

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Ester STAJIČ

MANIPULIRANJE PLOIDNOSTI PRI BUČKAH
(*Cucurbita pepo* L.)

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Ester STAJIČ

MANIPULIRANJE PLOIDNOSTI PRI BUČKAH
(*Cucurbita pepo* L.)

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

MANIPULATION OF PLOIDY IN ZUCCHINI
(*Cucurbita pepo* L.)

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije. Laboratorijsko delo je bilo opravljeno v prostorih Katedre za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin na Oddelku za agronomijo, Biotehniška fakulteta. Za mentorico je bila imenovana doc. dr. Jana Murovec, za recenzenta pa doc. dr. Aleš Kladnik.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednica: prof. dr. Branka Javornik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: doc. dr. Jana Murovec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Aleš Kladnik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum predstavitve:

Podpisana 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.

Podpis kandidatke:

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

- ŠD Du2
- DK UDK 635.62:631.528(043.2)
- KG žlahtnjenje rastlin/indukcija haploidov/bučke/*Cucurbita pepo*/podvajanje genoma/adventivna regeneracija
- AV STAJIČ, Ester, dipl. bioteh. (UN)
- SA MUROVEC, Jana (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
- LI 2015
- IN MANIPULIRANJE PLOIDNOSTI PRI BUČKAH (*Cucurbita pepo* L.)
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
- OP X, 41 str., 14 pregl., 7 sl., 42 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Razvili smo protokol za indukcijo haploidov in podvajanje genoma pri bučkah, kmetijsko pomembni vrsti družine bučevk. Za indukcijo haploidov smo uporabili opraševanje s pelodom, obsevanim z X žarki, ter *in vitro* reševanje nedozorelih embrijev. Pridobili smo 97 plodov iz 153 cvetov, opršenih s pelodom, obsevanim z dozami od 300 do 600 Gy. Ploidnost smo določili s pomočjo pretočne citometrije pri 21 od 122 izoliranih embrijev, od teh sta bila 2 haploida in ostali diploidi. Diploidne regenerante smo testirali s pomočjo mikrosatelitnih markerjev, da bi preverili njihovo potencialno homozigotnost zaradi spontanega podvajanja kromosomov. V naših poskusih nismo potrdili spontanega podvajanja kromosomov pri diploidnih regenerantih. Tetraploidnost smo inducirali preko adventivne regeneracije izsečkov kotiledonov na Murashige in Skoog (MS) gojišču, kateremu smo dodali 1 mg l^{-1} 6-benzilaminopurina (BAP), 30 g l^{-1} saharoze, $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ N^6 -[2-izopentenil]-adenina (2iP) ali $0,25 \text{ mg l}^{-1}$ para-aminobenzojske kisline (PABA) ter dve različni koncentraciji (10 ali 20 mg l^{-1}) fuzarične kisline (FA). Potrdili smo podvajanje genoma pri 5 od 287 regeneriranih rastlin. Odstotek izsečkov z regeneranti je obsegal od 28,41 do 36,26 %. Največje število regenerantov na izseček (1,56) smo zasledili na MS gojišču z $0,25 \text{ mg l}^{-1}$ PABA in 20 mg l^{-1} FA, medtem ko je bilo na MS gojišču z $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ 2iP in 10 mg l^{-1} FA najmanjše število (0,84) regenerantov na izseček. Tetraploidne regenerante smo kasneje aklimatizirali in uspešno križali z diploidnimi rastlinami, da smo pridobili triploidno seme, vendar ta niso kalila.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

- ND Du2
- DC UDC 635.62:631.528(043.2)
- CX plant breeding/haploid induction/zucchini/*Cucurbita pepo*/genome doubling/adventitious regeneration
- AU STAJIČ, Ester
- AA MUROVEC, Jana (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Biotechnology
- PY 2015
- TY MANIPULATION OF PLOIDY IN ZUCCHINI (*Cucurbita pepo* L.)
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
- NO X, 41 p., 14 tab., 7 fig., 42 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB We developed a protocol for haploid induction and genome doubling in zucchini, an economically important species of the Cucurbitaceae family. For haploid induction we used pollination with X-ray irradiated pollen and *in vitro* embryo rescue. We obtained 97 fruits from 153 flowers pollinated with pollen irradiated with doses from 300 to 600 Gy. Ploidy level was determined using flow cytometry in 21 out of 122 isolated embryos, of which 2 were haploid and the remainder diploid. Diploid regenerants were tested by simple sequence repeat (SSR) marker analysis to reveal their potential homozygous status. No spontaneous chromosome doubling could be confirmed in our experiments. We induced tetraploidy through adventitious regeneration from cotyledonary explants on media based on Murashige in Skoog (MS) supplemented with 1 mg l⁻¹ 6-benzylaminopurine (BAP), 30 g l⁻¹ sucrose, 0,5 mg l⁻¹ N6-[2-isopentenyl]-adenine (2iP) or 0,25 mg l⁻¹ p-aminobenzoic acid (PABA) and two different concentrations (10 or 20 mg l⁻¹) of fusaric acid (FA). We confirmed genome doubling in 5 out of 287 regenerated plants. The percentage of regenerated explants ranged from 28,41 to 36,26 %. The highest number of shoots per regenerating explant (1,56) was found on MS medium supplemented with 0,25 mg l⁻¹ PABA and 20 mg l⁻¹ FA, while MS medium supplemented with 0,5 mg l⁻¹ 2iP and 10 mg l⁻¹ FA was least effective, with 0,84 shoots per regenerating explant. Tetraploid regenerants were later acclimatized and successfully crossed with diploid plants to produce triploid seeds, which did not germinate.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
SLOVARČEK	X
1 UVOD	1
1.1 CILJI RAZISKOVANJA	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 BUČEVKE	3
2.2 HAPLOIDI	4
2.2.1 Indukcija haploidov iz ženskih gamet	5
2.2.2 Indukcija haploidov iz moških gamet	8
2.3 IDENTIFIKACIJA HAPLOIDOV	8
2.3.1 Določanje ploidnosti	8
2.3.2 Analiza homozigotnosti	9
2.4 PODVAJANJE GENOMA	9
2.5 TRIPLOIDI	11
3 MATERIAL IN METODE	12
3.1 PRIPRAVA GOJIŠČ	12
3.2 INDUKCIJA HAPLOIDOV	15
3.2.1 Rastlinski material	15
3.2.2 Reševanje embrijev	15
3.3 ADVENTIVNA REGENERACIJA	16
3.3.1 Rastlinski material	16
3.3.2 Priprava izsečkov	16
3.3.3 Vpliv sestave gojišča na regeneracijski potencial in podvajanje genoma	16
3.3.4 Aklimatizacija tetraploidnih regenerantov in pridobivanje	16

triploidnega semena	17
3.4 PRETOČNA CITOMETRIJA	18
3.5 MOLEKULARNA ANALIZA DIPLOIDNIH REGENERANTOV, PRIDOBLENIH Z METODO OPRAŠEVANJA Z OBSEVANIM PELODOM	18
3.5.1 Izolacija DNA iz rastlinskega tkiva	18
3.5.2 Merjenje koncentracije izolirane DNA	19
3.5.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	19
3.5.4 Gelska elektroforeza	22
3.5.5 Fragmentna analiza	22
3.5.6 Obdelava rezultatov	22
4 REZULTATI	23
4.1 INDUKCIJA HAPLOIDOV	23
4.1.1 Opraševanje z obsevanim pelodom	23
4.1.2 <i>In vitro</i> reševanje embrijev	24
4.1.3 Pretočna citometrija	25
4.1.4 Analiza mikrosatelitov	25
4.2 PODVAJANJE GENOMA	27
4.2.1 Adventivna regeneracija	27
4.2.2 Pretočna citometrija	29
4.2.3 Pridobivanje triploidnega semena	30
5 RAZPRAVA	32
5.1 INDUKCIJA HAPLOIDOV	32
5.2 PODVAJANJE GENOMA	33
5.3 PRIDOBIVANJE TRIPLOIDOV	34
6 SKLEPI	36
7 POVZETEK	37
8 VIRI	38
ZAHVALA	

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Neuspešno oprášena cvetova (označena z belo etiketo), v ozadju normalno razvit plod	23
Slika 2: Rast izoliranih embrijev na gojišču E20A	25
Slika 3: Elektroferogram mikrosatelitnega markerja CMTp245 regeneranta št. 7, označen s fluorokromom VIC (zeleno).	25
Slika 4: Adventivna regeneracija izsečka kotiledona na gojišču REN z dodatkom PABA	27
Slika 6: Merjenje velikosti genoma (določanje ploidnosti) regenerantov s pretočno citometrijo	29
Slika 7: Nastali plodovi po križanju tetraploidnih in diploidnih rastlin (levo zgoraj) (A), prerezan plod (desno) (B), triploidno seme (levo spodaj) (C)	31

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Pridelava buč in bučk v Evropi in po svetu (FAOSTAT, 2015)	4
Preglednica 2: Pregled uporabljenih tehnik za indukcijo haploidov pri bučevkah	5
Preglednica 3: Najpogosteje uporabljene doze in viri obsevanja pri različnih vrstah bučevk	7
Preglednica 4: Sestava gojišča MS (Duchefa) (Murashige in Skoog, 1962)	12
Preglednica 5: Sestava gojišča E20A (Sauton in Dumas De Vault, 1987)	14
Preglednica 6: Uporabljeni začetni oligonukleotidi za namnoževanje mikrosatelitnih lokusov in lastnosti posameznih markerjev (motiv ponovitve in pričakovana dolžina) ter uporabljen protokol (Gong in sod., 2008; Formisano in sod. 2011)	20
Preglednica 7: Število nastalih plodov iz opršenih cvetov in uspešnost oprašitve za posamezno dozo in pogoje vlažnosti obsevanja	23
Preglednica 8: Število izoliranih embrijev in povprečno število izoliranih embrijev na 100 semen	24
Preglednica 9: Dolžine fragmentov za prvih pet lokusov	26
Preglednica 10: Dolžine fragmentov za naslednjih pet lokusov	26
Preglednica 11: Vpliv sestave gojišča na odzivnost izsečkov in število regenerantov na izseček	28
Preglednica 12: Adventivna regeneracija izsečkov kotiledonov in število regenerantov na izseček glede na starost sejancev	28
Preglednica 13: Vpliv sestave gojišča na regeneracijo poganjkov s podvojenim genomom	29
Preglednica 14: Vpliv sestave gojišča na koreninjenje regenerantov	30

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

%	odstotek
°C	stopinje Celzija
2iP	<i>N</i> ⁶ -[2-izopentenil]adenin
angl.	angleško
BAP	6-benzilaminopurin
bar	enota za merjenje tlaka
bp/kbp	bazni par/kilobazni par
BPB	bromfenol modro (angl. <i>bromophenol blue</i>)
cm	centimetri
CTAB	heksadeciltrimetilamonijev bromid
ddH ₂ O	bidestilirana voda
DICA	dikloroizocianurna kislina
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EtBr	etidijev bromid
FA	fuzarična kislina
Gy	Gray
ha	hektar
HH	višja zračna vlažnost (angl. <i>high humidity</i>)
IAA	indol-3-ocetna kislina
IBA	indol-3-maslena kislina
lat.	latinsko
M	molarnost [mol l ⁻¹]
MS gojišče	Murashige in Skoog gojišče
NAA	naftalenocetna kislina
obr./min	obrati na minuto
PABA	para-aminobenzojska kislina
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i>)
pH	merilo za koncentracijo hidroksidnih ionov v raztopini
QTL	lokus s kvantitativnimi lastnostmi (angl. <i>quantitative trait locus</i>)
RH	nižja zračna vlažnost (angl. <i>room humidity</i>)
s/min/h	sekunda/minuta/ura
SSR	mikrosateliti (angl. <i>simple sequence repeats</i>)
t	tona
T	temperatura
UV žarki	ultravijolični žarki

SLOVARČEK

Adventivna regeneracija – regeneracija poganjkov iz posameznih celic ali skupkov celic (adventivni meristemi), ki ne izvirajo iz meristemskega tkiva, temveč so delitve inducirane z zunanjimi dejavniki

Ploidnost – število kopij genoma v jedru; haploidna jedra imajo eno garnituro kromosomov, diploidna jedra imajo dve garnituri homolognih kromosomov

Endopoliploidija – stanje, značilno predvsem za mlada tkiva, kjer v tkivu najdemo celice različnih ploidnosti, nastale z večkratnim podvajanjem genoma brez vmesne delitve celic

Hibrid – križanec dveh čistih linij

Inbriding depresija – nezaželen pojav pri samoopraševanju (najpogosteje pri tujeprašnicah), ko se zaradi homozigotnosti začnejo izražati škodljivi recesivni geni

in situ – eksperiment se izvaja na prvotnem mestu, lat. »v naravni legi«

in vitro – eksperiment se izvaja v nadzorovanih laboratorijskih pogojih, lat. »v kozarcu«

1 UVOD

Biotehnologija omogoča povsem nov pristop k žlahtnjenju rastlin. Poleg klasičnih tehnik (križanje in selekcija), lahko z uvedbo sodobnih biotehnoloških pristopov dosežemo številne žlahtniteljske cilje hitreje. Hibridi se pridelujejo že desetletja, saj nam omogočajo večji in bolj izenačen pridelek. To je posledica t.i. pojava heteroze, ko križamo dve čisti liniji (Bohanec, 2004). Pridobivanje homozigotnih linij pa običajno zahteva 8 do 10 let samoopraševanja, šele nato jih lahko križamo z namenom pridobivanja hibridov (Chahal in Gosal, 2006). Z uporabo tehnik indukcije haploidov in kasnejšega podvajanja genoma, se temu lahko izognemo in pridemo do čistih linij iz heterozigotne rastline že v eni generaciji. Pri tujeprašnicah, ki izražajo visoko stopnjo inbriding depresije, pa je lahko uporaba te tehnike edina možnost za pridobivanje homozigotnih linij (Murovec in Bohanec, 2012).

Podvajanje genoma po indukciji haploidov za povrnitev plodnosti rastlin lahko poteka spontano (kar je ponavadi redko) ali pa s pomočjo antimitotskih sredstev, ki so lahko toksična (Murovec in Bohanec, 2012). Kot alternativa za podvajanje genoma se lahko uporabi adventivna regeneracija na gojišču z dodanimi rastnimi regulatorji. Ta se lahko uporabi tudi za podvajanje genoma diploidnih rastlin, s čimer je možno pridobiti tetraploidne rastline (Košmrlj in sod., 2014b).

