

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Tomaž KRUMPESTAR

**VPLIV FUZARIČNE KISLINE NA REGENERATIVNO
SPOSOBNOST IN VITRO IN PLOIDNOST OLJNIH
BUČ (*Cucurbita pepo* L. ssp. *pepo* var. *styriaca* Greb.)**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Tomaž KRUMPESTAR

**VPLIV FUZARIČNE KISLINE NA REGENERATIVNO SPOSOBNOST
IN VITRO IN PLOIDNOST OLJNIH BUČ (*Cucurbita pepo* L. ssp. *pepo*
var. *styriaca* Greb.)**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**INFLUENCE OF FUSARIC ACID ON REGENERATION CAPABILITY
IN VITRO AND PLOIDY LEVEL OF OIL PUMPKINS (*Cucurbita pepo* L.
ssp. *pepo* var. *styriaca* Greb.)**

M. Sc. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa druge stopnje Biotehnologija na Biotehniški fakulteti, na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je dne 28. 11. 2014 sprejela temo in za mentorja imenovala prof. dr. Boruta Bohanca.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

Član: prof. dr. Marjana REGVAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je naloga 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.

Tomaž Krumpestar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK UDK 635.62: 577.2.085(043.2)
- KG oljna buča/fuzarična kislina/regeneracija/in vitro metoda/klični listi/ploidnost
- AV KRUMPESTAR, Tomaž
- SA BOHANEC, Borut (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
- LI 2015
- IN VPLIV FUZARIČNE KISLINE NA REGENERATIVNO SPOSOBNOST IN VITRO IN PLOIDNOST OLJNIH BUČ (*Cucurbita pepo* L. ssp. *pepo* var. *styriaca* Greb.)
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
- OP VIII, 35 str., 6 preg., 18 sl., 27 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Buče so pomembna kmetijska kultura in se gojijo širom vsega sveta. Na področju Slovenije je predvsem pomembna štajerska oljna buča (*C. pepo* ssp. *pepo* var. *styriaca* Greb.). Tako kot tudi pri mnogih drugih rastlinah tudi pri gojenju buč predstavljajo težavo fuzarijske bolezni, ki jih povzročajo glive iz rodu *Fusarium*. V raziskavi smo želeli preveriti vpliv fuzarične kisline na sposobnost regeneracije in vitro. Regeneracija iz izsečkov kličnih listov je potekala pri različnih koncentracijah FA in ob prisotnosti različnih rastlinskih hormonov. Preverili smo uspešnost regeneracije na MS gojišču s kombinacijami hormonov BAP in ABA ter BAP in IAA. Zanimal nas je tudi vpliv FA na ploidnost regenerantov, kar smo preverjali z uporabo pretočnega citometra. Ugotovili smo, da na regeneracijo najbolj vpliva kombinacija hormonov BAP in IAA, pri uporabi BAP in ABA, pa dodatek nizke koncentracije FA izboljša uspešnost regeneracije. Prav tako smo potrdili, da FA vpliva na ploidnost poganjkov, saj nam je uspelo pridobiti dva tetraploidna regeneranta.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 635.62: 577.2.085(043.2)
CX oil pumpkin/fusaric acid/regeneration/in vitro method/cotyledons/ploidy
AU KRUMPESTAR, Tomaž
AA BOHANEC, Borut (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study in Biotechnology
PY 2015
TI INFLUENCE OF FUSARIC ACID ON REGENERATION CAPABILITY IN VITRO AND PLOIDY LEVEL OF OIL PUMPKINS (*Cucurbita pepo* L. ssp. *pepo* var. *styriaca* Greb.)
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO VIII, 35 p., 6 tab., 18 fig., 27 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Cucurbits are an important crop and are grown worldwide. Styrian oil pumpkin (*C. pepo* ssp. *pepo* var. *styriaca* Greb.) is very important variety in Slovenia. For cucurbits, as for many other plants, the problem is susceptibility to *Fusarium* diseases. We attempted to verify the influence of fusaric acid on regeneration capability in vitro. Regeneration from cotyledonary explants on different media was analyzed. We used MS medium supplemented with different combinations of plant hormones (BAP, ABA, IAA) and FA. We also analyzed influence of FA on regenerated shoots ploidy level by flow cytometry. We found out that regeneration ratio was best on BAP and ABA supplemented medium and that on BAP and IAA supplemented medium regeneration was stimulated by low FA concentration. We also confirmed influence of FA on genome doubling by determination of two tetraploid shoots.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	II
KEY WORDS DOCUMENTATION	III
KAZALO VSEBINE	IV
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 ZNAČILNOSTI RODU <i>Cucurbita</i>	2
2.1.1 Morfološke značilnosti	2
2.1.2 Uporaba v prehranske namene	3
2.1.3 Tanek tip semenskega ovoja	4
2.2 REGENERACIJA POGANJKOV PRI BUČEVKAH	4
2.2.1 Adventivna regeneracija iz kotileodnov	5
2.2.2 Regeneracija iz listnih pecljev	6
2.2.3 Sestava gojišč	6
2.2.4 Ploidnost regenerantov	6
2.3 FUZARIJSKE BOLEZNI PRI BUČEVKAH	7
2.3.1 Fuzarična kislina	7
2.3.2 <i>Fusarium spp.</i>	8
2.3.3 Fuzarioze	8
2.3.4 Zvišanje odpornosti na <i>Fusarium spp.</i> z in vitro selekcijo	9
3 MATERIALI IN METODE	10
3.1 PRIDOBITEV RASTLINSKEGA MATERIALA	10
3.2 PRIPRAVA SEMEN IN KALITEV	10
3.2.1 Priprava gojišča za kalitev	10
3.2.2 Priprava in sterilizacija semen	10
3.2.3 Kalitev	11
3.3 PRIPRAVA GOJIŠČ IN REGENERACIJA	11
3.3.1 Priprava gojišča za adventivno regeneracijo	11
3.3.2 Priprava fuzarične kisline in dodajanje gojišču	12
3.3.3 Priprava rastlinskih izsečkov	13
3.3.4 Regeneracija in ocena uspešnosti	13
3.4 GOJENJE REGENERANTOV IN MERJENJE PLOIDNOSTI	13

3.4.1 Priprava elongacijskega gojišča	13
3.4.2 Priprava in subkultivacija regenerantov	14
3.4.3 Priprava rastlinskega materiala za merjenje ploidnosti	14
3.4.4 Merjenje s citometrom	14
3.5 SEKUNDARNA REGENERACIJA PETIOL	15
4 REZULTATI Z RAZPRAVO	16
4.1 KALITEV	16
4.2 REGENERACIJA	17
4.2.1 Okužbe izsečkov kotiledonov	17
4.2.2 Uspešnost regeneracije na regeneracijskem gojišču 1 in 2	18
4.2.3 Razvoj kalusa na izsečkih	19
4.2.4 Regeneracija korenin na izsečkih	20
4.2.5 Uspešnost regeneracije poganjkov	22
4.3 MERJENJE PLOIDNOSTI	25
4.4 REGENERACIJA PETIOL	27
5 SKLEPI	30
6 POVZETEK	32
7 VIRI	33
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Klasifikacija <i>C. pepo</i> na podvrste in skupine kultivarjev (Schaffer in sod., 2003).	3
Preglednica 2: Pet plasti semenske ovojnice in njihova debelina (Teppner, 2000).....	4
Preglednica 3: Sestava gojišča za kalitev	10
Preglednica 4: Sestava gojišč za adventivno regeneracijo	12
Preglednica 5: Končne koncentracije FA v gojišču in količine založne raztopine, ki smo jo je bilo potrebno dodati 250 ml gojišča.	12
Preglednica 6: Sestava gojišča za elongacijo	14

KAZALO SLIK

Slika 1: Oblika kotiledona uporabljena za regeneracijo in cone razreza pri različnih poskusih. Mi smo v raziskavi uporabili obliko označeno s št. 2 (Ananthakrishnan in sod., 2003).	5
Slika 2: Strukturna formula fuzarične kisline (MeSH, 2015).....	7
Slika 3: Sedem dni stari sejanci v plastičnih banjicah za kalitev, pripravljene za odstranitev kotiledonov.	17
Slika 4: Različne okužbe, ki so se razširile po gojišču in vidno propadanje izsečkov.	18
Slika 5: Razmerja med tipi regeneriranega kalusa na gojiščih s hormonom ABA in dodatkom 0, 5, 10, 20, 30 in 40 mg/l fuzarične kisline. 0 pomeni, da se kalus ni razvil, W predstavlja bel kalus, G pa zelen kalus.	19
Slika 6: Razmerja med tipi regeneriranega kalusa na gojiščih s hormonom IAA in dodatkom 0, 10, 20 in 30 mg/l fuzarične kisline. 0 pomeni, da se kalus ni razvil, W predstavlja bel kalus, G pa zelen kalus.	20

Slika 7: Razmerja med dolžinami regeneriranih korenin na gojiščih s hormonom ABA in dodatkom 0, 5, 10, 20, 30 in 40 mg/l fuzarične kisline. 0 pomeni, da se korenine niso razvile, S predstavlja kratke korenine, L pa dolge korenine.	21
Slika 8: Razmerja med dolžinami regeneriranih korenin na gojiščih s hormonom IAA in dodatkom 0, 10, 20 in 30 mg/l fuzarične kisline. 0 pomeni, da se korenine niso razvile, S predstavlja kratke korenine, L pa dolge korenine.....	21
Slika 9: Deleži izsečkov na katerih je prišlo do uspešne regeneracije poganjkov za posamezna gojišča. Osnovno gojišče z ABA brez FA in gojišča z ABA in dodatkom 5, 10, 20, 30 in 40 mg/l FA.	23
Slika 10: Deleži izsečkov na katerih je prišlo do uspešne regeneracije poganjkov za posamezna gojišča. Osnovno gojišče z IAA brez FA in gojišča z IAA in dodatkom 10, 20 in 30 mg/l FA.....	23
Slika 11: Razmerje izsečkov glede na število regeneriranih poganjkov na posameznem izsečku za gojišče z BAP in ABA.	24
Slika 12: Razmerje izsečkov glede na število regeneriranih poganjkov na posameznem izsečku za gojišče z BAP in IAA.....	25
Slika 13: Analizni graf pretočnega citometra, iz katerega vidimo diploidnost vzorca glede na lokacijo prvega vrha.	26
Slika 14: Analizni graf pretočnega citometra, iz katerega vidimo tetraploidnost vzorca glede na lokacijo prvega vrha.	26
Slika 15: Regeneranta pridobljena na gojišču z dodatkom 30 mg/l FA pred gojenjem na elongacijskem gojišču.	27
Slika 16: Tetraploidni regenerant.	27
Slika 17: Razmerja med petiolami, na gojiščih s hormonoma ABA in IAA. P predstavlja propadle petiole, K petiole, ki so razvile kalus in R petiole, pri katerih je prišlo do regeneracije.....	28
Slika 18: Nastanek kalusa na petiolah po 3 tednih regeneracije na gojišču s hormonom ABA in 10 mg/l FA.....	29

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

FA	fuzarična kislina
MS (gojišče)	Murashige & Skoog gojišče
BAP	6-benzilaminopurin, benziladenin
IAA	indolocetna kislina
2-iP	izopentenil adenin
TDZ	tidiazuron
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DICA	dikloroizocianurična kislina
ABA	abscizinska kislina
NAA	naftalenocetna kislina

1 UVOD

Bučevke sodijo med pomembne kulturne rastline, saj se številne vrste iz te družine uporabljajo v prehrani ljudi in živali. Med njih spadajo tudi vrste iz rodu *Cucurbita*, ki so po raznovrstnosti kultivarjev med najštevilčnejšimi. Letno se na svetu pridelava preko 21 milijonov ton buč, pri katerih se za prehrano lahko uporabljajo plodovi ali pa njihova semena. Na področju Slovenije je v pridelavi buč zelo pomembna štajerska oljna buča (*Cucurbita pepo* L. ssp. *pepo* var. *styriaca* Greb.), pri kateri se uporabljajo zreła semena za proizvodnjo bučnega olja. Na področju žlahtnjenja oljnih buč je bil največji napredek narejen pred okoli 100 leti, ko je bila odkrita mutanta s semeni brez trde semenske lupine. To je postopek pridobivanja olja iz semen močno olajšalo in povečalo učinkovitost proizvodnje. Kot tudi večina drugih sort buč so tudi oljne buče občutljive na patogene glive iz rodu *Fusarium*. Okužba z glivo povzroča fuzarično uvelost in gnilobo koreninskega vratu, pa tudi gnilobo na plodovih. Glive izločajo različne toksine, ki negativno vplivajo na prizadeto rastlino. Med pomembnejšimi je tudi fuzarična kislina (FA), s pomočjo katere patogen uniči rastlinske celice in poveča prepustnost tkiva, da lahko prodre v rastlino. Znano je, da se s pomočjo različnih tehnik žlahtnjenja lahko pridobi odpornejše sorte.

Danes se vse bolj uveljavljajo in vitro tehnike žlahtnjenja, saj omogočajo izvajanje raziskav v večjem obsegu in krajšem času. Za pridobivanje odpornejših ali tolerantnejših kultivarjev je primerna metoda in vitro selekcije, pri kateri se lahko in vitro kulturi dodajajo različni toksini oziroma spojine, ki negativno vplivajo na rastline. Zaradi somaklonske variabilnosti ali umetno izzvanih mutacij pridobimo rastline, ki so na prisotne toksine odpornejše in jih uporabimo za nadaljnje žlahtnjenje. Rezultati večih raziskav kažejo, da je mogoče metodo uporabiti tudi za pridobivanje odpornosti na fuzarično kislino pri različnih rastlinskih vrstah, uspešnost pa je odvisna od vrste in uporabljenih sort.

