

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Metod KOVAČIČ

**PODVAJANJE HAPLOIDNIH RASTLIN ČEBULE  
(*Allium cepa* L.) IN FERTILNOST DIHAPLOIDNIH  
REGENERANTOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Metod KOVAČIČ

**PODVAJANJE HAPLOIDNIH RASTLIN ČEBULE (*Allium cepa* L.) IN  
FERTILNOST DIHAPLOIDNIH REGENERANTOV**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**DOUBLING OF ONION (*Allium cepa* L.) HAPLOID PLANTS AND  
FERTILITY OF DIHAPLOID REGENERANTS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija agronomije. Opravljeno je bilo na Katedri za genetiko, biotehnologijo in žlahtnenje rastlin Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, kjer so bili opravljeni vsi postopki podvajanja haploidov in opravljene vse analize ploidnosti.

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

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Katja VADNAL  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

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

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Metod Kovačič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn  
DK UDK 635.25:575.822(043.2)  
KG čebula/podvajanje/dihaploidi/amiprofos-metil/pretočna citometrija/fertilitet  
KK AGRIS F30  
AV KOVAČIČ, Metod  
SA BOHANEČ, Borut (mentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo  
LI 2006  
IN PODVAJANJE HAPLOIDNIH RASTLIN ČEBULE (*Allium cepa* L.) IN FERTILNOST DIHAPLOIDNIH REGENERANTOV  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XI, 26, [4] str., 3 pregl., 11 sl., 1 pril., 24 vir.  
IJ sl  
JI sl/en
- AI Haploidne čebulice smo preko koreninic tretirali z amiprofos-metilom (APM) pri različnih koncentracijah (0  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$ , 2000  $\mu\text{M}$ ) z namenom podvajanja kromosomskega števila. Opazovali smo tudi vpliv porezanih ali neporezanih koreninic na sposobnost podvajanja. Tretiranje je trajalo tri dni pri koncentracijah APM-a od 0 do 1000  $\mu\text{M}$  in pet dni za vzorce, tretirane s koncentracijo APM-a 2000  $\mu\text{M}$ . Izkazalo se je, da APM ni imel vpliva na podvajanje kromosomskega števila, saj se poganjki haploidnih čebul pri nobenem obravnavanju niso podvojili. Stopnja preživelosti tretiranih čebulic s porezanimi koreninicami pri koncentracijah APM-a, manjših od 500  $\mu\text{M}$ , je bila 3,3 do 20 % večja kot stopnja preživelosti čebulic z neporezanimi koreninicami pri enakih koncentracijah APM-a. Ugotavljanje ploidnosti je bilo opravljeno s pretočnim citometrom Partec-PAS IIIi. Pri postopku pridobivanja novih hibridnih kultivarjev je dobrodošel podatek o fertiliteti linij, saj je zaradi inbriding depresije fertilitet dihaploidnih linij mnogokrat problematična. Fertilitet dihaploidnih regenerantov smo ugotavljali s štetjem fertitnih in sterilnih pelodnih zrn. Povprečna fertilitet vseh obravnavanih dihaploidnih regenerantov je bila 41,63 %. Najboljši vzorec je dosegel 96,86 % fertilitet.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDK 635.25:575.822(043.2)  
CX onion/doubling/dihaploids/amiprofos-methyl/flow cytometry/fertility  
CC AGRIS F30  
AU KOVAČIČ, Metod  
AA BOHANEČ, Borut (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy  
PY 2006  
TI DOUBLING OF ONION (*Allium cepa* L.) HAPLOID PLANTS AND FERTILITY OF DIHAPLOID REGENERANTS  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XI, 26, [4] p., 3 tab., 11 fig., 1 ann., 24 ref.  
LA sl  
AL sl/en

AB Haploid onion plants were treated with soaking bulbs with already formed roots in different concentrations of amiprofos-methyl (APM) (0  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$ , 2000  $\mu\text{M}$ ) to induce chromosome doubling. Doubling effect was measured also on roots that were either cut or non-cut. The treatment time was three days for onions treated with 0 to 1000  $\mu\text{M}$  of APM and five days for onions treated with 2000  $\mu\text{M}$  of APM. The treatment with APM had no doubling effect on onions. The higher surviving rate was achieved on onions with cut roots at concentrations of APM lower than 500  $\mu\text{M}$ . The onions with non-cut roots at the same concentration of APM had 3.3 to 20 % lower survival rate. The ploidy level was measured using flow cytometry on Partec-PAS IIIi. We also studied the fertility of the double haploid onion regenerants, since due to inbreeding depression fertility of doubled haploid lines is often a limiting factor. From each studied plant we collected three flower buds from an umbel. For estimation of pollen viability 1 % aceto-carmin staining was used. Average fertility of all doubled haploid regenerants was 41.63 %. The best regenerant achieved 96.86 % fertility.

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	IX
Okrajšave in simboli	X
Slovarček	XI
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN RAZISKAVE	2
<b>2 PREGLED DOSEDANJIH OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 INDUKCIJA HAPLOIDOV	3
2.2 PODVAJANJE HAPLOIDOV	4
2.3 FERTILNOST CVETOV	6
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	<b>8</b>
3.1 MATERIAL	8
<b>3.1.1 Material za podvajanje</b>	<b>8</b>
3.1.1.1 Pretočni citometer	8
<b>3.1.2 Material za ugotavljanje fertilitnosti</b>	<b>9</b>
3.2 METODE DELA	9
<b>3.2.1 Postopek pred podvajanjem</b>	<b>9</b>
<b>3.2.2 Postopek podvajanja z APM-om</b>	<b>9</b>
<b>3.2.3 Postopek preučitve fertilitnosti</b>	<b>11</b>
<b>3.2.4 Priprava raztopin</b>	<b>12</b>
3.2.4.1 Otto raztopina 1	12
3.2.4.2 Otto raztopina 2	12
3.2.4.3 Priprava raztopin amiprofos-metila (APM-a)	13
3.2.4.4 Priprava 1 % aceto-karmina	13
<b>4 REZULTATI</b>	<b>14</b>
4.1 REZULTATI PODVAJANJA Z APM-om	14

4.2	PREUČITEV FERTILNOSTI DIHAPLOIDNIH REGENERANTOV	18
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	21
5.1	RAZPRAVA	21
5.2	SKLEPI	22
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	23
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	25
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

		str.
Pregl. 1	Odstotek ploidnosti in odstotek preživelih čebulic (1. poizkus)	15
Pregl. 2	Odstotek ploidnosti in odstotek preživelih čebulic (2. poizkus)	16
Pregl. 3	Odstotki fertlnosti dihaploidnih regenerantov	20



KAZALO SLIK

	str.	
Sl. 1	Struktura amiprofos-metila	5
Sl. 2	Princip delovanja pretočnega citometra	9
Sl. 3	Čebulice pri tretiranju z različnimi koncentracijami APM-a	10
Sl. 4	Presajene čebulice v lonce s šotnim substratom v rastlinjaku	11
Sl. 5	Odprti cvetovi kobula pri čebuli	12
Sl. 6	Primerjava razvitosti koreninic (neporezane) pri različnih koncentracijah APM-a (0 $\mu\text{M}$ - K, 50 $\mu\text{M}$ , 200 $\mu\text{M}$ )	14
Sl. 7	Primer dihaploidnega vzorca	17
Sl. 8	Primer haploidnega vzorca	17
Sl. 9	Primer dobro fertilnega peloda	18
Sl. 10	Primer slabo fertilnega peloda	19
Sl. 11	Primer srednje dobro fertilnega peloda	19

## KAZALO PRILOG

- Priloga A Pregled ploidnosti vseh vzorcev čebulic in izločitev spontanih dihaploidov (2n) pred postopkom podvajanja

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

2,4-D	2,4-diklorofenoksiocetna kislina
2iP	N6-(2-izopentenil) adanin
6-BA	6-benzilamino purin
ACE	aceton
APM	amiprofos-metil
BA	6-benzilamino purin
DMSO	dimetil sufoksid
K	kontrola brez dodanega APM-a
MET	metanol
NAA	1-naftalenocetna kislina
TDZ	tidiazuron

## SLOVARČEK

gametofit	moška ali ženska spolna celica
heterozigotnost	kromosoma sta si na alelih različna
homozigotnost	kromosoma sta si na alelih enaka
inbriding depresija	izražanje letalnih in subletalnih genov

## 1 UVOD

Čebula je zelo zastopana in pomembna zelenjadnica na celem svetu. Gojimo jo lahko v vseh klimatih. Čebulo lahko kupimo skozi vse leto, zato ne čudi, da se v večini domov uporablja skoraj vsak dan, pa čeprav v malih količinah (Jakše, 1994).

