

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Mitja ŠIMONKA

**IZOLACIJA MIKROSPOR ČEBULE (*Allium cepa* L.)  
IN PREVERJANJE MOŽNOSTI ZORENJA *in vitro***

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Mitja ŠIMONKA

**IZOLACIJA MIKROSPOR ČEBULE (*Allium cepa* L.) IN  
PREVERJANJE MOŽNOSTI ZORENJA *in vitro***

DIPLOMSKO DELO  
Visokošolski strokovni študij

**ISOLATION OF ONION (*Allium cepa* L.) MICROSPORES AND  
VALIDATION FOR *in vitro* GERMINATION**

GRADUATION THESIS  
Higher professional studies

Ljubljana, 2014

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

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Boruta Bohanca, za delovno mentorico pa dr. Jano Murovec.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc BATIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

Članici: dr. Jana MUROVEC  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Mitja Šimonka

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Vs
- DK UDK 635.25:57.085.2:581.33(043.2)
- KG Čebula/*Allium cepa*/mikrospore/pelod/izolacija/kalitev/zorenje/*in vitro* metode/kaljivost peloda
- KK AGRIS F30
- AV ŠIMONKA, Mitja
- SA BOHANEC, Borut (mentor)/MUROVEC, Jana (somentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- LI 2014
- IN IZOLACIJA MIKROSPOR ČEBULE (*Allium cepa* L.) IN PREVERJANJE MOŽNOSTI ZORENJA *in vitro*
- TD Diplomsko delo (visokošolski strokovni študij)
- OP IX, 29 str., 4 pregl., 11 sl., 32 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Namen dela je bil vzpostavitev učinkovitega postopka izolacije mikrospor čebule, ne da bi jih poškodovali, ter odkritje primernih postopkov določanja optimalne razvojne faze (t. j. enocelične) in živosti peloda ob izolaciji in med gojenjem *in vitro*. Z nalogo smo še želeli ugotoviti, ali je pri čebuli mogoče izzvati *in vitro* dozorevanje peloda. Sprva smo preizkusili načine določanja razvojne stopnje in živosti peloda z uporabo različnih barvil ter vzpostavili povezavo med stopnjami razvoja in velikostjo popkov. Izolacijo enoceličnih mikrospor smo izvedli v brezprašnih komorah po razkuževanju popkov z 1,6 % raztopino dikloroizocianurne kisline in trikratnim spiranjem s sterilno bidestilirano vodo. Možnost *in vitro* zorenja enojedrnih mikrospor smo preverili s kulturo izoliranih mikrospor v sterilnih razmerah na gojiščih različnih sestav. Opisani rezultati omogočajo zorenje mikrospor čebule od enocelične razvojne faze do zrelega peloda na gojišču BKK. Najboljše rezultate kalitve svežega peloda sta dali metodi visečih kapljic in metoda trdega gojišča z dodanim agarjem. Kaljivost zrelega peloda na tekočem gojišču močno pospešimo s stresanjem petrijevih plošč na stresalniku.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Vs
- DC UDC 635.25:57.085.2:581.33(043.2)
- CX Onion/*Allium cepa*/microspores/pollen/isolation/germination/*in vitro* maturation
- CC AGRIS F30
- AU ŠIMONKA, Mitja
- AA BOHANEČ, Borut (supervisor)/MUROVEC, Jana (co-supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
- PY 2014
- TI ISOLATION OF ONION (*Allium cepa* L.) MICROSPORES AND VALIDATION FOR *in vitro* GERMINATION
- DT Graduation Thesis (Higher professional studies)
- NO IX, 29 p., 4 tab., 11 fig., 32 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The aim of the project was to establish an efficient protocol for the isolation of onion (*Allium cepa* L.) microspores (haploid male spores). We developed the procedures for the determination of the correct stages of development during onion pollen *in vitro* culture. We wished to explore the possibility of the induction of the onion *in vitro* pollen maturation. Using different cellular dyes we tested the stages of the pollen development and viability and we established the correlation between the stages of the pollen development and the size of the flower buds. For the isolation of the uninucleate microspores, the flower buds were disinfected with 1.6 % dichloroisocyanuric acid followed by washing with water. The maturation of the haploid microspores was performed in sterile conditions using maturation media with different compositions. This would facilitate the analysis of the correct media (BKK) for the onion microspore maturation from the single cell phase to the mature pollen. The highest germination rate of pollen was achieved by the hanging drop method or by using the solid germination medium. Shaking the petri dishes on the shaker increased the germination of the mature pollen on liquid media.

## KAZALO VSEBINE

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>
<b>2 PREGLED OBJAV.....</b>	<b>2</b>
2.1 ZGODOVINA ČEBULE.....	2
2.2 ČEBULA V MEDICINI .....	2
2.3 TAKSONOMSKA UVRSTITEV ČEBULE .....	2
2.4 BIOLOGIJA ČEBULE .....	3
2.5 METODE ŽLAHTNJENJA RASTLIN.....	3
2.6 RAZVOJ PELODA .....	5
2.7 ŽIVOST PELODA .....	5
2.8 KALITEV ZRELEGA PELODA V <i>in vitro</i> RAZMERAH.....	6
2.9 ZORENJE PELODA V <i>in vitro</i> POGOJIH.....	6
<b>3 MATERIAL IN METODE.....</b>	<b>8</b>
3.1 MATERIAL.....	8
3.2 METODE DELA .....	8
<b>3.2.1 Priprava gojišč.....</b>	<b>8</b>
<b>3.2.2 Določanje razvojne stopnje mikrospor.....</b>	<b>9</b>
3.2.2.1 Barvanje jeder .....	9
3.2.2.2 Opazovanje oblik mikrospor.....	11

<b>3.2.3</b>	<b>Določanje živosti zrelega peloda in mikrospor z MTT .....</b>	<b>11</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Metode <i>in vitro</i> kalitve zrelega peloda .....</b>	<b>12</b>
3.2.4.1	Kalitev na objektnem stekelcu .....	12
3.2.4.2	Kalitev v suspenzijski kulturi .....	13
3.2.4.3	Kalitev v visečih kapljicah.....	13
3.2.4.4	Kalitev na trdem gojišču .....	14
<b>3.2.5</b>	<b>Dokazovanje kaljivosti na brazdi pestiča .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Metoda izolacije mikrospor čebule .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.7</b>	<b>Časovni potek razvoja peloda med <i>in vitro</i> zorenjem .....</b>	<b>15</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>16</b>
4.1	REZULTATI RAZISKAVE 2009.....	16
4.2	REZULTATI RAZISKAVE 2010.....	19
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI .....</b>	<b>23</b>
5.1	RAZPRAVA .....	23
5.2	SKLEPI.....	24
<b>6</b>	<b>POVZETEK.....</b>	<b>26</b>
<b>7</b>	<b>VIRI.....</b>	<b>27</b>
<b>ZAHVALA</b>		

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Rezultati raziskave 2009, hibridna čebula '70309', tekoče gojišče BKK pH 5,5.....	17
Preglednica 2: Rezultati raziskave 2009, hibridna čebula '70309', tekoče gojišče BKK pH 5,1.....	18
Preglednica 3: Rezultati raziskave 2010, čebula 'Belokranjka', tekoče gojišče BKK pH 5,5 brez dodatkov (28.5.2010), z dodano maltozo (1. 6. 2010) in s saharozo (4. 6. 2010) .....	21
Preglednica 4: Rezultati raziskave 2010, 'Ptujška rdeča' čebula, tekoče gojišče BKK pH 5,5 brez dodatkov (28.5.2010), z dodano maltozo (1. 6. 2010) in s saharozo (4. 6. 2010).....	22



## KAZALO SLIK

Slika 1: Socvetji čebule .....	8
Slika 2: Razvojne stopnje enostavnega kobula pri čebuli (Klein in Kozonek, 1999: 186)...	9
Slika 3: Kljunasto merilo za določanje velikosti popkov (Digitalni ..., 2014) .....	10
Slika 4: Obarvanje jeder: A - z acetokarminom; B - z DAPI pri 10-kratni povečavi; C - s PI pri 10-kratni povečavi.....	10
Slika 5: Razvojne stopnje: A - tetrada; B- enocelična mikrospora; C - dvocelična mikrospora .....	11
Slika 6: Določanje živosti zrelega peloda in mikrospor: A - obarvana jedra živega peloda; B - neobarvana jedra – mrtvih mikrospor.....	11
Slika 7: Nabiranje odprtih cvetov čebule .....	12
Slika 8: Metoda kalitve v visečih kapljicah.....	13
Slika 9: Kalitev peloda: A - uspešna kalitev peloda hibridne sorte '70309'; B - neuspešna kalitev peloda sorte 'Moravec' .....	16
Slika 10: Kaljivost peloda čebule na gojišču BKK z različnimi pH vrednostmi: A - pH 5,0; B - pH 5,5; C - pH 6,0; Č - pH 6,5; D - pH 7,0 .....	19
Slika 11: Uspešna kalitev peloda čebule po enourni inkubaciji na trdem gojišču .....	20

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

<b>BKK</b>	Gojišče, ki sta ga pripravila Brewbaker in Kwack (1963), Kosel (2009) pa ga je prilagodil.
<b>DAPI</b>	4',6'-diamidino-2-fenil indol
<b>PI</b>	propidijev jodid
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
<b>r.p.m.</b>	obrati na minuto
<b>TTC</b>	2,3,5-trifenil tetrazolijev klorid
<b>MES</b>	2-(N-morfolino) etansulfonska kislina

## 1 UVOD

Poskusi genskih transformacij čebule z doslej preizkušenimi metodami so se izkazali za manj uspešne, kar omejuje njihovo uporabo v žlahtnjiteljske namene. Optimiziran postopek *in vitro* zorenja mikrospor bi omogočal transformacijo mikrospor in kasnejše opravevanje z gensko spremenjenim pelodom. Namen dela je vzpostavitev učinkovitega postopka izolacije mikrospor, med katerim bi jih čim manj poškodovali, ter odkritje primernih postopkov določanja optimalne razvojne faze (t. j. enocelične) ob izolaciji in živosti peloda med gojenjem *in vitro*. Rezultati nam bodo omogočali preizkušanje gojišč za zorenje mikrospor čebule od enocelične razvojne faze do zrelega peloda. Cilj naloge je, da preučimo, ali je pri čebuli mogoče izzvati *in vitro* dozorevanje peloda.

Pri delu si bomo pomagali z drugimi raziskavami o *in vitro* zorenju in kalitvi peloda drugih rastlinskih vrst, saj objav o dozorevanju peloda čebule (*Allium cepa* L.) v *in vitro* razmerah nismo zasledili.

Za zorenje in kalitev peloda bomo uporabili prilagojeno gojišče BKK in mu dodajali hranila (saharoza, maltoza), s katerimi bomo poskušali doseči uspešno gojišče za zorenje mikrospor in kalitev peloda čebule v *in vitro* razmerah.

Prav tako bomo gojišču spreminjali pH vrednosti in spremljali odziv peloda in mikrospor v različnih pH gojiščih.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZGODOVINA ČEBULE

Čebula prihaja iz srednje Azije, Bližnjega vzhoda ter Sredozemlja. Je ena izmed najstarejših kulturnih rastlin (3.000 let). Kot rastlino za zdravljenje so jo poznali že stari Grki in Rimljani. Pri nas je poznana pod imeni luk, navadna čebula, črnelec, črljenec in žbulj (Osvald in Kogoj-Osvald, 2005).