Številni znanstveniki poročajo o uspešni in vitro regeneraciji različnih vrst iz družine bučevk. Najuspešnejša je regeneracija poganjkov iz izsečkov kotiledonov, ki se pridobijo s kalitvijo semenskega materiala. Uspešnost regeneracije je zelo odvisna od uporabljene vrste in sestave gojišča za regeneracijo.

V raziskavi smo želeli potrditi uporabnost metode regeneracije poganjkov iz kličnih listov pri štajerski oljni buči. Uporabili smo regeneracijska gojišča z dodatki različnih rastlinskih hormonov in spremljali potek regeneracije na podlagi večih parametrov. Ocenjevali smo rast kalusa, korenin in poganjkov, ki so se razvili na izsečkih kličnih listov. Preizkušali smo tudi odvisnost regeneracijske sposobnosti od različnih koncentracij fuzarične kisline v gojiščih ter določili pri kakšni koncentraciji dobimo najboljši rezultat regeneracije poganjkov. Regenerantom smo ponovno preverjali odpornost na fuzarično kislino in sposobnost ponovne regeneracije iz petiol. Zaradi delovanja FA kot inhibitorja proliferacije, smo regenerantom preverili tudi ploidnost.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZNAČILNOSTI RODU *Cucurbita*

Rod *Cucurbita* vsebuje 15 vrst, oziroma 13 do 30 vrst odvisno od taksonomske razvrstitve. Z agronomskega vidika uporabnosti in pridelave so najpomembnejše vrste *Cucurbita pepo*, *C. moschata*, *C. maxima* in *C. ficifolia*. Vse vrste izvirajo iz srednje in južne Amerike in so se v Evropi začele gojiti šele po Kolumbovem odkritju Amerike. Danes je uporaba buč za različne namene zelo razširjena, saj se plodovi uporabljajo kot hrana, krma in v okrasne namene, pri nekaterih vrstah pa so bile dokazane tudi zdravilne lastnosti. Svetovna proizvodnja presega 21 milijonov ton buč. V zadnjih letih so raziskave pokazale, da so nekatere vrste uporabne tudi za fitoremediacijske namene, saj iz zemlje odstranjujejo nekatera organska onesnažila in ksenobiotike.

2.1.1 Morfološke značilnosti

Buče rastejo v obliki dolgih plazečih stebel ali vrež, razviti pa so bili tudi nekateri kultivarji, ki uspevajo v grmičasti obliki. Večina vrst je občutljivih na pozebo, za uspešno rast pa potrebujejo dovolj toplote od česar je tudi odvisno v katerih regijah se gojijo določene vrste buč. Vse rastline iz rodu *Cucurbita* so enodomne in imajo velike izstopajoče cvetove, ki odprti v premeru merijo med 10 in 16 centimetri. Cvetovi se pojavljajo po eden v vsakem nodiju in so svetlo rumene do oranžne barve. Značilno je, da je prvi cvet, ki zraste na rastlini vedno moškega spola. Vrste iz rodu *Cucurbita* so diploidi z 20 pari kromosomov ($2n=40$). Plodovi gojenih sort se med seboj zelo razlikujejo po velikosti, obliki in barvi. Prav tako se vrste razlikujejo po obliki listov. Najpogosteje gojene sorte buč izvirajo iz vrste *Cucurbita pepo* L. Ta vrsta izvira iz zmerno toplih predelov severne Amerike in je ena izmed prvih opisanih vrst po odkritju nove celine. Rastline te vrste rastejo v obliki dolgih vrež ali v grmičasti obliki. Listi so pentagonalne oblike in lahko variirajo od nezarezanih do globoko zarezanih, z nazobčanim listnim robom. *Cucurbita pepo* L. dobro uspeva v različnih temperaturnih regijah. Večinoma se gojijo sorte pri katerih se uporabljajo celi nedozoreli plodovi, razširjeno pa je tudi gojenje sort za pridelavo zrelih plodov. Pri zrelih plodovih se kot živilo lahko uporablja njihovo meso, semena ali pa se iz semen izdeluje bučno olje. *Cucurbita pepo* L. je verjetno vrsta z najbolj raznolikim naborom plodov v rastlinskem kraljestvu. Glede na velikost najdemo plodove težke od manj kot 100 g pa vse do ogromnih plodov, ki tehtajo preko 20 kg. Plodovi se prav tako močno razlikujejo po obliki, narebranosti, obliki površine in barvi ter barvnih vzorcih. Kot je prikazano v tabeli se vrsta deli na 3 podvrste.

Preglednica 1: Klasifikacija *C. pepo* na podvrste in skupine kultivarjev (Schaffer in sod., 2003).

Podvrsta	Opis
pepo (poznane le gojene oblike)	
buče	okrogle, sploščene, ovalne, jajčaste
vegetable marrow	kratke, konično valjaste
cocozele	dolge, trebušasto valjaste
cukini (zucchini)	enakomerno valjaste
pepo gourd	okrogle, gladke ali bradavičaste
texana (poznane divje in gojene oblike)	
acorn	koničaste, razbrazdane
patišon (scallop)	sploščene, z nazobčanim robom
kljukast vrat (crookneck)	dolg, ozek vrat
raven vrat (straightneck)	kratek, širok vrat
jajčasta buča (ovifera gourd)	jajčaste ali hruškaste oblike, gladke
fraterna (poznane le divje oblike)	

2.1.2 Uporaba v prehranske namene

Kot že omenjeno se veliko buč prideluje z namenom uživanja nedozorelih plodov, v prvih fazah njihovega razvoja, kot naprimer bučke (zucchini). Enako velja tudi za plodove drugih rastlin iz družine bučevk, kumare naprimer so primerne za uživanje že teden dni po začetku cvetenja. Značilno je, da plodovi vsebujejo veliko vode, katere vsebnost je med 90 in 96 odstotki. Zaradi tega se uvrščajo med živila z nizko hranilno vrednostjo glede na volumski delež hranil. Sadeži nekaterih sort postanejo z dozorevanjem neuporabni zaradi vsebnosti grenkih spojin. Pri sortah, ki so namenjene za uživanje zrelih plodov, se ob dozorevanju v sadežu zniža vsebnost vode, skladiščiti pa se začnejo različni metaboliti in sladkorji, največkrat saharoza in škrob, katerih vsebnost lahko doseže tudi 5 % sveže mase. V pridelavi buč so pomembne tudi sorte namenjene za pridelavo semen, ki se v prehrani uporablja kot prigrizek ali dodatek. Semena buč vsebujejo veliko olj in proteinov zato predstavljajo živilo z visoko hranilno vrednostjo. Olja sestojijo večinoma iz nenasičenih maščobnih kislin, predvsem iz oleinske in linolne. Na razmerje in vsebnost maščobnih kislin zelo vpliva genetska raznolikost med vrstami. Velik napredek pri razvoju sort za pridobivanje semen je bil dosežen pred okoli 100 leti, z odkritjem mutante *C. pepo*, ki producira gola semena brez semenske lupine. Sorta, pri kateri se semenska lupina na razvije, je uporabna predvsem za pridelavo semen, ki so namenjena pridobivanju bučnega olja. Pred tem je bilo potrebno v postopku pridobivanja olja semena olupiti, tako, da so gola semena močno poenostavila postopek in povečala njegovo učinkovitost. Bučno olje iz semen vrste *C. pepo* je visoko cenjeno v srednji in vzhodni Evropi (Schaffer in sod., 2003).

2.1.3 Tanek tip semenskega ovoja

Vsa semena rastlin iz rodu *Cucurbita* imajo semensko ovojnico sestavljeno iz petih plasti, ki se razvije iz zunanje povrhnjice zasnove. Pri divjem tipu in pri večini gojenih sort so semena obdana z debelo, trdno ovojnico, kar je posledica velike količine lignina, ki je prisoten v zunanjih štirih plasteh. Lignin daje ovojnici tudi značilno belkasto do svetlo rjavo barvo. Posebnost Štajerskih oljnih buč (*C. pepo* L. ssp. *pepo* var. *styriacea* Gerb.) in njihova najpomembnejša lastnost je temno zelena barva semen s tanko ovojnico. Ta lastnost semen je posledica mutacije, ki zagotavlja, da so celične stene celic v zunanjih štirih plasteh ovoja popolnoma brez lignina. Poleg tega pa je notranja peta plast zgrajena iz več plasti celic, kot pri sortah z debelo ovojnico.

Preglednica 2: Pet plasti semenske ovojnice in njihova debelina (Teppner, 2000).

Plast	Sloj celic (debelina)
1. epidermalna	
2. hipodermalna	3-5
3. sklerenhimska	1-2
4. aerenhimska	1-3
5. klorenhimska	8-10

Proti koncu razvoja semena, se celice druge in tretje plasti ponavadi popolnoma resorbirajo in tako ostane semenska ovojnica sestavljena le iz ostankov epidermalne, aerenhimske in klorenhimske plasti. Zaradi tanke strukture in vsebnosti protoklorofila v ovojnici seme pridobi značilno temno zeleno barvo, ki se ohrani tudi pri suhem semenu. Debelejša klorenhimska plast vpliva tudi na to, da se pri praženju in stiskanju raztopu večja količina protoklorofila, kar daje olju temnejšo barvo.

Z genetskega vidika je lastnost, da rastlina producira semena s tanko semensko ovojnico, recesivnega tipa. Sprva so predvidevali, da je lastnost nadzorovana z dvema glavnima genoma, vendar se je kasneje uveljavilo mnenje, da je lastnost odvisna od enega močno dominantnega gena in nekaj modifikatorskih genov, ki pridobijo veljavo v primeru recesivnega stanja glavnega gena. Ker je razvoj tanke semenske ovojnice recesivna lastnost, pomeni, da je žlahtnjenje, s pomočjo križanja z divjimi tipi, zelo oteženo in dolgotrajno (Tappner, 2000; Murovec in sod., 2012).

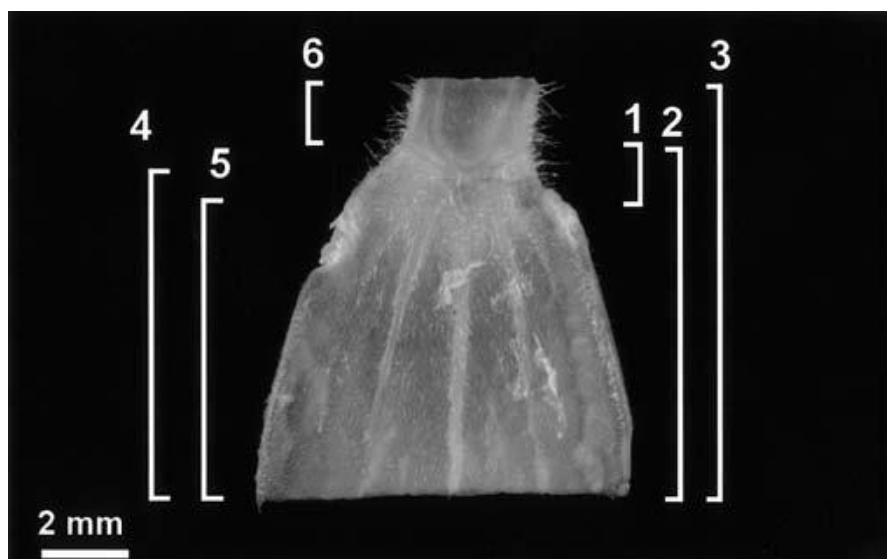
2.2 REGENERACIJA POGANJKOV PRI BUČEVKAH

Kljub temu, da vrsta *C. pepo* obsega širok nabor sort, ki se gojijo povsod po svetu in imajo visoko ekonomsko vrednost, se je do sedaj po mnenju Ananthkrishnan in sod. (2003) na področju biotehnologije zelo malo delalona razvoju in izboljšanju vrste. Za uspešne raziskave pri razvoju vrste je potrebno najprej zagotoviti enostavne in učinkovite postopke za

regeneracijo in vitro kultur. Pri razvoji regenerativnih postopkov je potrebno paziti, da so le ti prilagojeni uporabi na različnih kultivarjih, saj se s tem močno poveča možnost uporabe genskega inženiringa na sortah, ki se med seboj zelo razlikujejo (Ananthakrishnan in sod., 2003).

2.2.1 Adventivna regeneracija iz kotiledonov

Glavna prednost postopka regeneracije poganjkov iz semenskega materiala je, da so semena komercialnih kultivarjev lahko dosegljiva tudi v večjih količinah. Na začetku je pomembno, da se zagotovi sterilnost semenskega materiala, saj se s tem izognemo problematičnim okužbam, ki znižajo uspešnost postopka regeneracije. Po pripravi semena sledi kalitev, ki glede na sorto lahko traja od 5 do 9 dni. Zaradi različno hitrega razvoja posameznih semen lahko pride do razlik med sejanci. Uporabne so rastline, ki so ravno začele kaliti in imajo še zaprte klične liste z vidnim kratkim stebelcem in korenino, kot tudi razvitejši sejanci, ki imajo že zelene kotiledone, daljše steblice in razvejano korenino. Kot poročajo Ananthakrishnan in sod. (2003) razvojna stopnja sejanca nima vpliva na nadaljno uspešnost postopka regeneracije, medtem, ko Zhang in sod. (2008) poročajo, da je regeneracija uspešnejša pri 7 dnevni sejanjih, kot pri mlajših. Po drugi strani pa lahko na uspešnost regeneracije vpliva tudi nadaljna priprava kotiledonov. Kotiledone je potrebno najprej odrezati od stebca in s pokončnim rezom ločiti oba klična lista. Zgornje dele kličnih listov se lahko odstrani, natančno pa je potrebno odstraniti tudi glavni poganjek, ki se drži enega od kotiledonov. V raziskavi so preverjali tudi odziv regeneracije na delež odstranjenega kotiledona, tako, da so kotiledon različno skrajšali na vrhu ali pri osnovi.