Predstavniki vrste *Cucurbita pepo* L. so ena izmed kmetijsko najpomembnejših vrst družine bučevk, v Sloveniji pa se najpogosteje pridelujejo bučke. Žlahtnjenje poteka predvsem v smeri pridobivanja hibridov, v ospredje pa prihajajo tudi druge tehnike. Po tretiranju s kolhicinom so bili pridobljeni tetraploidi pri kumarah, melonah, bučah in lubenicah, s križanjem teh rastlin z diploidnimi pa so pridobili triploidne rastline, ki so zanimive predvsem pri lubenicah za produkcijo brezsemenskih plodov (Šiško, 2000).

1.1 CILJI RAZISKOVANJA

Cilj magistrskega dela je bil izdelati protokol pridobivanja haploidnih regenerantov bučk z metodo opráševanja z obsevanim pelodom in reševanja nezrelih embrijev, ter izdelati protokol podvajanja genoma diploidnih rastlin v tkivni kulturi preko adventivne regeneracije.

V ta namen smo za optimizacijo indukcije haploidov želeli preizkusiti različne doze obsevanja ter različne genotipe materinskih rastlin.

Pri podvajanju rastlin preko adventivne regeneracije smo želeli preveriti vpliv sestave gojišč (dodajanje različnih rastlinskih hormonov in različnih koncentracij fuzarične kisline) na regeneracijsko sposobnost izsečkov kotiledonov, ter na število nastalih tetraploidnih regenerantov.

Tetraploidne regenerante smo želeli križati z diploidnimi rastlinami z namenom pridobivanja triploidnih rastlin in primerjati njihove morfološke lastnosti z morfološkimi lastnostmi diploidnih izvornih rastlin.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevali smo, da bomo s pomočjo opráševanja z obsevanim pelodom in pravočasnim reševanjem nezrelih embrijev uspeli pridobiti haploidne rastline, pri čemer bo delež haploidov odvisen od doze obsevanja. Višja doza obsevanja bo vodila do višjega deleža haploidnih regenerantov, višja zračna vlažnost med obsevanjem peloda pa do večje uspešnosti opráševanja, saj naj bi ga ta zaščitila pred izgubo kaljivosti.

Z dodajanjem različnih rastlinskih hormonov ter fuzarične kisline v gojišče za tkivno kulturo bomo preko adventivne regeneracije rastlin uspeli pridobili tetraploidne rastline bučk, ki jih bomo nato uspešno aklimatizirali in oprášili. Višja koncentracija fuzarične kisline bo vodila v manjšo sposobnost regeneracije in večji delež tetraploidov.

S križanjem diploidnih in tetraploidnih bučk bomo pridelali triploidno seme, iz katerega bodo zrastle triploidne rastline.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BUČEVKE

Družina bučevk (*Cucurbitaceae*) je ena genetsko najbolj raznolikih družin (Jakše, 2000). V to družino spada 118 rodov oz. 825 vrst (Podgornik Reš, 2003). V Sloveniji gojimo kumare, melone, lubenice in različne tipe buč in bučk, ki so kmetijsko najpomembnejše vrste znotraj družine bučevk (Jakše, 2000). So tujeprašne rastline, ki jih oprahujejo žuželke in enodomne z enospolnimi cvetovi, kar pomeni, da so na rastlini ženski in moški cvetovi ločeni. Oboji se odprejo na isti dan, kar je tudi pogoj za uspešno oprahujevanje (Babnik, 2000). Ker izhajajo iz subtropskih in tropskih delov sveta, so občutljive na nizke temperature. Plodovi so sorazmerno veliki, ko dosežejo zrelost, določene vrste pa imajo plazeča stbla (vreže) in na vrežah vitice (Jakše, 2000).

Najpomembnejši predstavniki družine bučevk so (Šiško, 2000):

- lubenice (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai),
- kumare (*Cucumis sativus* L.),
- melone (*Cucumis melo* L.),
- buče in bučke (*Cucurbita pepo* L.).

Predstavniki rodu *Cucurbita* izvirajo iz Amerike, bučke (*Cucurbita pepo* L. subsp. *pepo* cv. group 'Zucchini') pa naj bi poleg fižola in koruze spadale med prve pridelke, njihovo pridelovanje naj bi namreč segalo v čas Majejskih civilizacij (Babnik, 2000). Glede na rast lahko predstavnike rodu *Cucurbita* razdelimo na: bučke (grmičasta rast) in buče (plazeča rast) (Jakše, 2000). Plodovi bučk so cilindrične oblike, marmorirane temno in svetlo zelene barve, lahko tudi svetlejše, rumene ali skoraj bele (Babnik, 2000). V ospredju je žlahtnjenje na odpornost na številne virusne in glivične okužbe (Godbole in Murthy, 2012), temperaturna nihanja, hitro rast plodov in čim večjo zasnovo cvetov. Večinoma se pridelujejo hibridi, saj so bolj rodni in imajo tržno prednost v pridelavi pred sortami (Babnik, 2000).

Svetovna pridelava buč in bučk je po zadnjih objavljenih podatkih obsegala v letu 2013 skoraj 1,8 milijona hektarjev (v Evropi dobrih 135.000 hektarjev), s skupnim pridelkom 24,6 milijonov ton (v Evropi skoraj 3,4 milijona ton). V Preglednici 1 so predstavljeni podatki pridelave buč in bučk od leta 2004 do leta 2013. Svetovna pridelava se je v zadnjih desetih letih postopno povečevala, iz slabih 21 na dobrih 24 milijonov ton. Pri površini pridelave lahko opazimo podoben trend, le da se je ta v prvih dveh letih (2005 in 2006) zmanjšal, šele nato se je postopno povečeval. V Evropi se je površina pridelave iz leta 2004 v leto 2005 skoraj prepolovila, nato pa vztrajno rastla do leta 2011. V naslednjih dveh

letih (2012 in 2013) pa se je zmanjšala. Pridelava buč in bučk v Evropi je zadnjih deset let nihala, vendar ta ni padla pod 2,9 milijonov ton.

Preglednica 1: Pridelava buč in bučk v Evropi in po svetu (FAOSTAT, 2015)

Leto		Pridelava (t)	Površina pridelave (ha)
2013	Evropa	3.368.703	135.829
	Svet	24.679.859	1.797.194
2012	Evropa	3.325.435	136.564
	Svet	24.683.911	1.788.876
2011	Evropa	3.401.476	137.403
	Svet	24.344.678	1.772.415
2010	Evropa	3.009.826	132.097
	Svet	23.169.632	1.728.901
2009	Evropa	3.114.550	130.800
	Svet	22.448.403	1.769.772
2008	Evropa	2.914.122	124.811
	Svet	21.861.224	1.620.450
2007	Evropa	3.066.775	133.815
	Svet	21.553.844	1.611.336
2006	Evropa	3.200.117	139.554
	Svet	21.018.499	1.590.098
2005	Evropa	2.974.193	129.888
	Svet	20.368.875	1.600.050
2004	Evropa	3.715.388	204.618
	Svet	20.669.557	1.637.413

V Sloveniji so najbolj razširjene bučke, ki se gojijo za prodajo plodov (Babnik, 2000). Pridelovalne površine so v letu 2014 obsegale 113 hektarjev, s pridelavo 2.240 ton (Podatkovni portal SI-STAT, 2015).

2.2 HAPLOIDI

Haploidi so rastline z gametnim številom garnitur kromosomov donorske rastline. So manjše rasti in praviloma sterilni, s podvojitvijo kromosomov (spontano ali inducirano) pa jim je možno povrniti plodnost. Lahko imajo eno garnituro kromosomov, če izhajajo iz diploidne donorske rastline ali več, če so bile donorske rastline tetraploidne ali heksaploidne (Chahal in Gosal, 2006; Murovec in Bohanec, 2012). Prednost njihove uporabe je pridobivanje homozigotnih linij v eni generaciji, pri tujeprašnicah pa lahko na ta način rešimo tudi problem inbriding depresije (Chahal in Gosal, 2006; Murovec in Bohanec, 2012). S podvajanjem števila kromosomov dobimo podvojene haploide, ki so homozigotni na vseh lokusih. S križanjem homozigotnih (podvojenih haploidnih) linij pridobivamo hibride (Murovec in Bohanec, 2012). Uporaba haploidov sega tudi na področje mutageneze, saj se lahko z njihovo pomočjo inducirane recesivne mutacije

izrazijo že v prvi generaciji po tretiranju (Chahal in Gosal, 2006; Murovec in Bohanec, 2012).

Nastanek haploidov je lahko spontan, vendar se to zgodi le poredko. Za praktično uporabo je potrebno njihov nastanek inducirati. Danes so tehnike indukcije haploidov pri določenih vrstah del rutine pri žlahtnjenju, vendar je njihova uporaba omejena le na nekaj vrst zaradi bioloških in tehničnih težav (lastnosti rastlin, učinkovitost protokola itd.) (Murovec in Bohanec, 2012).

Tehnike indukcije haploidov lahko razdelimo v dve glavni skupini, in sicer na tehnike indukcije iz ženskih gamet (ginogeneza) in na tehnike indukcije iz moških gamet (androgeneza) (Murovec in Bohanec, 2012). Podrobnejša razdelitev tehnik, ki so v uporabi pri bučevkah, je predstavljena v Preglednici 2.

Preglednica 2: Pregled uporabljenih tehnik za indukcijo haploidov pri bučevkah

Tehnike indukcije haploidov	Vir
Ginogeneza	
opraševanje z obsevanim pelodom	Sari in sod., 1994; Faris in sod., 1999; Kurtar in sod., 2002; Sugiyama in sod., 2002; Claveria in sod., 2005; Kurtar in sod., 2009; Ari in sod., 2010; Kurtar in Balkaya, 2010; Gonzalo in sod., 2011; Godbole in Murthy 2012; Košmrlj in sod., 2013
<i>in vitro</i> kultura neoprašenih plodnic	Metwally in sod., 1998b; Gémes-Juhász in sod., 2002; Shalaby, 2007; Diao in sod., 2009
Androgeneza	
<i>in vitro</i> kultura prašnic	Metwally in sod., 1998a; Ashok Kumar in sod., 2002; Song in sod., 2007; Ashok Kumar in Murthy, 2009

2.2.1 Indukcija haploidov iz ženskih gamet

Indukcija haploidov iz ženskih gamet ali ginogeneza lahko poteka *in vitro* (gojenje različnih delov neoprašenih cvetov z ženskimi gametami) ali *in situ* (različne tehnike opráševanja) (Murovec in Bohanec, 2012).

In vitro tehnike so bile znotraj bučevk do sedaj uspešne le pri bučah in kumarah, pri katerih so uporabili *in vitro* gojenje neoprašenih semenskih zasnov in plodnic (Metwally in sod., 1998b; Gémes-Juhász in sod., 2002; Shalaby, 2007; Diao in sod., 2009). Te je potrebno pred *in vitro* gojenjem tretirati z nizkimi ali visokimi temperaturami in nato gojiti na gojišču za indukcijo haploidov, ki vsebuje rastne regulatorje, ki so ključni za

reprogramiranje razvoja gametofitnih celic in indukcijo haploidov (Murovec in Bohanec, 2012). Uspešna indukcija in regeneracija haploidov je odvisna od samega tretiranja izsečkov (čas in temperatura), sestave gojišča, genotipa ter razvojne stopnje ženskega gametofita (Diao in sod., 2009). Stopnja regeneracije je višja kot pri androgenezi, kljub temu, da je v ženskih cvetovih število gamet bistveno nižje kot pri moških cvetovih (Chahal in Gosal, 2006), regeneranti pa naj bi bili tudi genetsko bolj stabilni (Murovec in Bohanec, 2012).

Pri bučevkah se za indukcijo haploidov iz ženskih gamet *in situ* uporablja opraševanje z obsevanim pelodom. Pri tem poteče t. i. pseudofertilizacija, saj obsevan pelod na brazdi kali, vendar jajčne celice ne more oploditi. Povzroči pa začetek delitve jajčne celice in s tem razvoj embrija z eno garnituro kromosomov, podedovano od mame (Ari in sod., 2010; Kurtar in Balkaya, 2010; Gonzalo in sod., 2011).

Za obsevanje peloda se lahko uporabi ultravijolične (UV), gama ali X žarke. Pri bučevkah so najpogosteje v uporabi gama žarki zaradi enostavnosti tehnike, visoke stopnje mutagenosti in dobre penetracije (Kurtar in sod., 2009; Kurtar in Balkaya, 2010). Vendar pa uporaba gama žarkov predstavlja potencialno nevarnost zaradi uporabe radiaktivnih elementov (IAEA, 2010), zato se v zadnjih letih vedno bolj uveljavlja uporaba rentgenskih žarkov. Pri bučevkah so te uporabili za indukcijo haploidov pri oljnih bučah (Košmrlj in sod., 2013), Sugiyama in sod. (2002) pa so jih uporabili pri lubenicah za razvoj plodov brez semen.

Uspešnost indukcije haploidov je odvisna od številnih dejavnikov (Gonzalo in sod. 2011):

- fiziološkega stanja donorske rastline,
- genotipa,
- *in vitro* pogojev regeneracije embrijev in
- doze obsevanja.

Optimalna doza obsevanja za indukcijo haploidov naj bi bila po besedah avtorjev Kurtar in Balkaya (2010) posledica različnih lastnosti peloda posameznih vrst, predvsem odpornosti peloda na obsevanje, ki je odvisna od velikosti peloda. Najpogosteje uporabljene doze obsevanja pri posameznih vrstah bučevk so predstavljene v Preglednici 3. Pri bučah je bilo do sedaj uporabljeno obsevanje z gama in X žarki, z nižjimi dozami obsevanja do 350 Gy (Gray) (Kurtar in sod., 2002; Kurtar in sod., 2009; Kurtar in Balkaya, 2010; Košmrlj in sod., 2013), pri bučkah pa protokola za indukcijo haploidov še ni.

