju cvetov iz indukcijskega gojišča na diferenciacijsko se lahko uporabijo celi cvetovi in ne samo odrezane plodnice, vendar je treba upoštevati dejstvo, da je bil delež hiperhidriranih poganjkov nekoliko večji pri postopku s celimi cvetovi (27,8 %) glede na

postopek s celimi plodnicami (25,5 %). Vsekakor pa ne smemo predstavljati samo zgornje polovice plodnic, ker ne bomo dobili zelenega organogenega odziva.

### 5.1.2 Optimizacija metode z uporabo različnih sladkorjev v gojišču

V nalogi smo ugotovili, da je metoda neposredne somatske organogeneze uspešna tudi ob uporabi drugih sladkorjev v gojišču, ne samo uveljavljene saharoze. V nalogi smo uporabili saharozo v koncentraciji 50 in 100 g/l ter maltozo in glukozo ekvimolarnih koncentracij. Pri vseh testiranih genotipih razen pri sorti 'Holandska rumena' smo dobili organogen odziv. Vzrokov za neuspeh pri tej sorti je lahko več, poleg genetskega vpliva je možen tudi slab material (čebulice), neustrezno gojenje rastlin, ipd. Podoben neuspešen primer je bil zabeležen tudi pri metodi Lutharjeve in Bohanca (1999), kjer inbridirana linija 'MSU8155B' ni dajala skoraj nikakršnega organogenega odziva, čeprav je bil možen vzrok za neuspeh, da so rastline te linije cvetele 3 tedne kasneje kot druge in so lahko bile temperature in ostali okoljski dejavniki v rastlinjaku neustrezni.

Ugotovili smo da obstajajo statistično značilne razlike med genotipi glede na uspešnost organogeneze, saj je bil "križanec F1" (21,97 %) statistično značilno boljši od sorte 'Belokranjka' (12,75 %), medtem ko so bili rezultati pri sorti 'Ptujška rdeča' (16,94 %) med obema omenjenima. S tem smo potrdili hipotezo da obstajajo statistično značilne razlike med vsemi izbranimi genotipi.

Do podobnih sklepov smo prišli pri obravnavi sladkorjev v gojišču in njihovih koncentracij. Najboljše rezultate smo dobili pri saharozi (20,1 %) in glukozi (20,2 %) med katerima ni bilo statistično značilnih razlik. Maltoza se je izkazala kot najslabši sladkor (11,3 %) in je bila statistično značilno slabša od preostalih dveh. Hipoteza, da obstajajo statistično značilne razlike med sladkorji na uspeh organogeneze se je izkazala za pravilno.

Metoda ponuja veliko regeneracijsko uspešnost; v povprečju je 20 % izsečkov (cvetov) tvorilo okoli 2–5 poganjkov. Ob predpostavki da čebulna rastlina tvori do 5 socvetij in je na vsakem od 200 do 600 cvetov, lahko v eni sezoni dobimo med 500 in 1000 poganjkov. Ta rezultat je občutno boljši kot pri metodi, ki sta jo uporabila Pike in Yoo (1990), ki jima je uspela 11 % indukcija cvetov na katerih je nastalo povprečno 5 poganjkov ter pri metodi Mohamed-Yasseena in sod. (1993), katerim je uspelo izzvati do 42 poganjkov na socvetje.

Rezultati pri saharozi in glukozi so variirali med 15,6 in 28,2 % (saharosa) in nekoliko bolj - med 5,7 in 46,2 % (glukoza), kar je primerljivo z rezultati Lutharjeve in Bohanca (1999),

ki sta pri enakem gojišču kot v našem poskusu ter saharozi koncentracije 50 g/l dobila rezultate med 14,6 in 57,9 %.

Med koncentracijami sladkorjev ni bilo statistično značilnih razlik. Hipotezo da obstajajo statistično značilne razlike med koncentracijami sladkorjev v gojišču smo s tem ovrgli.