Slika 1: Oblika kotiledona uporabljenega za regeneracijo in cone razreza pri različnih poskusih. Mi smo v raziskavi uporabili obliko označeno s št. 2 (Ananthakrishnan in sod., 2003).

Glede na rezultate raziskave Ananthkrishnan in sod. (2003), je za regeneracijo najprimernejša oblika reza kotiledona taka, da se odstrani vrhnji del kotiledona in pri osnovi ostane krajši del stebelca. Oblika je prikazana na sliki 1 in je označena s št. 2. Enako obliko reza so v svojih raziskavah uporabljali tudi Kathiravan in sod. (2006) ter Zhang in sod. (2008).

2.2.2 Regeneracija iz listnih pecljev

Poganjke je pri rastlinah iz družine bučevk mogoče regenerirati tudi iz drugih delov rastline, kot so naprimer listni peclji oziroma petiole. Jeyakumar in sod. (2014) v svoji raziskavi poročajo o uspešni regeneraciji poganjkov iz petiol pri rastlini *Cucumis anguria* L. Regeneracija jim je uspela preko predhodnjega razvoja zelenega kalusa na dozorelih in nedozorelih listnih pecljih. Z regeneracijo poganjkov iz zelenih delov sejančkov so se ukvarjali tudi Lee in sod. (2003) in sicer pri buči *C. maxima*. Regenerante so želeli pridobiti iz delov kotiledonov, stebelc in korenin sejančkov. Poročajo, da je postopek regeneracije uspešen le pri uporabi kličnih listov, iz delov stebelc in korenin pa jim ni uspelo pridobiti novih poganjkov.

2.2.3 Sestava gojišč

Poleg načina priprave in izbire regeneracijskega materiala je zelo pomembna tudi sestava gojišča za regeneracijo. Kot osnovo za pripravo gojišča večina avtorjev raziskav uporablja MS gojišče z dodanimi vitamini ali brez njih. MS gojišču je potrebno dodati saharozo, ki služi kot vir ogljikovih hidratov in agar za strjevanje. Glavne razlike med uporabljenimi gojišči se kažejo pri izbiri rastlinskih hormonov, ki se dodajajo gojišču. Gojišča za regeneracijo se lahko razlikujejo po vsebnosti različnih hormonov, kombinacijah hormonov in razmerju med njimi. V pregledanih objavah je med citokinini najpogostejša izbira hormon BAP. Nekateri raziskovalci so preizkušali uspešnost regeneracije z BAP v kombinaciji z drugimi hormoni. Lee in sod. (2003) so pri svojem delu iskali optimalno koncentracijo BAP v gojišču, s tem, da so v gojišča dodali BAP v koncentracijah od 1-10 mg/l. Ugotovili so, da je regeneracija najuspešnejša pri vsebnosti 1-5 mg/l BAP v gojišču, pri višjih koncentracijah pa je odstotek regeneracije zelo nizek. Abrie in sod. (2001) so raziskovali vpliv različnih citokininov na uspešnost regeneracije. V kombinaciji z IAA so uporabili štiri različne citokinine in sicer BAP, kinetin, 2-iP in TDZ. Raziskava je potrdila, da je regeneracija poganjkov najuspešnejša pri uporabi hormona BAP, na drugem mestu pa je po uspešnosti kinetin.

2.2.4 Ploidnost regenerantov

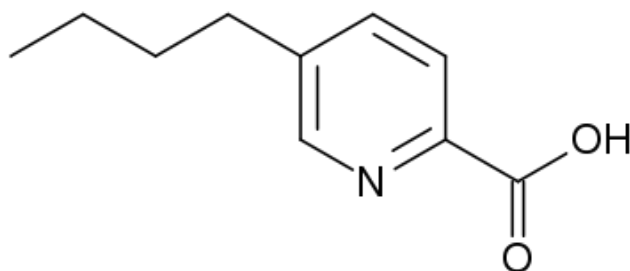
Ploidnost regenerantov pri bučah je lahko različna, tako kot tudi pri nekaterih drugih rastlinah. V primeru regeneracije iz kotiledonov je lahko poliploidnost posledica prisotnosti različnih celic v kličnih listih. Pri regeneraciji buč iz kotiledonov lahko pridobimo diploidne

poganjke z dvema paroma kromosomov, kot tudi tetraploide in miksoploide. Do tega pride, ker je kotiledon sestavljen iz diploidnih in tetraploidnih celic. Tako se lahko poganjek regenerira iz skupka diploidnih celic ali iz skupka tetraploidnih celic, možno pa je tudi, da pride do regeneracije iz skupka mešanih celic, pri čemer dobimo himerni poganjek. Sprememba ploidnosti v celicah je lahko tudi posledica endoreduplikacije, vendar Košmrlj in sod. (2015) poročajo, da je v semenu buče endoreduplikacija v najmanjši meri prisotna prav v tkivu kotiledona. Pogostost regeneracije tetraploidov je v veliki meri odvisna od tega, na katerem delu kotiledona pride do formacije poganjkov. Pri vrstah iz rodu *Cucurbita* ponavadi pride do regeneracije na spodnjem, mlajšem koncu kotiledona, kjer je v začetni razvojni fazi prisotnih manj tetraploidnih celic. Prav to znižuje možnost nastanka tetraploidnega poganjka. Pri melonah, kjer do regeneracije prihaja na različnih delih kotiledona, posledično pridobimo več tetraploidnih regenerantov. Na ploidnost regenerantov pa lahko vplivajo tudi drugi faktorji, kot so naprimer spremembe v sestavi gojišča, koncentracija citokininov v gojišču in prisotnost etilena ali drugih spojin (Kathiravan in sod., 2006).

2.3 FUZARIJSKE BOLEZNI PRI BUČEVKAH

2.3.1 Fuzarična kislina

Fuzarična kislina je derivat pikolinske kisline, katerega najdemo v večih vrstah gliv iz rodu *Fusarium*. Večinoma se uporablja v različnih raziskavah, tudi kot potencialna molekula za različne terapevtske aplikacije. Mehanizmi delovanja fuzarične kisline so zaenkrat še slabo poznani. Domnevno deluje kot inhibitor encima dopamin beta-hidroksilaza, ki spreminja dopamin v norepinefrin. Poznano je, da deluje tudi na drugih področjih in sicer kot inhibitor celične proliferacije in DNA sinteze. Prav inhibicija celične proliferacije je razlog, da prisotnost FA pri procesu regeneracije poganjkov lahko povzroči spremembo ploidnosti regenerantov (MeSH, 2015). Prisotnost fuzarične kisline v rastlinah vpliva tudi na povečano celično prepustnost.



Slika 2: Strukturna formula fuzarične kisline (MeSH, 2015).

Seznam pomembnejših vrst iz rodu *Fusarium*, ki proizvajajo fuzarično kislino zajema: *F. moniliforme*, *F. napiliforme*, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum*, *F. sambucinum*, *F. heterosporum*,

F. thapsinum, *F. nygamai*, *F. sachari*, *F. subglutinaus*, *F. crookwellense*, podvrste *F. oxysporum* in podvrste *F. solani* (Labeda in sod., 2010).

2.3.2 *Fusarium* spp.

Fusarium je rod filamentoznih gliv, ki se nahajajo v zemlji in so široko razširjene po vsem svetu. Številne vrste predstavljajo rastlinske patogene, ki so odgovorni za bolezni agronomsko in hortikulturno pomembnih kultur. Naprimer že samo podvrste glive *F. oxysporum* povzročajo fuzarijsko uvelost in gnilobo koreninskega vratu pri več kot 100 rastlinskih vrstah. Zaradi velikega pomena, tako iz ekonomskega kot tudi iz znanstvenega vidika, sta vrsti *F. oxysporum* in *F. graminearum* uvrščeni med 10 najbolj patogenih gliv. Poleg fuzarične kisline, te glive proizvajajo tudi druge mikotoksine, ki kontaminirajo krmo in hrano. Najbolj pogosta je kontaminacija žit, v katerih najdemo mikotoksine kot so trihoteceni in fumonizin, ki škodljivo vplivajo na zdravje ljudi in živali (Edel-Hermann in sod., 2015).

2.3.3 Fuzarioze

Bolezni na rastlinah, ki jih povzročajo glive iz rodu *Fusarium* oziroma fuzarioze so poznane pri številnih kulturnih rastlinah. Poleg buč in drugih bučevk v veliki meri prizadenejo tudi žitarice, okrasne rastline in nekatero tropsko sadje, kot naprimer banane in ananas. Najpogostejše bolezni, ki jih pri bučevkah povzročajo glive iz rodu *Fusarium* so fuzarijska uvelost, gniloga koreninskega vratu, trohnoba vrež in gniloba plodov. Najbolj razširjena je fuzarijska uvelost, ki jo povzročajo različne podvrste *F. oxysporum*. Uvelost pri bučah (*Cucurbita* spp.) povzroča *F. oxysporum* f. sp. *cucurbitacearum*, pri melonah *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, pri lubenicah pa *F. oxysporum* f. sp. *niveum*. Kot poročajo Gerlagh in sod. (1988), lahko nekatere podvrste napadajo različne rastline iz družine Cucurbitaceae, predvsem v zgodnejšem razvojnem obdobju rastline, pri starejših rastlinah pa postanejo okužbe bolj specifične. Patogene glive, ki povzročajo uvelost se najpogosteje prenašajo okuženega semena, odmrlih rastlinskih delov in preko zemlje. Pri mladih rastlinah se posledice kažejo kot rumenenje in padavica sejancev, pri starejših pa kot rumenenje listov in uvelost posameznih vrež. Ob hudi okužbi lahko pride do uvelosti in propada celotne rastline.

Druga bolezen, ki se pojavlja pri bučah je gniloba koreninskega vratu in se pojavlja kot posledica okužbe s *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*. Okužba se najprej kaže z uvelostjo listov in kasneje z odmrtjem celotne rastline. Ob odstranitvi zemlje okoli rastline, se vidno kaže okužba koreninskega vratu in zgornjega dela korenine, kjer tkivo postane svetlejšje barve in dobi vodeno, krhko strukturo, kasneje pa počrni in propade. Do okužbe pride preko okuženega semena, kjer lahko gliva preživi več let in ne vpliva na kaljivost semena. Ista vrsta glive povzroča tudi gnilobo plodov pri bučah, še posebej v vlažnejših razmerah in ob poškodbi površine plodov (Zitter, 1998).

2.3.4 Zvišanje odpornosti na *Fusarium* spp. z in vitro selekcijo

Zaradi velikega obsega rastlinskih vrst, ki jih lahko prizadane okužba z glivo *Fusarium*, se je že mnogo raziskovalcev ukvarjalo z zviševanjem odpornosti rastlin. Pri nekaterih kulturah že obstajajo sorte, ki so odpornejše na okužbo, vendar je prenos te lastnosti s tradicionalnimi metodami križanja precej težaven in neuspešen.

Fuzarična kislina je eden od pomembnejših toksinov glive, ki v rastlini poveča prepustnost celic in jih s tem tudi uničuje. Gliva si z razgradnjo rastlinskih celic utre pot v notranje tkivo rastline in jo uniči, zato je eden od ciljev žlahtnjenja pridobiti rastline, katerih celice so odporne na FA. S tem rastlina blokira vdor glive v tkivo in omeji infekcijo (Matsumoto in sod., 2010).

Selekcija odpornosti regenerantov lahko poteka in vitro z dodajanjem izbranega toksina. Somaklonske različice regenerantov paradižnika lahko pridobimo s pomočjo selekcije s fuzarično kislino. V poskusu, kjer je bila fuzarična kislina uporabljena kot selektivni toksin se je pokazalo, da ima FA tudi mutageno delovanje. Na somaklonsko variabilnost najbolj vplivajo genetske lastnosti osnovnega rastlinskega material in njegova odpornost na izbrani toksin. Na podlagi poskusov s paradižnikom in fuzarično kislino, je bilo dokazano, da se rastlinski genom na patogen prilagodi s poliploidizacijo in z mutacijami, ki vračajo genom bližje divjemu tipu. Pridobljena rezistenca se lahko pri fenotipu odraža na dva načina. Pozitivne mutacije ne vplivajo na glavne karakteristike sorte ali pa se zaradi spremembe genoma tudi fenotip popolnoma spremeni (Nguyen in sod., 1992).