### 2.2 ČEBULA V MEDICINI

Čebula ima veliko zdravilnih učinkov, kot so preprečevanje: srčnih obolenj, sladkorne bolezni (diabetes), osteoporoze, prehlada in drugih bolezni. Vsebuje kemijske komponente, ki imajo protivnetne, protiholesterolne, antirakotvorne in antioksidativne lastnosti. Veliko ljudi po svetu uporablja čebulo za zdravljenje žuljev, turov in bul. Ko čebulo prerežemo, se iz celic sprostijo encimi (aliinaze), razgradijo aminokislino in ustvarijo sulfenične kisline (RSOH). Ker je kislina nestabilna, razpade v plin imenovan sin-propanetial-S-oksidi. Ta plin kot aerosol pride v oko in reagira z vodo v očesu zaradi česar nastane razredčena raztopina žveplene kisline. Ker kislina draži živčne končiče v očesu, začne telo izločati solze, s katerimi razredči in spere dražečo snov (Čebula, 2013).

### 2.3 TAKSONOMSKA UVRSTITEV ČEBULE

Rod *Allium* je vrstno bogat in taksonomsko zapleten. 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 to družino spadajo številne rastline z značilno oblikovanimi založnimi organi v obliki čebulic, nepravih stebel ali rizomov. Običajno so to dve- ali večletne rastline. Družina lilijevk se deli v (Osvald in Kogoj-Osvald, 2005):

- čebulnice (Allioideae) in
- špargljevke (Asparagoideae).

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

1. razred: Liliopsida,
2. podrazred: Liliidae,

3. nadred: Liliianaee,
4. red: Amaryllidales,
5. družina: Alliaceae,
6. poddružina: Allioideae,
7. pleme: Allieae,
8. rod: *Allium*.

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

## 2.4 BIOLOGIJA ČEBULE

V skupino čebulnic spadajo samo zelenjadnice iz družine Alliaceae (lukovke). So enokaličnice in tujeprašnice. Značilna je protandrija; to pomeni, da pelod dozori, ko brazda še ni sprejemljiva za pelod (Jakše, 2002).

Čebula je dvoletna, fakultativno troletna rastlina. Sestavljena je iz adventivnih korenin, ki rastejo iz čebulnega krožca oz. skrajšanega stebela in nadomestijo glavno korenino. Le ta kmalu po vzniku propade. Po dveh do treh letih iz čebulice odženejo votla cvetna stebela (1–4), na katerih nastane enostaven kobil z več kot sto belimi cvetovi. Iz čebulnega krožca rastejo omeseneli listi, ki jih obdaja prozorna oz. nežno obarvana povrhnica. Celotno čebulico prekrivajo še suhi luskolisti, ki na vrhu preko čebulnega vratu prehajajo v zelene cevaste prave liste (Jakše, 2002).

Čebulice so različnih oblik: ovalne, okrogle in močno sploščene. Poznamo pekoče, polpekoče in sladke sorte z različno vsebnostjo sladkorja in eteričnih olj (Osvald in Kogoj-Osvald, 2005).

## 2.5 METODE ŽLAHTNJENJA RASTLIN

Večina metod za gensko spremembo vključuje stopnjo, pri kateri je potrebno regenerirati rastline iz spremenjenih celic ali tkiva. Uspešnost transformacije je močno odvisna od genotipa rastline. Skozi zgodovino so različni raziskovalci z gensko spremembo peloda ali pelodnih cevok pridelali transgene rastline.

Zrel pelod so transformirali z različnimi metodami (Kosel, 2009):

- z inkubacijo v raztopini z DNA,
- s kokultivacijo z bakterijo *Agrobacterium tumefaciens*,
- z elektroporacijo,
- z biolistiko.

Te metode so osnovane na domnevi, da se transgena DNA, ki pride v pelod, samodejno vstavi v genom in se ohranja s prenašanjem na potomce. Vendar zrel pelod vsebuje dve vrsti celic, vegetativne in generativne. Prve niso del genske linije, zato imajo samo transgeno DNA, ki bo vnešena v spermalni jedri, ki imata možnost prenosa v naslednjo generacijo. Generativna celica pa se deli še na dve spermalni celici.

Metoda transformacije moške zarodne linije je sestavljena iz treh korakov. V prvem koraku genetsko transformiramo enojedrne mikrospore s transgeno DNA, pri čemer v jedrno molekulo DNA vgradimo transgeni vključek. V drugem koraku transformirane enojedrne mikrospore gojimo dokler ne dozori do zrelih dvo- ali troceličnih pelodov. V tretjem koraku s transformiranimi zreli pelodi opravimo *in vivo* oprashi rastlin. Ko celotno seme dozori, odberemo transgeno seme. S to metodo se izognemo *in vitro* regeneraciji, ki omejuje možnosti genskega transformiranja številnih ekonomsko pomembnih rastlinskih kultur.

Naslednja prednost te metode je, da nam omogoča zelo hitro pridobivanje potrjenih transgenih rastlin. To je še posebej očitno v primeru transformacije tobaka. V tem primeru mikrospore *in vitro* dozori že v 6 dneh, do transgenega semena pa lahko pridemo že v 3–4 tednih. Nadaljnja selekcija transformiranih rastlin in končna pridobitev stabilne transgene semenske linije pa lahko traja še dodatne 2–3 tedne. Potemtakem lahko celoten postopek transformacije izvedemo v enem mesecu in pol. Številne študije so pokazale (Barinova in sod., 2004; Ylstra in sod., 1992), da je razvoj mikrospor tobaka močno odvisen od pH vrednosti gojišča. Touraev in sod. (2001) so ugotovili, da lahko embriogenetski razvoj mikrospor pospešimo z dodajanjem dušika in sladkorja gojišču.

Prednost je tudi v tem, ker med kratko *in vitro* maturacijo pretečeta manj kot dva celična cikla, v primerjavi z dalj trajajočimi *in vitro* regeneracijskimi postopki, katere velikokrat spremlja še nezaželena somaklonska variabilnost.

Četrta prednost transformacije enojedrnih mikrospor je v dejstvu, da vedno transformiramo le eno jedro in da po delitvah tega jedra postanejo vsa hčerinska jedra transformirana in je potem celotno tkivo zrelega peloda transformirano in genetsko uniformno. Na ta način se izognemo nezaželenemu pojavu himerizma. To je pojav, ko je rastlina (oz. rastlinski del) sestavljena iz dveh ali več genetsko različnih populacij celic in je glavni problem ter največja ovira pri običajnih metodah genske transformacije meristemov (Potrykus, 1991).

Dodatna prednost transformacije moške spolne linije je tudi v neodvisnem *in vitro* zorenju transformiranih mikrospor, ki so popolnoma izolirane ter ločene od moških spolnih organov in tkiv. Torej so v tako imenovani neodvisnosti od dedne mase rastlin. Pogoji *in vitro* zorenja mikrospor so takšni, da imitirajo normalni gametofitni razvoj, torej jih lahko uporabljamo pri vseh višje razvitih rastlinskih kulturah. Ker pa se pri metodi transformacije moške spolne linije zelo pogosto srečamo s številnimi tehničnimi problemi,

je ta metoda transformacije najprimernejša za tiste rastlinske kulture, ki v svojih cvetovih ali socvetjih tvorijo veliko število pelodov in semen.

Ta metoda nam omogoča neposredno opazovanje morfoloških, biofizioloških in biokemijskih sprememb, ki nastajajo med procesom *in vivo* zorenja peloda.

## 2.6 RAZVOJ PELODA

Razvoj peloda poteka v prašnicah, pri čemer se začne z delitvijo diploidnih sporofitnih celic. Tako nastanejo materinske celice peloda in pobudnice za nastanek tapetuma (notranje stene prašnice). Temu sledi dvakratna mejotična delitev materinskih celic in nastanek tetrad haploidnih celic. Po delovanju encima kalaze, ki se sintetizira v tapetumu, se celice znotraj tetrad sprostijo v enojedrne mikrospore (McCormick, 1993). Nastala mikrospora se začne pospešeno večati, na zunanji strani stene pa nastane eksina. Vmes se jedro mikrospore premika proti točki na obrobju celice, ki je nasproti pelodne pore. Med rastjo se manjše vakuole združujejo v eno. Ta pa pritiska citoplazmo ob steno nasproti pelodne pore, ker je volumen povečan (Bedinger, 1992). Ko mikrospora raste nekaj dni, se nesorazmerno mitotično deli, ob tem nastane dvocelično pelodno zrno iz dveh celic, to sta večja vegetativna in manjša generativna, ki se nahaja znotraj prve. Temu sledi razvlažitev peloda (ustrezna je 40–58 % vlažnost), nato se sprosti pelod iz prašnice. Sledi ponovna navlažitev peloda po medsebojnem vplivanju z brazdo pestiča ter kalitev skozi pelodno poro in pestični vrat do semenske zasnove (Bedinger, 1992).

## 2.7 ŽIVOST PELODA

Živost peloda lahko preverjamo s številnimi postopki, najpogosteje z metodami obarvanja. Z metodo obarvanja ugotavljamo živost peloda na osnovi prepustnosti membrane, vendar z njo ni mogoče potrditi kalivosti peloda ali zrelosti mikrospor. Za določanja živosti uporabljamo različna barvila, ki so uporabna na raznovrstnih rastlinah. Metode, ki temeljijo na prepustnosti membrane so največkrat odvisne od pronicanja barvila v notranjost peloda.

Najpogosteje se barva z laktofenol anilin modrim (Hayman, 1956), z redoks indikatorjem TTC (2,3,5-trifenil tetrazolijev klorid) (Stanley in Linskens, 1974), s trifenilmetanom "Anilin modrim" (Smith-Huerta in Vasek, 1984) in s fluorescein-diacetatom v kombinaciji s propidijevim jodidom (FDA-PI) (Heslop-Harrison in Heslop-Harrison, 1970). Anilin modro se uporablja za odkrivanje prisotnosti polisaharida kaloze v pelodni steni ali pelodni cevki. Pelod obarvamo s TTC in MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid), ki je odvisen od aktivnosti encima dehidrogenaze. Fluorescein diacetat pa se uporablja za določanje aktivnosti encima esteraze ter ugotavljanje poškodovanosti

plazmatske membrane. Z jodom določamo količine nakopičenega škroba (Wang in sod., 2004). Izbira metod za ugotavljanje živosti peloda je večinoma odvisna od rastlinske vrste ali letine, saj vsako barvilo ni enako uspešno za vse rastlinske vrste. Zato je potrebno poskusiti barvanje z različnimi barvili in tako določiti, kateri najbolj ustreza določeni rastlinski vrsti.