Preglednica 3: Najbolj učinkovite uporabljene doze in viri obsevanja pri različnih vrstah bučevk

Vrsta	Doza obsevanja (Gy)	Vir obsevanja	Vir podatkov
lubenice	200-300	gama žarki	Sari in sod., 1994
melone	200-300	gama žarki	Godbole in Murthy, 2012
buče (navadne)	25 in 50	gama žarki	Kurtar in sod., 2002
buče (orjaške, muškatne)	50 in 100	gama žarki	Kurtar in sod., 2009; Kurtar in Balkaya, 2010
buče (oljne)	200	X žarki	Košmrlj in sod., 2013
kumare	100	gama žarki	Claveria in sod., 2005
	500	gama žarki	Faris in sod., 1999

Kot že prej omenjeno, je uporabljena doza obsevanja odvisna predvsem od velikosti peloda in vira sevanja. Melone, kumare in lubenice imajo manjši pelod (povprečni premer 50-65 μm), buče in bučke pa večjega (180 μm), slednji je zaradi svoje velikosti bolj občutljiv na obsevanje. To je posledica občutljivosti na dehidracijo, zaradi česar se zmanjša njegova viabilnost. Ta pada z večanjem doze obsevanja, je pa izredno pomembna za induciranje nastanka haploidov (Kurtar in Balkaya, 2010). Opraševanje z obsevanim pelodom pogosto vodi v razvoj plodov brez semen (Godbole in Murthy, 2012), na splošno pa velja, da je delež diploidnih regenerantov pri nižjih dozah višji, saj te premalo poškodujejo dedni material peloda, zato je ta zmožen oploditi jajčno celico. Pri višjih dozah obsevanja se običajno razvije manj embrijev, vendar je delež haploidov večji (Murovec in Bohanec, 2012).

Uporabo višjih doz pri bučah in bučkah omejuje občutljivost peloda na obsevanje. Pri ostalih vrstah znotraj družine bučevk, so uporabljene doze obsevanja za indukcijo haploidov tudi do 900 Gy (X žarki) (Sugiyama in sod., 2002), pri bučah pa te ne presegajo 350 Gy (gama in X žarki) (Kurtar in sod., 2002; Kurtar in sod., 2009; Kurtar in Balkaya, 2009; Košmrlj in sod., 2013). Prav tako je velik delež dobljenih regenerantov diploidnih, kot rezultat oploditve s pelodom, ki ga obsevanje ni prizadelo (Kurtar in sod., 2002; Kurtar in sod., 2009; Kurtar in Balhaya, 2012; Košmrlj in sod., 2013). Košmrlj in sod. (2014a) so preučili vpliv zračne vlažnosti med obsevanjem na kaljenje peloda *in vitro* in ugotovili, da je pri obsevanju peloda pri višji zračni vlažnosti možno obsevati pelod tudi do 600 Gy in ohraniti kaljivost peloda, kar nakazuje na možnost uporabe višjih doz obsevanja za indukcijo haploidov pri bučah in bučkah.

Pri večini bučevk je za pridobivanje haploidnih rastlin potrebno po opraševanju z obsevanim pelodom *in vitro* reševanje nezrelih embrijev (Murovec in Bohanec, 2012). S pomočjo te metode zagotovimo regeneracijo embrijev, ki bi sicer propadli. Uspešnost je odvisna od razvojne stopnje embrija ob izolaciji in sestave gojišča (Godbole in Murthy, 2012). Zaželeno je, da so izolirani embriji čim bolj razviti, saj se taki bolje regenerirajo na

gojišču, vendar pa lahko prepozno pobiranje plodov vodi v večje število nekrotičnih embrijev, ki se na gojišču ne regenerirajo (Kurtar in sod., 2009; Kurtar in Balkaya, 2010).

2.2.2 Indukcija haploidov iz moških gamet

Če se za indukcijo haploidov uporabijo moške gametne celice, govorimo o androgenezi. V tem primeru se *in vitro* gojijo prašnice ali pa izolirane mikrospore (Murovec in Bohanec, 2012). Na uspešnost androgeneze najbolj vplivajo razvojna stopnja gamet in temperaturno tretiranje (Murovec in Bohanec, 2012), pomemben dejavnik pa je tudi genotip donorske rastline in fiziološko stanje rastline (Chahal in Gosal, 2006). Uspešnost regeneracije haploidov je odvisna od sestave gojišča (Ashok Kumar in Murthy, 2009), ponavadi pa vodi v velik delež spontano podvojenih haploidov (Murovec in Bohanec, 2012). V literaturi lahko pri bučevkah zasledimo uporabo androgeneze le pri kumarah (Ashok Kumar in sod., 2002; Ashok Kumar in Murthy, 2009; Song in sod., 2009) in bučah (Metwally in sod., 1998a).

2.3 IDENTIFIKACIJA HAPLOIDOV

Uspešnost indukcije in regeneracije haploidov je potrebno potrditi s pomočjo metod za identifikacijo haploidov. Ta poteka v dveh delih: 1. določanje ploidnosti regenerantov in 2. analiza homozigotnosti regenerantov. Z analizo homozigotnosti želimo ločiti sponatno podvojene haploide (diploidni in homozigotni) od nezaželenih heterozigotnih diploidov, ki lahko nastanejo iz somatskega diploidnega tkiva (Murovec in Bohanec, 2012) ali pa so posledica opravitve s pelodom, ki ga obsevanje ni prizadelo (Gonzalo in sod., 2010).

2.3.1 Določanje ploidnosti

Ploidnost lahko določamo na različne načine. Posredni načini temeljijo na vrednotenju morfoloških razlik med regenerantom in donorsko rastlino: merjenje velikosti rastlin, dimenzij listov, morfologija cvetov (haploidi so sterilni). Sem spadajo tudi druge metode, ki vključujejo mikroskopsko analizo celic zapiralk (merjenje velikosti in štetje kloroplastov). Posredni načini določanja ploidnosti veljajo za bolj zamudne tehnike, prav tako so zamudne citološke tehnike s katerimi se štejejo kromosomi v koreninskih vršičkih. Te spadajo pod neposredne metode, ki so veliko bolj zanesljive in robustne, in vključujejo še merjenje količine DNA z uporabo pretočne citometrije (Murovec in Bohanec, 2012; Noh in sod., 2012).

Pretočna citometrija je bila prvič uporabljena za določanje količine DNA v človeških celicah s pomočjo UV žarkov. Težave pri uporabi te metode za merjenje rastlinskih

vzorcev, je bila priprava vzorcev (Noh in sod., 2012). Prednosti pretočne citometrije so hitra in enostavna analiza velikega števila vzorcev ter identifikacija miksploidnih regenerantov (vsebujejo celice različnih ploidnosti) (Murovec in Bohanec, 2012). Osnova te tehnike je določanje količine DNA v jedrih preko merjenja intenzitete fluorescence barvil, ki se vežejo na DNA v jedru. Intenziteta fluorescence je sorazmerna količini DNA v jedru, kar je razvidno iz histograma, ki se izriše pri merjenju (Claveria in sod., 2005; Gonzalo in sod., 2011). Položaj vrhov histogramov se primerja s standardi in sklepa na ploidnost (Murovec in Bohanec, 2012). Tehnika se je izkazala za učinkovito pri analizi regenerantov pri kumarah (Claveria in sod., 2005), melonah (Gonzalo in sod., 2011) in oljnih bučah (Košmrlj in sod., 2013).

2.3.2 Analiza homozigotnosti

Ker se med indukcijo haploidov predvsem pri androgenezi lahko regenerirajo spontano podvojeni regeneranti, je zaželeno vrednotiti diploidne regenerante. Da bi ugotovili, ali so ti posledica spontanega podvajanja kromosomov (so homozigotni), je potrebna uporaba markerjev, saj pretočna citometrija in ostale citološke študije tega ne omogočajo (Diao in sod., 2009). Kateri markerji se uporabijo, je odvisno od njihove razpoložljivosti za posamezno rastlinsko vrsto (Murovec in Bohanec, 2012). Pri oljnih bučah so bili za analizo regenerantov po indukciji in regeneraciji haploidov uporabljeni mikrosatelitni (SSR) markerji, kjer so Košmrlj in sod. (2013) ugotovili, da sta bila že dva izbrana mikrosatelitna markerja dovolj za potrditev heterozigotnosti večine diploidnih regenerantov (96,8 %), z uporabo treh mikrosatelitnih markerjev, pa je bila heterozigotnost potrjena za kar 99,6 % diploidnih regenerantov. Iz teh rezultatov so zaključili, da je spontano podvajanje kromosomov pri indukciji haploidov s pomočjo opráševanja z obsevanim pelodom redok pojav in da je večina diploidnih regenerantov posledica oprášitve s pelodom, ki ga obsevanje ni dovolj prizadelo.

2.4 PODVAJANJE GENOMA

Plodnost haploidov je mogoče povrniti s podvojitvijo kromosomov. Na ta način se pridobi podvojene haploide, ki so homozigotni na vseh lokusih (Murovec in Bohanec, 2012). Ti predstavljajo pomemben material za pridobivanje hibridov, imajo pa tudi veliko uporabnost za genetske študije. Uporabljajo se lahko za določanje genov s kvantitativnimi lastnostmi (QTL študije), mapiranje genov in študije interakcij genotipa in okolja (Gonzalo in sod., 2011). Podvajanje števila kromosomov lahko poteče spontano (pri indukciji haploidov iz moških gamet), pri indukciji iz ženskih gamet pa je delež spontano podvojenih regenerantov izredno nizek in je potrebno podvajanje inducirati (Shalaby, 2007). Ponavadi se uporabljajo antimitotska sredstva, ki inhibirajo delovanje mikrotubulov, kot so kolhicin, orizalin in drugi. So toksične spojine in lahko vodijo do

nastanka tetraploidov (Murovec in Bohanec, 2012), himer (Claveria in sod., 2005) ali miksploidov, kar je nezaželeno (Lotfi in sod., 2003). Tudi uspešnost teh metod je nizka, pri kumarah so Claveria in sod. (2005) dobili 30 % diploidov po tretiranju s kolhicinom, miksploidnih regenerantov pa je lahko tudi do 64 % (Lotfi in sod., 2003).

Kot alternativa se v literaturi omenja podvajanje genoma s pomočjo adventivne regeneracije. V literaturi je veliko podatkov o adventivni regeneraciji znotraj rodu *Cucurbita* (Anathakrishnan in sod., 2003; Lee in sod., 2003; Kathiravan in sod., 2006; Pal in sod., 2007), podvajanje genoma diploidov preko adventivne regeneracije pa je bilo že potrjeno pri oljnih bučah (Košmrlj in sod., 2014b). Avtorji navajajo številne dejavnike, ki vplivajo na uspešnost regeneracije: starost in tip izsečka, genotip, sestavo gojišča, ter tudi endopoliploidijo. Preučevali so vpliv stopnje endoredupliciranosti oz. endopoliploidije na uspešnost regeneracije in odkrili, da ima bazalni del kotiledona, ki ima največjo stopnjo regeneracije, najmanjšo stopnjo endoredupliciranosti, iz česar so sklepali, da imajo izsečki z nižjo stopnjo endoredupliciranosti večjo stopnjo regeneracije (Košmrlj in sod., 2014b). Zaključki se ujemajo z rezultati avtorjev Lee in sod. (2003), ki so preverili uspešnost regeneracije pri treh različnih vrstah izsečkov (kotiledoni, hipokotili in korenine) in zasledili najboljšo regeneracijo pri izsečkih kotiledonov. Regeneracija je bila najboljša pri izsečkih kotiledonov 4 dni po kalitvi in dodatku 1-5 mg l⁻¹ BAP (6-benzilaminopurin) v gojišče. Pri uporabi izsečkov, starejših od 4 dni, se je stopnja regeneracije drastično zmanjšala.

Gojišče za adventivno regeneracijo pri predstavnikih rodu *Cucurbita* običajno vsebuje MS gojišče (Murashige in Skoog, 1962) z različnimi rastnimi regulatorji. Pri oljih bučah je bila najboljša regeneracija opažena na gojišču z dodanimi 2iP (N⁶-[2-izopentenil]adenin), PABA (para-aminobenzojska kislina) ali FA (fuzarična kislina). Fuzarična kislina je bila dodana v gojišče za selekcijo izsečkov, odpornih na glivo *Fusarium*, in v poskusih se je izkazalo, da ta v nizkih koncentracijah (5 mg l⁻¹) spodbuja regeneracijo, pri koncentracijah 10 in 20 mg l⁻¹ pa inducira podvajanje genoma (Košmrlj in sod., 2014b). V vseh primerih je bil v gojišču dodan tudi BAP, ki je imel pomembno vlogo tudi pri regeneraciji izsečkov pri orjaški buči (Lee in sod., 2003).

Sama adventivna regeneracija se lahko uporablja tudi za mikropropagacijo, študije somaklonske variabilnosti, genske transformacije in *in vitro* selekcijo za odpornost na stres (Košmrlj in sod., 2014b). Podvajanje genoma diploidov je pomembno za produkcijo tetraploidnih rastlin, ki se lahko uporabijo za križanje z diploidnimi rastlinami za produkcijo triploidov (Noh in sod., 2012).

2.5 TRIPLOIDI

S križanjem tetraploidnih rastlin z diploidnimi se pridobi triploidno seme, iz katerega zrastejo triploidne rastline. Te so pogosto v uporabi predvsem pri produkciji lubenic brez semen, ki so vedno bolj popularne zaradi svojih lastnosti (Hodghes, 2007; Noh in sod., 2012). So dobrega okusa in imajo trdno lupino, kar je izredno pomembno pri transportu. Plod je manjši, s kompaktno notranjostjo in ima daljšo življenjsko dobo, saj se počasneje razvija, pridelek pa je primerljiv pridelku običajnih diploidnih lubenic (Hodges, 2007) oz. je lahko tudi večji, saj rastline izražajo bolj bujno rast in imajo lahko več plodov (Noh in sod., 2012).