Matsumoto in sod. (2010) so pri svojem delu iskali najboljšo metodo in vitro selekcije na podlagi gojenja tropskih bananovcev, saj pri gojenju le teh predstavlja *F. oxysporum* enega največjih problemov. Pri vrstah, kot so banane, je iskanje tolerantnih in odpornih križancev s pomočjo tradicionalnih metod križanja neučinkovito in dolgotrajno zaradi počasnega razmnoževanja in visoke sterilnosti potomcev. Za razliko od selekcije na poskusnem polju, kjer se lahko rastline okuži s patogeno glivo, pri in vitro selekciji to ni mogoče. Problem je v hitri rasti glive, ki ob inokulaciji preraste rastlinski material in porabi vsa hranila. Rastline propadejo zaradi pomanjkanja hranil, tudi v primeru, da so razvile odpornost na glivo. V raziskavi so ugotovili, da je za in vitro selekcijo najprimernejša uporaba fuzarične kisline in filtrata patogene kulture. Zaradi hitrega razpadanja je potrebno fuzarično kislino v gojišča dodajati po avtoklaviranju in jo pred dodajanjem sterilizirati s pomočjo sterilne filtracije. Glede na občutljivost izbrane rastlinske vrste, je potrebno najprej prilagoditi koncentracijo FA v gojišču. pri prenizki koncentraciji je lahko selekcija neuspešna, pri previsoki pa propadejo vse rastline. Znano je tudi, da fuzarična kislina deluje toksično tudi na sorte, ki so drugače odporne na fuzarioze. Z uporabo takšnih sort za in vitro selekcijo je mogoče pridobiti nove mehanizme za odpornost in tako dodatno izboljšati odpornost sorte. Pri pridobivanju novih mutacij v rastlinskem materialu se lahko zanesemo na somaklonsko variabilnost in mutagenost FA ali pa v gojišča dodajamo druge mutagene spojine (Matsumoto in sod., 2010).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PRIDOBITEV RASTLINSKEGA MATERIALA

Za potrebe poskusa smo od gojitelja pridobili očiščena semena oljne buče *Cucurbita pepo* L. ssp. *pepo* var. *Styriacea* Gerb. hibridne kratkovrežne sorte GL Opal. Hibridna sotra GL Opal ima razvito dobro toleranco na gnilobo plodov in virus rumenega bučnega mozaika (Agrosaat, 2015).

3.2 PRIPRAVA SEMEN IN KALITEV

Za poskus regeneracije je bilo najprej potrebno pripraviti sterilizirana semena in gojišče za kalitev, da smo lahko s kalitivjo pridobili mlade sejance, katerim smo nato za potrebe nadaljevanja poskusa odstranili klične liste.

3.2.1 Priprava gojišča za kalitev

Gojišče za kalitev (preglednica spodaj) smo pripravili iz Murashige & Skoog gojišča z dodatkom vitaminov. Dodali smo še saharozo, nanosrebro in agar. Zatehtane količine MS gojišča in saharoze smo najprej raztopili v manjši količini destilirane vode in jo nato dodali do željene končne količine. Raztopini smo s pomočjo elektronskega pH metra in dodajanjem 1M KOH umerili pH vrednost na 5,8. Zatehtano količino agarja in nanosrebra smo dodali direktno v steklenico za avtoklaviranje in prilili raztopino gojišča. Gojišče smo avtoklavirali 15 minut pri 121°C in še toplega pred strjevanjem v brezprašni komori razdelili v sterilizirane plastične banjice, ki smo jih nato do uporabe hranili na sobni temperaturi v temi. Banjice za kalitev so imele v pokrovčkih vgrajene filtre za prepuščanje plinov.

Preglednica 3: Sestava gojišča za kalitev

Sestavine	Koncentracija v gojišču (g/l)
MS gojišče z vitamini	1x(4,4)
saharoza	30
agar	8
nanosrebro	0,008

3.2.2 Priprava in sterilizacija semen

Za izvedbo poskusa smo naključno odbrali cela, nepoškodovana semena. V primeru, da so bili na semenu prisotni suhi ostanki plodu, smo le te ročno odstranili. Očiščena semena smo najprej tretirali z dve minutnim namakanjem v 70 % etanolu. Ves nadaljnji postopek je potekal v brezprašni komori. Po odstranitvi etanola s pomočjo steriliziranega cedila, smo semena 20 minut namakali v 4 % (m/v) raztopini DICA. Raztopino smo pripravili tako, da

smo v 200 ml sterilizirane destilirane vode raztopili 8 g DICA in dodali dve kapljici surfaktanta Tween 20 (polisorbat 20). Ves čas tretiranja smo semena mešali s pomočjo magnetnega mešala. Sledilo je izpiranje semen na steriliziranem cedilu s sterilizirano destilirano vodo, toliko časa, da na površini semen ni bilo več prisotne pene. Izprana semena smo 90 minut namakali v sterilizirani destilirani vodi z dodatkom 200 mg/l nanosrebra ob neprestanem mešanju z magnetnim mešalom. Tako sterilizirana semena smo odcedili in jih po 8 skupaj prestavili v prozorne plastične banjice z gojiščem za kalitev. Pri postavitvi semen smo pazili, da so bila vsa semena v pokončnem položaju in s spodnjim koničastim delo rahlo porinjena v gojišče, saj se tako po kalitvi gojišče ni držalo kličnih listov in smo jih lažje pripravili za nadaljnjo uporabo.

3.2.3 Kalitev

Zaprte banjice s semeni smo inkubirali v rastni komori pri stalni temperaturi 23°C in svetlobnem ciklu 16 ur svetlo, 8 ur tema. Kalitev je potekala 7 do 9 dni, med tem časom pa smo spremljali razvoj sejanchkov. Za nadaljevanje dela smo se odločili, ko je bila večina sejancev v fazi, ko so pognali kratko koreninico in sta se klična lista začela rahlo odpirati. Zaradi različno hitre kalitve so imeli v tem času nekateri sejanci že popolnoma razprta in zelena klična lista, nekateri pa so komaj začeli poganjati koreninico in sta bila klična lista še popolnoma zaprta.

3.3 PRIPRAVA GOJIŠČ IN REGENERACIJA

Za preizkus regenerativne sposobnosti smo pripravili gojišča z dodatkom različnih rastlinskih hormonov in vsebnostjo različnih koncentracij fuzarične kisline.

3.3.1 Priprava gojišča za adventivno regeneracijo

Osnova gojišča za adventivno regeneracijo (preglednica spodaj) je bila pripravljena iz bazalnega Murashige & Skoog gojišča brez dodanih vitaminov, saharoze in agarja. Osnovi smo v različnih koncentracijah dodali različne rastlinske hormone, tako da smo dobili dve različni regeneracijski gojišči. Obe gojišči sta vsebovali hormon 6-benzilaminopurin (BAP), razlikovali pa sta se v tem, da je prvo vsebovalo abscizinsko kislino (ABA), drugo pa indolocetno kislino (IAA). Priprava je potekala tako, da smo najprej zatehtali MS gojišče in saharozo ter ju razropili v destilirani vodu. Dodali smo izbrane hormone iz pripravljenih založnih raztopin, nato pa z destilirano vodo dopolnili do željenega volumna. Sledilo je umerjanje pH vrednosti s pomočjo elektronskega pH metra. Z dodajanjem 1M KOH smo umerili pH vrednost na 5,8. Gojišče smo razdelili v 250 ml steklenice za sterilizacijo in dodali agar. Avtoklaviranje je potekalo 15 minut pri 121°C. Gojišče smo do uporabe hranili na sobni temperaturi v temi.

Preglednica 4: Sestava gojišč za adventivno regeneracijo

Sestavine	Koncentracija v gojišču
Gojišče 1	
bazalno MS gojišče	1x (4,3)
saharoza	30 g/l
agar	8 g/l
BAP	1 mg/l
ABA	0,25 mg/l
Gojišče 2	
bazalno MS gojišče	1x (4,3)
saharoza	30 g/l
agar	8 g/l
BAP	2 mg/l
IAA	0,1 mg/l

3.3.2 Priprava fuzarične kisline in dodajanje gojišču

Zaradi hitrega razpadanja fuzarične kisline v raztopini, smo založno raztopino pripravljali v manjših količinah, ki smo jih takoj porabili. Izračunali smo, koliko fuzarične kisline potrebujemo za pripravo posameznega gojišča in glede na izračun zatehtali potrebno količino. Fuzarično kislino smo najprej raztopili v 2 ml 90 % etanola, nato pa dodali destilirano vodo do željenega volumna, da smo pripravili založno raztopino koncentracije 50 mg/100 ml. V brezprašni komori smo raztopino sterilizirali z uporabo sterilne filtracije. Pripravljeno gojišče za adventivno regeneracijo smo segreti, da se je zopet utekočinilo in ga do uporabe pustil v vodni kopeli segreti na 54°C. Posamezno smo posodice gojišča prenesli v brezprašno komoro, kjer smo s pipeto dodali raztopino fuzarične kisline v željeni količini. Gojišče smo dobro premešali in ga razlili v plastične petrijevke premera 90mm. Vedno smo pripravili tudi kontrolno gojišče brez fuzarične kisline.

Preglednica 5: Končne koncentracije FA v gojišču in količine založne raztopine, ki smo jo je bilo potrebno dodati 250 ml gojišča.

Koncentracija FA v gojišču (mg/l)	Dodatek založne raztopine v 250 ml gojišča (ml)
0	0
5	2,5
10	5
20	10
30	15
40	20

3.3.3 Priprava rastlinskih izsečkov

Pri pripravi kotiledonov smo uporabili postopek, kot so ga opisali Ananthkrishnan in sod. (2003), delo pa je potekalo v brezprašni komori. Najprej smo natančno pregledali posodice s sejanci, označili okužene primerke in jih zavrgli. Sejance, ki niso kazali znakov okužbe, smo s pinceto prenesli na sterilne papirnate pladnje. S pomočjo skalpela in pincete smo odstranili koreninice in skrajšali steblica, odstranili pa smo tudi ostanke semenske ovojnice, ki se je ponekod še držala kličnih listov. Tako očiščene pare kličnih listov smo ločili s skalpelom in odstranili tudi ostanke glavnega brsta, ki se je ponavadi držal enega izmed kotiledonov. Vsak kotiledon smo skrajšali na vrhnjem delu in če je bilo potrebno smo skrajšali tudi ostanek steblica, tako da smo dobili izsečke kot je prikazano na sliki 1, oblika št. 2, v poglavju 2.2.1.

3.3.4 Regeneracija in ocena uspešnosti

Pripravljene izsečke iz kličnih listov, smo naključno razporedili v petrijevke z različnimi gojišči za adventivno regeneracijo. V vsako petrijevko smo prenesli po tri izsečke in jih s pinceto na spodnjem koncu kotiledona rahlo pritisnili v gojišče. Zaprte petrijevke smo označili in jih obvili s parafilmom, s čimer smo preprečili, da bi se vsebina med časom poteka poskusa izsušila. Sledila je inkubacija izsečkov v rastni komori, pri 23°C in osvetlitvenem ciklu 16 svetlo, 8 ur tema, ki je trajala 3 tedne. Med tem časom smo redno spremljali razvoj in odstranjevali petrijevke v katerih so se pojavile okužbe.

Po 3 tednih smo vse neokužene kotiledone označili in z več parametri ocenili uspešnost regeneracije posameznega izsečka. Ocenili smo ali je prišlo do uspešne regeneracije kličnega lista, koliko poganjkov se je regeneriralo, ali so pognale korenine in kakšna je bila njihova dolžina, ali je prišlo do razvoja kalusa in kakšne barve je bil razviti kalus.

3.4 GOJENJE REGENERANTOV IN MERJENJE PLOIDNOSTI

Poganjke, ki so se regenerirali na izsečkih, je bilo potrebno prestaviti na novo gojišče, kjer so zrastle do zadostne velikosti, da smo jih lahko uporabili za nadaljnje raziskave. V ta namen smo regenerante gojili na elongacijskem gojišču, do primerne velikosti, nato pa smo izvedli merjenje ploidnosti posameznih primerkov.

3.4.1 Priprava elongacijskega gojišča

Namen elongacijskega gojišča je bilo gojenje regenerantov do primerne velikosti in povečanje njihove biomase, ki smo jo lahko uporabili za nadaljnje meritve. Elongacijsko gojišče smo pripravili iz Murashige & Skoog gojišča z dodatkom vitaminov, kateremu smo dodali saharozo, agar in rastlinski hormon BAP. Zatehtani količini MS gojišča in saharoze smo raztopili v destilirani vodi in s pipeto dodali hormon BAP iz založne raztopine. Dodali smo

destilirano vodo do željene količine in nato s pomočjo elektronskega pH metra umerili pH raztopine. Vrednost pH smo z dodajanjem 1 M KOH umerili na 5,8. Gojišče smo prelili v steklenico za avtoklaviranje in dodali agar. Avtoklaviranje je potekalo 15 minut pri 121°C. Toplo gojišče smo razlili v plastične banjice z vgrajenim filtrom za izmenjavo plinov in jih do uporabe hranili na sobni temperaturi v temi.

Preglednica 6: Sestava gojišča za elongacijo

Sestavine	Koncentracija v gojišču
MS gojišče z vitamini	1x (4,4)
saharoza	30 g/l
agar	8 g/l
BAP	0,1 mg/l

3.4.2 Priprava in subkultivacija regenerantov

Kotiledone, pri katerih je prišlo do uspešne regeneracije poganjkov smo v brezprašni komori predstavili na sterilizirane papirnate pladnje. S pomočjo pincete in skalpela smo poganjke odstranili od ostankov kličnega lista. V primeru, da je bilo več poganjkov zraščanih skupaj smo jih ločili in spodaj nekoliko prikrajšali, če je bil na njih prisoten kalus. Regenerante smo nato po 6 skupaj prenesli v banjice z gojiščem za elongacijo in jih rahlo zapičili v gojišče, da so ohranili pokončno lego. Vsak poganjek posebej smo tudi označili in zaprte banjice prenesli v rastno komoro. Inkubacija je potekala 3 tedne pri 23°C in osvetlitvenem ciklu 16 svetlo, 8 ur tema. V tem času so regeneranti pognali dovolj novih listov, da smo jih lahko uporabili za merjenje ploidnosti.