## 2.8 KALITEV ZRELEGA PELODA V *in vitro* RAZMERAH

Poznamo več metod za *in vitro* kalitev zrelega peloda. Nekatere izmed teh so: kalitev z uporabo kulture v visečih kapljicah, kalitev v suspenziji pelodnih zrn in pa kalitev na trdni površini gojišča dopolnjenega z agarjem (ali drugim strjevalcem gojišča). Metodo kalitve v visečih kapljicah lahko uporabljamo samo v primerih, ko uporabljamo majhne koncentracije peloda v gojišču. Torej ta metoda ni najbolj primerna za biokemijske in fiziološke raziskave (Burke in sod., 2004). Številni dejavniki vplivajo na kalitev in razvoj pelodne cevke. Nekateri od teh dejavnikov so: jakost osvetlitve, relativna vlaga, temperatura in sestava gojišča. Različne razmere vplivajo na živost peloda in pelodna zrna, ki pripadajo različnim vrstam rastlin in so prilagojena na specifične okoljske razmere. Torej je za uspešno *in vitro* kalitev peloda posamezne vrste potrebno preučiti vse okoljske razmere in jih prilagoditi tej vrsti rastline.

Gojišče, ki ga uporabljamo za kalitev, mora nadomestiti spremembe, ki nastanejo med *in vitro* in naravnim okoljem, kakršne so na brazdi. Brewbaker in Kwack (1963) sta ustvarila gojišče, ki ga danes široko uporabljajo pri poskusih *in vitro* kalitve, saj ga je mogoče uporabiti pri več kot 86 rastlinskih vrstah (Jayaprakash in Sarla, 2001). Gojišče se imenuje BK gojišče. Sestavljeno je iz saharoze,  $H_3BO_3$ ,  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  in  $KNO_3$ . Za prehranjevanje peloda in uravnavanje osmotskega stanja je pomembna saharoza (Shivanna in Johri, 1985), katere optimalen delež v gojišču je 20 %, koncentracija manjša od 20 % je neučinkovita, večja koncentracija saharoze (30 % ali več) pa je škodljiva, ker zavira rast pelodne cevke in povzroči propad pelodnega zrna (Lee in sod., 1985).

Kosel (2009) je BK gojišče prilagodil tako, da je dodal 500 mg /L MES (2-(N-morfolino) etansulfonska kislina), saharozo pa je zamenjal z enakim odstotkom glukoze in maltoze.

## 2.9 ZORENJE PELODA V *in vitro* RAZMERAH

Za uspešno *in vitro* zorenje mikrospor do zrelega peloda sposobnega uspešne kalitve in razvoja pelodne cevke, moramo uravnati sestavine gojišča in okoljske dejavnike, od katerih sta najpomembnejša temperatura in relativna vlaga. Zelo pogosto so optimizirane razmere inkubacije za *in vitro* kalitev peloda podobne tistim razmeram, ki omogočajo tudi uspešno zorenje mikrospor iste rastlinske kulture. V najslabšem primeru optimizirane



razmere za kalitev peloda vsaj ne omejujejo ali ne preprečujejo procesa zorenja mikrospor. Prav zaradi teh razlogov, najpogosteje poskušamo najprej optimizirati gojišče in okoljske razmere za *in vitro* kalitev peloda (zrelega), šele nato se lotimo optimizacije okoljskih razmer in gojišča za *in vitro* zorenje mikrospor. Poskusi *in vitro* kalitve zrelega peloda običajno trajajo od nekaj minut pa do enega dneva. Poskusi *in vitro* zorenja mikrospor pa lahko trajajo od enega do več tednov. Torej so predhodni poskusi *in vitro* kalitve zrelega peloda za optimizacijo okoljskih razmer smiselni, saj lahko hitreje pridobimo podatke o odstotku kaljivosti zrelih pelodov v primerjavi s podatki o deležu dozorelih mikrospor na katere lahko čakamo bistveno dalj časa. Ne glede na to, da pogoji za *in vitro* kalitev peloda po večini ustrezajo razmeram za *in vitro* zorenje mikrospor, pa je potrebno gojišče za zorenje mikrospor dopolniti s pomembnimi hranili, kot so na primer dušik (laktalbumin hidrolizat), aminokislina (glutamin, prolin), ogljikovi hidrati (saharoza, maltoza), vitamini (pripravljeni po White, 1963), nukleozidi (uridin, citidin) in minerali (soli pripravljene po Murashige in Skoog, 1962). To velja predvsem zaradi dolgotrajnejšega postopka zorenja mikrospor. Najbolj pogosto uporabljen sladkor za *in vitro* zorenje mikrospor je saharoza (Touraev in Heberle-Bors, 1999).

Mikrospore določenih vrst, kot so navadni odolin (Barinova in sod., 2002), ječmen (Scott in Lyne, 1994) in kitajska vijolična kreša (Zhao in sod., 2007) ne morejo uspevati na gojišču, ki vsebuje saharozo saj odmrejo kmalu po tem ko jih izoliramo iz prašnic.

*In vitro* zorenje mikrospor do zrelega peloda lahko spremljamo na različne načine, in sicer s štetjem jeder peloda, ki jih predhodno obarvamo s posebnimi barvili, z merjenjem premera peloda in z merjenjem količine škroba, ki se je nakopičil v pelodu (Clement in sod., 1996). Uspešnost zorenja mikrospor določamo na dva načina. Pri prvem načinu testiramo sposobnost kalitve dozorelih mikrospor oziroma zrelih pelodov, pri drugem pa s posebnimi barvili določamo njihovo živost.

Stopnjo zrelosti peloda lahko določimo s pomočjo opazovanja delitve jedra in migracije jeder znotraj peloda, s pomočjo merjenja velikosti peloda ali pa z merjenjem količine škroba, ki se v pelodu akumulira tekom zorenja peloda.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

Rastlinski material, uporabljen pri raziskavah, smo pridobili iz čebul (*Allium cepa* L.), ki so bile vzgojene v rastlinjakih Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Pri poskusih *in vitro* zorenja mikrospor smo uporabili zaprte cvetove. Leta 2009 smo uporabili hibrid '70309' in sorto 'Moravec'. Popke smo nabirali konec junija ter začetek julija in so bili v razvojni fazi tik pred odprtjem. Leta 2010 smo uporabili čebuli sorte 'Belokranjka' in 'Ptujška rdeča'. Popke smo nabirali konec maja in začetek junija in so bili v razvojni fazi tik pred odprtjem.



Slika 1: Socvetji čebule

#### 3.2 METODE DELA

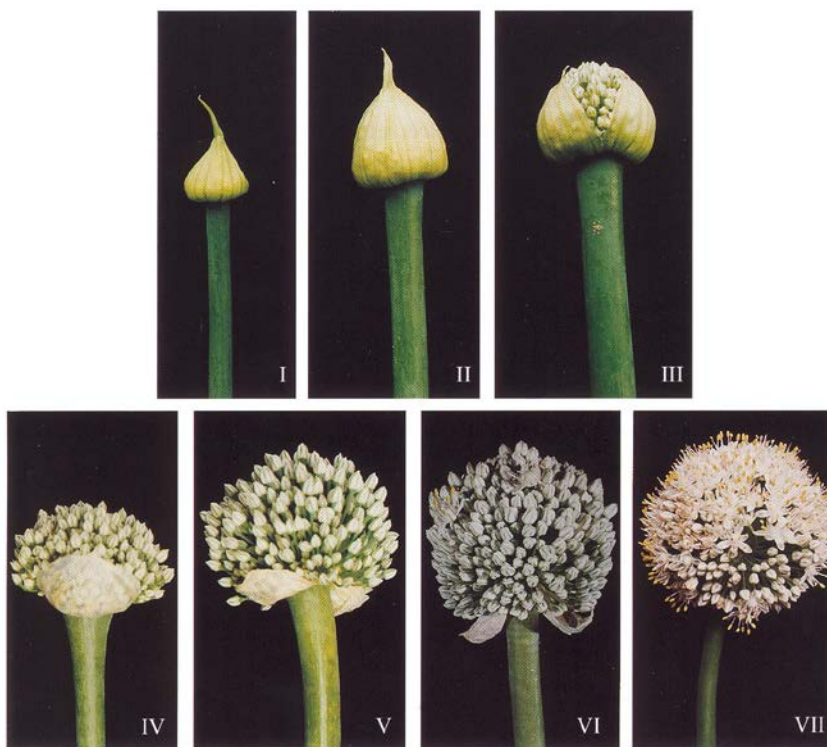
##### 3.2.1 Priprava gojišč

Za ugotavljanje kaljivosti peloda smo uporabili trdo gojišče z agarjem ali tekoče gojišče BKK (Brewbaker – Kwack) s pH 5,1 in pH 5,5 v letu 2009, leta 2010 pa s pH 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0. Vsa BKK gojišča, ki smo jih uporabljali za izolacijo mikrospor čebule, pa so bila tekoča s pH 5,1 in 5,5.

BKK gojišče smo pripravili v 100 ml ali pa v 250 ml posodice (odvisno od števila zrelih popkov) iz predhodno pripravljenih založnih raztopin, bidestilirane vode in sladkorja. Dodatki kot so glutamin, uridin in citidin so bili ločeno stehtani na precizni tehtnici. pH vrednost gojišča smo merili z elektronskim pH metrom in jo naravnali na želeno vrednost z dodajanjem 1 N HCl ali 1 N NaOH. Gojišča smo sterilizirali s sterilnim filtrskim vakuumskim sistemom (pore velikosti 0,2  $\mu\text{m}$ ) v komori za sterilno delo in jih hranili v hladilniku pri 4 °C.

### 3.2.2 Določanje razvojne stopnje mikrospor

Razvojno stopnjo mikrospor smo določili z razvrščanjem popkov po velikosti, barvanjem jeder in opazovanjem oblike mikrospor (tetrade, enojedrne in dvojedrne) pod mikroskopom. Ugotavljali smo, v katerih popkih (velikostni razred) se nahajajo mikrospore v zgodnji enojedrni fazi (eno jedro v sredini), katere smo kasneje uporabljali za poskuse *in vitro* zorenja mikrospor.