Ugotovili smo, da je sladkor maltoza manj primeren za metodo, ker je dejal statistično značilne slabše rezultate od ostalih dveh sladkorjev pri vseh testiranih genotipih. Čeprav smo naredili raziskavo samo z tremi genotipi je maltoza najverjetneje na splošno manj primerna pri mikropropagaciji čebule.

Toliko bolj zanimiva je glukoza, ki se je izkazala kot zelo dober nadomestek saharoze - med njima ni bilo statistično značilnih razlik. Ob tem je pri dveh genotipih dala najboljše rezultate in tudi najboljši celokupni rezultat: 46,2 % pri "križancu F1", ki je močno izstopal glede na povprečje. Opažena je bila tudi močna pospešitev rasti in izdolževanja poganjkov na diferenciacijskem gojišču predvsem pri sorti 'Ptujaska rdeča', ki je 3-krat preseгла rast poganjkov v primerjavi z ostalima dvema sladkorjema. To dejstvo bi veljalo še posebej upoštevati, če bi hoteli v nadaljnjih postopkih vzgajati nove rastline iz nastalih poganjkov, ker bi nam lahko njena uporaba skrajšala celoten potek.

## 5.2 SKLEPI

Ugotovili smo, da med genotipi obstajajo statistično značilne razlike v odzivnosti organogenih struktur.

Najboljša odzivnost je bila pri "križancu F1", ki se je statistično značilno razlikovala od najslabše odzivnosti sorte 'Belokranjka'. Rezultati pri sorti 'Ptujaska rdeča' se statistično niso razlikovali od ostalih dveh genotipov.

Med sladkorji v gojišču ni bilo statistično značilnih razlik med saharozo in glukozo, maltoza pa je dejala statistično značilne slabše rezultate

Med koncentracijami sladkorjev v gojišču ni bilo statistično značilnih razlik, tako da ne moremo trditi, da bi na splošno večja ali nižja koncentracija vseh sladkorjev vplivala na rezultat.

Zaradi variabilnosti rezultatov med posameznimi genotipi in sladkorji se poraja sklep, da bi bilo potrebno vsak genotip obravnavati individualno za nadaljnjo optimizacijo.

V nadaljnja testiranja bi veljalo vključiti dodatne sladkorje (npr. fruktozo, ki je redkeje uporabljena v mikropropagacijskih metodah) z večjo variabilnostjo njihovih koncentracij.

Uspeh metode je odvisen od veliko dejavnikov in uporaba optimalnega sladkorja v gojišču v optimalni koncentraciji je samo en od njih, a kot kaže zelo pomemben.



## 6 POVZETEK

Namen poskusov, opisanih v diplomski nalogi, je bil optimizacija metode neposredne somatske organogeneze pri čebuli (*Allium cepa* L.), ki sta jo razvila Luthar in Bohanec (1999). Inokulirala sta cele zrele cvetne popke in plodnice ter opazovala njihov odziv na različne kombinacije in koncentracije rastnih regulatorjev, strjevalcev gojišča, hranil in vpliv genotipa. Razvoj je potekal v dveh fazah, indukcijski, kjer so bili v gojišče s hormonoma 2,4-D in BAP v koncentraciji 2 mg/l inokulirani sterilizirani čebulni cvetovi in diferenciacijski, kjer so bile po šestih dneh plodnice ali celi cvetovi prestavljeni na diferenciacijsko gojišče s hormonom TDZ (2 mg/l). Razvoj poganjkov na diferenciacijskih gojiščih smo spremljali šest tednov.

V naši nalogi smo poskušali optimizirati metodo na dva načina:

- a) z drugačno pripravo izsečkov v gojiščih
- b) z uporabo drugih sladkorjev v gojiščih

Poleg saharoze, uporabljene v originalnem poskusu (50 in 100 g/l) smo uporabili še maltozo in glukozo ekvimolarnih koncentracij.