3.4.3 Priprava rastlinskega materiala za merjenje ploidnosti

Vsakemu regenerantu smo odrezali po en večji ali dva manjša lista. Peclje listov smo odstranili in uporabili le listne ploskve, ki smo jih vsako posebej prenesli v manjše plastične petrijevke. Dodali smo 1 ml pufra OTTO1 (Otto, 1990) in s pomočjo britvice zmacerirali rastlinski material. Vsebino petrijevke smo precedili skozi celično sito in tekoči del ujeli v epruvete primerne za uporabo na pretočnem citometru. Pred izvedbo meritev smo vsakemu vzorcu dodali še 2 ml pufra OTTO2.

3.4.4 Merjenje s citometrom

Vzorcem smo izmerili s pomočjo citometra in glede na zbrane podatke določili ploidnost vzorcev.

3.5 SEKUNDARNA REGENERACIJA PETIOL

Poskusili smo izvesti tudi sekundarno regeneracijo, pri kateri smo uporabili petiole regenerantov, ki smo jih dobili na regeneracijskem gojišču. Uporabili smo enako gojišče za adventivno regeneracijo kot predhodno za regeneracijo kličnih listov. Vse petiole smo gojili na gojiščih z dodatkom 10 mg/l fuzarične kisline. Regenerantom, ki so zrastle na elongacijskem gojišču, smo porezali liste in le tem nato odstranili listne ploskve. Listne peclje smo razrezali na dolžino 1,5 cm in jih po več skupaj prenesli na gojišče za adventivno regeneracijo v petrijevkah premera 90 mm. Pretrijevkesmo inkubirali 4 tedne pri 23°C in osvetlitvenem ciklu 16 svetlo, 8 ur tema.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 KALITEV

Pri procesu kalitve so nam največ težav povzročale okužbe, ki so nastale kot posledica slabo razkuženega semenskega materiala. Okužena semena so slabše kalila in tudi po kalitvi rastla počasneje od neokuženih sejancov. Opazili smo, da se pri semenu nekaterih proizvajalcev okužbe pojavljajo v večjem številu kot pri drugih. Razlog za to je lahko prisotnost večjega števila mikroorganizmov na nekaterih semenih, kar je posledica predhodne okuženosti rastlin in plodov ter načina in pogojev spravila semen. V primeru, da je na semenu prisotnih več mikroorganizmov, je možnost odstranitve vseh potencialnih kontaminantov med sterilizacijo manjša. Večje število okužb se je pri kalitvi pojavljalo tudi pri uporabi starejših semen v primerjavi z mlajšimi semeni. Ugotovili smo, da je najbolje uporabiti čimbolj nova semena, ki so bila pridelana v zadnji rastni sezoni, saj je delež kontaminiranih sejancov tako veliko manjši, kot pri uporabi starejših semen. Možna razlaga je, da so mikroorganizmi, ki povzročajo kontaminacije na starejših semenih prisotni že daljši čas in so lahko prodrli že globlje v seme, kjer jih sredstva za sterilizacijo semenskega materiala težje dosežejo in uničijo.

Druga težava, ki se je pojavljala med procesom kalitve je prav tako povezana s starostjo uporabljenega semenskega materiala. S starostjo seme izgublja sposobnost kalitve, zato se je pri uporabi starejših semen pojavil večji delež nekaljivih semen, ki so bila za nadaljevanje raziskave neuporabna. Starejša semena v primerjavi z novimi za kalitev potrebujejo tudi več časa in kalijo bolj neenakomerno, zato je težje izbrati čas, ko je večina sejancev primernih za nadaljevanje poskusa.

Ugotovili smo, da je z vidika pojavljanja okužb oziroma uspešnosti sterilizacije najbolje uporabiti semena, ki so bila pridelana v prejšnji rastni sezoni. Takšna semena tudi hitro in enakomerno kalijo, visok je tudi delež kaljivosti. Pri uporabi novih semen oljnih buč, smo kot optimalen čas kalitve določili 7-9 dni, saj v tem času večina sejancov doseže stopnjo, ko se klična lista začneta razpirati in zeleneti.



Slika 3: Sedem dni stari sejanci v plastičnih banjicah za kalitev, pripravljeni za odstranitev kotiledonov.

4.2 REGENERACIJA

4.2.1 Okužbe izsečkov kotiledonov

Tako kot pri procesu kalitve, so tudi med potekom regeneracije težave povzročale okužbe rastlinskega materiala. Večina kontaminacij je bila bakterijskega izvora, nekaj pa je bilo tudi glivnih, in so izhajale iz predhodno okuženih kotiledonov. Okuženi kotiledoni so hitro začeli propadati in niso kazali nobenih znakov regeneracije. V primeru, da je bil eden od kotiledonov v petrijevki okužen se je okužba preko gojišča hitro razširila tudi na druga dva izsečka in takšno petrijevko je bilo potrebno zavreči. Vse kontaminirane petrijevke smo ob odkritju okužbe sproti odstranjevali in jih nismo upoštevali pri zbiranju rezultatov in izračunih uspešnosti regeneracije.



Slika 4: Različne okužbe, ki so se razširile po gojišču in vidno propadanje izsečkov.

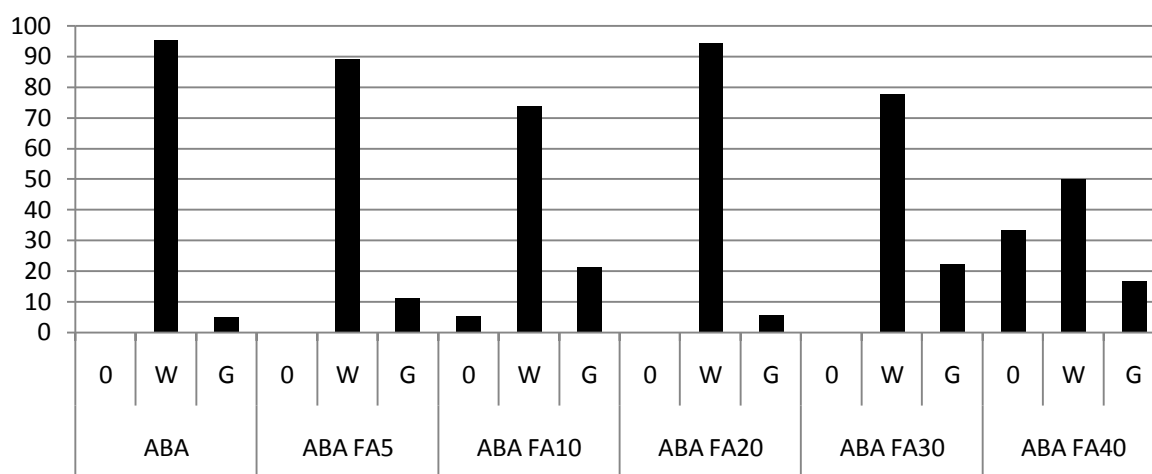
4.2.2 Uspešnost regeneracije na regeneracijskem gojišču 1 in 2

Gojišče za regeneracijo 1 je vsebovalo dva rastlinska hormona in sicer 1 mg/l BAP in 0,25 mg/l ABA. Gojišču so bile dodane različne koncentracije fuzarične kisline, tako da smo pridobili 6 različnih gojišč, enega brez FA in ostale s koncentracijami 5, 10, 20, 30, 40 mg/l. Na grafih v nadaljevanju je prikazana uspešnost regeneracije, ki smo jo ocenili z več parametri. Pregledali smo ali je na izsečkih nastal kalus in kakšne barve je bil, ali so se na izsečkih regenerirale korenine in kakšna je bila njihova dolžina in pri koliko izsečkih je prišlo do regeneracije poganjkov. Na gojišču 1 smo na koncu pridobili 128 izsečkov, ki so bili primerni za ocenjevanje uspešnosti regeneracije.

Regeneracijsko gojišče 2 se je od prvega razlikovalo po vsebnosti rastlinskih hormonov, saj je vsebovalo več hormona BAP in sicer 2 mg/l, namesto ABA pa je vsebovalo auksin IAA v koncentraciji 0,1 mg/l. Pripravljenih je bilo 5 različnih gojišč glede na vsebnost fuzarične kisline, kontrolno gojišče brez FA in gojišča s koncentracijami 10, 20, 30 in 40 mg/l FA. Uspešnost regeneracije je bila ocenjena z enakimi parametri kot pri gojišču 1. Za izvedbo ocene je bilo na koncu poskusa primernih 123 izsečkov, ki so ostali neokuženi. Na gojišču s 40 mg/l FA so vsi izsečki propadli, zato za to gojišče nismo imeli rezultatov za obdelavo.

4.2.3 Razvoj kalusa na izsečkih

Pri razvoju kalusa so bili na gojišču 1 zelo uspešni vsi izsečki ne glede na koncentracijo dodane fuzarične kisline. Od 128 izsečkov le 4 (3,1 %) niso razvili kalusa in sicer dva izsečka na gojišču z 10 mg/l FA in 2 izsečka na gojišču s 40 mg/l FA. Kot je razvidno iz slike 5 se je na večini izsečkov razvil kalus bele barve, zelen kalus pa je bil na različnih gojiščih prisoten na 5 do 22 odstotnih izsečkov. Kalus se je v največji meri razvil na spodnjem delu kotiledonov ob odrezanem stebclu, v nekaj primerih, pa je v manjših količinah nastal tudi na drugih delih izsečkov, predvsem tam, kjer je bilo tkivo kotiledonov poškodovano s pinceto ali skalpelom.

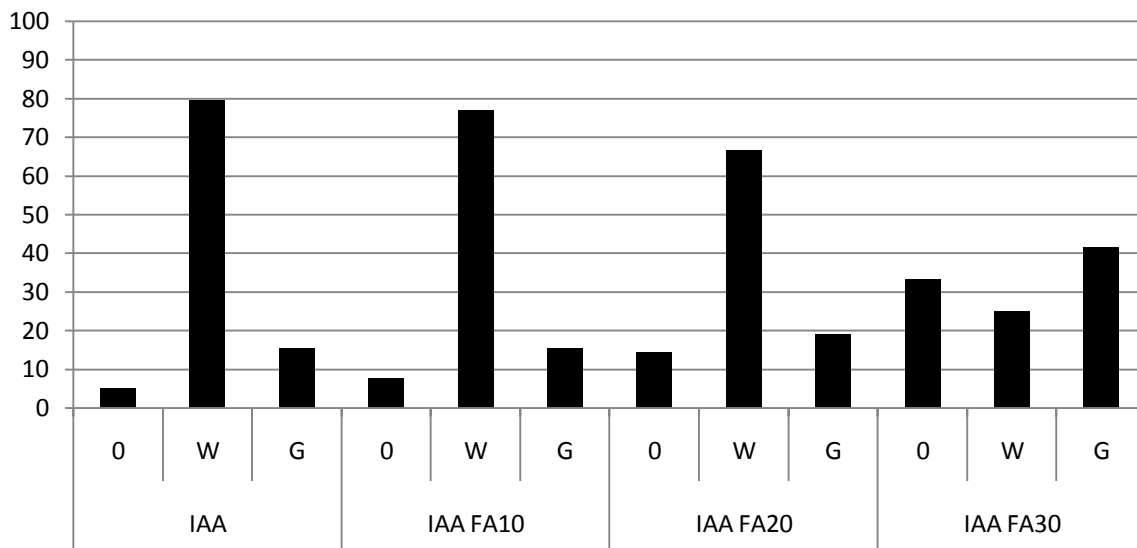


Slika 5: Razmerja med tipi regeneriranega kalusa na gojiščih s hormonom ABA in dodatkom 0, 5, 10, 20, 30 in 40 mg/l fuzarične kisline. 0 pomeni, da se kalus ni razvil, W predstavlja bel kalus, G pa zelen kalus.

Regeneracija kalusa je bila nekoliko manj uspešna na gojišču 2. Od 123 izsečkov jih 16 (13 %) ni razvilo kalusa. Tako kot na gojišču 1 tudi tukaj prevladuje kalus bele barve, razen na gojišču s koncentracijo 30 mg/l FA, kjer je več izsečkov razvilo zelen kalus. Pri tej koncentraciji se pojavi tudi največ izsečkov brez kalusa in sicer kar pri tretjini kotiledonov ni prišlo do regeneracije.

Če primerjamo obe gojišči, vidimo, da na regeneracijo kalusa, kot tudi na samo preživetje izsečkov koncentracije FA do 20 mg/l nimajo večjega vpliva, pri višjih koncentracijah pa se sposobnost razvoja kalusa zmanjša, veliko izsečkov pa tudi popolnoma propade. Raziskovalci, ki so se ukvarjali z regeneracijo različnih buč, v svojih poročilih ne navajajo veliko rezultatov glede sposobnosti regeneracije kalusa. Kathiravan in sod. (2006) poročajo, da je regeneracija kalusa odvisna od sorte buč in da različne sorte *C. pepo* regenerirajo različne količine kalusa, pri nekaterih sortah pa kalus sploh ne nastane, čeprav pride do regeneracije poganjkov. Kim in sod. (2010) so preučevali regeneracijo kotiledonov pri buči *Cucurbita ficifolia* in ugotovili, da višanje koncentracije hormonov BAP in zeatina do 5 mg/l

pozitivno vpliva na količino razvitega kalusa. Poročajo, da ima pozitiven učinek na razvoj kalusa tudi dodajanje 0,1 mg/l AgNO_3 v gojišče.