Slika 2: Razvojne stopnje enostavnega kobula pri čebuli (Klein in Kozonek, 1999: 186)

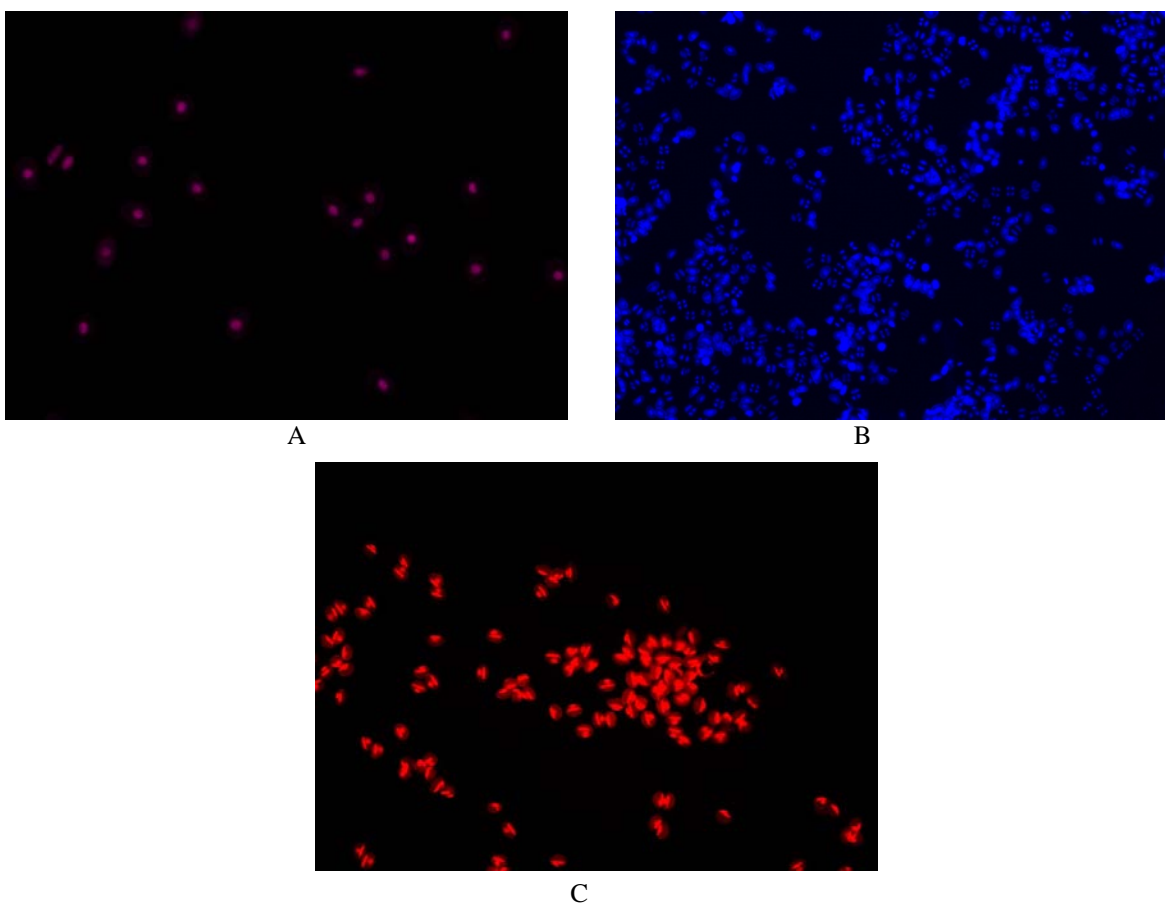
#### 3.2.2.1 Barvanje jeder

Sprva smo nabirali socvetja različnih razvojnih stopenj (slika 2), ki so imela različno velike popke. Odtrganim popkom smo s kljunastim merilom izmerili velikost in jih na podlagi tega razvrstili v razrede od najmanjših do največjih. Nato smo iz posameznih razredov odvzeli 15–30 popkov in pripravili mikroskopski preparat. Manjše popke smo s skalpelom, ki je bil čist in steriliziran za vsak posamezen preparat, razrezali v kapljici barvila na objektnem stekelcu, pri večjih popkih pa smo pod stereomikroskopom s pomočjo igel in pincete izolirali prašnice in jih prav tako razrezali v kapljici barvila. Za tem smo odstranili vse (očesu) vidne ostanke rastlinskega tkiva v kapljici ter s kapalko dodali še nekaj kapljic barvila. Tako pripravljene preparate smo pokrili s krovnim stekelcem.



Slika 3: Kljunasto merilo za določanje velikosti popkov (Digitalni ..., 2014)

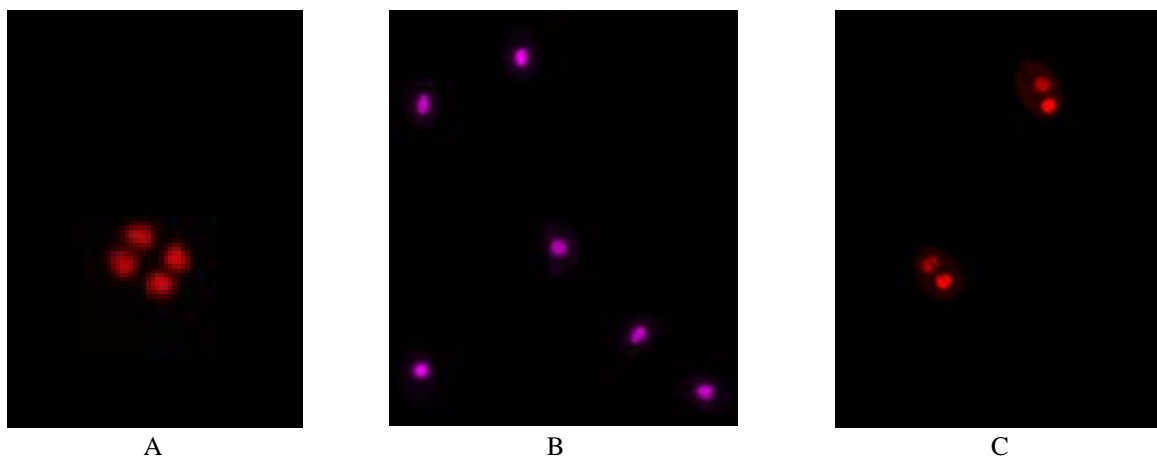
Jedra smo barvali z acetokarminom, z DAPI (4,6 diamidin-2-fenilindol) in s PI (propidijev jodid). Kadar smo barvali z acetokarminom, tj. nefluorescenčna tehnika, smo preparate opazovali z navadno svetlobo pod mikroskopom. Jedra so se obarvala vinsko rdeče. Pri barvanju z DAPI (fluorescira svetlomodro) in s PI (fluorescira rdeče) pa smo za opazovanje preparatov potrebovali posebne svetlobne filtre. Pri barvanju z DAPI in PI smo morali biti zelo previdni, saj sta barvila kancerogeni. Vsa barvila in preparate smo shranjevali v temi na 4 °C.



Slika 4: Obarvanje jeder: A - z acetokarminom; B - z DAPI pri 10-kratni povečavi; C - s PI pri 10-kratni povečavi

### 3.2.2.2 Opazovanje oblik mikrospor

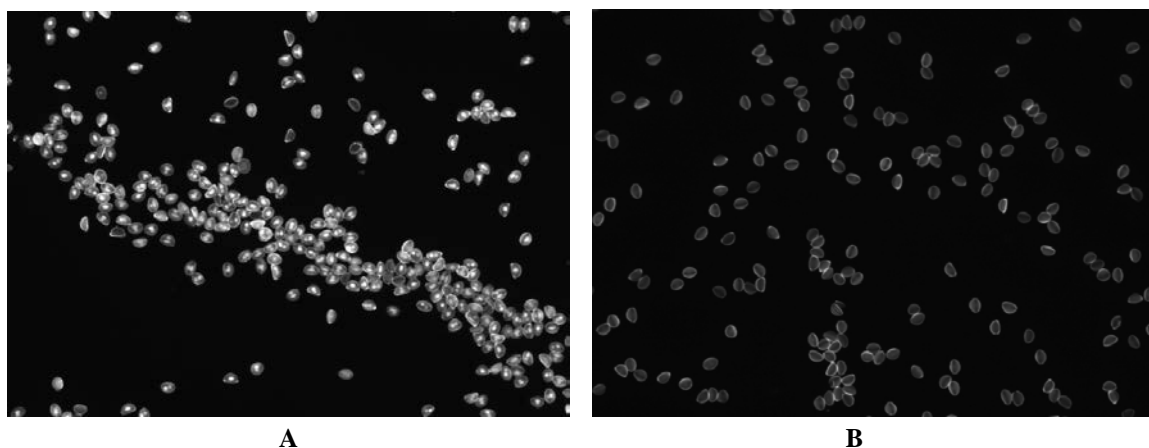
Na koncu smo z opazovanjem obarvanih jeder pod mikroskopom določili razvojno stopnjo mikrospor.



Slika 5: Razvojne stopnje: A - tetrada; B- enocelična mikrospora; C - dvočelična mikrospora

### 3.2.3 Določanje živosti zrelega peloda in mikrospor z MTT

Živost zrelega peloda in mikrospor smo ugotavljali hkrati z določanjem razvojne stopnje mikrospor, in sicer z obarvanjem jeder. Jedra smo obarvali z MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid), saj je postopek hitrejši, ne fluorescira (za opazovanje preparatov uporabimo navadno svetlobo brez uporabe filtrov) in je zdravju manj škodljiv kot ostale metode. Če se le ta niso obarvala in so ostala temna, je pomenilo, da je bila mikrospora mrtva in neuporabna za nadaljnje raziskovanje.



Slika 6: Določanje živosti zrelega peloda in mikrospor: A - obarvana jedra živega peloda; B - neobarvana jedra – mrtvih mikrospor

### 3.2.4 Metode *in vitro* kalitve zrelega peloda

Za poskuse smo vedno uporabili samo svež pelod ter sveže mikropore, ker smo želeli ugotoviti, kolikšen je okvirni odstotek peloda, ki je v določenem mikroskopskem preparatu sposoben kaliti ali zoreti na začetku *in vitro* poskusa.

Za preizkušanje *in vitro* kalitve zrelega peloda smo uporabili svež pelod iz odprtih cvetov socvetja čebule, katerega smo nabrali v dopoldanskem času. Iz nesterilnih cvetov smo jemali pelod za vzorce, saj nam zaradi hitre inkubacije ni bilo potrebno izvajati poskuse sterilno.



Slika 7: Nabiranje odprtih cvetov čebule

V letu 2009 smo uporabili dve osnovni metodi za kalitev peloda. Ti metodi sta kalitev na objektnem stekelcu ter kalitev v suspenzijski kulturi. Pri poskusih kalitve na objektnem stekelcu smo želeli opazovati kalitev peloda po krajši inkubaciji (po največ 1 uri) in kako hitro se pelod odziva. Pri poskusih kalitve v suspenzijski kulturi pa smo želeli opazovati kalitev peloda po daljši inkubaciji (največ 1 dan), ugotoviti dolžine pelodnih cevok, ter ugotoviti, kako vpliva gostota peloda in količina gojišča na kalitev.

#### 3.2.4.1 Kalitev na objektnem stekelcu

Pri metodi na objektnem stekelcu smo kanili kapljico gojišča na objektno stekelce ter vanjo pomočili 5–10 odprtih cvetov. Odprte cvetove smo tudi stresali nad kapljico gojišča z iglo, po tresenju pa odstranili vse vidne delce iz kapljice. Preden smo začeli 1 urno inkubacijo pri 23 °C smo dodali še 3–4 kapljice gojišča (da ni prišlo do izsušitve, po potrebi tudi med inkubacijo). Pelod smo inkubirali približno 24 ur v vlažnostni komori (kartonska škatla z vlažnimi papirnatimi brisačami na dnu in pokrita z aluminijasto folijo) v inkubatorju pri 23 °C. Nato smo preparat prekrili s krovnim stekelcem ter opazovali rezultate pod mikroskopom povezanim z digitalno kamero in računalnikom.