Osnovno gojišče, indukcijsko in diferenciacijsko, je bilo sestavljeno iz BDS mešanice mikroelementov in vitaminov, 500 mg/l inozitola ter 200 mg/l prolina. Poleg tega so gojišča vsebovala in se razlikovala še v dodanih sladkorjih kot je opisano preglednici 3 ter hormone, tako kot je navedeno v preglednici 2.

V prvem delu naloge, kjer smo po indukciji prestavili na diferenciacijsko gojišče cele cvetove, pri bazi izrezane plodnice ali zgornje polovice plodnic smo dobili statistično značilno enake rezultate pri uporabi celega cveta (28,7 %) in cele plodnice (25,4 %), medtem ko smo pri uporabi zgornjih polovic plodnic dobili le 1,3 % odziv.

V drugem delu naloge, kjer smo testirali vpliv različnih sladkorjev in njihovih koncentracij, smo na diferenciacijsko gojišče prestavili le plodnice odrezane pri bazi, kar je bilo ugotovljeno kot optimalno v originalnem poskusu in potrjeno v prvem delu našega poskusa.

Za vhodni material v drugem delu naloge smo uporabili 4 genotipe čebule, 3 sorte: 'Belokranjka', 'Holandska rumena' ter 'Ptujška Rdeča' in "križanec F1" inbridiranih linij

B2371Cx B2923B. Sorta 'Holandska rumena' ni izkazala nikakršne organogene odzivnosti, zato smo jo izločili iz nadaljnega dela.

Pri proučevanju sladkorjev smo pri vseh šestih kombinacijah (trije sladkorji z dvema koncentracijama) dobili pri vseh ostalih genotipih organogen odziv. Med koncentracijami sladkorjev v gojišču ni bilo statistično značilnih razlik. Statistično podobne rezultate, primerljive z metodo Lutharjeve in Bohanca (1999), smo dobili pri saharozi (20,1 %) in glukozi (20,2 %), medtem ko je maltoza dajala slabše rezultate od obeh (11,3 %).

## 7 VIRI

- Bohanec B. 1992. Tehnike rastlinskih tkivnih kultur. Ljubljana BF, Oddelek za agronomijo, Center za rastlinsko biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin: 168 str.
- Bohanec, B., Jakše, M., Ihan, J., Javornik, B. 1995. Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants. *Plant Science*, 104: 215-224
- Brewster J. L. 2008. Onions and other vegetable alliums. Wallingford, CAB International: 454 str.
- Caligari P. D. S., Shohet S. 1993. Variability in somatic embryos. V: *Scedes: application of synthetic seeds to crop improvement*. Redenbaugh, K. (ur.), Boca Raton, CRC Press: 163-174
- Chun Y. W. 1993. Clonal propagation in non-aspen poplar hybrids. V: *Micropropagation of Woody Plants*. Ahuja, M. R. (ur). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 209-222
- Černe M. 1992. Čebulnice, čebula, česen, por, zimski luk, drobnjak, šalotka. Ljubljana. ČZP Kmečki glas: 61 str.
- Černe M., Kacjan-Maršič N. 2001. Čebulnice. *Sodobno kmetijstvo*, 34, 5: 202-206
- Debergh P., Aitken-Christie J., Cohen D., Grout B., Von Arnold S., Zimmerman R. 1992. Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. *Plant Cell, Tissue And Organ Culture*, 30: 135-140
- DeHertogh A. A., Le Nard M. 1993. *The physiology of flower bulbs*. Amsterdam, Elsevier: 811 str.
- Dunstan D.I., Short, K.C. 1977. Improved growth of tissue culture of onion, *Allium cepa* L. *Physiologia Plantarum*, 41,1: 70-72
- Dunstan D.I., Short K.C. 1979. Shoot production from the flower haed of *Allium cepa* L. *Scientia Horticulturae*, 10: 345-356
- Fujieda K., Matsuoka N., Fujita Y. 1979. Vegetative multiplication of onion, *Allium cepa* L., through tissue culture. *Japanese Society of Horticulture Science*, 48: 186-194
- Gomaa A. M., Abdel-Rahman E.A. 2011. A review on the materials used during the mummification process in ancient Egypt. *Mediterranean Archaeology and Archaeometry*, 11, 2: 129–150
- Hartmann H. T., Kester D. E., Davies, F.T., Geneve, L. R. 1997. *Plant propagation: Principles and Practices*. Sixth edition. Prentice Hall international: 928 str.