Čebula spada v družino lukovk (Alliaceae), je enokaličnica ter tujeprašna (protoandrija) dvoletna rastlina (fakultativno triletna). Drugo leto požene iz čebulice cvetno steblo (1-4 ali več), ki je votlo in oblikuje enostaven kobul s 100 in več belimi cvetovi (Jakše, 2004). Prašniki (antere) dozoriijo prej kot plodnica (stigma), ki postane občutljiva na pelod šele nekaj dni po odprtju prašnikov.

Čebule se močno razlikujejo po obliki, barvi luskolistov, dolžini rastne dobe, odpornosti proti boleznim, ostrini okusa ter po vsebnosti suhe snovi in sposobnosti skladiščenja. Vse te razlike so bolj ali manj odvisne od genske raznolikosti in rastnih razmer. Večjo izenačenost in sočasno zorenje dosegajo predvsem hibridi. Večina slovenskih tujeprašnih sort je neizenačenih po obliki in času dozorevanja, vendar z dobrim skladiščnim potencialom in visoko vsebnostjo suhe snovi (Jakše, 1994).

Žlahtnjenje hibridnih kultivarjev čebule, ki dosegajo večje in bolj izenačene pridelke, je bilo enostavnejše po odkritju citoplazmatske moške sterilnosti pri čebuli. Tako pri požlahtnjenju novega hibrida ni bilo potrebno več ročno odstranjevanje prašnikov.

Vendar pa je zaradi dvoletnega življenjskega cikla in tujeprašnosti pridobivanje čistih naravnih linij še zmeraj dolgotrajen postopek (6-10 let samoopraševanja). Indukcija haploidnih rastlin in njej sledeče podvajanje kromosomov bi občutno skrajšala čas, ki je potreben za pridobitev boljših hibridov čebule (Bohanec in sod., 1995).

Ker je čebula tujeprašna rastlina, predstavlja razvoj homozigotnih linij nujen korak pred proizvodnjo hibridov. *In vitro* kultura neoprašenih ovarijev in celih cvetov postaja pri čebuli zelo zanesljiva tehnika, ki dovoljuje pridobivanje homozigotnih linij že v samo dveh letih (Campion in Schiavi, 1994).

Ker populacije čebule še zmeraj vsebujejo škodljive gene, je inbriding depresija očitna. Podvojeni haploidi so tako alternativna možnost, ki ponuja prvič pri rastlinah čebule popolno homozigotnost in fenotipsko izenačenost (Bohanec, 2002).

Z biotehnološkim postopkom pridobitve dihaploidnih linij lahko zelo pospešimo žlahtnjenje novega hibrida in se do določene mere izognemo inbriding depresiji – izrazu letalnih in subletalnih genov. Gre za indukcijo haploidov, pri čemer vzgojimo rastlinice, ki se razvijejo iz monoploidnih celic moškega ali ženskega gametofita brez oprašitve. Pri rodu *Allium* indukcija haploidov iz moškega gametofita ni uspešna, indukcijo iz ženskega gametofita pa je izvedlo že kar nekaj raziskovalnih skupin (Muren, 1989; Champion in Alloni, 1990; Keller, 1990; Champion in sod., 1992).

Pridobljene haploidne rastline čebule so z žlahtniteljskega vidika neuporabne, potrebno jih je podvojiti na diploidni nivo. Za razliko od številnih drugih vrst, pri katerih postopki pridobivanja haploidov potekajo predvsem po poti androgeneze, je pri ginogenetskih regenerantih spontano podvajanje redko. Jakše in sod., (2003) navajajo manj kot 10 % sposobnost spontane podvojitve genoma pri čebuli.

Do zdaj preučeni postopki podvajanja so zahtevni in le deloma uspešni.

### 1.1 NAMEN RAZISKAVE

Namen diplomske naloge je bil preučiti alternativno možnost podvojitve haploidnih rastlin čebule z uporabo amiprofos-metila (APM), ki bi ga rastline vsrkale skozi korenine čebulice. Pri izvedbi postopka smo se zgledovali po Weich in Levall (2003) postopku podvajanja haploidnih rastlin sladkorne pese (*Beta vulgaris* L.), pri katerih je metoda podvajanja z vsrkanjem antimitotika preko korenin uspešna.

Drugi namen diplomske naloge pa je preučitev moške fertilitnosti že pridobljenih dihaploidnih regenerantov. Do zdaj tovrstnih študij nismo zasledili.

## 2 PREGLED DOSEDANJIH OBJAV

Čebula izhaja iz Srednje Azije, Bližnjega vzhoda ter Sredozemlja. Je ena izmed najstarejših kulturnih rastlin, saj jo omenjajo že pred 3000 leti. Kot zdravilno rastlino so jo poznali že stari Grki in Rimljani. V svetu je pridelovanje razširjeno na 1,7 milijonih ha, v glavnem na območju vzhodne Azije, južne Evrope, Rusije in sosednjih držav (Osvald, 2004).

Čebula spada v družino lukovk – *Alliaceae*. Je enokaličnica in tujeprašnica (protoandrija). Je dvoletna rastlina, fakultativno triletna. Drugo ali tretje leto poženejo iz čebulice cvetna stebila (1-4 ali več), ki so votla in oblikujejo enostaven kobul s 100 in več belimi cvetovi. Plod je orešek. Semena so črna, rahlo izdolžena ali trikotna. Gojimo jo zaradi omesenelih luskolistov, ki izraščajo iz skrajšanega stebila, ki ga imenujemo čebulni krožec. Glavna korenina kmalu po vzniku odmre. Iz čebulnega krožca izraščajo nadomestne ali adventivne korenine. Omeseneli luskolisti so obdani s prozorno ali rahlo obarvano povrhnjico, celotno čebulico pa prekrivajo še suhi luskolisti. Pri vrhu čebulice prehajajo luskolisti preko čebulnega vratu v zelene cevaste prave liste. Oblika čebulice je lahko podolgovata, ovalna, okrogla, rahlo sploščena, ploščata, močno sploščena, pogačasta ali trikotno zaobljena. Barva luskolistov je lahko bela, blede rumena, rožnata, bakreno rjava, žitno rumena, rjava, rdečkasta, vijoličnordeča. Luskolisti so lahko bolj tanki ali debelejši, oprijemajoči ali ohlapni (Jakše, 2004).

Ker je čebula tujeprašna rastlina, so prve hibride pridobili s križanjem čistih linij, ki so bile pridobljene s postopki samoopraševanja. Pri čebuli je izrazita heterozigotnost, zato moramo za pridobitev homozigotnih - čistih linij čebulo samoopraševati najmanj pet generacij. Tako s samoopraševanjem povečujemo homozigotnost linije. Ko križamo dve čisti liniji med seboj, dobimo potomstvo, ki je izenačeno v rasti in času dozorevanja.

Cilji zlahtnjenja čebule so čebulice okrogle do rahlo izdolžene oblike, čvrsto meso, okus, izenačenost kultivarja po obliki in zorenju, tesno prilegajoči in čvrsti luskolisti, ozek čebulni vrat, dobre skladiščne sposobnosti, pozno poganjanje cvetnega stebila, majhen in izbočen čebulni krožec ter da 30-50 % čebulice gleda iz zemlje (Jakše, 2004).

### 2.1 INDUKCIJA HAPLOIDOV

Haplidi so rastline z enojnim številom kromosomov. V naravi so med višjimi rastlinami haplidi zelo redki. Ponavadi so take rastline tudi manjše rasti kot diploidne. Haploidne rastline lahko razmnožujemo samo vegetativno, ker nimajo sposobnosti produkcije kaljivih semen. Haploidne rastline dobimo tako, da induciramo razvoj anter ali ovarijev brez oprasitve v *in vitro* kulturi.

Uspešno *in vitro* ginogenetsko regeneracijo haploidnih embrijev je prvi objavil Muren (1989). Ugotovil je, da so bili najbolj odzivni ovariji, ki so bili izrezani iz cveta 3-5 dni pred odprtjem prašnikov. Tudi koncentracija sladkorja je bila pomembna: največji odziv pri čebuli je bil dosežen pri 10 % sladkorja v gojišču.