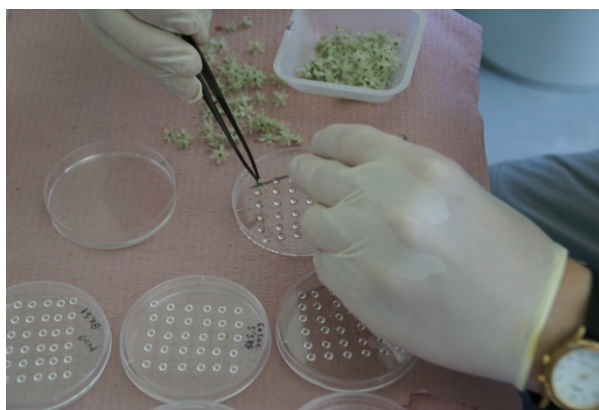
### 3.2.4.2 Kalitev v suspenzijski kulturi

Za to metodo smo na dno petrijeve plošče dali kapljico gojišča ter vanjo pomočili 15–20 odprtih cvetov. Cvetove smo pretresli z iglo, zatem smo iz kapljice gojišča odstranili vse večje delce, ter dodali še toliko kapljic gojišča, da je bilo dno petrijeve plošče prekrito z gojiščem. Zaprte petrijeve plošče smo ovili s parafilmom, da so tesnile. Več plošč skupaj pa smo zavili v aluminijasto folijo (v temi) in jih inkubirali 24 ur pri 24 °C v inkubatorju na stresalniku na nižjih obratih. Po pretečenem času smo petrijeve plošče neposredno opazovali pod mikroskopom.

Ker rezultati kalitve na objektnem stekelcu in v suspenzijski kulturi niso prinesli dobrih rezultatov, smo v letu 2010 poskusili še dve novi metodi kalitve. Tudi pripravo materiala smo v letu 2010 spremenili, saj je bilo očitno, da pelod obeh genotipov ni kalil. Tako smo cele popke sterilizirali in jih nato inokulirali na trdno gojišče, jih dali v rastno komoro in jih pustili nekaj dni, da so se cvetovi odprli. Ko se je to zgodilo, smo cvetove uporabili za novi metodi ugotavljanja kaljivosti. Hkrati pa smo za novi metodi dokazovanja kaljivosti uporabljali tudi svež pelod, ki pa ni bil steril.

### 3.2.4.3 Kalitev v visečih kapljicah

Prva je bila metoda visečih kapljic, kjer smo za vsako gojišče na dno dveh srednje velikih plastičnih petrijevk nalili vodo za ohranjanje vlage. Na pokrovčke smo nakapali 15 µl kapljice ustreznega gojišča z multikanalno pipeto. Na pokrovček je prišlo približno 30 kapljic. Pelod smo potresli po kapljicah z iglo. Nato smo s pokrovi s kapljicami prekrili spodnji del petrijevke, jih ovili s parafilmom in jih dali v škatle, ki smo pokrili z aluminijasto folijo ter dali najprej za eno uro na stresalnik na 23 °C, po pregledu pa še za 24 ur. Za kalitev smo poskusili gojišča BKK s pH 5,0, pH 5,5, pH 6,0, pH 6,5 in pH 7,0.



Slika 8: Metoda kalitve v visečih kapljicah

#### 3.2.4.4 Kalitev na trdem gojišču

Pri tej metodi smo uporabili trdo gojišče iz 15 % saharoze in 1 % agarja, po katerem smo z iglo potresali pelod. Vse preparate smo inkubirali v temi pri 23°C za eno uro, po pregledu pa še za 1 dan.

#### 3.2.5 Dokazovanje kaljivosti na brazdi pestiča

Kaljivost smo dokazovali tako, da smo 24 ur po opráševanju nabrali vratove pestičev in jih eno uro barvali v raztopini anilin modrega v fosfatnem pufri (1% anilin modro v 0,1 N Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Nato smo položili vratove pestičev na objektno steklo, jih prekriili s krovnim steklom, ter jih s topim predmetom sploščili. Tako pripravljene preparate smo si ogledali pod fluorescentnim mikroskopom z UV osvetlitvijo.

#### 3.2.6 Metoda izolacije mikrospor čebule

Za metodo izolacije mikrospor smo uporabljali samo zaprte cvetove velikostnih razredov od 2,5 mm do 4,5 mm, iz točno določenih socvetij čebule. Izolacije smo izvajala v sterilnih razmerah. Vso potrebno opremo za izvajanje poskusov smo pred uporabo pripravili v sterilnih razmerah in jih avtoklavirali (121 °C, 20 minut). Nekaj erlenmajericam smo dodali 50 ml bidestilirane vode preden smo jih pokrili z alufolijo in jih odnesli avtoklavirati. Vse postopke izolacije smo izvajali v sterilni komori, saj so mikrospore znotraj popka sterilne, z izolacijo v sterilnih razmerah pa lahko dosežemo več tednov trajajoče *in vitro* zorenje.

Najprej smo popke zložili na pladenj, saj smo za eno izolacijo potrebovali približno 50 popkov. V sterilno (sterilizirano) erlenmajerico s 50 ml bidestilirane vode smo dodali 0,83 g dikloroizocianurne kisline in počakali, da se je raztopina zbistrila. Po zbistritvi smo dodali popke ter magnet za mešanje in erlenmajerico spet pokrili s folijo. Pri tem smo pazili, da se popki niso dotaknili vratu erlenmajerice in so neposredno padli v raztopino. Vsebino smo nato mešali 10 minut na magnetnem mešalniku, na zmerni hitrosti, saj bi prevelika hitrost povzročila dvig tekočine in možno razlitje tekočine ter okužbo popkov. Po končanem mešanju smo raztopino odličali tako, da smo s sterilno pinceto zadržali vse popke. Popke smo nato še dvakrat sprali s sterilno bidestilirano vodo in jih zopet zadržali v erlenmajerici s sterilno pinceto. Ko smo zaključevali s tretjim spiranjem smo med mešanjem (da se popki nebi posedli) vso vsebino vlili skozi sterilno cedilce. Iz cedilca smo s sterilno pinceto odstranili magnet in pobrali popke, ter jih dali v srednje veliko sterilno PVC petrijevo ploščo. V petrijevo ploščo smo dodali malo (tekočega) gojišča za *in vitro* zorenje ter s sterilno britvico sesekljali popke dokler ni nastala zelena suspenzija. Paziti smo morali, da se nismo dotaknili roba plošče. Pokrito petrijevo ploščo smo 3 minute rahlo mešali po mizi ter po končanem mešanju vso vsebino hitro vlili čez sterilno cedilce v



sterilno stekleno čašo. Da smo dobili zeleno rjavo suspenzijo mikrospor v čašo, smo morali najprej dva do trikrat sprati cedilce z enakim gojiščem, nato smo polovico zeleno rjave suspenzije zlili v eno falkonko, drugo polovico pa v drugo falkonko (falkonke so bile sterilne, da se suspenzija ni okužila) ter s pipeto dodali toliko gojišča za *in vitro* zorenje, da je bil skupni volumen v falkonki 10 ml. Falkonke smo nato zaprli in jih centrifugirali (700 r.p.m., 5 min, 0 zaviranja). Ko smo končali centrifugiranje, smo s sterilno pipeto odstranili vso tekočino do peleta, nato smo dodali gojišče do meje 12 ml, falkonke smo zaprli in jih stresali, dokler pelet ni bil raztopljen. Malim sterilnim petrijevkam smo sterilno s pipetami dodali toliko suspenzije, da je bilo dno prekrito. Petrijevke smo pokrili in zatesnili s parafilom ter jih dali v kartonasto škatlo s pokrovom. Nato smo jih inkubirali v temi (v škatli) v inkubatorju na 24 °C na stresalniku (43 r.p.m.). Po 1 uri smo 3 petrijeve plošče z gojiščem BKK pregledali pod mikroskopom, da smo ugotovili in določili fazo razvoja peloda.

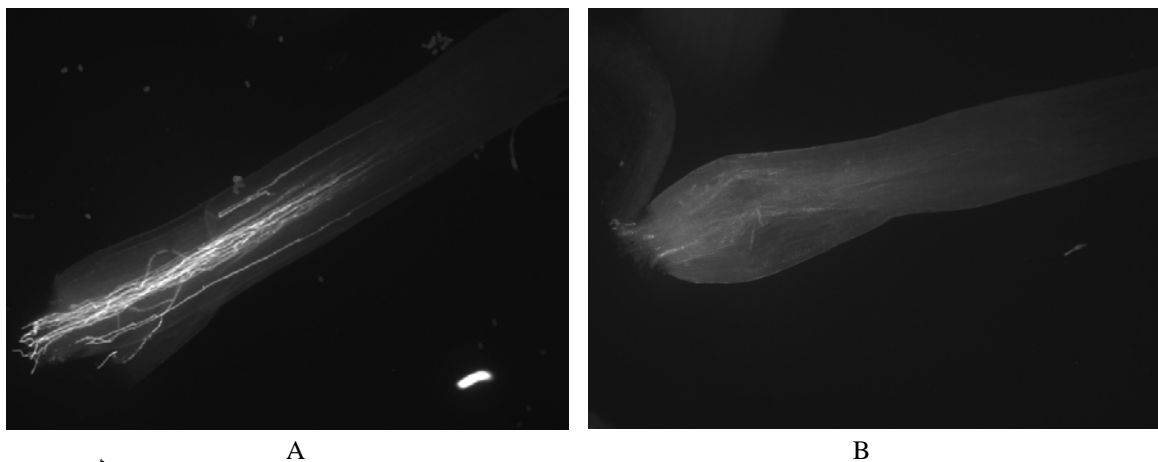
### **3.2.7 Časovni potek razvoja peloda med *in vitro* zorenjem**

Pri zadnjem poskusu *in vitro* zorenja mikrospor smo uporabili gojišče BKK s pH 5,1 in 5,5. Enojedrne mikropore smo preverjali z barvilom PI. Nekajkrat tedensko smo vzeli vzorce iz petrijevih plošč (z gojiščem BKK pH 5,1 in 5,5), ter jih pregledali pod mikroskopom in si rezultate vsakega pregleda zabeležili. Vsak preparat iz katerega smo jemali vzorce, smo obdelovali v brezprašni komori in s sterilnimi pipetami, da se vzorci niso okužili. Zanimalo nas je, kdaj nastopi eno- oz. do dvocelična razvojna stopnja ter kdaj nastopi kalitev dozorelega peloda tekom *in vitro* zorenja. Za izračun deleža določene razvojne stopnje smo vsakič pregledali vsaj 100 pelodnih zrn v vsakem preparatu. Po 5–20 dneh je bila inkubacija prekinjena z namenom, da smo neposredno pod mikroskopom na manjši povečavi (4x objektiv) pregledali petrijeve plošče. S tem smo določili le delež kalečih pelodnih zrn, ne pa tudi razvojne stopnje nekalečega peloda.

## 4 REZULTATI

### 4.1 REZULTATI RAZISKAVE 2009

Slika 9A prikazuje, kako pelodna cev vskaljenega peloda prodira po vratu pestiča, medtem ko je na sliki 9B razvidno, da kalitev peloda ni bila uspešna.



Slika 9: Kalitev peloda: A - uspešna kalitev peloda hibridne sorte '70309'; B - neuspešna kalitev peloda sorte 'Moravec'

Zaradi vzorčenja se nam je včasih zgodilo, da je bilo po parih dneh večje število manj razvitih mikrospor, kakor ob izolaciji. Takšen primer je razviden v preglednici 1, ko je bilo ob izolaciji 22.06.2009, 88,1 % enojedrnih mikrospor, po štirih dneh (26.06.2009) pa je bil delež prešteti enoceličnih mikrospor 100 %. Takim primerom bi se lahko izognili s pregledom večjega števila celic.