Kljub temu pa ima produkcija triploidov nekatere ovire. Največja je pomanjkanje dostopnih tetraploidnih čistih linij za produkcijo hibridnega semena. Razlog je predvsem v metodah za produkcijo tetraploidnih linij (protokoli za poliploidizacijo), ki imajo za enkrat še zelo nizko uspešnost. Poleg tega njihovo uporabo omejujejo tudi dolga rastna doba in slaba kaljivost semen zaradi trdne ovojnice. Posledično je delež pridobljenih triploidnih rastlin nizek (Hodghes, 2007; Noh in sod., 2012).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 PRIPRAVA GOJIŠČ

Vsa gojišča, ki smo jih uporabili za rast v tkivni kulturi, so bila narejena na enak način, razlikovala so se le v sestavi. Za indukcijo haploidov smo uporabili gojišče E20A (Sauton in Dumas De Vault, 1987) (Preglednica 5), pri poskusih adventivne regeneracije pa je bila osnova vseh gojišč mešanica makro- in mikroelementov po Murashige in Skoog-u (MS) (1962) (Preglednica 4).

Za pripravo gojišč z osnovo MS, smo zatehtali ustrezno količino komercialne mešanice makroelementov, mikroelementov in vitaminov, ter skupaj s saharozo raztopili v bidestilirani vodi (ddH_2O) (Millipore, MA, ZDA) z mešanjem na magnetnem mešalu. Odpipetirali smo še ustrezne rastlinske hormone, ter umerili volumen s pomočjo merilne bučke. Pred dodatkom agarja (Daishin agar, Duchefa) smo umerili še pH vrednost na 5,8. Gojišča smo sterilizirali z avtoklaviranjem za 20 min pri $121\text{ }^\circ\text{C}$ in pritisku 1,13 bar. Po avtoklaviranju smo v ohlajeno gojišče ($55\text{ }^\circ\text{C}$) za adventivno regeneracijo (REN) dodali sterilno še fuzarično kislino. Gojišča smo razlivali v sterilne petrijevke (Sterilin®, Cambridge, VB) in posodice s filtrom (Microbox OV80, Combiness, Nazareth, Belgija).

Preglednica 4: Sestava gojišča MS (Duchefa) (Murashige in Skoog, 1962)

Mikroelementi	Masna koncentracija (mg l^{-1})
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
Fe-Na-EDTA	36,70
H_3BO_3	6,20
KI	0,83
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	16,90
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8,60
Makroelementi	
CaCl_2	332,02
KH_2PO_4	170,00
KNO_3	1900,00
MgSO_4	189,54
NH_4NO_3	1650,00
Organske sestavine	
glicin	2,00
mio-inozitol	100,00
nikotinska kislina	0,50
piridoksin-HCl	0,50
tiamin-HCl	0,10

Pri poskusih adventivne regeneracije in podvajanja genoma smo uporabili naslednja gojišča:

- Gojišče za kalitev semen:

MS osnovno gojišče brez vitaminov (M 0221.; Duchefa)	4,302 g l ⁻¹
saharoza (Duchefa)	30 g l ⁻¹
agar (Duchefa)	8 g l ⁻¹
pH	5,8

- REN + PABA gojišče za adventivno regeneracijo:

MS osnovno gojišče brez vitaminov	4,302 g l ⁻¹
6-benzilaminopurin (BAP) (Sigma)	1 mg l ⁻¹
para-aminobenzojska kislina (PABA) (Sigma)	0,25 mg l ⁻¹
saharoza	30 g l ⁻¹
agar	8 g l ⁻¹
pH	5,8

- REN + 2iP gojišče za adventivno regeneracijo:

MS osnovno gojišče brez vitaminov	4,302 g l ⁻¹
BAP	1 mg l ⁻¹
N6-[2-izopentenil]adenin (2iP) (Sigma)	0,5 mg l ⁻¹
saharoza	30 g l ⁻¹
agar	8 g l ⁻¹
pH	5,8

- Gojišče za subkultivacijo regenerantov:

MS osnovno gojišče z vitamini (M 0222.; Duchefa)	4,405 g l ⁻¹
saharoza	30 g l ⁻¹
BAP	0,1 mg l ⁻¹
agar	8 g l ⁻¹
pH	5,8

- MS gojišče za koreninjenje:

MS osnovno gojišče brez vitaminov	4,302 g l ⁻¹
saharoza	30 g l ⁻¹
agar	8 g l ⁻¹
pH	5,8

- MS + IBA gojišče za koreninjenje:

MS osnovno gojišče brez vitaminov	4,302 g l ⁻¹
-----------------------------------	-------------------------

indol-3-maslena kislina (IBA) (Sigma)	1 mg l ⁻¹
saharoza	30 g l ⁻¹
agar	8 g l ⁻¹
pH	5,8

• MS + NAA gojišče za koreninjenje:

MS osnovno gojišče brez vitaminov	4,302 g l ⁻¹
naftalenocetna kislina (NAA) (Sigma)	1 mg l ⁻¹
saharoza	30 g l ⁻¹
agar	8 g l ⁻¹
pH	5,8

Za pripravo gojišča E20A smo najprej pripravili založne raztopine mikro- in makroelementov, hormonov, železa, vitaminov in aminokislin (razen mio-inozitola). Vse komponente razen aminokislin (Ca-pantotenat, biotin in glicin) smo odpipetirali v čašo in dodali predhodno zatehtano količino saharoze in mio-inozitola. Dodali smo ddH₂O in mešali na magnetnem mešalu. Za umeritev volumna smo vsebino čaše prelili v merilno bučko in dopolnili z ddH₂O do oznake, nato smo umerili še pH vrednost. Dodali smo še strjevalec in gojišče sterilizirali z avtoklaviranjem pod enakimi pogoji kot gojišče MS. Po končani sterilizaciji smo ohlajenemu gojišču sterilno dodali še aminokislino (Ca-pantotenat, glicin, biotin). Gojišče smo razlili v posodice s 25 prostorčki (Sterilin®, Cambridge, VB).

Preglednica 5: Sestava gojišča E20A (Sauton in Dumas De Vaulx, 1987)

Makroelementi	mg l⁻¹	Vitamini in AK	mg l⁻¹
KNO ₃	1075	mio-inozitol	50,3
NH ₄ NO ₃	619	piridoksin HCl	5,5
MgSO ₄ x 7H ₂ O	206	nikotinska kislina	0,7
CaCl ₂ x 2H ₂ O	156,5	tiamin HCl	0,6
KH ₂ PO ₄	71	Ca-pantotenat	0,5
Ca(NO ₃) ₂ x 4H ₂ O	25	biotin	0,005
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	19	glicin	0,1
(NH ₄) ₂ SO ₄	17	Železo	mg l⁻¹
KCl	3,5	Na ₂ EDTA	18,65
Mikroelementi	mg l⁻¹	FeSO ₄	13,9
MnSO ₄ x H ₂ O	11,065	Hormoni	mg l⁻¹
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	1,8125	IAA	0,01
H ₃ BO ₃	1,575	Ogljikovi hidrati	g l⁻¹
KI	0,3475	saharoza	20
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,094	Strjevalec	g l⁻¹
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,008	agar	8
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,008	pH	5,8

3.2 INDUKCIJA HAPLOIDOV

3.1.2 Rastlinski material

V poskusih indukcije haploidov smo uporabili 4 različne sorte bučk: 'Bianca di Trieste F1', 'Elite F1', 'Greyzini F1' in 'Nano verde di Milano F1', ki smo jih posejali v rastlinjak in na polje.

En dan pred odprtjem cvetov smo le-te zavezali, da bi preprečili nezaželeno opraševanje s pomočjo žuželk. Naslednje jutro smo moške cvetove pobrali, odprli, ter pelod prenesli v manjše petrijevke. Pelod smo nato obsevali z različnimi dozami X žarkov (300 do 600 Gy) v komori RX-650 (Faxitron Bioptics, Tucson, AZ). Vpliv višje zračne vlažnosti na uspešnost oprašitve smo preverili tako, da smo nekatere petrijevke s pelodom položili v večje petrijevke, v katerih je bilo približno 10 ml ddH₂O. Po zaključenem obsevanju smo ženske cvetove odprli, oprašili, ponovno zavezali, ter ustrezno označili (datum oprašitve, ime materinske rastline, doza obsevanja). Redno smo spremljali uspešnost oprašitve in pojav plesni ali gnitja na nastajajočih plodovih.

3.1.3 Reševanje embrijev

Razvite plodove smo pobrali 4 tedne po opraševanju, tako da smo jih odrezali na sredini peclja, ter prenesli v laboratorij, kjer smo jih najprej oprali, da smo odstranili zemljo. Plod smo prerezali s kuhinjskim nožem prečno, ter nato še vzdolžno, ter pobrali semena, jih oprali, ter prenesli v brezprašno komoro. Tam smo semena površinsko sterilizirali z uporabo 1,67 % raztopine dikloroizocianurne kisline natrijeve soli (DICA) (Sigma). Raztopino smo pripravili v sterilnih 250 ml erlenmajricah, tako da smo ji dodali še par kapljic detergenta Tween® 20 (Sigma). Semena smo v tej raztopini razkuževali 15 minut. Po končani sterilizaciji semen smo vsebino erlenmajric prelili preko sterilnega cedila in semena spirali s sterilno ddH₂O, da smo odstranili razkužilo.

Semena smo prestavili na sterilne pladnje ter iz semen izolirali embrije, tako da smo semena z uporabo skalpela in igle prerezali. Embrije smo položili na gojišče E20A v 100 mm posodice s 25 prostorčki. Posodice smo inkubirali v rastni komori, kjer smo embrije gojili pod pogoji: temperatura = 23 ± 1 °C, fotoperioda = 16 h svetloba / 8 h tema do primerne velikosti, ko jim je bila določena ploidnost.

3.3 ADVENTIVNA REGENERACIJA

3.3.1 Rastlinski material

Za namen adventivne regeneracije smo uporabili semena 4 sort: 'Novodiamant F1', 'Ibis F1', 'Black Jack F1' in 'Gold Rush F1' (Franchi Sementi, Italija). Semena smo površinsko sterilizirali tako, da smo jih 1 minuto namakali v 70 % etanolu, sprali s sterilno ddH₂O preko cedila, ter jih nato z uporabo 1,67 % raztopine dikloroizocianurne kisline natrijeve soli (DICA) še dodatno sterilizirali. Raztopini smo dodali še par kapljic detergenta Tween® 20, ter semena namakali 20 minut, nato smo jih ponovno sprali z ddH₂O. Sterilizirana semena smo predstavili na gojišče za kalitev, posodice s semeni pa v rastno komoro.

3.3.2 Priprava izsečkov

Izsečke kotiledonov smo pripravili iz sejancev 7, 9 in 12 dni po kalitvi. Izsečke smo pripravili tako, da smo semena olupili, ločili kotiledona, odrezali zgornji del ter odstranili brst, da smo zagotovili, da so poganjki res bili posledica adventivne regeneracije. Prav tako smo pazili, da pri odstranjevanju brsta nismo odrezali preveč bazalnega dela, saj ima ta del po podatkih Košmrlj in sod. (2014b) najvišjo stopnjo regeneracije. Izsečke smo nato prenesli na gojišče za adventivno regeneracijo (REN) z dodatki različnih rastlinskih hormonov (2iP ali PABA) in različnih koncentracij fuzarične kisline (FA).

3.3.3 Vpliv sestave gojišča na regeneracijski potencial in podvajanje genoma

Pripravljene izsečke kotiledonov smo prenesli na gojišče za regeneracijo (REN), ki je vsebovalo različna rastlinska hormona: 0,5 mg l⁻¹ 2iP ali 0,25 mg l⁻¹ PABA in eno od dveh različnih koncentraciji fuzarične kisline (10 ali 20 mg l⁻¹).

Uspešnost adventivne regeneracije smo spremljali s štetjem odzivnih izsečkov in štetjem nastalih poganjkov na izseček. Rezultate smo predstavili kot delež odzivnih izsečkov in kot število nastalih poganjkov na izseček, pri čemer smo za obe vrednosti izračunali povprečno vrednost na petrijevko. Pri številu nastalih poganjkov na izseček smo podali še najmanjšo (min) ter najvišjo vrednost (max).

Vsi nastali poganjki so bili predstavljeni na gojišče za subkultivacijo regenerantov (REN z dodatkom 0,1 mg l⁻¹ BAP), na katerem so rasli do primerne velikosti za odvzem vzorca za določanje plojdnosti s pretočno citometrijo.

3.3.4 Aklimatizacija tetraploidnih regenerantov in pridobivanje triplodnega semena

Regeneranti, ki smo jim s pretočno citometrijo potrdili tetraploidnost, so bili prestavljeni na gojišče za koreninjenje. Preizkusili smo tri različna gojišča (gojišče MS, gojišče MS + IBA, gojišče MS + NAA). Ko so imeli regeneranti lepo razvite liste in korenine, smo jih dali na aklimatizacijo.

Aklimatizacija je potekala tako, da smo rastline vzeli iz posodic, kjer so rastla na gojišču, previdno oprali korenine, da smo odstranili ostanke gojišča, ter jih prenesli v naprej pripravljene lončke za sejanje, v katerem je bil komercialni substrat in gnojilo. Posajene regenerante smo skupaj z lončki postavili v mini rastlinjake, kjer smo postopoma zniževali vsebnost relativne zračne vlage. Po 2 tednih smo rastline odgrnili in prestavili v večje lonce.

Hkrati smo sejali tudi diploidne rastline ('Elite F1'), ki smo jih uporabili za križanje z aklimatiziranimi tetraploidnimi regeneranti. Križanje je potekalo tako, da smo ženske cvetove en dan pred odprtjem zaprli, naslednje jutro pa smo jih oprášili, tako da smo s prašniki odprtih moških cvetov podrgnili po brazdi ženskega cveta. Po oprášanju smo ženske cvetove ponovno zaprli in označili.

Redno smo spremljali potek razvoja plodov iz oprášenih cvetov. Plodove smo pobrali, ko so se razvili do končne velikosti in se je pecelj posušil. Te smo enostavno odstranili od starševske rastline, ter jih prenesli v laboratorij. Tam smo plodove oprali, prerezali in pobrali semena. Semena smo oprali in postavili v sušilnik na 40 °C za 3 dni, da so se posušila. Posušena semena smo zapakirali v papirnate vrečke in hranili v hladilniku na 8 °C.

Triploidno seme smo konec maja 2015 sadili v substrat v zasaditvene lonce v rastlinjak Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete in po zasaditvi spremljali kalitev semen.