Campion in Alloni (1990) sta dobila haploidne rastline iz neoplojenih ovul brez tvorbe kalusa v nobenem koraku postopka. Poizkus so začeli s cvetno predkulturo na trdnem gojišču in po 10-20 dneh so bile ovule odstranjene in gojene na gojišču z drugačno hormonsko sestavo. Odstotek pridobljenih embrijev iz ovul je bil še vedno nizek (0,28 %). Postopek je bil izboljššan (Campion in sod., 1992) z uporabo 100 g/l sladkorja namesto 30 g/l in 2 mg/l 2,4-D in BA v gojišču predkulture.

Campion in Schiavi (1994) navajata, da je sladkor faktor, ki najbolj vpliva na število embrijev. Ovule dajo približno toliko embrijev kot ovariji ali celi cvetovi, vendar zahtevajo več ročnega dela. Ovarije je lažje izrezati, vendar celi cvetovi predstavljajo najlažji način pridobivanja haploidov, čeprav včasih dajo manjše število embrijev.

Pri procesu indukcije, opisane po Campionu in sod. (1992), so Bohanec in sod. (1995) in Jakše in Bohanec (1994) v drugem indukcijskem gojišču zamenjali 2iP in NAA s TDZ (2 mg/l) in ugotovili, da v povprečju izboljša stopnjo regeneracije na 7,6 %.

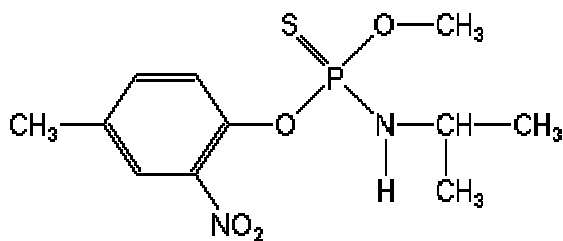
Ginogenezo štirih kultivarjev čebule iz ovul in ovarijev z dvema korakoma postopka so izvedli Bohanec in sod. (1995). Ugotovili so, da je bila indukcija pri ovarijih večja kot pri ovulah in močno pogojena z genotipom. Tiazuron (2 mg/l) je imel pozitiven učinek na regeneracijo. Analiza z encimom esteraza je pokazala, da je bilo 59 % regenerantov homozigotnih.

Pri podvajanju čebule igra pomembno vlogo odzivnost neke linije za ginogenezo. Bohanec in sod. (1999) so demonstrirali, da križanje odzivnih z neodzivnimi linijami čebule poveča ginogenetsko sposobnost v hibridnem potomstvu.

## 2.2 PODVAJANJE HAPLOIDOV

Za podvajanje haploidov potrebujemo snovi, ki povzročajo blokado delitvenega vretena v mitozii. Te kemične spojine so predvsem alkaloidi in nekateri herbicidi, ki imajo vpliv na delitev celic. Torej, delujejo antimitotično ali antimikrotubularno. Podvojevalce, ki se uporabljajo za podvajanje haploidnih rastlin, predstavljajo predvsem kolhicin, orizalin, trifluralin in amiprofos-metil. Slednji se uporablja kot herbicid z antimitotskim delovanjem. Njegova formula je  $C_{11}H_{17}N_2O_4PS$  (Wood, 2006). Njegovo strukturo predstavlja slika 1.





Slika 1: Struktura amiprofos-metila (Wood, 2006)

Za podvajanje kromosomskega števila lahko uporabimo embrije, dele rastlin in tudi korenine.

Ker je odstotek pridobljenih dihaploidov še vedno nizek, predstavlja podvajanje kromosomskega števila glavno oviro pri širši uporabi ginogenetskih rastlin čebule za nadaljno vzgojo čistih linij čebule. Znano je, da se spontana diploidizacija haploidnih rastlin odvija v koreninskem rastnem vršičku (Campion in Azzimonti, 1988).

Campion in sod. (1995) so ugotovili, da izpostavitve ovarijev in celih cvetov v gojišču z 2,4-D ali NAA in 6-BA za 15 dni zadostuje za učinkovito ginogenetsko odzivanje ovarijev in celih cvetov tako, da lahko proembriji preostalih 30-80 dni rastejo na brez hormonskem gojišču. Navajajo, da tretiranje z 10 in 100 mg/l kolhicina za 24 ur da najvišje število diploidnih celic v koreninskih vršičkih, vendar v pogojih diploidizacija ne poteče. Pri tridnevnem tretiranju z 10 mg/l kolhicina so dobili 46 % popolnoma diploidnih poganjkov rastlin.

Geoffriau in sod. (1997) navajajo, da je diploidizacija potekla dobro (64 %) pri mikropropagaciji eksplantov, tretiranih s 0,625 mM kolhicina pri 24 °C. Testirali so kolhicin (0,625–12,5 mM) in orizalin (10–200 µM) za 24 ur pri rasti pogojih 4 °C v temi ali 24 °C pri 16-urni fotoperiodi. Najboljše rezultate so dobili z 2,5 mM kolhicina (do 65,7 % diploidov) in z 50 µM orizalina (do 57,1 % diploidov). Obe kemikaliji sta povzročili nastanek miksploidov (rastline, ki kažejo lastnosti haploidnih in dihaploidnih rastlin skupaj) in vplivali na regeneracijo rastlin, vendar je bila kvaliteta rastlin, tretiranih z orizalinom, boljša.

Jakše in Bohanec (2001) sta tretirala embrije takoj po regeneraciji. Uporabila sta okoli 7000 embrijev, ki sta jih tretirala z amiprofos-metilom (APM) ali orizalinom v tekočem in trdnem gojišču. Prvi rezultati so pokazali, da je amiprofos-metil bolj učinkovit in manj toksičen od orizalina.

Jakše in sod. (2003) so ugotovili, da je amiprofos-metil boljši od orizalina glede toksičnosti za rastline. Dodatka 2 % DMSO in 1 % Triton X-100 k 25  $\mu\text{M}$  APM nista izboljšala učinka podvajanja kromosomov. V končnem poizkusu s 6658 embriji so demonstrirali, da je bilo dvodnevno tretiranje v tekočem mediju s 50  $\mu\text{M}$  najbolj uspešno glede na podvojeno število kromosomov (36,7 % rastlin je bilo diploidnih, vendar jih je glede na kontrolo preživelo le 52,5 %). Pri dvodnevnem tretiranju v tekočem mediju s 25  $\mu\text{M}$  APM in pri dvodnevnem tretiranju na trdnem mediju s 50  $\mu\text{M}$  APM je bila produkcija diploidov 28,9 % in 21,3 %. To bi lahko predstavljalo alternativne metode pri podvajanju kromosomov, saj sta imeli v primerjavi z netretirano kontrolo ti dve tretirani zmanjšano stopnjo preživelosti za samo 24 %.

Spontana diploidizacija se pri čebuli zgodi v frekvenci manj kot 10 % (Jakše in sod., 2003).

Grzebelus in Adamus (2004) sta v svojem poizkusu uporabila dobro razvite embrije, pridobljene iz cvetnih kultur različnih linij čebule. Podvajanje sta izvedla *in vitro* na dveh vrstah regeneracijskega gojišča z dodatkom enega od štirih anti-mitotskih snovi (trifluralin, orizalin, amiprofos-metil in kolhicin) pri različnih koncentracijah. Embriji so bili na gojišču 24 ali 27 ur in nato prestavljeni na regeneracijsko gojišče brez anti-mikrotubulnih dodatkov. Med dobljenimi regeneranti je bilo 19–35 % diploidnih. Največji podvojitveni učinek so dobili na embrijih, ki so bili tretirani s 50  $\mu\text{M}$  trifluralina ali orizalina ali APM-a. Najmanj vitifikacije na embrijih so zasledili pri tretiranju z APM-om.

Weich in Levall (2003) poročata o podvajanju haploidnih rastlin rdeče pese (*Beta vulgaris* L.) preko korenin s podvojevalcem kolhicinom. Rdeči pesi sta sprala korenine pod tekočo vodo in konice korenin porezala za približno 1 mm. Tako sta olajšala transport kolhicina do meristematske cone. Korenine rastlin sta namočila v 0,2 % raztopini kolhicina z 0,25 % DMSO in jih tako pustila pet ur. Po tretiranju sta korenine sprala in rastline posadila v cvetlične lončke v rastlinjaku. V fazi šestega lista sta preštela kromosomsko število. Podvajanje haploidnih rastlin rdeče pese je preseglo 90 % uspeh.