Uspešno dozorevanje mikrospor pa nam je uspelo pri izolaciji 24.06.2009, saj se je pri izolacijah iz vseh treh velikostnih razredov popkov pojavilo dozorevanje mikrospor v kulturi. Tako je v preglednici 1 prikazano, da je ob izolaciji iz 2,5–3 mm velikih popkov bil delež tetrad 66,7 %, po petih dneh pa je delež padel na 41,1 %. V istem času se je delež enoceličnih mikrospor povečal iz 27,4 % na 54,7 %, delež dvoceličnih mikrospor pa iz 5,9 % na 13,1 %. Ti rezultati dokazujejo, da so mikrospore hibridne čebule '70309' v tekočem gojišču BKK s pH 5,5 vsaj v nekaterih primerih dozorevale.

Iz rezultatov v preglednici 1 smo zaključili, da je stopnja razvitosti mikrospor poleg od velikosti popkov zelo odvisna tudi od časa pobiranja popkov, saj so bile v julijskih izolacijah pretežno dvocelične mikrospore, tako v velikostnem razredu 3–3,5 mm kot tudi v 3,5–4 mm razredu. V istih velikostnih razredih je bilo v junijskih izolacijah manj dvoceličnih in več enoceličnih mikrospor.

Šimonka M. Izolacija mikrospor čebule (*Allium cepa* L.) in preverjanje možnosti zorenja *in vitro*.  
Dipl delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za agronomijo, 2014

Preglednica 1: Rezultati raziskave 2009, hibridna čebula '70309', tekoče gojišče BKK pH 5,5

Velikost popkov (mm)		2,5-3				3-3,5				3,5-4			
Datum izolacije	Datum pregleda	Skupno število pregledanih celic	Delež tetrad (%)	Delež enoceličnih mikrospor (%)	Delež dvooceličnih mikrospor (%)	Skupno število pregledanih celic	Delež tetrad (%)	Delež enoceličnih mikrospor (%)	Delež dvooceličnih mikrospor (%)	Skupno število pregledanih celic	Delež tetrad (%)	Delež enoceličnih mikrospor (%)	Delež dvooceličnih mikrospor (%)
22.6.	22.6.	-	-	-	-	101	0,0	88,1	11,9	0	0,0	0,0	0,0
	26.6.	-	-	-	-	103	0,0	100,0	0,0	201	0,0	89,6	10,4
24.6.	24.6.	135	66,7	27,4	5,9	120	14,2	84,2	1,7	199	0,0	98,5	1,5
	29.6.	457	41,1	45,7	13,1	100	2,0	98,0	0,0	251	0,0	43,8	56,2
	22.9.	-	-	-	-	126	0,0	100,0	0,0	-	-	-	-
29.6.	13.7.	117	64,1	33,3	2,6	101	0,0	100,0	0,0	210	0,0	52,4	47,6
	22.9.	107	40,2	59,8	0,0	100	0,0	100,0	0,0	106	0,0	92,5	7,5
9.7.	10.7.	-	-	-	-	113	0,0	9,7	90,3	82	0,0	8,5	91,5
	13.7.	-	-	-	-	138	0,0	22,5	77,5	152	0,0	0,0	100,0
	14.7.	-	-	-	-	205	0,0	0,0	100,0	115	0,0	0,0	100,0
	20.7.	153	0,0	0,0	100,0	125	0,0	0,0	100,0	136	0,0	0,0	100,0
	23.7.	-	-	-	-	175	0,0	0,0	100,0	133	0,0	0,0	100,0
13.7.	14.7.	-	-	-	-	100	0,0	0,0	100,0	100	0,0	0,0	100,0
	20.7.	-	-	-	-	100	0,0	0,0	100,0	146	0,0	0,0	100,0
20.7.	20.7.	192	0,0	19,8	80,2	152	0,0	0,0	100,0	-	-	-	-
	23.7.	136	0,0	52,9	47,1	114	0,0	40,4	59,6	-	-	-	-
	22.9.	157	0,0	0,0	100,0	111	0,0	0,0	100,0	-	-	-	-

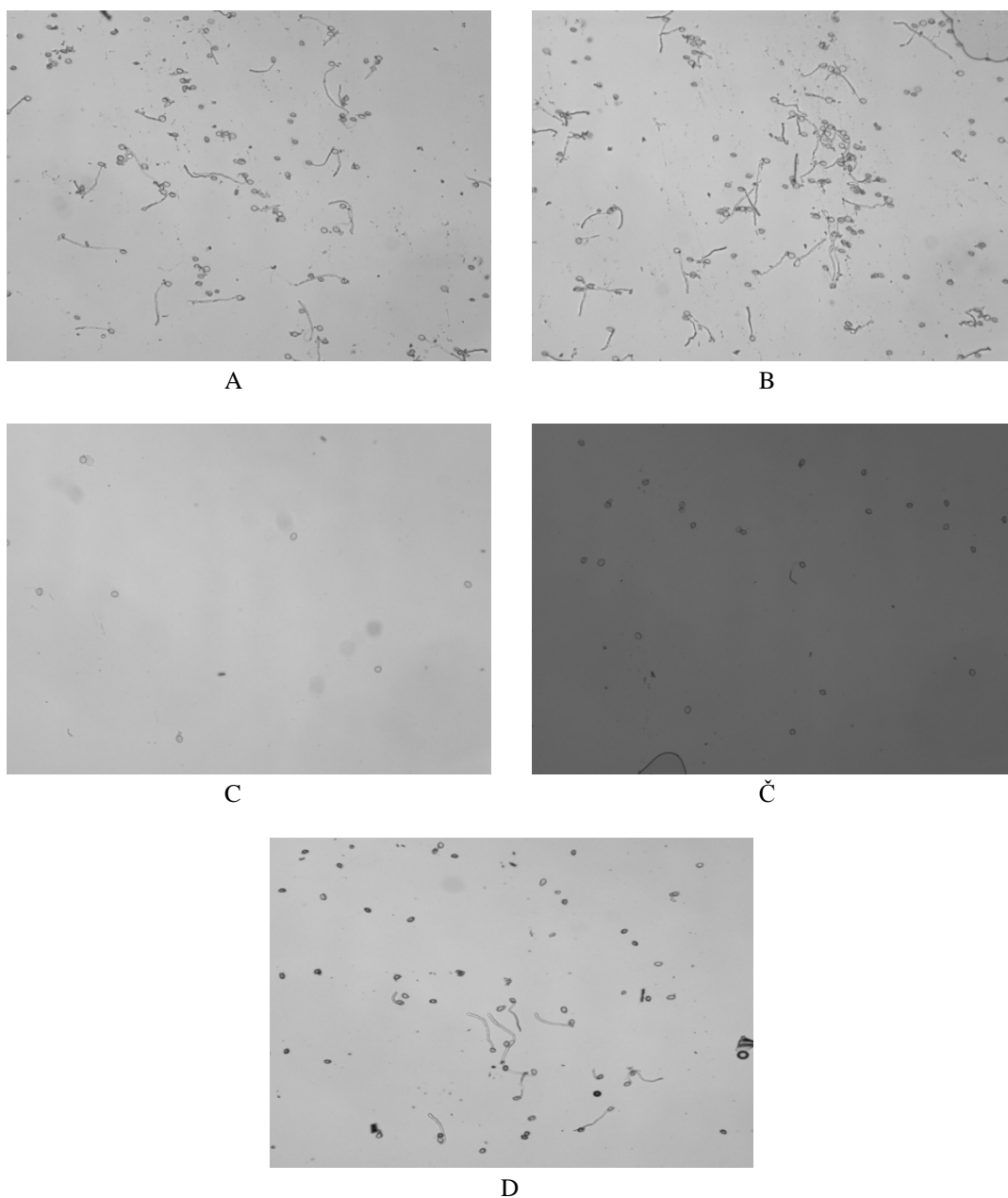
Preglednica 2: Rezultati raziskave 2009, hibridna čebula '70309', tekoče gojišče BKK pH 5,1

Velikost cvetnih popkov (mm)		3,5-4					4-4,5		
Datum izolacije	Datum pregleda	Skupno število pregledanih celic	Delež tetrad (%)	Delež enojedrnih mikrospor (%)	Delež dvojedrnih mikrospor (%)	Skupno število pregledanih celic	Delež tetrad (%)	Delež enojedrnih mikrospor (%)	Delež dvojedrnih mikrospor (%)
10.7.	13.7.	123	0	0	100,0	125	0	0	100,0
	14.7.	129	0	0	100,0	146	0	0	100,0
	20.7.	101	0	0	100,0	130	0	0	100,0
	23.7.	100	0	0	100,0	140	0	0	100,0

Tekoče gojišče BKK s pH 5,1 smo pri hibridni čebuli '70309' preizkusili samo pri eni izolaciji, in sicer pri izolaciji dne 10. 7. 2009. Ker so bile že ob izolaciji vse mikrospore v dvocelični fazi, dozorevanja nismo mogli spremljati, kar je razvidno iz preglednice 2.

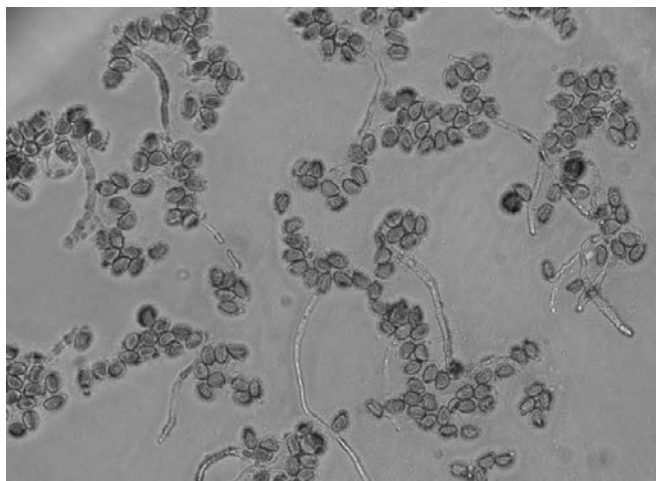
#### 4.2 REZULTATI RAZISKAVE 2010

V letu 2010 smo uporabili enako gojišče (BKK) kot leta 2009, le da smo ga pripravili z več različnimi vrednostmi pH-ja (5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0). Po končanem pregledu kalitve smo prišli do ugotovitve, da pelod najboljše kali na gojiščih BKK s pH 5,0, 5,5 in 7,0.



Slika 10: Kaljivost peloda čebule na gojišču BKK z različnimi pH vrednostmi: A - pH 5,0; B - pH 5,5; C - pH 6,0; Č - pH 6,5; D - pH 7,0

Ker rezultati kalitve na objektnem stekelcu in v suspenzijski kulturi niso prinesli dobrih rezultatov, smo v letu 2010 poskusili še dve novi metodi kalitve (kalitev na trdem gojišču in v visečih kapljicah). Rezultati so bili boljši kot leta 2009. Metoda visečih kapljic se je izkazala za najbolj uspešno, saj je bil tu delež kalečih pelodov največji. Ugotovili smo, da oba peloda, sterilni in nesterilni, uspešno kalita.