- History of Onions. National Onion Association. 2011  
<https://www.onions-usa.org/all-about-onions/history-of-onions> (15. jul. 2016)
- Hussey G., Falavigna A. 1980. Origin and production of *in vitro* adventitious shoot in the onion, *Allium cepa* L. Journal of Experimental Botany, 31, 125: 1675-1686
- Hussey G. 1978. *In vitro* propagation of the onion *Allium cepa* by axillary and adventitious shoot proliferation. Scientia Horticulturae, 9: 227-236
- James D. J., Passey A. J., Barbara D. J., Bevan M. 1989. Genetic transformation of apple (*Malus pumila* Mill.) using a disarmed Ti-binary vector. Plant Cell Reports, 7: 658-661
- Jelaska S. (1994). Kultura biljnih stanica i tkiva. Zagreb, Školska knjiga: 441 str.
- Kacjan - Maršič N., Ugrinović K. 2001. Čebula. Sodobno kmetijstvo, 34, 5: 211-214
- Kahane R., Rancillac M., Teyssendier B. 1992. Long-term multiplication of onion (*Allium cepa* L.) by cyclic shoot regeneration *in vitro*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 28: 281-288
- Lumsden, P. J., Nicholas, J. R., Davies, W. J. 1994. Physiology, growth and development of plants in culture. The Netherlands, Kluwer Academic publishers: 427 str.
- Luthar Z., Bohanec B. 1999. Induction of direct somatic organogenesis in onion (*Allium cepa* L.) using a two step flower or ovary culture. Plant Cell Reports, 18: 797-802
- Major Food And Agricultural Commodities And Producers – Countries By Commodity. 2012.  
<http://faostat.fao.org> (15. jul. 2016)
- Matsubara S. Hihara H. 1978. Onion bulblet regeneration on receptacles *in vivo* and *in vitro*. Japanese Society of Horticulture Science, 46: 479-486
- Mohamed-Yasseen Y., Splittstoesser W. E., Litz R. E. 1993. *In vitro* bulb formation and plant recovery from onion inflorescences. HortScience, 28: 1052
- Mohamed-Yasseen Y. Splittstoesser W. E., Litz R. E. 1994. *In vitro* shoot proliferation and production of sets from garlic and shallot. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 36: 243-247
- Murashige T. Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15, 3: 473-497
- Phillips G. C., Luteyn K. J. 1983. Effects of picloram and other auxins on onion tissue cultures. Journal American Society of Horticulture Science, 108: 948-953

Pierik R. L. M. 1987. *In Vitro* Culture of Higher Plants. The Netherlands, Kluwer Academic publishers: 346 str.

Pike L. M., Yoo K. S. 1990. A tissue culture technique for the clonal propagation of onion using immature flower buds. *Scientia Horticulturae*, 45: 31-36

Sreelatha, U., Nair, S. R., Rajmohan, K. 1998. Factors affecting somatic organogenesis from leaf explants of *Anthurium* species. *Jurnal of Ornamental Horticulture*, 6, 1: 48-54

Struik P. C., Jones L. 1991. *Biotechnological Improvements in Crop Production*. Butterworth-Heinemann publishers: 376 str.

Thorpe T. A. 1994. Morphogenesis and regeneration. V: *Plant cell and tissue culture*. Vasil I. K., Thorpe T. A. (ur.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 17-36

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se vsem, ki so mi pomagali pri izvedbi diplomske naloge, predvsem pa:

- Borutu Bohancu, za predlog diplomske naloge in mentorstvo,
- Zlati Luthar, za pomoč pri laboratorijskem delu in predvsem za nasvete pri pisanju ter požrtvovalnost pri zaključevanju naloge,
- Kaji Klun, za lektorske nasvete.