### 2.3 FERTILNOST CVETOV

Slaba fertilitnost regenerantov ni specifično pogojena s procesom indukcije haploidov, ampak bolj s populacijami čebule na splošno. Inbriding depresija, izražana tudi kot nizka fertilitnost, preprečuje pridobivanje homozigotnih čistih linij pri nekaterih vrstah, tudi pri čebuli (Bohanec, 2002).

Povrnitev fertilitnosti je glavni dejavnik in kriterij, ki bo odločal o izbiri celotnega haplo-diploidizacijskega postopka (Geoffriau in sod., 1997), ker bodo samo fertitni dihaploidni regeneranti lahko ohranjali matične linije.

Alan in sod. (2004) poročajo o uspešni produkciji velikega števila plodnih spontanah in induciranih dihaploidnih linij čebule. Preko 1100 ginogenetskih rastlin so vzgojili iz približno 47000 cvetov, vzgojenih med letoma 1999 in 2001. Število semen, pridobljenih iz ene rastline, je variralo med 2 in več kot 600. Linije so razdelili v razrede z nizkim (1-10 semen), srednjim (15-90 semen) in visokim (več kot 100 semen) odstotkom semen na rastlino. Med dihaploidnimi regeneranti so ugotovili 14 rastlin brez semen, 7 rastlin z nizkim odstotkom semen, 15 rastlin s srednjim in 17 rastlin z visokim odstotkom semen. Kaljivosti peloda niso določali, zato je težko opredeliti, kolikšen del sterilnosti izvira iz moške in kolikšen del iz ženske sterilnosti. Potomstvo dveh induciranih in petih spontanah in diploidnih linij je pokazalo izenačenost v rasti, primerljivo z v visoki meri inbridiranimi linijami. Spontani in inducirani diploidi so pokazali podobno plodnost.

### 3 MATERIAL IN METODE

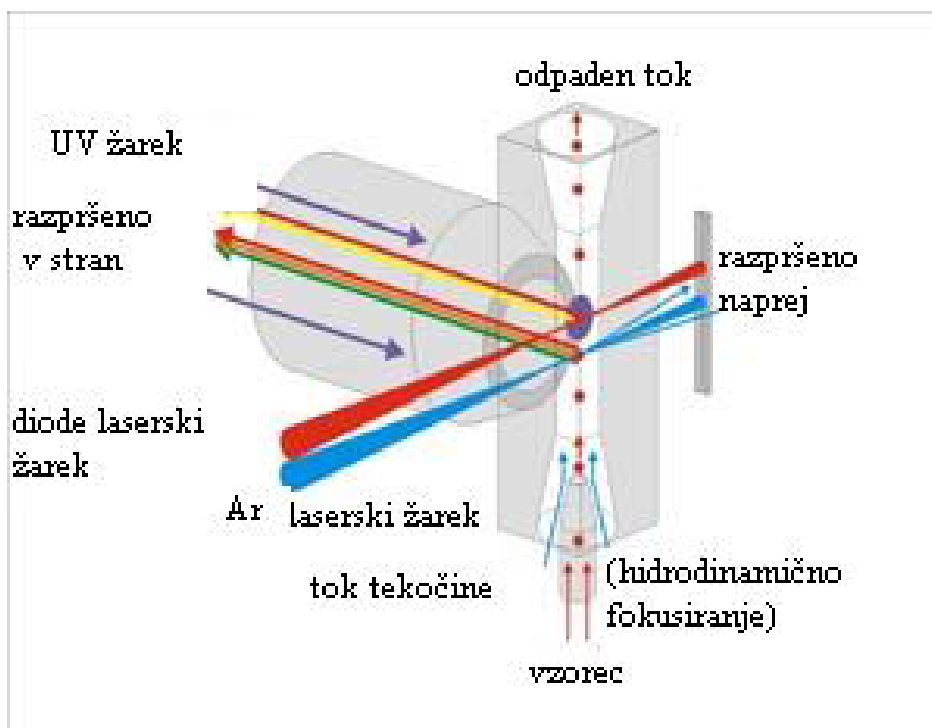
#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Material za podvajanje

Kot izhodiščni material smo uporabili haploidne čebulice različnih kultivarjev in linij, večina je izvirala iz linije B2923, ki so bile vzgojene iz embrijev (regenerantov), pridobljenih s postopki ginogeneze v letu 2003. Uporabili smo približno 360 haploidnih čebulic. Za podvajanje čebulic smo uporabili anti-mitotsko delujoč amiprofos-metil (AMP) v različnih koncentracijah (0  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$ , 2000  $\mu\text{M}$ ). Potrebovali smo še šest pravokotnih posod (dimenzije 30 x 50 cm), cedilca s 50  $\mu\text{m}$  mrežico, steklene in plastične petrijevke, britvice za sekanje listov, stiropor, šotni substrat, cvetlične lončke, destilirano vodo, Otto raztopino 1 in Otto raztopino 2, DAPI založno raztopino, kivete ter pretočni citometer Partec-PAS IIIi.

##### 3.1.1.1 Pretočni citometer

Pretočni citometer je aparat, s katerim lahko analiziramo in štejemo celice in mikrodelce. Lahko analizira preko 100.000 delcev v približno minuti. Ker deluje po principu meritev ekscitirane fluorescence, ima vgrajene različne vire svetlobe, kot so na primer UV-žarnica (HBO mercury arc), laser (Ar-ion), s katerimi osvetlimo s fluorescenčnimi barvili obarvane delce. Aparat ima optični sistem za zaznavo ekscitirane svetlobe. Ima natančno računalniško vodeno črpalko, ki potisne vzorec po cevki skozi svetlobni žarek. Volumen vzorca je mehansko določen s pomočjo dveh elektrod, ki se dotikata vzorca. Aparat ima vgrajen tudi sistem za samodejno čiščenje cevk, po katerih teče vzorec, zato ni možno, da bi se vzorci med seboj pomešali. Aparat vsebuje tudi programsko opremo, ki omogoča enostavnejšo uporabo. Shematski prikaz delovanja pretočnega citometra je na sliki 2. Pretočna citometrija predstavlja danes standard za avtomatizirane hitre celične analize (Partec, 2006).



Slika 2: Princip delovanja pretočnega citometra (Partec, 2006)

### 3.1.2 Material za ugotavljanje fertilitetnosti

Pri ugotavljanju fertilitetnosti smo uporabili pelod dihaploidnih regenerantov, 1 % raztopino aceto-karmina, objektna in krovna stekelca, mikroskop, petrijevke, skalpel, pinceto in digitalni fotoaparati. Fertilitetnost smo preučevali na 44-ih dihaploidnih regenerantih čebule.

## 3.2 METODE DELA

### 3.2.1 Postopek pred podvajanjem

Preden smo se lotili tretiranja čebulic s podvojevalcem APM-om, smo vse regenerante pregledali s postopkom pretočne citometrije, tako da smo lahko vse spontano podvojene regenerante izločili in v poizkusu uporabili samo haploidne rastline čebule. Priloga A prikazuje vse pregledane regenerante ("n" pomeni, da je regenerant haploiden, "2n" pomeni, da je regenerant diploiden). Vsi "2n" regeneranti so bili izločeni iz poizkusa. Čebulice smo nato shranili v temen hladen prostor, da je potekla dormanca.

### 3.2.2 Postopek podvajanja z APM-om

Ko smo imeli pregledane haploidne čebulice, smo jih naključno izbrali, vse približno enake velikosti. V posode smo natočili 1,5 l destilirane vode in izrezali stiropor tako, da je plaval

na vodi. V stiropor smo naredili luknjice, velike tako, da se je čebulica, ko smo jo postavili vanje, dotikala vode. Tako smo naredili pri vseh obravnavanjih (slika 3).



Slika 3: Čebulice pri tretiranju z različnimi koncentracijami APM-a

Tako pripravljene posode s čebulicami smo pustili dva dni v prostoru pri sobni temperaturi (24 °C). Po dveh dneh, ko so čebulice odgnale prve koreninice, smo nekaterim obravnavanjem porezali koreninice za približno 1 mm in vsem zamenjali vodo iz kadi - pri kontrolah z 1,5 l destilirane vode, pri ostalih obravnavanjih pa z 1,5 l pripravljene raztopine APM-a pri različnih koncentracijah za vsako obravnavanje posebej (50–2000  $\mu$ M). Tako pripravljene čebulice smo pustili še tri dni pri istih pogojih, kot je že bilo omenjeno. Po zaključenem tretiranju (po treh dneh, le pri čebulicah pri koncentraciji 2000  $\mu$ M po petih dneh) smo vse čebulice odstranili iz kadi in jim izprali koreninice z destilirano vodo. Nato smo jih posadili v cvetlične lončke, napolnjeje s šotnim substratom (slika 4) in jih postavili v rastlinjak. Posadili smo jih konec septembra.