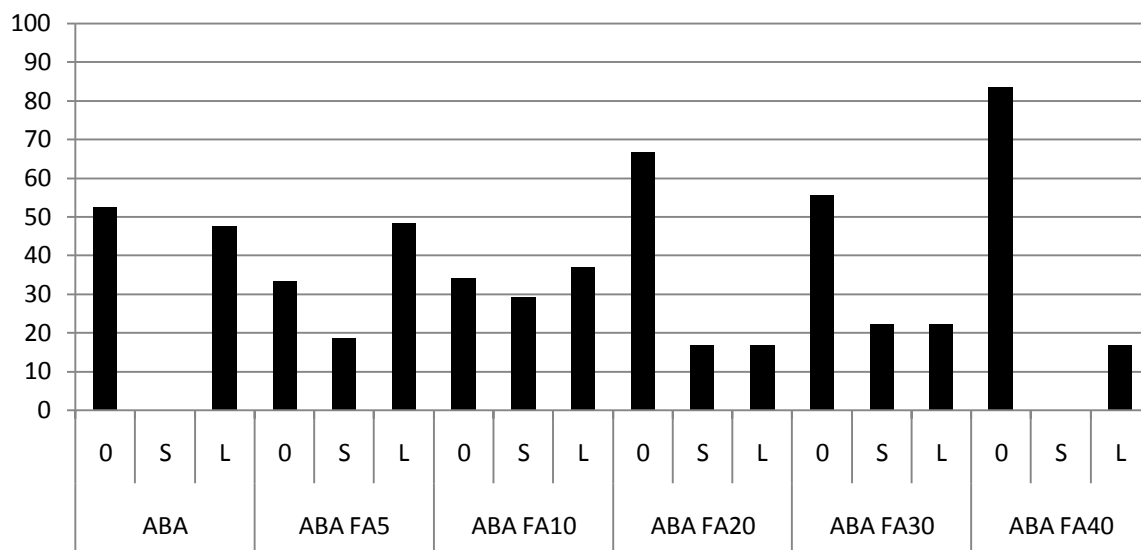


Slika 6: Razmerja med tipi regeneriranega kalusa na gojiščih s hormonom IAA in dodatkom 0, 10, 20 in 30 mg/l fuzarične kisline. 0 pomeni, da se kalus ni razvil, W predstavlja bel kalus, G pa zelen kalus.

4.2.4 Regeneracija korenin na izsečkih

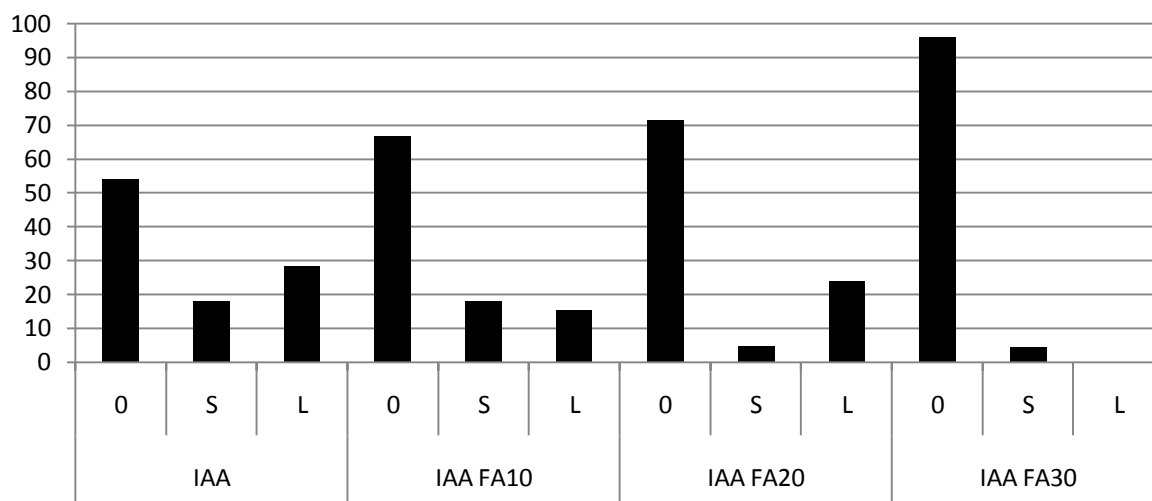
Izsečke smo glede na uspešnost regeneracije korenin razdelili v tri skupine in sicer na tiste brez korenin, s kratkimi koreninami, ki so bile dolge do 3 cm in na izseček z dolgimi koreninami, ki so merile več kot 3 cm.

Na gojišču 1 je pri vseh koncentracijah FA prišlo do regeneracije korenin. Na gojišču brez FA so se korenine pojavile pri 48 odstotkih izsečkov, vse korenine pa so spadale v kategorijo dolgih korenin. Najuspešnejša regeneracija korenin je potekala na gojiščih z dodatkom 5 in 10 mg/l FA, kjer je bilo brez korenin le 34 odstotkov izsečkov. Na obeh gojiščih so prevladovala dolge korenine. Z višanjem koncentracije FA se je delež regeneriranih korenin zmanjševal, število kratkih in dolgih korenin pa je bilo zelo izenačeno. Pri najvišji koncentraciji FA 40 mg/l so korenine zrasle le pri enem izsečku.



Slika 7: Razmerja med dolžinami regeneriranih korenin na gojiščih s hormonom ABA in dodatkom 0, 5, 10, 20, 30 in 40 mg/l fuzarične kisline. 0 pomeni, da se korenine niso razvile, S predstavlja kratke korenine, L pa dolge korenine.

Gojišče 2 je bilo pri regeneraciji korenin na splošno nekoliko manj učinkovito pri vseh koncentracijah FA. Rast korenin je bila najuspešnejša na gojišču brez dodane FA, kjer so se korenine pojavile pri 46 odstotkih izsečkov, glede na dolžino pa so za 10 % prevladovale dolge korenine. Z višanjem vsebnosti FA v gojiščih je uspešnost regeneracije korenin upadala, tako, da so na gojišču s 30 mg/l FA korenine nastale le pri enem izsečku od 24.



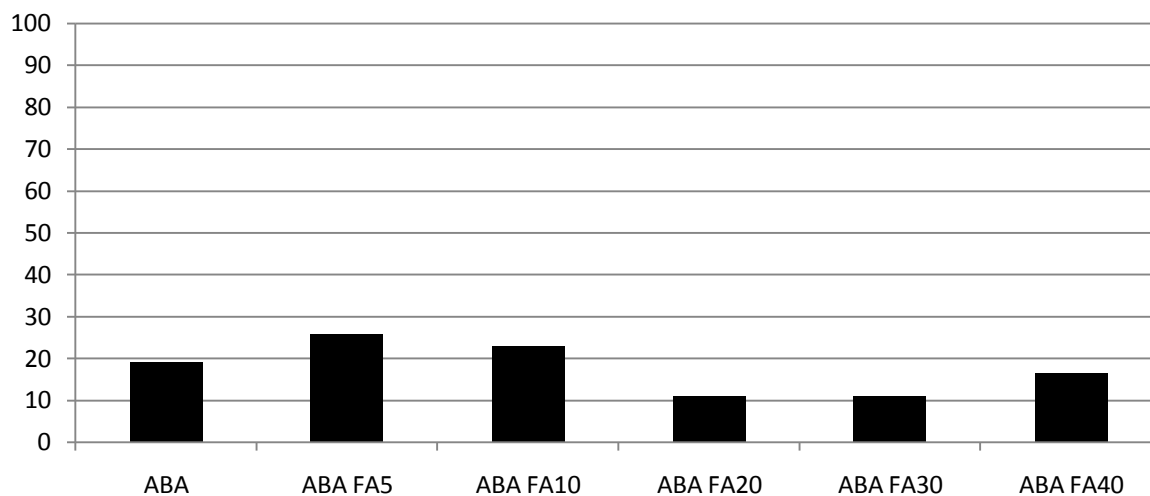
Slika 8: Razmerja med dolžinami regeneriranih korenin na gojiščih s hormonom IAA in dodatkom 0, 10, 20 in 30 mg/l fuzarične kisline. 0 pomeni, da se korenine niso razvile, S predstavlja kratke korenine, L pa dolge korenine.

Pri primerjavi obeh gojišč lahko opazimo, da so na gojiščih brez FA ne glede na vsebnost hormonov korenine zrasle pri zelo podobnem deležu izsečkov, na gojiščih s FA pa je bila regeneracija slabša na gojišču s hormonom IAA. Iz rezultatov lahko razberemo, da višje koncentracije FA zavirajo razvoj korenin ne glede na vrsto hormonov v gojiščih. Glede dolžine korenin, je razmerje med dolgimi in kratkimi koreninami precej izenačeno, večinoma pa nekoliko prevladujejo dolge korenine. Na podlagi zbranih rezultatov, bi težko zaključili, da je dolžina odvisna od uporabljenih hormonov ali od prisotnosti fuzarične kisline, bolj verjetno pa je, da je dolžina odvisna od hitrosti in sposobnosti izsečka za regeneracijo in so korenine zrasle daljše pri izsečkih, ki so z regeneracijo začeli v krajšem času.

4.2.5 Uspešnost regeneracije poganjkov

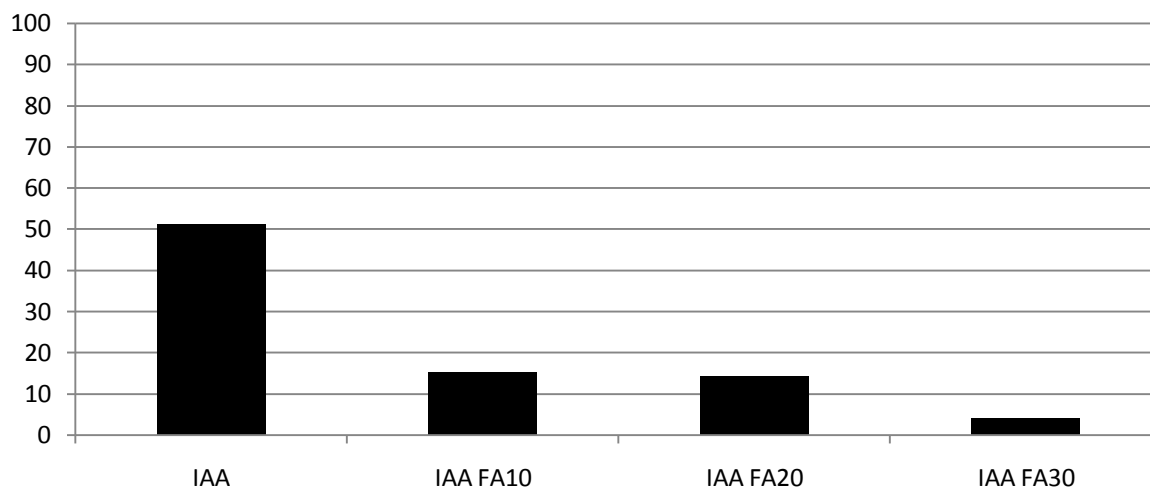
Uspešnost regeneracije poganjkov, smo ovrednotili na dva načina in sicer glede na delež kotiledonov, pri katerih je prišlo do razvoja poganjkov in na število poganjkov, ki so se regenerirali na posameznem kotiledonu. Iz primerjave gojišč ne glede na vsebnost fuzarične kisline, smo ugotovili, da je regeneracija uspešnejša na drugem gojišču s hormonom IAA. Na tem gojišču je do regeneracije poganjkov prišlo pri 25 odstotkih izsečkov, medtem ko so se na gojišču z ABA poganjki pojavili pri 19 odstotkih izsečkov. Mnogo bolj uspešna je bila tudi regeneracija na drugem gojišču brez dodane FA.

Kot je razvidno iz slike 9 je bila na gojišču 1 brez dodatka FA regeneracija uspešna pri 19 % izsečkov, najuspešnejša pa je bila pri dodatku 5 mg/l FA, kjer je dosegla 26 odstotno uspešnost. Z višanjem koncentracije FA se je delež izsečkov z regeneriranimi poganjki zmanjševal in tako pri dodatku 20 in 30 mg/l FA dosegel le 11 %. Pri dodatku 40 mg/l fuzarične kisline se delež regenerantov poveča na 17 % vendar je zvišanje uspešnosti posledica majhnega števila preživelih izsečkov pri tej koncentraciji FA. Za ocenjevanje je namreč preživelo le 6 kotiledonov in pri enem od njih je prišlo do regeneracije poganjka.



Slika 9: Deleži izsečkov na katerih je prišlo do uspešne regeneracije poganjkov za posamezna gojišča. Osnovno gojišče z ABA brez FA in gojišča z ABA in dodatkom 5, 10, 20, 30 in 40 mg/l FA.

Tudi na drugem gojišču uspešnost regeneracije poganjkov pada z zviševanjem koncentracije fuzarične kisline v gojišču. Na gojišču z IAA brez dodatka FA je prišlo do regeneracije poganjkov kar pri 51 % kotiledonov. Z dodajanjem 10 mg/l FA se je uspešnost močno znižala, na dobrih 15 %, pri vsebnosti 30 mg/l FA v gojišču pa je regeneracija poganjkov uspela le pri 4 odstotkih izsečkov.