3.4 PRETOČNA CITOMETRIJA

Za določanje ploidnosti regenerantov, pridobljenih po reševanju embrijev in adventivni regeneraciji, smo uporabili pretočno citometrijo z uporabo barvila DAPI na pretočnem citometru CyFlow (Partec, GmbH). Za določanje ploidnosti regenerantom, smo za primerjavo uporabljali vzorce listov diploidnega standarda 'Elite F1'. Delovanje citometra smo preverili s pomočjo vzorca standarda bele detelje (*Trifolium repens* L.).

Priprava vzorcev je potekala za vse vzorce (diploidni standard, vzorec bele detelje, vzorec regeneranta) enako. Delo je za vzorce regenerantov, ki so bili še v tkivni kulturi, potekalo v brezprašni komori. Za pripravo vzorca smo odrezali košček (približno 1 cm²) mladega lista, ki smo mu dodali pufer Otto 1, sestavljen iz 0,1 M raztopine citronske kisline in 0,5 % Tween® 20. Z ostro britvico smo vzorec sesekljali in prefiltrirali skozi 30 µm filter v merilno epruveto. Nato smo dodali 3 kratni volumen pufru Otto 2, ki je vseboval interkalarno barvilo DAPI (1 mg/200 ml pufru) in 0,4 M natrijev hidrogen fosfat.

Tako pripravljene vzorce smo izmerili na pretočnem citometru, kjer smo položaj vrha histograma regenerantov primerjali s položajem vrha histograma diploidnega standarda.

3.5 MOLEKULARNA ANALIZA DIPLOIDNIH REGENERANTOV, PRIDOBLENIH Z METODO OPRAŠEVANJA Z OBSEVANIM PELODOM

Namen molekularne analize diploidnih regenerantov je bil preveriti njihovo homozigotnost z uporabo mikrosatelitnih markerjev. Želeli smo preveriti ali so naši diploidni regeneranti posledica opraševanja s pelodom, ki ga obsevanje ni dovolj prizadelo in je zato oplodilo jajčno celico (heterozigotni regeneranti) ali so posledica spontanega podvajanja kromosomov (homozigotni podvojeni haploidi).

3.5.1 Izolacija DNA iz rastlinskega tkiva

Celokupno DNA smo izolirali iz diploidnih regenerantov iz poskusa indukcije haploidov. Odvzem vzorca je potekal sterilno v brezprašni komori, saj so bili regeneranti še v kulturi. DNA smo izolirali tudi iz donorskih rastlin, pri katerih smo z opraševanjem inducirali nastanek haploidov.

Nadaljni koraki so potekali v digestoriju. Rastlinskemu tkivu v terilnici smo dodali 1 ml na 68 °C predhodno segretega CTAB ekstrakcijskega pufru (2 % (w/v) CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8,0, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,2 % (v/v) merkaptotanol) in tkivo homogenizirali. Nastalo suspenzijo smo prelili v mikrocentrifugirko in vzorce inkubirali 1,5 - 2 uri pri 68 °C. Po inkubaciji smo vzorcu dodali 700 µl topila kloroform : izoamilalkohol v razmerju 24 : 1, dobro premešali in vzorce centrifugirali 10 minut na

11.000 obratov min^{-1} in 4 °C (centrifuga Beckman J2-HS, rotor JA-18). Tako smo ločili vodno in organsko fazo. Vodno fazo, v kateri je bila DNA, smo previdno odpipetirali v novo mikrocentrifugirko, pri čemer smo pazili, da nismo prenesli ostankov rastlinskega tkiva ali topila v organski fazi. Za obarjanje DNA smo dodali 70 μl (1/10 volumna) 3 M natrijevega acetata (NaOAc) (pH 5,2) in 700 μl (1 volumen) izopropanola, ohlajenega na -20 °C, ter ponovno premešali. Mikrocentrifugirke smo postavili v zamrzovalnik na -20 °C za 30 - 60 minut in nato ponovno centrifugirali za 15 min pri 11.000 obratov min^{-1} in 4 °C. Po centrifugiranju je bila DNA vidna kot oborina na dnu mikrocentrifugirke. Supernatant smo odlili, oborino pa sprali z 1 ml 70 % etanola. S stresanjem smo pelet ločili od dna, nato pa smo etanol odstranili in odprte mikrocentrifugirke pustili na zraku, da je preostali etanol izhlapel. Nato smo dodali 60 μl TE pufra (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0) in vzorce postavili čez noč v hladilnik na 8 °C, da se je DNA raztopila. Vzorce smo nato do nadaljne uporabe hranili v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.5.2 Merjenje koncentracije izolirane DNA

S pomočjo DNA fluorometra DyNA Quant™ 200 (Amersham Biosciences, Amersham, VB) smo vzorcem izmerili koncentracijo izolirane DNA. Postopek merjenja je potekal po navodilih proizvajalca. Najprej smo pripravili pufer, ki je vseboval 1 x TNE pufer (0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 7,0), fluorescentno barvilo Hoechts 33258 (1 μl ml^{-1}) in ddH₂O. V kiveto smo odpipetirali 2 ml pufra in 2 μl vzorca in pomerili koncentracijo. Kot standard za kalibracijo koncentracije smo uporabili DNA telečjega timusa (1 mg ml^{-1} DNA v 1 x TNE pufu). DNA izoliranih vzorcev smo redčili z ddH₂O na koncentracijo 5 ng μl^{-1} .

3.5.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo želeli namnožiti mikrosatelitne lokuse, s katerimi bi preverili homozigotno stanje regenerantov. Za vsak mikrosatelitni lokus smo uporabili en par začetnih oligonukleotidov.

Reakcijske mešanice so se razlikovale glede na to, katere začetne oligonukleotide smo uporabili, prav tako so se razlikovali tudi temperaturni profili reakcij. Vse so potekale na cikličnem termostatu GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems Inc., Foster City, ZDA)

Preglednica 6: Uporabljeni začetni oligonukleotidi za namnoževanje mikrosatelitnih lokusov in lastnosti posameznih markerjev (motiv ponovitve in pričakovana dolžina), ter uporabljen protokol (Gong in sod., 2008; Formisano in sod. 2011)

Lokus	Zaporedje oligonukleotidov 5'-3'	Dolžina namnoženega fragmenta (bp)	Motiv ponovitve	Protokol
CMTp79	CCA TCT TCT GCT CCA TTT GC (forward) CAC CGA GTC TAA AAG GGA TCG (reverse)	185	TC	1
CMTp80	CTT GGA TTG GAT CGG AAG G (forward) CCA AAT TGG ATA GCG AGA CG (reverse)	150	AG	1
CMTp88	ACC TAC CGT CAC ACC CAC AT (forward) CCA CCT GAA AAC AGG GCT AA (reverse)	167	TC	1
CMTp142	TCA ACC AAG TGC CAA TCT CA (forward) ACTGATCCACCGACTGATACG (reverse)	158	TC	1
CMTp177	AGC CAA ACC AGC ATC GAA AT (forward) CGA CGA TGT CAA ACC TCC AC (reverse)	194	AG	1
CMTp193	GGT GAC GGC AAG AAA AGC TA (forward) GCT GAC CCT CTC TCC CTC TC (reverse)	186	GA	1
CMTp224	CAC CGA CGA CTC CAT CAT C (forward) CTT CTT GTC CCC AAA ATC ACA (reverse)	151	CAA	1
CMTp235	ATG ATG GAG TCC CAG TCG AG (forward) ACC CAC ACA CCC TCT CCT C (reverse)	148	GTT	2
CMTp245	AGG TAA CTG CAC CCC AGC TA (forward) CCC ATC TCT CAA GCT CAT CC (reverse)	134	GCG	2
CMTp252	TCT CAC TCA TCC ACC ACA CC (forward) CGT TTC GAG TCA TTT GTT CG (reverse)	160	TTC	1

Protokol 1:

Sestava reakcijske mešanice za 1 vzorec (končni volumen 10 μ l):

- 1 μ l 10 x PCR pufra (10 mM Tris HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl pH 8,3)
- 0,6 μ l MgCl₂
- 0,8 μ l deoksi nukleotidi (dNTP)
- 0,025 μ l forward začetnih oligonukleotidov
- 0,25 μ l reverse začetnih oligonukleotidov
- 0,225 μ l tail začetnih oligonukleotidov označenih s fluorokromom
- 0,05 μ l Taq polimeraze
- 2,05 μ l vode
- 5 μ l genomske DNA s koncentracijo 5 ng μ l⁻¹

Temperaturni profil:

- začetna denaturacija: 2 minuti pri 95 °C
- 7 ciklov: 45 sekund pri 94 °C, 45 sekund pri 68 °C, 1 minuta pri 72 °C (vsak cikel se temperatura spusti za 2 °C)
- 30 ciklov: 45 sekund pri 94 °C, 45 sekund pri 54 °C, 1 minuta pri 72 °C
- zaključno podaljševanje verige: 5 minut pri 72 °C, ohlajevanje na 4 °C

Protokol 2:

Sestava reakcijske mešanice za 1 vzorec (končni volumen 15 μ l):

- 1,5 μ l 10 x PCR pufra (10 mM Tris HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl pH 8,3)
- 1,8 μ l MgCl₂
- 1,2 μ l deoksinukleotidi (dNTP)
- 0,225 μ l forward začetnih oligonukleotidov
- 0,225 μ l reverse začetnih oligonukleotidov
- 0,3 μ l tail začetnih oligonukleotidov označenih s fluorokromom
- 0,09 μ l Taq polimeraze
- 6,66 μ l vode
- 3 μ l genomske DNA s koncentracijo 5 ng μ l⁻¹

Temperaturni profil:

- začetna denaturacija: 3 minute pri 95 °C
- 10 ciklov: 30 sekund pri 95 °C, 30 sekund pri 65 °C, 30 sekund pri 72 °C (vsak cikel se temperatura spusti za 1 °C)
- 20 ciklov: 30 sekund pri 95 °C, 30 sekund pri 55 °C, 30 sekund pri 72 °C
- zaključno podaljševanje verige: 5 minut pri 72 °C, ohlajevanje na 4 °C

Po končani reakciji smo vzorce do nadaljnje analize hranili na -20 °C.

3.5.4 Gelska elektroforeza

Uspešnost PCR reakcije smo preverili na 1,2 % agaroznem gelu, debeline 0,5 mm. Gel smo pripravili tako, da smo agarozo (SeaKem® LE Agarose; Lonza, Basel, Švica) zmešali z 1 x TBE pufrom (89 mM Tris, 89 mM H₃BO₃, 2 mM EDTA) in mešanico v mikrovalovni pečici trikrat zavreli. Ko se je raztopina ohladila na približno 60 °C, smo dodali 0,5 µg ml⁻¹ etidijevega bromida (EtBr) (Sigma) in jo vlili v kalup z vstavljenim glavnikom. Ko se je gel strdil, smo previdno odstranili glavnik, ter gel položili v elektroforetsko posodo sistema Bio Rad Sub-Cell® Model 192 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, ZDA) in prelili z 1 x TBE pufrom. Pred nanosom vzorcev na gel, smo le-te pripravili tako, da smo jim dodali 1/4 volumna nanašalnega barvila BPB (12,5 % (w/v) Ficoll® 400, 6,7 % (v/v) bromfenol modro, 10 x TBE) in na kratko centrifugirali. Poleg vzorcev smo nanесли še dolžinski DNA standard GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas) za oceno dolžin pomnoženih fragmentov. Elektroforeza je potekala približno 45 min pri pogojih 120 V. Po končani elektroforezi smo DNA fragmente detektirali s pomočjo EtBr, ki omogoča vizualizacijo v UV spektru. Za detekcijo in slikanje smo uporabili Bio Spectrum® S10 Imaging System (UVP, LLC, Upland, ZDA).

3.5.5 Fragmentna analiza

Določanje dolžine namnoženih fragmentov je bilo izvedeno s pomočjo kapilarne elektroforeze ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) na Oddelku za zoologijo, Biotehniške fakultete. Vzorce smo pripravili tako, da smo združili po 4 µl PCR produktov, označenih z različnimi fluorokromi (FAM, VIC, NED, PET). Za vsak združen vzorec smo pripravili mešanico formamida in internega dolžinskega standarda Gene Scan™ 600 LIZ (Applied Biosystems, CA, ZDA). Za en vzorec smo zmešali 0,50 µl standarda in 10,6 µl formamida. Tej mešanici smo dodali 1 µl združenega vzorca, vse skupaj premešali, centrifugirali in poslali na analizo.

3.5.6 Obdelava rezultatov

Dobljene rezultate fragmentne analize smo analizirali s programom Peak Scanner™ Software v2.0 in določili dolžine dobljenih fragmentov (alelov). Alele regenerantov smo nato primerjali z aleli donoskih rastlin.

4 REZULTATI

4.1 INDUKCIJA HAPLOIDOV

4.1.1 Opraševanje z obsevanim pelodom

Pri poskusu indukcije haploidov z opraševanjem z obsevanim pelodom smo skupno oprašili 153 cvetov pri 4 različnih sortah bučk. Pri opraševanju smo uporabili mešan pelod (različni tipi in sorte), ki smo ga obsevali z dozami: 300, 400, 500 in 600 Gy. Pri vsaki dozi smo pelod obsevali pri pogojih nižje (RH) in višje zračne vlažnosti (HH). V nekaj dneh po oprašitvi smo že lahko določili uspešnost oprašitve, saj so neuspešno oprašeni plodovi začeli takoj propadati (Slika 1, rumeni plodnici označeni z belo etiketo), določen delež plodov (7 plodov) pa je propadel kasneje. Skupno smo pridobili 97 plodov, od katerih je bilo 7 takih, ki se niso popolnoma razvili in so ostali manjši ter kazali anomalije v obliki.