Slika 4: Presajene čebulice v lonce s šotnim substratom v rastlinjaku

Ko so rastline dosegle fazo 3–4 listov po približno treh tednih rasti, smo jim odrezali približno 1,5 cm najmlajšega lista in ga analizirali s pretočno citometrijo, na ta način smo ugotavljali ploidnost rastlin. Košček lista smo v plastični petrijevki skupaj s 500  $\mu$ l raztopine Otto 2 nasekljali z britvico. Tako nasekljane liste smo precedili skozi najlonsko cedilce v kivete za pretočni citometer in dodali 1000  $\mu$ l raztopine Otto 1. Z aparatom za pretočno citometrijo smo nato lahko ugotovili, ali je rastlinica ostala haploid ali se je podvojila v diploid. V vsakem vzorcu je bilo prešteti približno 2000 jeder. Pred začetkom meritev smo pretočni citometer umerili z znanim vzorcem diploidne rastline čebule.

### 3.2.3 Postopek preučitve fertilitetnosti

Pelod dihaploidnih rastlin smo zbrali tako, da smo iz vsakega socvetja - kobula rastline odstranili tri naključno izbrane odprte cvetove (slika 5). Te cvetove smo prenesli v laboratorij in jim tam vsakemu posebej odstranili po tri prašnike. Nato smo prašnike vsakega cveta posebej stisnili na objektno stekelce, tako da so se prašniki odprli (počili). Na pelod smo kapnili 1 % raztopino aceto-karnina in pokrili s krovnim stekelcem. Tako

pripravljen vzorec smo pogledali pod mikroskopom. Fertilen pelod se je obarval rožnato, medtem ko se sterilni (nefertilen) pelod ni obarval. Pri vsakem vzorcu smo posneli tudi deset naključnih slik preko celega vzorca. Tako je imela vsaka rastlina čebule tri vzorce peloda in pri vsakem vzorcu smo naredili po deset fotografij. Kasneje smo lahko na fotografijah prešteli vsa pelodna zrna in tako izračunali odstotek fertilitetnosti dihaploidnih čebul.



Slika 5: Odprti cvetovi kobula pri čebuli (Onion, 2006)

### 3.2.4 Priprava raztopin

#### 3.2.4.1 Otto raztopina 1

Pripravili smo po 200 ml raztopine Otto buffer 1, in sicer tako, da smo zatehtali 4,2 g monohidrata citronske kisline, mu dodali 1,0 ml surfaktanta Tween-a in dolili destilirane vode do oznake 200 ml na bučki.

#### 3.2.4.2 Otto raztopina 2

Pri pripravi Otto raztopine 2 smo zatehtali 14,2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  in dodali 2,1 ml DAPI založne raztopine (DAPI založna raztopina: 10 mg DAPI/20 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ). Nato smo dolili destilirano vodo do oznake 200 ml na bučki.



#### 3.2.4.3 Priprava raztopin amiprofos-metila (APM-a)

Za APM vemo, da je 0,3043 mg/ml enako 1 mM. Na primer za 1,5 l 500  $\mu$ M raztopino APM-a smo morali zatehtati 0,2283 g APM-a. Zatehtani APM smo najprej raztopili v metanolu ali acetonu s pomočjo magnetnega mešalnika. Ko je bil APM popolnoma raztopljen, smo počasi prilili destilirano vodo do oznake 1,5 l na bučki. Destilirano vodo je bilo potrebno dolivati počasi, saj bi se v nasprotnem primeru APM ponovno kristaliziral. Tak postopek smo uporabili pri vseh koncentracijah APM-a.

#### 3.2.4.4 Priprava 1 % aceto-karmina

Za pripravo 1 % raztopine aceto-karmina potrebujemo 1 g karmina v prahu, 45 ml koncentrirane očetne kisline in 55 ml destilirane vode. Očetno kislino in vodo zmešamo in dobimo 100 ml 45 % očetne kisline, ki jo segrejemo do vrelišča. Nato v vrelo 45 % očetno kislino dodamo karmin in pustimo, da vre še 5-10 min z občasnim mešanjem, dokler se barva ne spremeni v temno rdečo. Ohladimo in prefiltriramo v temen lonček ter shranimo v hladilniku za nadaljno uporabo (Singh, 2002).

## 4 REZULTATI

### 4.1 REZULTATI PODVAJANJA Z APM-om

Pri poizkusu smo primerjali vpliv različnih koncentracij APM-a na zmožnost podvajanja genogenetskih čbul. Primerjali smo tudi razliko med porezanimi in neporezanimi koreninami čbulic. Poizkus smo začeli z nizkimi koncentracijami (0  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ ). Tretiranje z APM-om je trajalo tri dni. Pri koncentracijah 0  $\mu\text{M}$  in 50  $\mu\text{M}$  smo imeli čbulice z neporezanimi in porezanimi koreninicami, pri koncentracijah 100  $\mu\text{M}$  in 150  $\mu\text{M}$  smo uporabili samo čbulice s porezanimi koreninicami in pri koncentraciji 200  $\mu\text{M}$  samo čbulice z neporezanimi koreninicami, saj smo predvidevali, da bo najvišja koncentracija lahko že škodljiva. Na sliki 6 (predstavljene so čbulice z neporezanimi koreninicami) lahko vidimo, da je prisotnost APM-a vplivala na razvoj koreninic čbulic, saj so se pri višjih koncentracijah slabše razvile. Iz preglednice 1 je razvidno, da se čbulice pri nobenem obravnavanju niso podvojile v dihaploide. Primerjava stopnje preživelih čbulic pri različnih koncentracijah glede na porezane ali neporezane koreninice pokaže, da je z višjo koncentracijo zmanjšana stopnja preživelih čbulic, vendar je bila večja preživelost med porezanimi kot med neporezanimi (50  $\mu\text{M}$  neporezane 93,3 %, 50  $\mu\text{M}$  porezane 96,6 %).



Slika 6: Primerjava razvitosti koreninic (neporezane) pri različnih koncentracijah APM-a (0  $\mu\text{M}$  - K, 50  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ )

Preglednica 1: Odstotek ploidnosti in odstotek preživelih čebulic (1. poizkus)

APM ( $\mu\text{M}$ )	Št. tret. čebul	Št. preživelih čebul	Odstotek preživelih (%)	Ploidnost (%)		
				n	n+2n	2n
neporezane						
0	15	14	93,33	100	0	0
50	30	28	93,33	100	0	0
200	30	30	100	100	0	0
porezane						
0	15	15	100	100	0	0
50	30	29	96,67	100	0	0
100	30	27	90,00	100	0	0
150	30	28	93,33	100	0	0