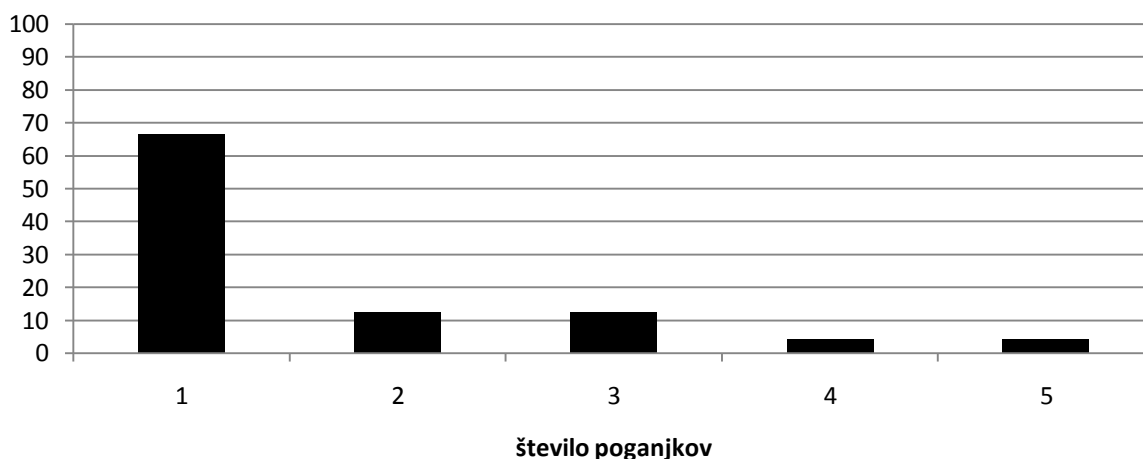


Slika 10: Deleži izsečkov na katerih je prišlo do uspešne regeneracije poganjkov za posamezna gojišča. Osnovno gojišče z IAA brez FA in gojišča z IAA in dodatkom 10, 20 in 30 mg/l FA.

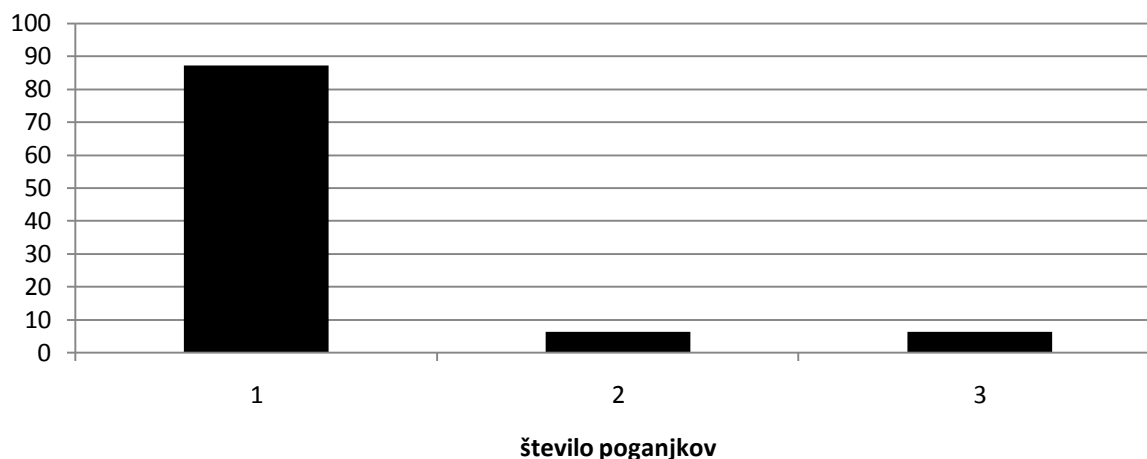
Če primerjamo obe uporabljeni gojišči, je pri gojiščih brez dodane FA, kot že omenjeno, mnogo bolj uspešno gojišče 2, saj je bil odstotek regeneracije višji za kar 32 %. Pri primerjavi

gojišč z dodatkom FA so si rezultati ne glede na dodane hormone zelo podobni in bi težko zaključili, da je katero od gojišč uspešnejše od drugega. Z optimizacijo gojišča za regeneracijo poganjkov so se pri svojem delu ukvarjali Abrie in sod. (2001), vendar jim pri 3 različnih sortah buč *C. maxima* in *C. pepo* ni uspelo pridobiti poganjkov ne glede na spreminjanje koncentracije hormonov BAP in IAA v gojišču. Ananthkrishnan in sod. (2003) so ravno tako preizkušali sposobnost regeneracije večih sort *C. pepo* in na osnovnem MS gojišču z dodatkom BAP dobili pozitivne rezultate. Odvisno od preizkušane oblike izsečkov jim je uspelo regenerirati poganjke pri 63 do 88 odstotkih kotiledonov, kar je dosti boljše, kot v našem primeru, sploh v primerjavi z uspešnostjo regeneracije na gojišču 1. Zhang in sod. (2008) so izvedli uspešno regeneracijo poganjkov pri *C. moschata* in poročajo o vplivu starosti izsečkov na sposobnost regeneracije in o pomenu optimalne koncentracije BAP v regeneracijskem gojišču.

Grafa na slikah 11 in 12 prikazujeta razmerje števila poganjkov, ki so se razvili na posameznih izsečkih. Na gojišču 1 so se poganjki razvili na 24 izsečkih, na gojišču 2 pa na 31 izsečkih. V največ primerih smo na obeh gojiščih dobili po en poganjek na izseček. Na gojišču 1 smo v 12 % dobili tudi po dva in po 3 poganjke na izseček, v dveh primerih pa se je regeneriralo po 4 in po 5 poganjkov. Pri drugem gojišču se je v kar 87 % regeneriral samo en poganjek, v dveh primerih sta se regenerirala 2 poganjka v dveh pa 3 poganjki. Za obe gojišči velja, da so bili izsečki z regeneriranim večjim številom poganjkov gojeni na gojiščih z nizko vsebnostjo dodane FA, pri višjih koncentracijah FA pa se je vedno regeneriral le en poganjek.



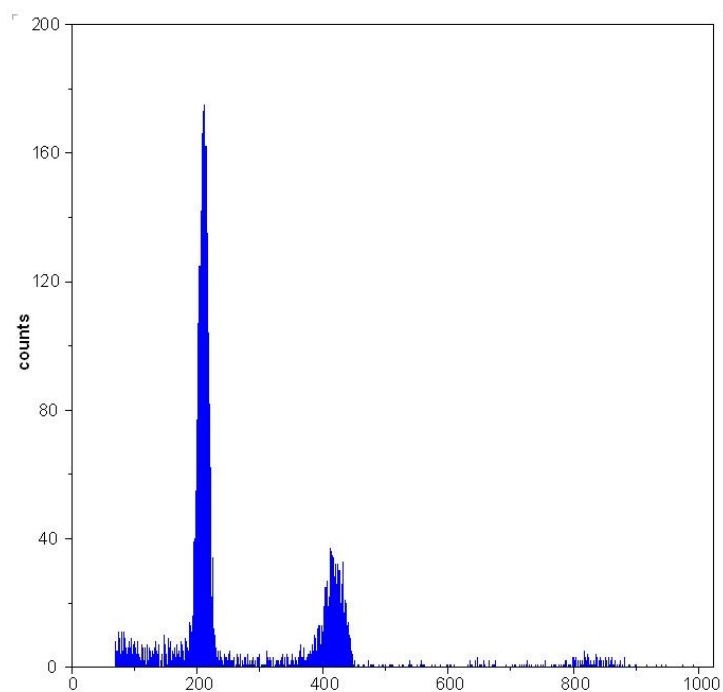
Slika 11: Razmerje izsečkov glede na število regeneriranih poganjkov na posameznem izsečku za gojišče z BAP in ABA.



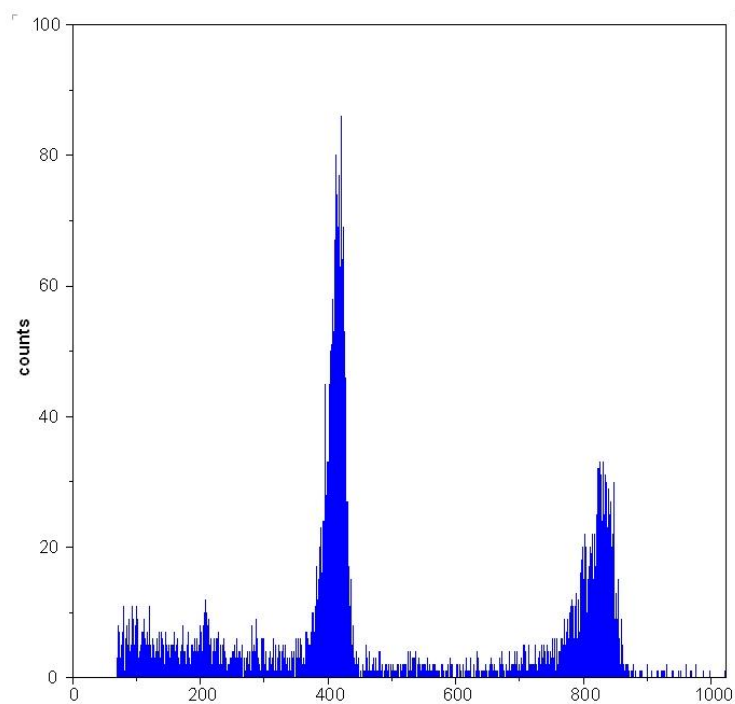
Slika 12: Razmerje izsečkov glede na število regeneriranih poganjkov na posameznem izsečku za gojišče z BAP in IAA.

4.3 MERJENJE PLOIDNOSTI

Ploidnost regenerantov smo merili s pomočjo pretočnega citometra in na podlagi grafičnega prikaza izmerjenih vrhov določili ploidnost vzorca. Skupno smo pridobili 55 regenerantov, od katerih sta dva propadla med procesom elongacije. Iz preostalih regenerantov smo pripravili vzorce in sicer 23 vzorcev iz regeneracijskega gojišča 1 in 30 vzorcev iz regeneracijskega gojišča 2. Vseh 30 regenerantov, ki smo jih pridobili na gojišču z BAP in IAA je bilo diploidnih. Med 23 regeneranti, ki smo jih pridobili iz gojišča z BAP in ABA smo odkrili 2 tetraploida. Skupno je tako delež nastalih tetraploidov predstavljal 4 % regenerantov. Oba tetraploida sta se regenerirala na gojišču z dodatkom 10 mg/l FA, kar potrjuje tudi lastnost fuzarične kisline, da zavira celično proliferacijo.



Slika 13: Analizni graf pretočnega citometra, iz katerega vidimo diploidnost vzorca glede na lokacijo prvega vrha.



Slika 14: Analizni graf pretočnega citometra, iz katerega vidimo tetraploidnost vzorca glede na lokacijo prvega vrha.



Slika 15: Regeneranta pridobljena na gojišču z dodatkom 30 mg/l FA pred gojenjem na elongacijskem gojišču.

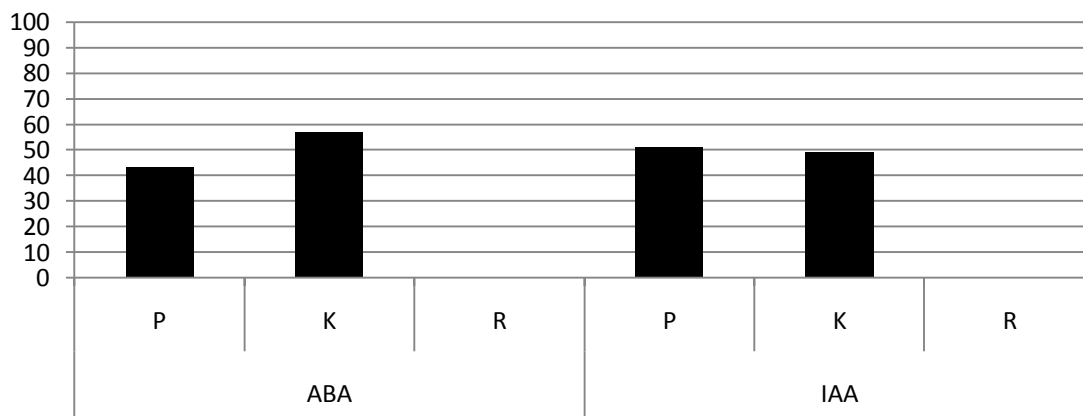


Slika 16: Tetraploidni regenerant.

4.4 REGENERACIJA PETIOL

Na gojišču s hormonom IAA smo 3 tedne v petrijevkah gojili 112 izsečkov petiol, na gojišču z ABA pa 98 izsečkov petiol. V času regeneracije so nekatere petiole propadle, kar je bilo v nekaterih primerih posledica okužb, pri ostalih pa bi bil lahko razlog za propad prenizka razvitost tkiva ob pripravi izsečkov, saj so bile uporabljene vse petiole, tudi od nerazvitih listov. Na gojišču z IAA je propadlo 57 (51 %) petiol, na gojišču z ABA pa 42 (43 %) petiol. Na preostalih petiolah se je pri obeh gojiščih po okoli 14 dneh gojenja začel na odrezanih koncih razvijati kalus zelene barve, ki je v enem tednu zrastel na 2-kratno debelino petiol. Po

treh tednih se je vsa rast ustavila in pri nadaljnem gojenju na nobeni od petiol ni prišlo do regeneracije poganjkov.



Slika 17: Razmerja med petiolami, na gojiščih s hormonoma ABA in IAA. P predstavlja propadle petiole, K petiole, ki so razvile kalus in R petiole, pri katerih je prišlo do regeneracije.

Uspešna regeneracija poganjkov iz listnih pecljev, bi lahko služila kot osnova za razvoj metode, ki nebi temeljila na uporabi kličnih listov. Regenerante, bi tako lahko pridobivali tudi iz odraslih rastlin ali iz poganjkov gojenih v tkivni kulturi.

O uspešni regeneraciji poganjkov iz petiol poročajo Jeyakumar in sod. (2014), ki so iz petiol najprej pridobili kalus in ga nato prenesli na drugo gojišče za regeneracijo poganjkov iz kalusa. Za uspešnejšo regeneracijo kalusa, so uporabili kombinacijo hormonov BAP in višjo koncentracijo auksina NAA, za razliko od naših gojišč z auksinom IAA in abscizinsko kislino. Poročajo tudi, da je za regeneracijo poganjkov uspešnejša kombinacija hormonov TDZ in NAA kot kombinacija BAP in NAA.