Slika 1: Neuspešno oprašena cvetova (označena z belo etiketo), v ozadju normalno razvit plod

Preglednica 7: Število nastalih plodov iz oprašenih cvetov in uspešnost oprašitve za posamezno dozo in pogoje vlažnosti obsevanja

Doza obsevanja (Gy)	Vlažnost	Število oprašenih cvetov	Število nastalih plodov	Uspešnost oprašitve (%)
300	RH	13	10	76,9
	HH	10	4	40,0
400	RH	10	6	60,0
	HH	9	7	77,8
500	RH	26	25	96,1
	HH	32	26	81,3
600	RH	11	7	63,6
	HH	19	17	89,5

Uspešnost oprašitve z obsevanim pelodom je bila od 40,0 do 96,1 %. Pri pogojih nižje zračne vlažnosti uspešnost oprašitve niha z večanjem doze obsevanja (76,9 % pri 300 Gy, 60,0 % pri 400 Gy, 96,1 % pri 500 Gy, 63,6 % pri 600 Gy). Pri pogojih višje zračne vlažnosti pa uspešnost oprašitve narašča z večanjem doze (40,0 % pri 300 Gy, 77,8 % pri 400 Gy, 81,3 % pri 500 Gy, 89,5 % pri 600 Gy). Pri vseh uporabljenih dozah obsevanja so vidne razlike v uspešnosti oprašitve glede na pogoje zračne vlažnosti med obsevanjem. Pri dozah obsevanja 300 in 500 Gy je bila uspešnost opraševanja višja pri nižji zračni vlažnosti, pri dozah obsevanja 400 in 600 Gy pa je bila uspešnost opraševanja višja pri višji zračni vlažnosti.

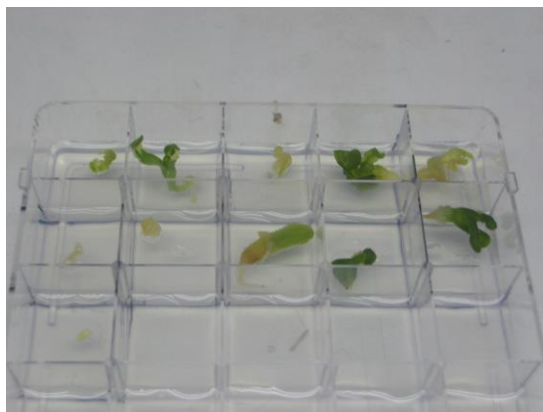
4.1.2 *In vitro* reševanje embrijev

Plodove smo 4 tedne po oprašitvi pobrali in prerezali. Pri plodovih z anomalijami v obliki smo opazili, da so ti v notranjosti suhi in nimajo semen ali pa da imajo le malo semen. Vsa semena smo prešteli in jih dalje uporabili za *in vitro* reševanje embrijev. Pri aseptičnem odpiranju semen se je izkazalo, da je veliko semen praznih. Skupaj smo izolirali 122 embrijev iz 97 plodov.

Preglednica 8: Število izoliranih embrijev in povprečno število izoliranih embrijev na 100 semen

Doza obsevanja (Gy)	Vlažnost	Število nastalih plodov	Število izoliranih embrijev	Povp. št. embrijev/100 semen (min; max)
300	RH	10	48	1,28 (0; 4,92)
	HH	4	24	1,28 (0,43; 2,45)
400	RH	6	0	0 (0; 0)
	HH	7	3	0,61 (0; 3,33)
500	RH	25	3	0,08 (0; 0,52)
	HH	26	3	0,04 (0; 0,72)
600	RH	7	33	1,02 (0; 3,38)
	HH	17	8	0,12 (0; 0,52)

Embriji so bili večinoma zelo majhni (par mm) in večina se jih je na gojišču E20A slabo regenerirala (Slika 2). Rezultati iz Preglednice 8 kažejo veliko variabilnost pri številu izoliranih embrijev glede na število nastalih plodov. Pri dozi 300 Gy smo skupno dobili največ embrijev, najmanj pri dozi 400 Gy, vendar je bilo tam pridobljenih tudi najmanj plodov. Povprečno število embrijev na 100 semen je bilo od 0 do 1,28. Bistvenih razlik med obsevanjem pri nižji ali višji zračni vlažnosti (razen pri dozi 600 Gy) ni opaziti.



Slika 2: Rast izoliranih embrijev na gojišču E20A

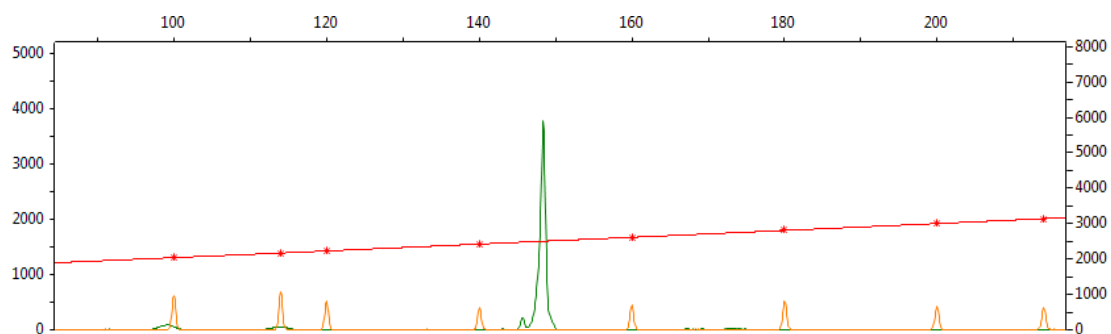
Večji embriji so rastle normalno. Ko so bili dovolj veliki, smo jim odvzeli vzorce za nadaljne analize (merjenje ploidnosti in izolacija DNA).

4.1.3 Pretočna citometrija

Regenerantom smo kasneje odvzeli vzorce in jim določili ploidnost. Od 122 izoliranih embrijev, smo ploidnost določili pri 21 embrijih, od teh sta bila 2 haploida in ostali diploidi. Ostalim embrijem ploidnosti ni bilo mogoče določiti zaradi okužb in slabe regeneracije v kulturi. Haploida sta bila dobljena iz opraševanja s pelodom obsevanim z dozo 300 (RH, 1 haploid) in 600 Gy (RH, 1 haploid), pri ostalih so bili vsi izolirani embriji diploidi.

4.1.4 Analiza mikrosatelitov

Diploidnim regenerantom smo izolirali DNA in njihovo homozigotnost preverili s pomočjo 10 mikrosatelitnih markerjev. Alelni profil smo primerjali s starši. Ugotovili smo, da je en regenerant homozigoten na vseh 10 testiranih lokusih, ostalih 17 regenerantov pa je bilo heterozigotnih na vsaj enem lokusu.



Slika 3: Elektroferogram mikrosatelitnega markerja CMTp245 regeneranta št. 7, označen s fluorokromom VIC (zeleno). Z oranžno barvo so prikazani fragmenti internega dolžinskega standarda označenega z oranžnim fluorokromom

Preglednica 9: Dolžine fragmentov za prvih pet lokusov

Vzorec	CMTp79		CMTp80		CMTp88		CMTp142		CMTp177	
Donorska rastlina št. 19	192	192	169	169	173	173	164	164	206	206
Regenerant št. 2	192	192	169	169	173	173	164	164	206	206
Donorska rastlina št. 17	204	206	169	169	182	192	160	164	-	-
Regenerant št. 3	204	204	169	169	182	192	160	160	232	232
Donorska rastlina št. 20	202	204	-	-	182	192	164	182	-	-
Regenerant št. 16	202	204	169	171	182	192	164	182	206	206
Donorska rastlina št. 18	202	202	169	169	182	192	-	-	206	206
Regenerant št. 1	202	202	169	169	192	192	182	182	164	164
Regenerant št. 4	204	204	169	169	182	192	164	182	206	206
Regenerant št. 5	202	204	169	169	182	192	164	182	164	164
Regenerant št. 6	204	204	169	169	182	192	182	182	206	206
Regenerant št. 7	202	202	169	169	182	192	164	182	206	206
Regenerant št. 8	202	202	169	169	182	182	182	182	164	206
Regenerant št. 9	194	202	169	169	182	182	164	172	164	164
Regenerant št. 10	202	204	169	169	182	192	182	182	206	206
Regenerant št. 11	202	204	169	169	182	192	164	182	164	206
Regenerant št. 12	204	204	169	169	192	192	182	182	206	206
Regenerant št. 13	202	204	169	169	182	192	164	182	164	206
Regenerant št. 14	202	204	169	169	182	182	182	182	206	206
Regenerant št. 15	202	204	169	169	192	192	160	182	206	232

Preglednica 10: Dolžine fragmentov za naslednjih pet lokusov

Vzorec	CMTp193		CMTp224		CMTp235		CMTp245		CMTp252	
Donorska rastlina št. 19	198	198	165	165	-	-	148	148	176	176
Regenerant št. 2	198	198	165	165	-	-	148	148	176	176
Donorska rastlina št. 17	173	173	165	170	163	163	132	148	176	197
Regenerant št. 3	173	173	165	165	163	163	122	132	197	197
Donorska rastlina št. 20	173	219	165	165	151	163	-	-	163	176
Regenerant št. 16	198	198	165	165	144	163	132	148	163	176
Donorska rastlina št. 18	173	217	165	165	151	163	132	148	163	176
Regenerant št. 1	217	217	165	165	163	163	122	132	176	176
Regenerant št. 4	217	217	165	165	163	163	122	132	176	176
Regenerant št. 5	-	-	165	165	151	163	132	148	176	176
Regenerant št. 6	173	217	165	206	163	163	122	132	176	176
Regenerant št. 7	173	217	165	165	163	163	148	148	176	176
Regenerant št. 8	173	217	165	165	-	-	148	148	163	176
Regenerant št. 9	173	198	165	165	163	172	132	148	163	176
Regenerant št. 10	173	217	165	165	151	163	122	132	163	176
Regenerant št. 11	217	217	165	165	151	163	132	148	163	176
Regenerant št. 12	173	217	165	165	151	163	122	132	163	176
Regenerant št. 13	173	173	165	165	151	163	132	148	163	176
Regenerant št. 14	173	217	165	165	163	163	132	148	163	176
Regenerant št. 15	173	173	165	165	151	163	132	148	163	176

4.2 PODVAJANJE GENOMA

4.2.1 Adventivna regeneracija

Za adventivno regeneracijo smo preizkusili različna gojišča, ki so se razlikovala po dodatku rastnih regulatorjev (PABA in 2iP) in po dodatku dveh različnih koncentraciji FA (10 in 20 mg l⁻¹). Poganjki so se regenerirali iz bazalnega dela kotiledonov, kot je razvidno iz Slike 5.



Slika 4: Adventivna regeneracija izsečka kotiledona na gojišču REN z dodatkom PABA

Delež izsečkov z regeneranti je obsegal od 28,41 do 36,26 %. Pri gojiščih z dodanim 2iP ni opaziti bistvenih razlik v adventivni regeneraciji med različnima koncentracijama dodane FA. Razliko lahko opazimo le pri gojišču z dodatkom PABA, kjer je bila regeneracija višja v primeru nižje koncentracije FA. Pri gojišču, kjer je bila poleg PABA dodana tudi 20 mg l⁻¹ FA, pa je bila regeneracija nižja v primerjavi s kontrolo brez FA. Največje število regenerantov na izseček smo zasledili na gojišču z dodatkom PABA in 20 mg l⁻¹ FA (1,56 regenerantov na izseček), najnižje pa na gojišču z dodatkom 2iP in 10 mg l⁻¹ (0,84). V obeh primerih (dodatek 2iP ali PABA) je bilo večje število regenerantov na izseček na gojišču z višjo koncentracijo FA. Če primerjamo gojišči z dodanim 2iP ali PABA pri enaki koncentraciji FA, lahko opazimo, da so v obeh primerih (delež izsečkov z regeneranti, povprečno število regenerantov na izseček) vrednosti višje pri gojišču z dodatkom PABA, razen v primeru deleža odzivnih izsečkov na gojišču z 20 mg l⁻¹ FA, kjer sta gojišči primerljivi.

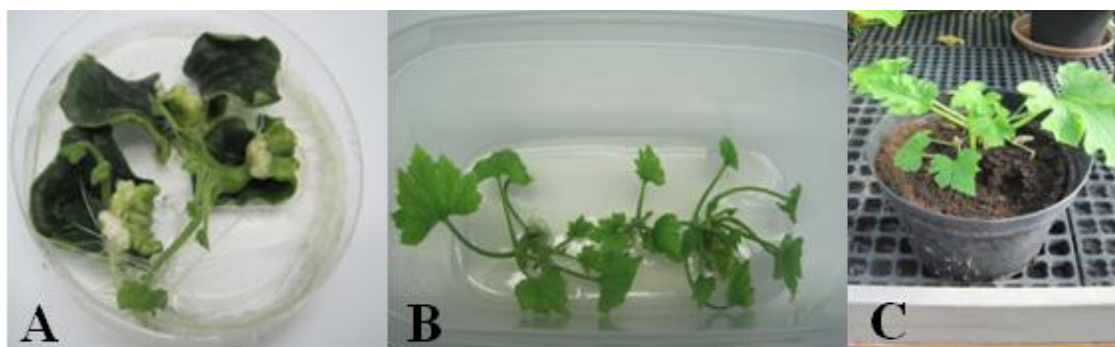
Preglednica 11: Vpliv sestave gojišča na odzivnost izsečkov in število regenerantov na izseček

Gojišče	Odstotek odzivnih izsečkov (%)	Povprečno število regenerantov na izseček (min; max)
PABA	36,11	1,33 (0; 3)
10FA PABA	36,26	0,97 (0; 3)
20FA PABA	28,41	1,56 (0; 3,33)
10FA 2iP	28,87	0,84 (0; 4)
20FA 2iP	28,99	1,21 (0; 4)

Poleg sestave gojišča smo preverili tudi razlike v regeneracijski sposobnosti izsečkov iz različno starih sejancev. Izsečki iz 7 dni starih sejancev so pokazali veliko manjši regeneracijski potencial kot izsečki iz 9 ali 12 dni starih sejancev. Razlike so bile vidne tako v deležu odzivnih izsečkov kot tudi v številu regenerantov na izseček. Prav tako so imeli manjši regeneracijski potencial izsečki iz 12 dni starih sejancev v primerjavi z izsečki iz 9 dni starih sejancev.