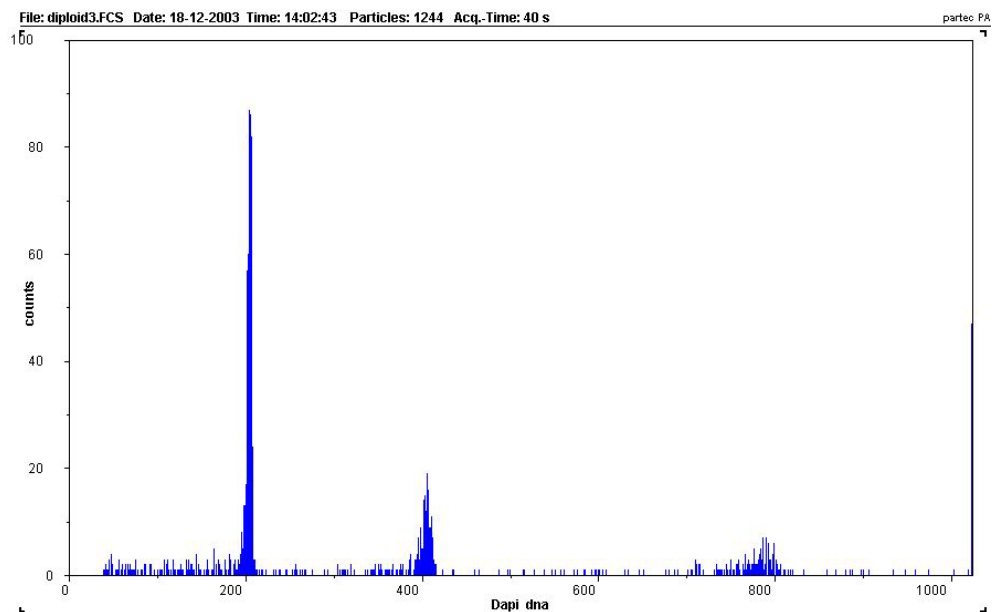
Zaradi slabega podvajanja smo poizkus ponovili, tokrat z višjimi koncentracijami APM-a (0  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$ , 2000  $\mu\text{M}$ ). Tudi pri tem poizkusu smo čebulice tretirali tri dni, razen pri koncentraciji 2000  $\mu\text{M}$ , ko smo jih tretirali pet dni. Pri koncentracij 500  $\mu\text{M}$  smo primerjali tudi vpliv topil, ki se uporabljajo z APM-om, in sicer kombinacija acetona ali metanola in acetona z APM-om. Tudi pri teh obravnavanjih, kljub zelo visokim koncentracijam APM-a, do podvajanja haploidnih čebulic ni prišlo. Tukaj lahko opazimo (preglednica 2), da je stopnja preživelosti čebulic višja pri porezanih koreninicah (100; 86,6; 60 %) pri nižjih koncentracijah (0  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  + ACE, 500  $\mu\text{M}$  + MET + ACE), kot pri neporezanih (93,3; 80; 40 %) pri istih koncentracijah APM-a. Pri višjih koncentracijah (1000  $\mu\text{M}$ , 2000  $\mu\text{M}$ ) pa je bila stopnja preživelih čebulic višja pri neporezanih (70; 86,6 %) kot pri porezanih (60; 53,3 %).

Preglednica 2: Odstotek ploidnosti in odstotek preživelih čebulic (2. poizkus)

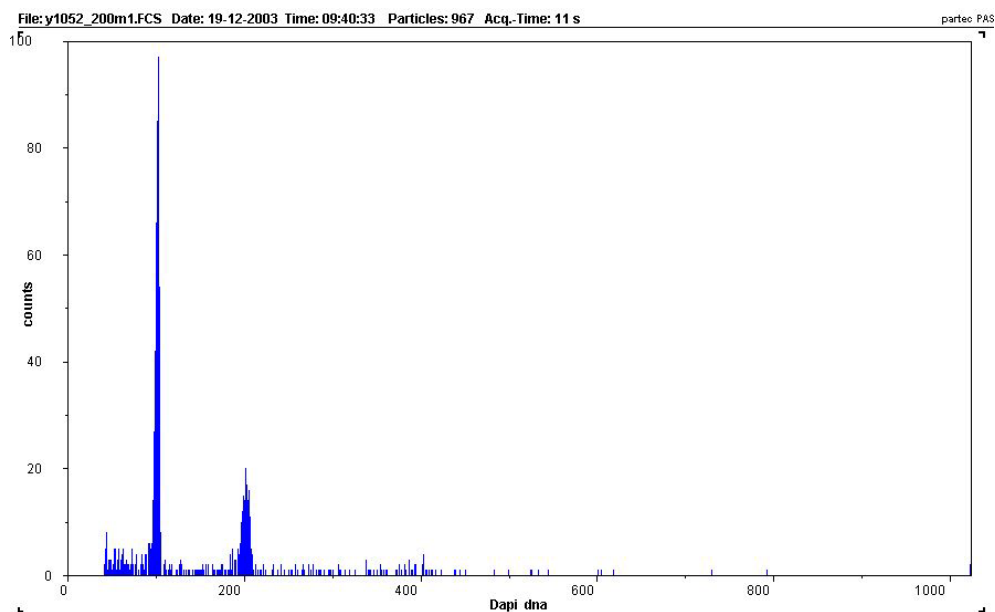
APM ( $\mu\text{M}$ )	Št. tret. čebul	Št. preživelih čebul	Odstotek preživelih (%)	Ploidnost (%)		
				n	n+2n	2n
neporezane						
0	15	14	93,33	100	0	0
500+ ACE	15	12	80,00	100	0	0
500+MET+ACE	15	6	40,00	100	0	0
1000	30	21	70,00	100	0	0
2000	15	13	86,67	100	0	0
porezane						
0	15	15	100,00	100	0	0
500+ ACE	15	13	86,67	100	0	0
500+MET+ACE	15	9	60,00	100	0	0
1000	30	18	60,00	100	0	0
2000	15	8	53,33	100	0	0

Primerjava topil acetona in metanola skupaj z acetonom pri koncentraciji 500  $\mu\text{M}$  APM-a za porezane in neporezane koreninice pokaže, da se je pri kombinaciji metanola in acetona skupaj zmanjšal odstotek preživelosti glede na kontrolo za 40-57,1 %, medtem ko je uporaba samo acetona kot topila za APM glede na kontrolo zmanjšala odstotek preživelosti čebulic za samo 13,4-14,3 %. To bi lahko pomenilo, da bi bila zamenjava metanola z acetonom koristna.

Ploidnost smo ugotavljali s pretočnim citometrom. Pred začetkom meritev smo aparat umerili z znanim dihaploidnim vzorcem čebule (slika 7). Tako smo dobili podatke, kako izgleda diploid. Pri vseh obravnavanjih smo dobili podoben rezultat, kot ga prikazuje slika 8. To pomeni, da pri nobenem obravnavanju ni prišlo do podvojitve kromosomskega števila in so vse čebulice ostale haploidne.