Slika 18: Nastanek kalusa na petiolah po 3 tednih regeneracije na gojišču s hormonom ABA in 10 mg/l FA.

5 SKLEPI

V raziskavi smo preverili uspešnost regeneracije poganjkov iz izsečkov kličnih listov oljne buče *Cucurbita pepo* L. ssp. *pepo* var. *styriaca* Greb. Preverili smo tudi vpliv različnih koncentracij fuzarične kisline na sposobnost regeneracije izsečkov in na spremembo ploidnosti regeneriranih poganjkov.

Za potrebe ocenjevanja uspešnosti regeneracije nam je uspelo ob koncu regeneracijskega obdobja pridobiti 251 zdravih izsečkov primernih za ocenjevanje. Izsečke smo gojili na dveh regeneracijskih gojiščih, 128 izsečkov je bilo gojenih na gojišču s hormonoma ABA in BAP, 123 pa na gojišču s hormonoma IAA in BAP. Obe gojišči sta bili pripravljene tudi z vsebnostjo različnih koncentracij FA.

Uspešnost regeneracije smo ocenjevali na podlagi regeneracije kalusa, regeneracije korenin in regeneracije poganjkov. Če pogledamo uspešnost regeneracije na splošno, je najbolj uspešna regeneracija kalusa, ki je nastal pri skoraj vseh izsečkih. Rast korenin je bila večinoma odvisna od koncentracije FA in lahko bi zaključili, da višje koncentracije kisline znižujejo sposobnost regeneracije korenin. Izjema se je pokazala le pri nižjih koncentracijah FA (5 in 10 mg/l) na gojišču s hormonom ABA, kjer je bila regeneracija korenin boljša kot na kontrolnem gojišču brez FA. Enak pojav opazimo tudi pri regeneraciji poganjkov, ki so se v kombinaciji ABA in nizke koncentracije FA regenerirali bolje kot na gojišču z ABA brez FA. O pozitivnem učinku nižjih koncentracij FA na regeneracijo poročajo tudi Košmrlj in sod. (2015), ki so največ regenerantov na posamezni izseček dobili pri dodatku 10 mg/l FA. Za uporabo pri postopkih žlahtnjenja je najpomembnejša prav regeneracija poganjkov, za katero lahko zaključimo, da je najbolje uspela na gojišču s hormonoma IAA in BAP, v prisotnosti fuzarične kisline, pa je bila regeneracija na vseh gojiščih precej nizka in bi bilo potrebno metodo za uspešno nadaljnjo uporabo nekoliko izboljšati. Preizkusiti bi bilo potrebno druge kombinacije hormonov saj Kim in sod. (2010) naprimer poročajo o boljši regeneraciji poganjkov pri uporabi hormonov zeatin in IAA, Kathiravan in sod. (2006) ter Zhang in sod. (2008) pa so visok odstotek regeneracije dobili na osnovnem MS gojišču z dodatkom BAP.

Merjenje ploidnosti, ki je potekalo s pomočjo pretočnega citometra, je zajemalo skupno 53 vzorcev. Večina pridobljenih regenerantov je bila diploidnih, uspelo pa nam je pridobiti tudi dva tetraploidna regeneranta (4 %). Oba tetraploidna poganjka sta se regenerirala na gojišču s hormoni BAP in ABA z dodatkom 10 mg/l fuzarične kisline. Nastanek tetraploidov na gojiščih z nižjo koncentracijo FA je bil pričakovan, saj fuzarična kislina deluje tudi kot inhibitor proliferacije. Ploidnost regenerantov oljnih buč so raziskovali tudi Košmrlj in sod. (2015) in pri svojem delu dobili podobne rezultate. Poročajo, da so med 205 vzorci odkrili 6 tetraploidov, vsi pa so se regenerirali ob prisotnosti 10 ali 20 mg/l FA v gojišču.

Pri drugem delu raziskave nismo dobili pozitivnih rezultatov, saj regeneracija poganjkov iz petiol ni bila uspešna. Od skupno 110 petiol, ki smo jih pridobili iz regenerantov, jih je med regeneracijo 99 propadlo, na ostalih pa se je uspešno razvila večja količina zelenega kalusa. Rast kalusa na gojiščih z 10 mg/l FA lahko potrdi odpornost ali toleranco celic na fuzarično kislino, nemoremo pa govoriti o pridobitvi odpornejših rastlin, saj bi bilo v primeru razvoja poganjkov le te potrebno preizkusiti na odpornost s patogeno glivo. Kot poročajo Matsumoto in sod. (2010) se lahko odpornost in vitro kulture in odpornost rastline razlikujeta in nista nujno povezani, oziroma regenerirana rastlina iz odporne kulture ni odporna na dejansko okužbo z glivo *Fusarium*. Jeyakumar in sod. (2014), ki so se ukvarjali z regeneracijo poganjkov iz petiol, poročajo o uporabi drugih hormonov in dvostopenjski metodi, pri kateri so kalus prenesli na gojišče s hormonoma TDZ in NAA. Za boljše rezultate in uspešnejše nadaljevanje raziskave bi morali izboljšati metodo sekundarne regeneracije.

6 POVZETEK

Razvoj metod, ki se uporabljajo pri žlahtnjenju buč, je pomemben zaradi velikega obsega proizvodnje le teh v svetovnem merilu. Pri bučah se kot hrana in krma lahko uporabljajo celi plodovi ali pa le semena. V našem prostoru je pomembna pridelava oljne buče, pri kateri se uporabljajo semena za izdelavo bučnega olja. Glavna lastnost oljnih buč je, da imajo semena brez semenske lupine, kar močno olajša postopek predelave v olje. Večina danes gojenih sort buč je občutljivih na okužbo s patogeno glivo *Fusarium*, ki povzroča fuzarično uvelost, gnilobo koreninskega vratu in gnitje plodov. Med pomembnejše toksine, ki jih med procesom okužbe uporablja gliva, sodi tudi fuzarične kislina.

Zaradi potreb hitrega razvoja in napredka pri pridobivanju novih, odpornejših sort, se vse več pozornosti namenja novejšim, in vitro tehnikam žlahtnjenja. V naši raziskavi smo združili metodo in vitro selekcije in regeneracije poganjkov in rastlinskega tkiva. Pri in vitro selekciji je pomembna genetska raznolikost rastlinskega materiala, kar smo dosegli z uporabo izsečkov kličnih listov, z raznovrstnim genotipom, dodatno pa se je raznolikost povečala zaradi somaklonske variabilnosti. Selekcijo smo izvajali s pomočjo fuzarične kisline, ki dodatno deluje na spremembo genetskega materiala. Namen raziskave je bil potrditev sposobnosti regeneracije poganjkov oljne buče iz kličnih listov in določitev vpliva fuzarične kisline na uspešnost regeneracije ter ploidnost regenerantov.

Na dveh različnih regeneracijskih gojiščih, z vsebnostjo različnih rastlinskih hormonov nam je uspelo uspešno pridobiti regenerante iz izsečkov kličnih listov. Regeneracija poganjkov, je bila najbolj uspešna ga gojišču s hormonoma IAA in BAP brez FA. Kot pričakovano, je dodatek fuzarične kisline negativno vplival na uspešnost regeneracije, razen v nizkih koncentracijah 5 in 10 mg/l, ko se je odstotek regeneracije nekoliko povešal glede na kontrolno gojišče brez FA. Pri višjih koncentracijah FA, je bila regeneracija slabša, preživelo pa je tudi veliko manj izsečkov. Z merjenjem ploidnosti celic regenerantov, smo potrdili tudi mutageni vpliv fuzarične kisline, oziroma njen vpliv na celično proliferacijo. Med 53 regeneranti, ki so bili primerni za merjenje ploidnosti, smo našli dva tetraploida, kar pomeni, da so tetraploidni 4 % pridobljenih regenerantov.

7 VIRI

- Abrie A.L., Staden J. 2001. Development of regeneration protocols for selected cucurbit cultivars. *Plant Growth Regulation*, 35: 263-267
- Agrosaat, sorte in hibridi oljnih buč.
http://www.agrosaat.si/Sorte_in_hibridi,123,0.html (maj 2015)
- Ananthkrishnan G., Xia X., Elman C., Singer S., Paris H.S., Gal-On A., Gaba V. 2003. Shoot production in squash (*Cucurbita pepo*) by in vitro organogenesis. *Plant Cell Reproduction*, 21: 739-746
- Desjardins A.E., Proctor R.H. 2007. Molecular biology of *Fusarium* mycotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 47-50
- Edel-Hermann V., Gautheron N., Mounier A., Steinberg C. 2015. *Fusarium* diversity in soil using a specific molecular approach and a cultural approach. *Journal of Microbiological Methods*, 111: 64-71
- Gerlagh M., Blok W.J. 1988. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucurbitacearum* n.f. embracing all formae speciales of *F. oxysporum* attacking cucurbitaceous crops. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 94: 17-31
- Jeyakumar J.J., Kamaraj M., Thiruvengadam M. 2014. Efficient plant regeneration from petiole explants of west indian gherkin (*Cucumis anguria* L.) via indirect organogenesis. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 23, 3: 307-315
- Kathiravan K., Vengedesan G., Singer S., Steinitz B., Paris H.S., Gaba V. 2006. Adventitious regeneration in vitro occurs across a wide spectrum of squash (*Cucurbita pepo*) genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85: 285-295
- Kim K.-M., Kim C.K., Han J.-S. 2010. In vitro regeneration from cotyledon explants in figleaf gourd (*Cucurbita ficifolia* Bouche) a rootstock for Cucurbitaceae. *Plant Biotechnology Reports*, 4: 101-107
- Košmrlj K., Murovec J., Bohanec B. 2013. Haploid induction in hull-less seed pumpkin through parthenogenesis induced by x-ray-irradiated pollen. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 138, 4: 310-316

- Košmrlj K., Kastelec D., Bohanec B. 2014. Styrian oil pumpkin pollen germinability at higher irradiation doses: optimization of the in vitro germination protocol and irradiation procedure. *Turkish Journal of Biology*, 38: 516-522
- Košmrlj K., Kladnik A., Bohanec B. 2015. Adventitious regeneration in styrian oil pumpkin in relation to the endoreduplication pattern and induced tertaploidy on fusaric acid-supplemented media. *Plant Growth Regulation*, 75, 3, 587-594
- Labeda A., Švabova L. 2010. In vitro screening methods for assessing plant disease resistance. V: Mass screening techniques for selecting crops resistant to diseases. Vienna, International Atomic Energy Agency: 5-45
- Lee Y.K., Chung W.I., Ezura H. 2003. Efficient plant regeneration via organogenesis in winter squash (*Cucurbita maxima* Dutch.). *Plant Science*, 164: 413-418
- Matsumoto K., Barbosa M.L., Souza L.A.C., Teixeira J.B. 2010. In vitro selection for resistance to fusarium wilt in banana. V: Mass screening techniques for selecting crops resistant to diseases. Vienna, International Atomic Energy Agency: 101-113
- MeSH - Medical subject headings. PubMed vocabulary
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68005669> (maj 2015)
- Murashige T., Shoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497
- Murovec J., Drašlar K., Bohanec B. 2012. Detailed analysis of *Cucurbita pepo* seed coat types and structures with scanning electron microscopy. *Botany*, 90: 1161-1169
- Nanasato Y., Kanagaya K., Okuzaki A., Tsuda M., Tabei Y. 2011. *Agrobacterium*-mediated transformation of kabocha squash (*Cucurbita moschata* Duch) induced by wounding with aluminium borate whiskers. *Plant Cell Reports*, 30: 1455-1464
- Nanasato Y., Okuzaki A., Tabei Y. 2013. Improving the transformation efficiency of cucurbita species: factors and strategy for practical application. *Plant Biotechnology*, 30: 287-294
- Nguyen H.M., Smirnov V.A., Kien T.T., Balashova N.N. 1992. Somaclonal variation induced by fusaric acid. *Genetika*, 28, 8: 113-120
- Otto F. 1990. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. V: *Methods in Cell Biology*. New York, Academic Press: 105-110

- Schaffer A.A., Paris H.S. 2003. Melons, squashes and gourds. V: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Caballero B. (ed.). New York, Academic Press: 3817-3826
- Shah P., Singh N.K., Khare N., Rathore M., Anandhan S., Arif M., Singh R.K., Das S.C., Ahmed Z., Kumer N. 2008. *Agrobacterium* mediated genetic transformation of summer squash (*Cucurbita pepo* L. cv. Australian green) with *cbf-1* using a two vector system. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 95: 363-371
- Teppner H. 2000. *Cucurbita pepo* (*Cucurbiteceae*) – History, seed coat types, thin coated seeds and their genetics. Phytion Annals rei Botanicae, 40: 1-42
- Venter S.L., Steyn P.J., Steyn H.S.F. 1996. Production of fusaric acid by *Fusarium oxysporum*. Potato Research, 39: 79-84
- Zitter T.A. 1998. Fusarium diseases of cucurbits. Vegetable Crops. Cornell University, Department of plant pathology. Ithaca.
http://vegetablemdonline.ppath.cornell.edu/factsheets/Cucurbits_Fusarium.htm (maj, 2015)

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Borutu Bohancu, ki mi je omogočil izvedbo raziskave in izdelavo magistrskega dela ter za vso pomoč in nasvete pri raziskavi in pisanju.

Hvala Kristini Košmrlj in ostalim zaposlenim na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin za nasvete in pomoč pri izvedbi raziskovalnega dela.

Zahvaljujem se tudi svoji družini in sestrični Ani, ki so me podpirali in spodbujali skozi vsa leta študija biotehnologije.