Slika 11: Uspešna kalitev peloda čebule po enourni inkubaciji na trdem gojišču

Ker se je v letu 2010 gojišče BKK s pH vrednostjo 5,5 izkazalo kot zelo ugodno za kalitev zrelega peloda, smo ga uporabili v nadaljnjih poskusih zorenja mikrospor. Tako smo izolirali mikrospore iz steriliziranih popkov različnih velikosti (2,5–3 mm, 3–3,5 mm, 3,5–4 mm) in jih poskušali zoreti v tekočem BKK gojišču s pH 5,5 z dodano saharozo ali maltozo. Pridobljeni rezultati zorenja mikrospor iz leta 2010 za sorto 'Belokranjka' so prikazani v preglednici 3, za sorto 'Ptujška rdeča' pa v preglednici 4.

Ker so se nam tudi pri izolacijah v tekočem gojišču BKK s pH 5,5 z ali brez dodatkov pojavili nezanesljivi rezultati (preglednici 3, 4), ne moremo zaključiti ali dodatek maltoze ali saharoze vpliva na dozorevanje mikrospor.

Nihanje deleža dvoceličnih mikrospor bi lahko razložili tudi s propadanjem starejših dvoceličnih mikrospor.

Preglednica 3: Rezultati raziskave 2010, čebula 'Belokranjka', tekoče gojišče BKK pH 5,5 brez dodatkov (28.5.2010), z dodano maltozo (1. 6. 2010) in s saharozo (4. 6. 2010)

Velikost popkov (mm)		3-3,5				3,5-4				4-4,5			
Datum izolacije	Datum pregleda	Skupno število pregledanih celic	Delež tetrad (%)	Delež enoceličnih mikrospor (%)	Delež dvoceličnih mikrospor (%)	Skupno število pregledanih celic	Delež tetrad (%)	Delež enoceličnih mikrospor (%)	Delež dvoceličnih mikrospor (%)	Skupno število pregledanih celic	Delež tetrad (%)	Delež enoceličnih mikrospor (%)	Delež dvoceličnih mikrospor (%)
28.5.	1.6.	100	0,0	100,0	0,0	297	0,0	87,2	12,8	-	-	-	-
	4.6.	505	0,0	90,5	9,5	285	0,0	90,9	9,1	-	-	-	-
	11.6.	153	0,0	97,4	2,6	246	0,0	98,0	2,0	-	-	-	-
	16.6.	168	0,0	52,4	47,6	215	0,0	95,3	4,7	-	-	-	-
1.6.	1.6.	-	-	-	-	371	0,0	90,6	9,4	279	0,0	83,2	16,8
	4.6.	-	-	-	-	380	0,0	31,6	68,4	674	0,0	43,0	57,0
	11.6.	-	-	-	-	478	0,0	58,6	41,4	202	0,0	27,2	72,8
	16.6.	-	-	-	-	290	0,0	82,8	17,2	381	0,0	66,9	33,1
4.6.	4.6.	292	0,0	66,1	33,9	680	0,0	84,0	16,0	368	0,0	92,1	7,9
	11.6.	631	0,0	75,3	24,7	356	0,0	65,2	34,8	425	0,0	32,2	67,8
	16.6.	629	0,0	93,6	6,4	145	0,0	89,7	10,3	330	0,0	75,8	24,2

Preglednica 4: Rezultati raziskave 2010, 'Ptujška rdeča' čebula, tekoče gojišče BKK pH 5,5 brez dodatkov (28.5.2010), z dodano maltozo (1. 6. 2010) in s saharozo (4. 6. 2010)

Velikost popkov (mm)		3-3,5				3,5-4				4-4,5			
Datum izolacije	Datum pregleda	Skupno število pregledanih celic	Delež tetrad (%)	Delež enoceličnih mikrospor (%)	Delež dvooceličnih mikrospor (%)	Skupno število pregledanih celic	Delež tetrad (%)	Delež enoceličnih mikrospor (%)	Delež dvooceličnih mikrospor (%)	Skupno število pregledanih celic	Delež tetrad (%)	Delež enoceličnih mikrospor (%)	Delež dvooceličnih mikrospor (%)
28.5.	1.6.	-	-	-	-	136	0,0	92,6	7,4	797	0,0	96,1	3,9
	4.6.	-	-	-	-	411	0,0	79,6	20,4	241	0,0	71,8	28,2
	11.6.	-	-	-	-	320	0,0	98,4	1,6	453	0,0	92,5	7,5
	16.6.	-	-	-	-	270	0,0	88,9	11,1	360	0,0	77,8	22,2
1.6.	1.6.	318	0,0	98,1	1,9	628	0,0	93,2	6,8	-	-	-	-
	4.6.	309	0,0	79,9	20,1	553	0,0	81,4	18,6	-	-	-	-
	11.6.	341	0,0	89,7	10,3	450	0,0	92,0	8,0	-	-	-	-
	16.6.	311	0,0	95,8	4,2	448	0,0	95,5	4,5	-	-	-	-
4.6.	4.6.	325	0,0	88,3	11,7	481	0,0	21,2	78,8	288	0,0	7,3	92,7
	11.6.	346	0,0	100,0	0,0	450	0,0	33,3	66,7	412	0,0	29,1	70,9
	16.6.	401	0,0	94,0	6,0	200	0,0	0,0	100,0	275	0,0	29,1	70,9



## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Razvojno stopnjo kobula čebule smo določili po raziskavi iz leta 1999 (Klein in Korzonek, 1999), kjer so razvojne stopnje razdelili na sedem faz. Ugotovili smo, da so bile za našo raziskavo najbolj primerne faze IV, V in VI (glej sliko 2), saj so takrat popki velikostnih razredov od 2,5 mm do 4,5 mm. Z našimi rezultati pa smo dokazali, da velikost in oblika popkov ni edini merodajni kazalec razvojne stopnje mikrospor, saj smo ugotovili, da so v kasnejših (toplejših) mesecih v enakem velikostnem razredu mikropore bolj razvite.

Pomembno je, da smo popke takoj po nabiranju dali hladiti na led, saj bi visoke zunanje temperature povzročile, da bi se pelod izsušil in postal nekaleč (mrtev), še preden bi ga uspeli sterilizirati v brezprašni komori.

Pri poskusih kalitve svežega zrelega peloda, tako sterilnega kot nesterilnega, smo se posluževali metod kalitve na trdem gojišču z agarjem (točka 3.2.4.4) in metode visečih kapljic (točka 3.2.4.3), katere je uporabljal tudi Kosel (2009). Ugotovili smo, da sta bili obe metodi uspešni in sta dali dobre rezultate. Za izvajanje poskusa je lažje uporabiti metodo trdega gojišča z agarjem, saj moramo biti pri metodi visečih kapljic precej natančni, saj se nam lahko kapljice hitro razlijejo po petrijevki.

Ugotovili smo, da so metode kalitve bolj uspešne, če poleg primerne temperature za kalitev peloda dodajamo še kisik, kar dosežemo tako, da uporabimo stresalnik. Pomembno je, da hitrost stresanja ni prevelika, saj ob veliki hitrosti pelod slabše kali.

Pri dokazovanju kaljivosti z metodo visečih kapljic smo uporabili gojišča BKK s pH 5,0–7,0. Ugotovili smo, da je bila kaljivost zelo dobra pri pH 5,0; 5,5 in 7,0. Iz tega lahko sklepamo, da pelodu ustreza rahlo kislo do nevtrarno okolje. V prihodnje bi bilo potrebno poizkusiti še rahlo bolj bazičen pH (7,5–8,5) in morda bolj kisel pH (4,0–5,0).

Pri poskusih kalitve leta 2009 smo uporabili čebulo sorte 'Moravec', ki je bila moško sterilna, in hibrid '70309'. Kakor je bilo pričakovano, je sorta 'Moravec' mnogo slabše kalila, mikropore so bile ob izolaciji večinoma mrtve in maloštevilne, medtem ko so bili poskusi na hibridu zelo uspešni. Nadalje smo ugotovili, da je *in vitro* dozorevanje pri sorti 'Moravec' neuspešno, saj na gojiščih niso bile opažene delitve celic.

Iz rezultatov preglednic 1 in 2 smo ugotovili, da je stopnja razvitosti mikrospor poleg od velikosti popkov močno odvisna tudi od časa pobiranja popkov, saj so v kasnejšem časovnem obdobju in enaki velikosti popkov mikropore bolj razvite.

Pri preglednici 2 smo ugotovili, da poskus ni bil izveden ob pravem času (prepozno), saj smo ob izolaciji dobili samo dvocelične mikrospore. Izolacijo bi morali izvesti iz manjših popkov ali prej.

V letu 2010 smo za poskuse uporabili čebuli sorti 'Belokranjka' in 'Ptujška rdeča'. Obe sta dali dobre rezultate tako glede kalivosti kot tudi *in vitro* zorenja mikrospor.

Opazili smo, da je pri nekaterih izolacijah tako v letu 2009, kot v letu 2010 nastal iz enocelične mikrospore nastal dvocelični pelod. Zasledili smo, da je razvoj iz enocelične celice mikrospore v dvocelični pelod stekel tako pri gojiščih z različnima pH vrednostima (pH 5,1 in pH 5,5), kot pri dodanih sladkorjih v gojiščih (saharoza, maltoza). Za bolj zanesljive rezultate, bi bilo v prihodnje potrebno opraviti večje število izolacij.

Kosel (2009), ki je opravljal raziskave na črnem bezgu (*Sambucus nigra* L.) je ugotovil, da se celična jedra dobro obarvajo z barvilom PI (tako zreli kot nezreli pelod), slabše pa z DAPI in acetokarminom. Tudi pri nas so bili rezultati obarvanja celic in jeder podobni, le da sta se metodi z DAPI in PI enako dobro izkazali.

Kosel je živost peloda uspešno dokazoval z nefluorescenčnim barvilom MTT, katero je dalo pozitivne rezultate živosti tudi pri nas.

Pri *in vitro* kalitvi zrelega peloda je Kosel (2009) ugotovil, da so gojišča s pH vrednostjo 4,0 in 5,1 najbolj uspešni. Da so za *in vitro* kalitev bolj primerne vrednosti pH ki so nižje od 7,0, so ugotovili tudi Ylstra in sod. (1992) na pelodu tobaka.

Pri optimizaciji gojišča je Kosel (2009) ugotovil, da je najbolj primerno gojišče BKK s vrednosto pH 5,1 in 5,5 s saharozo brez dodane maltoze ali glukoze vrednosto pH 5,1 in 5,5.

Vse poskuse je izvajal z metodo kalitve na stekelcih v vlažnostni komori in z metodo , z katero smo tudi mi dobili dobre rezultate, saj se je v našem poskusu izkazala za uspešno.

## 5.2 SKLEPI

Opazili smo, da so rezultati kalitve zelo odvisni od sorte in boljši pri tistih sortah čebule, ki niso moško sterilne.

V letu 2009, ko smo opravljali poskuse s čebulo sorte 'Moravec' in hibridom '70309', smo opazili, da je hibrid dal precej boljše rezultate kot 'Moravec', saj je pelod hibrida '70309' uspešno kalil in tudi izolacija mikrospor je bila uspešna, medtem, ko je bil 'Moravec' pri kalitvi in pri izolaciji mikrospor neuspešen.

V letu 2010, ko smo uporabljali čebuli sorte 'Belokranjka' in 'Ptujška rdeča', sta se obe izkazali za zelo uspešni sorti pri poskusih in kasneje tudi pri rezultatih. Pri obeh sortah smo dosegli, da je pelod kalil in pri obeh smo uspešno izolirali mikropore.