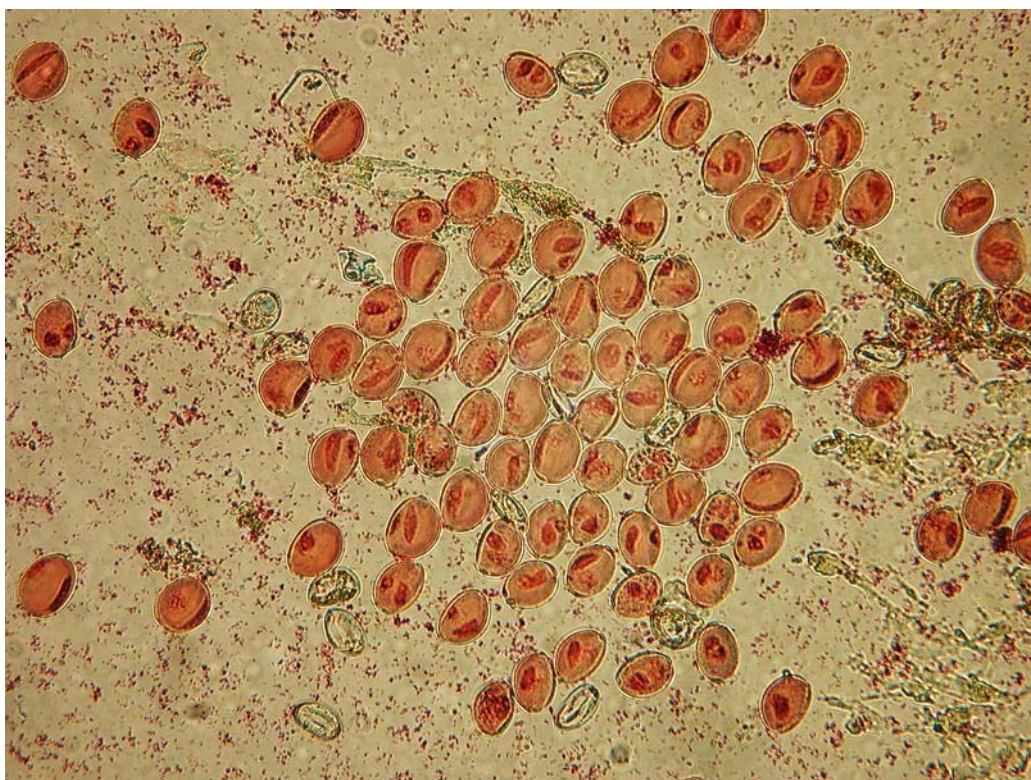
Slika 7: Primer dihaploidnega vzorca



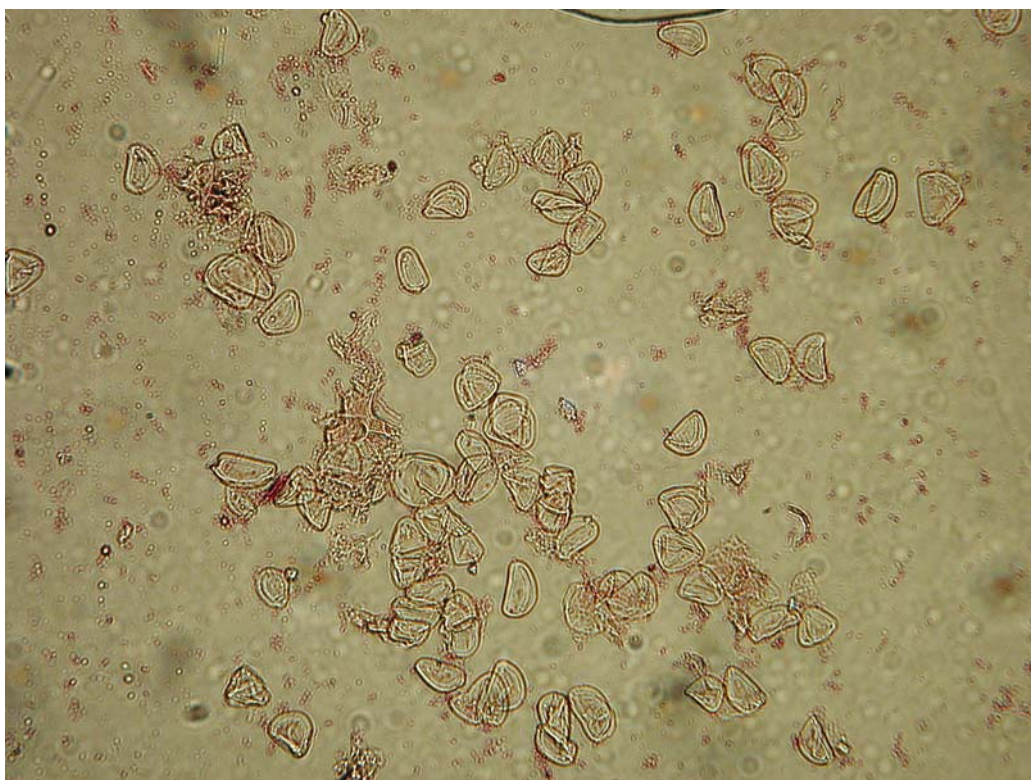
Slika 8: Primer haploidnega vzorca

#### 4.2 PREUČITEV FERTILNOSTI DIHAPLOIDNIH REGENERANTOV

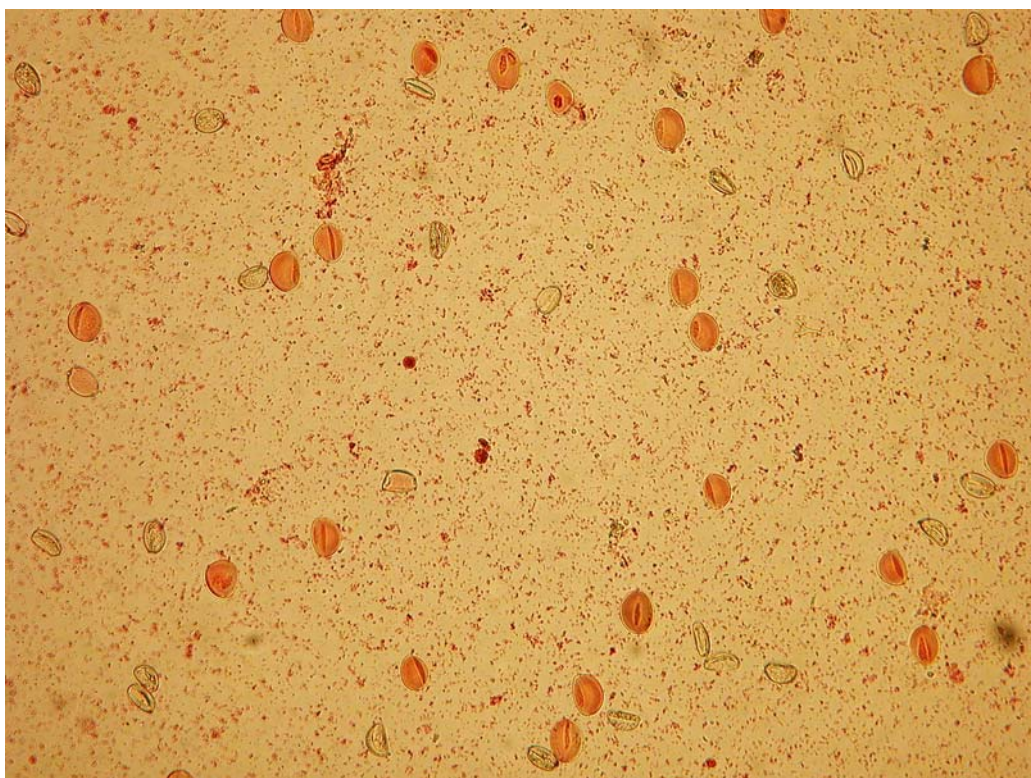
Pri preučevanju fertilnosti smo prešteli vsa obarvana (fertilna) in neobarvana (neživa) pelodna zrna. Fertilna pelodna zrna so se obarvala rdeče, sterilna pa so ostala neobarvana – prozorna. Pregledali smo 44 dihaploidnih regenerantov. Povprečna fertilnost vseh dihaploidnih regenerantov je bila 41,63 %. Vendar so bile razlike med posameznimi rastlinami velike. Od vseh pregledanih je imelo 19 (43,18 %) dihaploidnih regenerantov fertilnost manjšo od 20 %, trije (6,81 %) dihaploidni regeneranti so imeli fertilnost od 21-40 %, štirje (9,09 %) dihaploidni regeneranti so imeli fertilnost od 41-60 %, osem (18,18 %) dihaploidnih regenerantov je imelo fertilnost od 61-80 % in najboljšo fertilnost, ki je bila od 81-100 %, je imelo 10 (22,72 %) dihaploidnih regenerantov. Najboljši regenerant (R47) je dosegel fertilnost 96,86 %. Na sliki 9 vidimo primer dobro fertilnega peloda, na sliki 10 pa vidimo primer slabo fertilnega peloda. Slika 11 prikazuje vzorec srednje dobro fertilnega peloda. Preglednica 3 prikazuje odstotke fertilnosti za vsak obravnavani vzorec.



Slika 9: Primer dobro fertilnega peloda



Slika 10: Primer slabo fertilnega peloda



Slika 11: Primer srednje dobro fertilnega peloda

Preglednica 3: Število pelodnih zrn in odstotki fertilnosti dihaploidnih regenerantov

Regenerant	Št. rdečih zrn	Št. belih zrn	Skupno št. zrn	Fertilnost (%)
R47	1730	56	1786	96,86
V273(1s)	721	38	759	94,99
V273(2s)	868	83	951	91,27
x1046	925	824	1749	52,89
x1217	1135	240	1375	82,55
x1707	0	81	81	0,00
x1854	1090	117	1207	90,31
x1930	323	893	1216	26,56
x2654	1124	214	1338	84,01
x3182	7	189	196	3,57
x3850	761	190	951	80,02
x4250	438	415	853	51,35
x4375	0	93	93	0,00
x4576	203	1187	1390	14,60
x4576	80	885	965	8,29
x5198	1070	844	1914	55,90
x5333	699	1171	1870	37,38
x554	1220	179	1399	87,21
x5662	480	300	780	61,54
x6161	1606	102	1708	94,03
x6775(1s)	682	352	1034	65,96
x6775(2s)	1069	393	1462	73,12
x682	1002	97	1099	91,17
x6852	15	249	264	5,68
x6923	547	461	1008	54,27
x7018	937	432	1369	68,44
x7608	21	398	419	5,01
y1159	690	239	929	74,27
y1318	1085	365	1450	74,83
y137	2	220	222	0,90
y1385a	1	833	834	0,12
y1385b	4	1089	1093	0,37
y139	0	165	165	0,00
y1509	1	890	891	0,11
y1595	5	1039	1044	0,48
y3051	684	138	822	83,21
y312	27	779	806	3,35
y404	6	1719	1725	0,35
y439	12	1537	1549	0,77
y518a(1s)	6	996	1002	0,60
y518a(2s)	0	540	540	0,00
y618	612	1153	1765	34,67
y716	0	1452	1452	0,00
y727	513	122	635	80,79



## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Rezultati kažejo, da amiprofos-metil (APM) ni vplival na podvojitev kromosomskega števila preko korenin v nobenem obravnavanju. To je verjetno zato, ker je pri starejši fazi ginogenetskega materiala čebule mobilnost antimitotskega sredstva od korenin do rastnega vršička težja in zato ne pride do podvojitve. Determinacija ploidnosti pred tretiranjem se je izkazala za dobro, saj smo na ta način lahko izločili vse predhodno spontano podvojene regenerante (priloga A) in tako dobili rezultate, ki so pogojeni samo z vplivom APM-a. Nekatere rastlinske vrste imajo sposobnost spontanega podvajanja (Bohanec in sod., 1995), vendar smo v našem primeru te predhodno izločili iz obravnave.