Preglednica 12: Adventivna regeneracija izsečkov kotiledonov in število regenerantov na izseček glede na starost sejancev

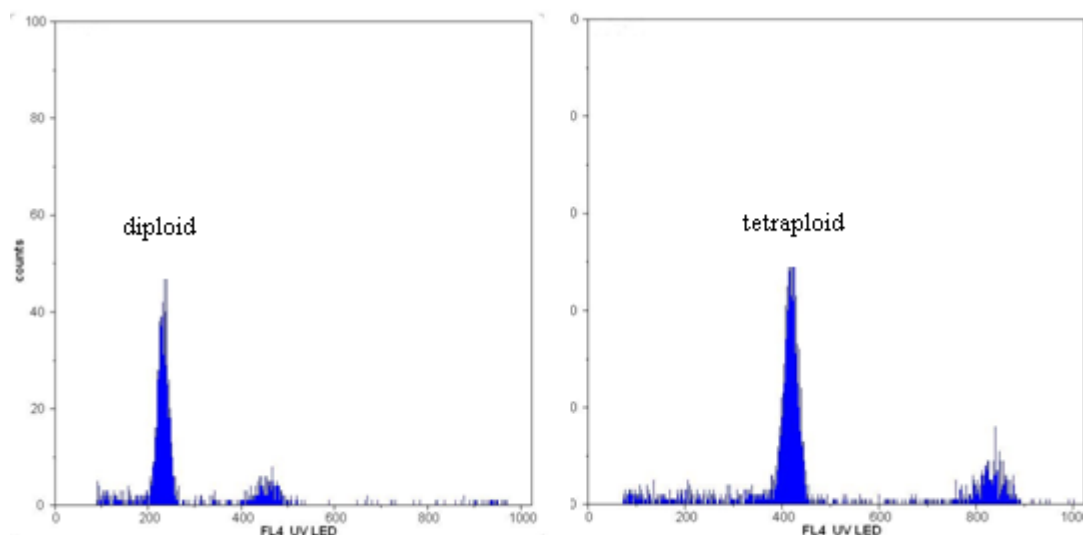
Število dni na gojišču za kalitev	Odstotek izsečkov z regeneranti (%)	Povprečno število regenerantov na izseček (min; max)
7	7,64	0,31(0; 2)
9	45,85	1,25 (0; 3,67)
12	37,83	0,99 (0; 2,33)



Slika 5: Posamezne stopnje pridobivanja tetraploidnih rastlin: (A) adventivna regeneracija izsečkov kotiledonov, (B) subkultivacija poganjkov, (C) rast aklimatiziranih rastlin

4.2.2 Pretočna citometrija

Izmed 287 regenerantov, katerim smo določili ploidnost, je bilo 5 tetraploidov, 15 miksoploidov, ostali pa so bili diploidi.



Slika 6: Merjenje velikosti genoma (določanje ploidnosti) regenerantov s pretočno citometrijo: histogram diploidnega regeneranta (levo) in histogram tetraploidnega regeneranta (desno)

Pri podvajanju genoma sta se kot najbolj učinkovita izkazala: gojišče z dodatkom PABA in 10 mg l⁻¹ FA (2 regenerirana tetraploida) ter gojišče z dodatkom 2iP in 20 mg l⁻¹ FA (3 regenerirani tetraploidi). Pri ostalih gojiščih ni prišlo do regeneracije poganjkov s podvojenim genomom, dobili smo pa kar nekaj miksoploidnih regenerantov.

Preglednica 13: Vpliv sestave gojišča na regeneracijo poganjkov s podvojenim genomom

Gojišče	Število regenerantov, ki jim je bila določena ploidnost	Tetraploidni regeneranti (%)	Miksoploidni regeneranti (%)	Diploidni regeneranti (%)
PABA	3	0	33,3	66,7
10FA PABA	93	2,2	6,5	91,4
20FA PABA	52	0	5,8	94,2
10FA 2iP	86	0	4,7	95,3
20FA 2iP	49	6,1	2,0	91,8

Merjenje ploidnosti smo ponovili pri aklimatiziranih tetraploidih, eden izmed treh aklimatiziranih tetraploidov se je izkazal za himero.

4.2.3 Pridobivanje triploidnega semena in ocena triploidov

Regeneraciji izsečkov je sledilo koreninjenje. Diploidne regenerante smo predstavili na tri različna gojišča, da bi poiskali optimalno gojišče za koreninjenje pred aklimatizacijo. Uporabili smo: gojišče MS brez dodanih hormonov, gojišče MS + IBA in gojišče MS + NAA.

Preglednica 14: Vpliv sestave gojišča na koreninjenje regenerantov

Gojišče	Delež regenerantov s koreninami (%)	Povprečno število korenin	Povprečna dolžina korenin (cm)
MS	60	2,2	6,25
MS + IBA	33,3	1	1,35
MS + NAA	25	4	4,19

Za koreninjenje se je najbolje izkazalo gojišče MS brez dodanih hormonov, saj je na tem gojišču največji delež regenerantov pognal korenine (60 %), te so bile v povprečju tudi daljše od korenin regenerantov na ostalih gojiščih. Regeneranti na gojišču z dodatkom IBA so imeli najkrajše korenine (povprečna dolžina 1,35 cm), ki so bile tudi vidno debelejšje v primerjavi s tistimi na gojišču MS brez hormonov, prav tako so imeli regeneranti na tem gojišču v povprečju le po eno korenino. Največje število korenin so imeli regeneranti na gojišču z dodatkom NAA, vendar je bil delež regenerantov s koreninami na tem gojišču najmanjši. Za koreninjenje tetraploidnih regenerantov smo zato uporabili navadno MS gojišče.

Koreninjenju je sledila aklimatizacija. Uspešno smo aklimatizirali 3 od 5 tetraploidov. Eden se je v kulturi okužil, drugi pa je kazal znake hiperhidriranosti (visoka vsebnost vode, nizka vsebnost klorofila). Ko so aklimatizirani tetraploidi zacveteli, smo izvedli križanja z diploidnimi rastlinami 'Elite F1'. Izvedli smo 9 opravevanj, pri čemer smo enkrat uporabili kot mamo tetraploida (in kot očeta diploida) in obratno. Plod se ni razvil v treh primerih, 3 plodovi so propadli, iz treh pa smo pobrali semena.



Slika 7: Nastali plodovi po križanju tetraploidnih in diploidnih rastlin (levo zgoraj) (A), prerezan plod (desno) (B), triploidno seme (levo spodaj) (C)

Uspešnost opraševanja je bila večja v primeru, ko smo kot mamo uporabili diploida, vendar je imel ta tudi večje število ženskih cvetov kot tetraploid. Plodovi so bili slabše razviti in v notranjosti brez semen, razen enega, pri katerem smo našli 30 semen. Semena so se nam že na otip zdela prazna in po sejanju niso kalila.

5 RAZPRAVA

5.1 INDUKCIJA HAPLOIDOV

Pri vseh testiranih dozah obsevanja so po oprahitvi nastali plodovi, iz katerih nam je uspelo izolirati embrije. To je v nasprotju z ugotovitvami Kurtar in sod. (2002), ki poročajo, da pri uporabljenih dozah gama žarkov, višjih od 50 Gy, ni prišlo do razvoja embrijev. Z našimi rezultati smo potrdili domneve Košmrlj in sod. (2014a), da bi z uporabo višje zračne vlažnosti med obsevanjem pelod lahko obsevali tudi z višjimi dozami (v našem primeru tudi do 600 Gy). Kljub temu, da so se plodovi razvili in imeli semena, je bilo veliko praznih. Podobno so ugotovili tudi Košmrlj in sod. (2013), ki poročajo o naraščanju števila praznih semen z višanjem doze obsevanja. Odpiranje vsakega semena za *in vitro* reševanje embrijev je zato zelo dolgotrajen postopek. V literaturi lahko zasledimo številne alternative, med drugim tudi uporabo X žarkov za ločevanje semen z embrijem in praznih semen pri kumarah (Claveria in sod., 2005), vendar je ta metoda pri bučah in bučkah neuporabna zaradi debele semenske ovojnice (Kurtar in Balkaya, 2010). Po reševanju embrijev, je velik delež izoliranih embrijev propadel (le 21 od 122 smo lahko določili ploidnost). Podobno se je zgodilo tudi pri reševanju embrijev pri melonah, kar je lahko posledica izraženih neugodnih recesivnih genov v haploidnem stanju, ki se v heterozigotnem stanju ne izrazijo (Gonzalo in sod., 2011).

Ker je bil pri oljnih bučah delež regeneriranih diploidov po oprahitvi z dozami X žarkov do 300 Gy visok, smo v naših poskusih uporabili višje doze obsevanja. Glede na objavljeno literaturo smo pričakovali višji delež haploidov. Kljub temu, da je bil delež haploidov na plod nizek, smo dobili višji delež haploidov glede na število izmerjenih, kot so pri oljih bučah dobili Košmrlj in sod. (2013). Kot že omenjeno, pa je uspešnost pri predstavnikih rodu *Cucurbita* omejena zaradi lastnosti peloda, predvsem zaradi njegove velikosti in morfoloških značilnosti (Kurtar in Balkaya, 2010). Zato ta med obsevanjem hitro izgublja viabilnost. Kot rešitev se omenja izpostavljanje peloda višji zračni vlažnosti med obsevanjem, ki smo jo tudi preverili. V naših poskusih je bil vpliv višje zračne vlažnosti na uspešnost oprahitve z obsevanim pelodom izrazito ugoden le pri obsevanju z najvišjo dozo, saj je bila uspešnost oprahitve pri 600 Gy in HH za 25,9 odstotnih točk višja kot pri RH. Pri ostalih dozah obsevanja pa ni bilo izrazitejših razlik (400 Gy) ali pa je bila uspešnost celo nižja (pri dozah 300 in 500 Gy) (Preglednica 7). Dodatna pomanjkljivost pri družini bučevk je tudi endopoliploidija, ki se pogosto izraža v mladih tkivih. Posledično lahko opazimo dodatne vrhove pri določanju ploidnosti s pretočno citometrijo, prvi vrh, ki predstavlja osnovno ploidno stanje, pa je lahko zelo nizek (Košmrlj in sod., 2013), kar je tudi pri naši analizi ploidnosti predstavlja težave.

Analiza mikrosatelitov je pokazala, da je bil en regenerant homozigoten na vseh 10 lokusih, vendar je bila na teh lokusih homozigotna tudi rastlina, uporabljena za indukcijo haploidov, zaradi česar ta ni bil potrjen za spontano podvojenega haploida. Vsi ostali regeneranti so bili heterozigotni na vsaj enem lokusu, kar potrjuje, da je spontano podvajanje kromosomov pri opraševanju z obsevanim pelodom redko. Podobno so ugotovili tudi Košmrlj in sod. (2013), ki so z uporabo mikrosatelitov analizirali več kot 250 regenerantov in potrdili heterozigotnost večine že z uporabo dveh mikrosatelitnih markerjev.

5.2 PODVAJANJE GENOMA

S pomočjo drugega pristopa smo želeli inducirati podvajanje genoma s pomočjo adventivne regeneracije izsečkov kotiledonov na gojišču z dodano fuzarično kislino. Ta je v preteklosti inducirala podvajanje genoma pri izsečkih kotiledonov oljnih buč (Košmrlj in sod., 2014b) in bi se zato lahko uporabila kot alternativa antimitotskih sredstev za podvajanje genoma tudi pri bučkah. Naši rezultati potrjujejo zaključke avtorjev Košmrlj in sod. (2014b), ki navajajo, da ima bazalni del kotiledonov najvišji regeneracijski potencial in da je ta tudi najmanj endoredupliciran. Tudi v naših poskusih adventivne regeneracije pri bučkah so se poganjki regenerirali izključno iz bazalnega dela kotiledonov. Podobno so ugotovili tudi drugi avtorji pri adventivni regeneraciji v rodu *Cucurbita* (Ananthakrishnan in sod., 2003; Lee in sod., 2003; Kathiravan in sod., 2006), ki so opazili, da je bila regeneracija iz drugih delov kotiledonov (npr. distalni del), hipokotil, korenine, itd. veliko manjša, oziroma do nje sploh ni prišlo. Odstotek regeneracije izsečkov je v primerjavi z ostalimi študijami pri vrsti *C. pepo* v povprečju nižji (Ananthakrishnan in sod., 2003; Kathiravan in sod., 2006), primerljiv pa je z rezultati pri oljnih bučah (Košmrlj in sod., 2014b), ter v primeru števila poganjkov na izseček pri avtorjih Lee in sod. (2003), ki so delali poskuse na orjaških bučah. Razlog je lahko v ostalih dejavnikih, ki vplivajo na uspešnost regeneracije (npr. genotip rastline), ter v sami naravi regeneracije poganjkov. Ti so se večkrat regenerirali v skupkih, zaradi česar je bilo težko doreči njihovo število.

Poleg ostalih dejavnikov, ima tudi sestava gojišča pomemben vpliv na regeneracijo izsečkov. Izmed številnih rastnih dejavnikov, ki so jih preizkusili pri izsečkih oljnih buč, so se dodatek 2iP, PABA in FA izkazali kot najboljše (Košmrlj in sod., 2014b). Vpliv 2iP so pojasnili s pomočjo že prej objavljenih študij, kjer je bila regeneracija odvisna od koncentracije prekursorske molekule za 2iP. Dodatek eksogenega 2iP pa naj bi imel enak vpliv. PABA ima podobno delovanje kot avksini in je strukturno podobna IAA. Spodbuja tudi sistemsko odpornost, zato bi lahko spremenila odziv izsečkov na FA. Ta se ponavadi dodaja v gojišču za selekcijo regenerantov za povečanje odpornosti na glivo *Fusarium* in naj bi v gojišču omejevala preživetje in regeneracijo izsečkov. Pri oljnih bučah so opazili zmanjševanje zmožnosti regeneracije s povečanjem koncentracije FA. V naših poskusih je

bilo to le v primeru dodatka PABA v gojišče. V gojišču, kjer je bil dodan 2iP, je bila regeneracija glede na število poganjkov na izseček celo višja pri višji koncentraciji FA.

Lee in sod. (2003) pa navajajo, da naj bi imela starost semen, iz katerih so izsečki kotiledonov, celo večji vpliv na regeneracijo kot sestava gojišča. Izsečki iz semen 4 dni po kaljenju, so imeli največjo zmožnost regeneracije, regeneracija pri izsečkih iz semen, starejših od 4 dni, pa je drastično upadla. Naši rezultati se od njihovih razlikujejo. V našem primeru je bila regeneracija izsečkov iz semen, ki so bila na gojišču za kaljenje 7 dni (cca. 4 dni po kaljenju) najnižja. Najvišja pa je bila v primeru izsečkov iz semen, ki so bila na gojišču 9 dni (cca. 6 dni po kaljenju), kjer so drugi avtorji Lee in sod. (2003) opazili drastični upad v regeneraciji.