Pobiranje popkov je najbolj primerno v jutranjem času ali ko so temperature nižje. Višje temperature niso ustrezne za pobiranje popkov saj izsušijo pelod, kar vpliva na razvoj, kalitev in delitev celic pri poskusih.

Ko smo izvedli optimizacijo pH vrednosti ter sladkorja v gojišču smo ugotovili, da je mogoče kaljivost zrelega peloda pospešiti tako, da petrijeve plošče stresamo na stresalniku. Tako smo dokazali, da s tresenjem pelodu dovajamo večjo količino kisika, pri čemer je bila kalitev peloda opazno povečana.

Prilagojeno gojišče BKK se je izkazalo kot uspešno za kalitev in gojenje izoliranih mikrospor čebule. Pri tem pa moramo ugotoviti, kateri pH najbolj ustreza sorti, ki jo izoliramo *in vitro*. Pri naših poskusih je bil pH 5,5 najbolj primeren, saj je pelod tam najboljše kalil in dozoreval.

Kot uspešni sta se izkazali tudi gojišči BKK z dodano saharozo in maltozo, saj je bilo ob uporabi obeh gojišč pri poskusih opaziti uspešno kalitev peloda in uspešno izolacijo mikrospor čebule.

Menim, da smo s to raziskavo uspešno optimizirali metode in gojišča za zorenje in izolacijo mikrospor čebule (*Allium cepa* L.).

## 6 POVZETEK

Ne glede na vse kulturnozgodovinske vidike, prek katerih vemo, da so čebulo uporabljali že pred davnimi časi, je bila ta zelenjava vedno tudi pomembno zdravilo. Čebula naj bi imela širok razpon zdravilnih učinkov, od preprečevanja prehlada do srčnih bolezni, diabetesa, osteoporoze in drugih bolezni. Ker je njena uporaba tako široka, je želja najti optimiziran postopek *in vitro* zorenja mikrospor, ki bi omogočal transformacijo rastlin s pomočjo opráševanja z gensko spremenjenim pelodom.

Za izolacijo mikrospor čebule (*Allium cepa* L.) in preverjanje možnosti zorenja mikrospor *in vitro* smo uporabili 4 sorte čebule, in sicer smo v letu 2009 uporabili hibrid '70309' in pa moško sterilno sorto 'Moravec'. Slednja se je izkazala za neuspešno, saj ni bila uspešna niti kalitev peloda niti zorenje mikrospor. Hibrid '70309' pa se je izkazal za uspešnega pri izolacijah mikrospor, malo manj pa je bil uspešen pri kalitvi peloda. Leta 2010 smo uporabili sorti 'Belokranjka' in 'Ptujška rdeča', ki pa nista hibridni sorti. Obe sorti sta se izkazali za zelo uspešni tako pri kalitvi peloda, kakor tudi pri izolaciji mikrospor.

*In vitro* kalitev zrelega peloda smo leta 2009 izvajali v suspenzijski kulturi in na objektivnih stekelcih, vendar so bili boljši rezultati dobljeni v suspenziji gojišča BKK v petrijevi plošči. Ker obe metodi nista pokazali upešnih rezultatov, smo leta 2010 poskusili še dve novi metodi, in sicer metodo visečih kapljic in metodo trdega gojišča z dodanim agarjem. Obe metodi sta se izkazali za zelo uspešni. Ugotovili smo, da lahko kaljivost zrelega peloda močno pospešimo z inkubacijo petrijevih plošč na stresalniku. Istočasno smo poskusili, kako uspešna je kalitev peloda iz popkov, ki so bili sveže nabrani in takih, ki so bili nabrani zaprti, sterilizirani ter dani na sterilno gojišče, kjer so se odprli, ko so dozoreli. Tudi pri tem poskusu smo dobili zelo dobre rezultate. Ugotovili smo, da sterilno dozoreli pelod kali slabše kot nesterilni pelod. Poskusili smo še kalitev peloda neposredno na brazdo pestiča z nesterilnim in s sterilnim pelodom; nesterilni je kalil bolje od sterilnega (tudi pri sterilnem pelodu je bilo zaznati kaljivost, vendar slabšo).

Cilj našega dela je bila izolacija mikrospor čebule in preverjanje možnosti zorenja *in vitro*. Določevanje razvojne stopnje mikrospor in peloda smo izvedli tako, da smo najprej barvali z barvili PI, acetokarminom in z DAPI. Predhodni poskusi so pokazali, da je metoda barvanja z barvilom PI najbolj učinkovita, in sicer tako za mikropore kot za zrel pelod. Določevanje živosti peloda smo izvedli z barvanjem z barvilom MTT. To barvilo smo izbrali, ker ne flourescira in ker ni kancerogeno. Za *in vitro* zorenje enoceličnih mikrospor smo preučili različna gojišča z različnimi pH vrednostmi. V procesu optimizacije gojišča za *in vitro* zorenje enoceličnih mikrospor smo ugotovili, da je od vseh testiranih gojišč najbolj primerno "spremenjeno gojišče BKK" s pH vrednostjo 5,5.

Z diplomsko nalogo smo dokazali, da je pri čebuli mogoče izzvati *in vitro* dozorevanje peloda, hkrati pa nam je uspelo proizvesti dvocelične mikropore.

## 7 VIRI

- Barinova I., Clément C., Martiny L., Baillieul F., Soukupova H., Heberle-Bors E., Touraev A. 2004. Regulation of developmental pathways in cultured microspores of tobacco and snapdragon by medium pH. *Planta*, 219, 1: 141–146
- Barinova I., Zhexembekova M., Barsova E., Lukyanov S., Heberle-Bors E., Touraev A. 2002. *Antirrhinum majus* microspore maturation and transient transformation *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*, 53, 371: 1119–1129
- Bedinger P. 1992. The remarkable biology of pollen. *The Plant Cell*, 4: 879–887
- Brewbaker J.L., Kwack B.H. 1963. The essential role of calcium ion pollen germination and pollen tube growth. *American Journal of Botany*, 50, 9: 859–865
- Burke J.J., Velten J., Oliver M.J. 2004. *In vitro* analysis of cotton pollen germination. *Agronomy Journal*, 96: 359–368
- Clement C., Al-Award D., Audran J.-C. 1996. *In vivo* and *in vitro* pollen maturation in *Lilium*: influence of carbohydrates. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 65: 73–82
- Čebula. 2013. Wikipedija.  
<https://sl.wikipedia.org/wiki/%C4%8Cebula> (1. 8. 2013)
- Digitalni šbler (pomično mjerilo) 15 cm. Njuskalo.  
<http://www.njuskalo.hr/mjerni-instrumenti/digitalni-subler-oglas-2992744> (1. 8. 2013)
- Fritsch R.M., Friesen N. 2002. Evolution, domestication and taxonomy. *Allium crop science: recent advances*. V: CABI Publishing, Rabinowitch H.D., Currah L, (eds.), Wallingford, UK: 5–30
- Hayman D.L. 1956. The genetic control of incompatibility in *Phalaris coerulescens* Desf. *Australian Journal of Biological Sciences*, 9: 321–331
- Heslop-Harrison J., Helsop-Harrison Y. 1970. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence: intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technology*, 45: 115–120
- Jakše M. 2002. Gradivo za vaje iz predmeta vrtnarstvo: 2. letnik visokošolskega strokovnega študija kmetijstva-hortikultura. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 44 str.

- Jayaprakash P., Sarla N. 2001. Development of an improved medium for germination of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. pollen *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*, 52, 357: 851–855
- Klein M., Korzonek D. 1999. Flower size and developmental stage of *Allium cepa* L. umbels. *Acta biologica Cracoviensia, series botanica*, 41: 185–192
- Kosel J. 2009. Biotehnološki postopki za kalitev in *in vitro* dozorevanje peloda bezga (*Sambucus nigra* L.). Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 40 str.
- Lee C.W., Thomas J.C., Buchmann S.L. 1985. Factors affecting *in vitro* germination and storage of jojoba pollen. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 110, 5: 671–676
- McCormick S. 1993. Male gametophyte development. *Plant Cell*, 5, 10: 1265–1275
- Miller D.D., Lancelle S.A., Hepler P.K. 1996. Actin microfilaments do not form a dense meshwork in *Lilium longiflorum* pollen tube tips. *Protoplasma*, 195: 123–132
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15, 3: 473–497
- Osvald J., Kogoj-Osvald M., 2005. Vrtnarstvo: splošno vrtnarstvo in zelenjadarstvo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 591 str.
- Potrykus I. 1991. Gene transfer to plants - assessment of published approaches and results. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 205–225
- Scott P., Lyne R.L. 1994. Initiation of embryogenesis from cultured barley microspores: a further investigation into the toxic effects of sucrose and glucose. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37, 1: 61–65
- Shivanna K.R., Johri B.M. 1985. The angiosperm pollen, structure and function. San Francisco, John Wiley & Sons, USA: 374 str.
- Smith-Huerta N.L., Vasek F.C. 1984. Pollen longevity and stigma pre-emption in *Clarkia*. *American Journal of Botany*, 71: 1183–1191
- Stanley R.G., Linskens H.F. 1974. Viability tests. V: Pollen biology, biochemistry and management. Berlin, Springer : 67–86
- Takhtajan A. 1997. Diversity and classification of flowering plants. New York, Columbia University Press: 643 str.

- Touraev A., Heberle-Bors E. 1999. Microspore embryogenesis and *in vitro* pollen maturation in tobacco. Plant cell culture protocols. V: Methods in molecular biology. Hall R.D. (ed.). New Jersey, Humana Press: 281–291
- Touraev A., Pfosser M., Heberle-Boris E. 2001. The microspore: a haploid multipurpose cell. Advances in Botanical Research, 35: 53–109
- Wang Z.-Y., Ge Y., Scott M., Spangenberg G. 2004. Viability and longevity of pollen from transgenic and nontransgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) (Poaceae) plants. American Journal of Botany, 91, 4: 523–530
- White P.R. 1963. A handbook of plant tissue culture. Lancaster, The Jacques Catell Press Pennsylvania: 277 str.
- Ylstra B., Touraev A., Moreno R.M.B., Stoger E., van Tunen A.J., Vicente O., Mol J.N.M., Heberle-Bors E. 1992. Flavonols stimulate development, germination and tube growth of tobacco pollen. Plant Physiology, 100: 902–907
- Zhao X., Wang W., Li Y., Xing J., Chen F., Wang S. 2007. maturation and germination of *Orychopragmus violaceus* microspores. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 91: 53–60

## **ZAHVALA**

Zahvalil bi se rad mentorju prof. dr. Borutu BOHANCU za nasvete in strokovno pomoč pri izdelavi diplomskega dela.

Zahvala gre tudi dr. Jani MUROVEC za aktivno sodelovanje pri raziskovalnem delu diplomskega dela.

Zahvala gre še izr. prof. dr. Marijani JAKŠE in prof. dr. Francu BATIČU za pregled diplomskega dela kot članoma komisije.

Velika zahvala gre moji ženi Ajdi, ki mi je veliko pomagala pri diplomu, zahvala gre tudi mojim staršem in sestrični, ki so me spodbujali in mi pomagali.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim, ki so mi kakorkoli pomagali pri izdelavi diplomske naloge.