Regeneracijo poliploidov pri adventivni regeneraciji so opazili tudi ostali avtorji. Miksoploidni in himerni regeneranti so bili detektirani pri drugih predstavnikih *C. pepo* (Ananthakrishnan in sod., 2003; Kathiravan in sod., 2006), avtorji Lee in sod. (2003) pa so dobili tudi enega tetraploida, ki pa se v tkivni kulturi ni regeneriral. Na gojišču s fuzarično kislino so pri oljnih bučah pridobili tetraploide le pri koncentracijah 10 in 20 mg l⁻¹ (višje in nižje doze niso inducirale podvajanja genoma, prav tako niso opazili nobenih tetraploidov na gojišču brez FA). V našem primeru smo dobili tetraploide pri obeh koncentracijah FA, vendar ne na vseh gojiščih. Vloga FA pri podvajanju genoma do sedaj še ni pojasnjena. Tudi ta bi lahko bila povezana s stopnjo endoredupliciranosti izsečkov (Košmrlj in sod., 2014b).

5.3 PRIDOBIVANJE TRIPLOIDOV

Pred aklimatizacijo smo preizkusili tri različna gojišča za koreninjenje in ugotovili, da je bilo koreninjenje najboljše na MS gojišču brez dodanih hormonov, kar je v nasprotju z ugotovitvami Pal in sod. (2007), ki so dobili največje število korenin na gojišču z 1 mg l⁻¹ IBA. Ta se pogosto uporablja pri indukciji nastanka korenin v rodu *Cucurbita*, v našem primeru pa je inducirala nastanek korenin le pri tretjini regenerantov, le-te so bile tudi zelo kratke. Na nastanek korenin lahko poleg sestave gojišča vplivajo tudi stanje regenerantov, pri katerih želimo inducirati nastanek korenin, gojišče in število subkultivacij pred uporabo gojišč za koreninjenje in čas na gojišču pred koreninjenjem. Poleg tega pa na nastanek korenin vplivajo tudi okoljski dejavniki in genotip.

Pri produkciji triploidov smo naleteli na številne težave. Prva je bila nizka uspešnost križanja tetraploidov s diploidi, kar lahko delno razložimo tudi s slabšimi okoljskimi pogoji (nizke temperature). Plodovi, ki so nastajali, so se nepravilno razvijali, ter so bili v notranjosti prazni. Seme, ki smo ga pridobili, pa ni kalilo. Podobne ovire navajajo tudi avtorji pri produkciji triploidov pri lubenicah (Hodghes, 2007; Noh in sod., 2012).

6 SKLEPI

Razvili smo protokol za indukcijo haploidov pri bučkah s pomočjo opraševanja s pelodom, obsevanim z X žarki, s katero smo po *in vitro* reševanju nedozorelih embrijev pridobili 2 haploida. Naši rezultati analize mikrosatelitov potrjujejo predhodno objavljene raziskave, ki pravijo, da je spontano podvajanje pri opraševanju z obsevanim pelodom redko in je večina diploidnih regenerantov posledica opraševanja s pelodom, ki ga obsevanje ni prizadelo.

Razvili smo tudi protokol za poliploidizacijo bučk preko adventivne regeneracije izsečkov kotiledonov na gojišču s fuzarično kislino. Dokazali smo, da dodatek fuzarične kisline v gojišče za adventivno regeneracijo spodbuja podvajanje genoma in bi se ta lahko uporabila namesto animitotskih sredstev za podvajanje genoma diploidov. Tako pridobljeni tetraploidi bi se lahko uporabljali za produkcijo triploidnih rastlin. Z uporabo te metode smo pridobili 5 tetraploidov, 3 od teh smo uspešno aklimatizirali in kasneje križali z diploidnimi rastlinami. Tako smo pridobili triploidno seme, ki pa ni kalilo, zato morfološka ocena triploidnih rastlin ni bila mogoča.

7 POVZETEK

V družino bučevk spadajo številne kmetijsko pomembne vrste, kot so melone, kumare, lubenice, buče in bučke. Žlahtnjenje pri bučevkah poteka v smeri pridobivanja hibridov s križanjem čistih linij. Te bi lahko namesto z večletnim samoopraševanjem dobili z indukcijo haploidov, saj lahko z uporabo te metode in uspešno regeneracijo pridobimo popolno homozigotne rastline že v eni generaciji. Nastanek haploidov lahko induciramo s pomočjo različnih tehnik iz ženskih ali moških gamet, vsaka ima svoje prednosti in slabosti. Za uporabo haploidnih regenerantov pri postopkih ginogeneze v žlahtniteljske namene je potrebno njihov genom podvojiti, kar lahko naredimo z uporabo antimitotskih sredstev ali preko adventivne regeneracije. Ta se je izkazala za učinkovito tudi pri pridobivanju tetraploidnih regenerantov pri oljnih bučah, ki se lahko uporabijo za pridobivanje triploidnih rastlin, ki so se pokazali za zanimive pri lubenicah.

V ta namen smo pri bučkah razvili protokol za indukcijo haploidov z opraševanjem z obsevanim pelodom in protokol za podvajanje genoma preko adventivne regeneracije na gojišču s fuzarično kislino. Z indukcijo haploidov smo z uporabo višjih doz obsevanja (nad 300 Gy) pridobili 2 haploida, ostali diploidni regeneranti pa so se izkazali večinoma za heterozigotne in so bili posledica opraševanja s pelodom, ki ga obsevanje ni dovolj prizadelo. Za adventivno regeneracijo smo uporabili gojišča po Murashige in Skoog-u z dodatki različnih rastnih dejavnikov (PABA, 2iP in FA) in dosegli regeneracijo od 28,41 do 36,26 % izsečkov. Tako smo pridobili 287 regenerantov, od katerih je pri 5 prišlo do podvojitve genoma. Te smo aklimatizirali in s križanjem z diploidnimi rastlinami pridobili triploidno seme.

8 VIRI

- Ananthakrishnan G., Xia X., Elman C., Singer S., Paris H. S., Gal-On A., Gaba V. 2006. Shoot production in squash (*Cucurbita pepo*) by *in vitro* organogenesis. *Plant Cell Reports*, 21: 739-746
- Ari E., Ikten H., Gocmen M., Coskun R., Eren A. 2010. Comparative evaluation of different embryo rescue techniques on parthenogenetic melon (*Cucumis melo* L.) fruits induced with irradiated pollen. *African Journal of Biotechnology*, 9, 33: 5347-5356
- Ashok Kumar H.G., Murthy H.N., Paek K.Y. 2002. Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. *Scientia Horticulturae*, 98: 213–222
- Ashok Kumar H.G., Murthy H.N. 2009. Effect of sugars and amino acids on androgenesis of *Cucumis sativus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 78: 201–208
- Babnik N. 2000. Tehnologije pridelave bučk. *Sodobno kmetijstvo*, 33, 4: 179-180
- Bohanec B. 2004. Osnove rastlinske biotehnologije. V: Gensko spremenjena hrana. Bohanec B., Javornik B., Strel B. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 1-28
- Chahal G.S., Gosal S.S. 2006. Principles and procedures of plant breeding: biotechnical and conventional approaches. Harrow, Alpha Science International Ltd.: 604 str.
- Claveria E., Garcia-Mas J., Dolcet-Sanjuan R. 2005. Optimization of cucumber doubled haploid line production using *in vitro* rescue of *in vivo* induced parthenogenic embryos. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130, 4: 555-560
- Diao W., Jia Y., Song H., Zhang X., Lou Q., Chen J. 2009. Efficient embryo induction in cucumber ovary culture and homozygous identification of the regenerants using SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 119: 246–251
- FAOSTAT. Food and Agricultural Organization of the United Nations.
<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E> (julij 2015)
- Faris N.M., Nikolova V., Niemirowicz-Szczytt K. 1999. The effect of gamma irradiation dose on cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid embryo production. *Acta Physiologiae Plantarum*, 21, 4: 391-396
- Formisano G., Roig C., Esteras C., Ercolano M. R., Nuez F., Monforte A. J., Belen Pico M. 2012. Genetic diversity of Spanish *Cucurbita pepo* landraces: an unexploited resource for summer squash breeding. *Genetic Resources and Crop Evolution*

- Gémes-Juhász A., Balogh P., Ferenczy A., Kristóf Z. 2002. Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on *in vitro* gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Reports*, 21:105–111
- Godbole M., Murthy H. N. 2012. Parthenogenetic haploid plants using gamma irradiated pollen in snapmelon (*Cucumis melo* var. *momordica*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109:167–170
- Gong L., Stift G., Kofler R., Pachner M., Lelley T. 2008. Microsatellites for the genus *Cucurbita* and an SSR-based genetic linkage map of *Cucurbita pepo* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 117: 37–48
- Gonzalo M. J., Claveria E., Monforte A. J., Dolcet-Sanjuan R. 2011. Parthenogenic haploids in melon: generation and molecular characterization of a doubled haploid line population. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 136, 2: 145–154
- Hodges L. 2007. Growing seedless (triploid) atermelons. Lincoln, Division of the Institute of Agriculture and Natural Resources, University of Nebraska.
<http://www.ianrpubs.unl.edu/pages/publicationD.jsp?publicationId=849> (julij 2015)
- IAEA safety standards: radiation safety of gamma, electron and X ray facilities for protecting people and the environment. 2010. Vienna, International Atomic Energy Agency: 303 str.
http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/Pub1454_web.pdf (julij 2015)
- Jakše M. 2000. Razširjenost pridelovanja bučnic v svetu. *Sodobno kmetijstvo*, 33, 4: 151-152
- 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
- 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. 2014a. 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. 2014b. Adventitious regeneration in styrian oil pumpkin in relation to the endoreduplication pattern and induced tetraploidy on fusaric acid-supplemented media. *Plant Growth Regulation*, 75, 3: 587-594

- Kurtar E. S., Balkaya A. 2010. Production of *in vitro* haploid plants from *in situ* induced haploid embryos in winter squash (*Cucurbita maxima* Duchesne ex Lam.) via irradiated pollen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 102: 267–277
- Kurtar E. S., Balkaya A., Ozbakir M., Ofluoglu T. 2009. Induction of haploid embryo and plant regeneration via irradiated pollen technique in pumpkih (*Cucurbita moschata* Duchesne ex. Poir). *African Journal of Biotechnology*, 8, 21: 5944-5951
- Kurtar E. S., Sari N., Abak K. 2002. Obtention of haploid embryos and plants through irradiated pollen technique in squash (*Cucurbita pepo* L.). *Euphytica*, 127: 335–344
- Lee Y. K., Chung W. I., Ezura H. 2003. Efficient plant regeneration via organogenesis in winter squash (*Cucurbita maxima* Duch.). *Plant Science*, 164: 413-418
- Lotfi M., Alan A. R., Henning M. J., Jahn M. M., Erle E. D. 2003. Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. *Plant cell reports*, 21: 1121-1128
- Metwally E.I., Moustafa S.A., El-Sawy B.I., Shalaby T.A. 1998a. Haploid plantlets derived by anther culture of *Cucurbita pepo*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52: 171–176
- Metwally E.I., Moustafa S.A., El-Sawy B.I., Haroun S.A., Shalaby T.A. 1998b. Production of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated ovules of *Cucurbita pepo*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52: 117-121
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497
- Murovec J., Bohanec B. 2012. Haploids and doubled haploids in plant breeding. V: *Plant breeding*. Abdurakhmonov I. (ed.). Rijeka, InTech: 87-106
- Noh J., Sheikh S., Chon H. G., Seong M. H., Lim J. H., Lee S. G., Jung G. T., Kim J. M., Ju H., Huh Y. C. 2012. Screening Different Methods of Tetraploid Induction in Watermelon [*Citrullus lanatus* (thunb.) Manst. and Nakai]. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 53, 6: 521-529
- Pal S. P., Alam I., Anisuzzaman M., Sarker K. K., Sharmin S. A., Alam M. F. 2007. Indirect Organogenesis in Summer Squash (*Cucurbita pepo* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 31: 63-70
- Podatkovni portal SI-STAT. Okolje in naravni viri. Statistični urad Republike Slovenije.

http://pxweb.stat.si/pxweb/Dialog/varval.asp?ma=1502403S&ti=&path=../Database/Okolje/15_kmetijstvo_ribistvo/04_rastlinska_pridelava/01_15024_pridelki_povrsina/&lang=2 (julij 2015)

Podgornik Reš R. 2003. Čarobni svet buč. Ljubljana, Kmečki glas: 158 str.

Sari N., Abak K., Pitrat M., Rode J.C., Dumas de Vaulx R. 1994. Induction of parthenogenetic haploid embryos after pollination by irradiated pollen in watermelon. Hortscience, 29, 10:1189–1190

Sauton A., Dumas De Vaulx R. 1987. Obtention de plantes haploides chez le melon (*Cucumis melo* L.) par gynogenese induite par pollen irradie. Agronomie, 7, 2: 141–148

Shalaby T. A. 2007. Factors affecting haploid induction through *in vitro* gynogenesis in summer squash (*Cucurbita pepo* L.). Scientia Horticulturae, 115: 1–6

Song H., Lou Q., Luo X., Wolukau J.N., Diao W., Qian C., Chen J. 2007. Regeneration of doubled haploid plants by androgenesis of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant Cell Tissue Organ Cultur, 90: 245–254

Sugiyama K., Morishita M., Nishino E. 2002. Seedless watermelons produced via soft-X-irradiated pollen. HortScience, 37, 2: 292-295

Šiško M. 2000. Žlahtnjenje bučnic. Sodobno kmetijstvo, 33, 4: 153-155

ZAHVALA

Zahvaljujem se za pomoč vsem, ki so mi pomagali in pripomogli k nastanku magistrske naloge. Še posebej se zahvaljujem mentorici doc. dr. Jani Murovec za gradivo, napotke in usmerjanje pri pisanju, prav tako pa tudi za vso pomoč v laboratoriju.

Za hiter in temeljit pregled naloge se zahvaljujem recenzentu doc. dr. Alešu Kladniku.

Prav tako se zahvaljujem tudi vsem sodelavcem na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin, za vso pomoč, nasvete in dobro družbo.

Zahvala gre tudi družini in vsem prijateljem, ki ste mi stali ob strani med samim študijem.