Kljub dejstvu, da se je podvajanje sladkorne pese (*Beta vulgaris* L.) preko korenin (Weich in Levall, 2003) izkazalo za uspešno (več kot 90 %), se je pri čebuli (*Allium cepa* L.) izkazalo za neuspešno.

Za slab odziv regenerantov na APM gre iskati razloge verjetno tudi pri genotipu regenerantov in samem stanju rastlin po regeneraciji, pogojih v rastlinjaku in pri skladiščenju. Regeneranti, ki niso preživeli aklimatizacije do velikosti vsaj treh listov, so bili v večini primerov napadeni od tripsov.

Razlog, ki preprečuje učinkovitost podvajanja v poznejših stopnjah razvoja čebule, je verjetno nedostopnost apikalnega meristema, ki ima za posledico, da v odraslih čebulah podvajanje kromosomov ni mogoče (Jakše in sod., 2003).

Z uporabo še višjih koncentracij APM-a ali daljšim časom tretiranja bi po vsej verjetnosti bil rezultat enak, zmanjšala bi se samo stopnja preživelih rastlin.

Presenetljiv je podatek, da so bila obravnavanja s porezanimi koreninami na koncu poizkusa uspešnejša (večji odstotek preživelosti čebulic) od neporezanih. To gre verjetno pripisati večjemu sproščanju hormonov v rastlinah s porezanimi koreninami, ki spodbujajo rast novih korenin. Kljub temu pa porezanost oziroma neporezanost korenin na podvajanje ni imela vpliva.

Ker je bilo to drugo leto rasti za čebulice, so te že prešle v generativno fazo. To se je odrazilo pri nekaterih regenerantih, ki so pogнали cvetna stebela (6,67 %). Pri pregledu cvetov nismo našli nobenega diploida in pelod ni bil fertilen, niti sami kobuli niso bili močno razviti.

Pregled ploidnosti je bil opravljen s pretočnim citometrom, ker je to hitrejši in natančnejši način kot štetje kromosomov v vršičkih korenin.

Učinkovita metoda za podvajanje kromosomov mora upoštevati tako stopnjo preživelih regenerantov in učinek podvajanja kromosomov (Jakše in sod., 2003) kot tudi fertilitet samih dihaploidnih regenerantov.

Odstotek fertiliteti je močno pogojen z genotipom, kar so pokazali tudi rezultati. Pri nizki fertiliteti se je močno izrazila inbriding depresija. Fertilitet se da izboljšati s kasnejšim samoopraševanjem, vendar je pri tem potrebno počakati dve leti.

Kljub dejstvu, da se haploidnim rastlinam plodnost povrne, ko jim podvojimo kromosome, je kar nekaj dihaploidnih regenerantov ostalo sterilnih. To gre pripisati vplivu škodljivih recesivnih genov. Inbriding depresija se je pri teh diploidnih regenerantih močno izrazila.

Ocena izpred desetletja je bila, da biotehnoške tehnike še niso tako dobre, da bi jih lahko uporabljali v komercialne namene pri vzgoji rastlin čebul (Jakše, 1994). V zadnjem času (Bohanec, osebna komunikacija) v svetovnem merilu vsa vodilna semenarska podjetja že uporabljajo metodo indukcije haploidnih linij pri čebuli, ne glede na zaplete. Omejitve so zlasti različna ginogenetska odzivnost pogojena z genotipom, uspeh podvajanja kromosomov ter končna fertilitet linij. Podobno kot se je zgodilo pri drugih tujeprašnicah, lahko pričakujemo, da bo z večimi cikli selekcije formiran nov genofond močno požlahtnjenih linij, pri katerih bi bila inbriding depresija mnogo manj izražena.

## 5.2 SKLEPI

Naše predvidevanje, da bodo rastline haploidnih regenerantov vsrkale APM skozi korenine in se diploidizirale, se je izkazalo za napačno. Postopek, kakršen uspešno poteka pri sladkorni pesi, žal pri čebuli ni bil izvedljiv. Ponovno je bila potrjena visoka sposobnost ohranjanja haploidnega statusa pri čebuli, ki se z večletnim vegetativnim razmnoževanjem ni spremenil.

Ugotovitev odstotka moške fertiliteti omogoča učinkovitejše vrednotenje linij glede na njihovo sposobnost samoopraševanja oziroma opraševanja drugih linij v postopku pridobivanja hibridnih kultivarjev. Ugotovljen visok odstotek moške fertiliteti pri nekaterih preučevanih linijah (do 97,6 %) je zelo vzpodbuden.

V prihodnje bi bilo, glede na dobljene rezultate, smiselno med seboj križati najfertilnejše linije in formirati genetsko bazo za tvorbo nove generacije izboljšanih linij čebule.

## 6 POVZETEK

Čebula je dvoletna tujeprašna rastlina. Dosedanje žlahtnjenje čebule je zahtevalo najmanj pet generacij samoopraševanja, kar pa zahteva zelo veliko časa – 10 let. Da bi ta čas skrajšali, so raziskovalci začeli uporabljati tehnike žlahtnjenja z uporabo haploidov. Do danes so postopki pridobivanja haploidnih rastlin že močno napredovali. Pri čebuli indukcija haploidov preko androgeneze ne more potekati, vendar pa lahko poteka preko ginogeneze.

Ker haploidne rastline niso fertile, je pri njih to fertilitnost potrebno obuditi. To se lahko zgodi samo s postopki podvajanja kromosomskega števila. Vendar je to še zmeraj ozko grlo pri uporabi dihaploidnih linij čebule. S podvojitvijo haploidov dobimo rastline, ki so diploidne, so fertile in imajo popolnoma homozigoten genom, kar je pri čebuli redkost zaradi tujeprašnosti. S podvojenimi haploidi bi tako prišli do čistih linij že v samo dveh letih. Pri križanju dveh dihaploidnih linij bi tako dobili potomstvo  $F_1$  generacije in heteroza bi bila močno izražena, pridelki pa izenačeni.

Pri diplomskem delu smo predvideli, da bodo rastline čebule v fazi čebulice (torej drugem letu rasti) skozi korenine vsrkale anti-mitotsko delujoč amiprofos-metil (APM). Uporabili smo haploidne čebulice (pretežno linije B2923), ki so bile vzgojene iz embrijev (regenerantov), pridobljenih s postopki ginogeneze.

Za podvajanje smo uporabili različne koncentracije APM-a (0  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$ , 2000  $\mu\text{M}$ ). Čas tretiranja z APM-om je bil tri dni, le za koncentracijo 2000  $\mu\text{M}$  je tretiranje trajalo pet dni. Pri poizkusu smo opazovali tudi vpliv sprejema APM-a pri neporezanih in za približno 1 mm porezanih koreninicah čebulic. Po treh do petih dneh tretiranja smo koreninice čebulic sprali z destilirano vodo in čebulice posadili v cvetlične lončke, napolnjene s šotnim substratom, v katerem so nadaljevale rast v rastlinjaku.

Ko so bili razviti trije do štirje listi, smo konec najmlajšega lista prikrajšali za približno 1,5 cm in ga analizirali s pretočno citometrijo. Odrezane konce listov smo v 500  $\mu\text{l}$  Otto 1 raztopini z britvico nasekljali, da so jedra celic lažje prešla iz tkiva listov. Tako nasekljane liste smo precedili skozi cedilce in dodali 1000  $\mu\text{l}$  Otto 2 raztopine. Tako pripravljene vzorce smo analizirali na pretočnem citometru Partec – PAS IIIi. Pri vsakem vzorcu smo prešteli približno 2000 jeder, da smo potrdili, ali gre za haploidno ali diploidno rastlino.

Pri naših obravnavanjih ni prišlo do podvajanja kromosomskega števila v nobenem primeru. To pomeni, da APM ne povzroča kromosomskega podvajanja skozi korenine v samih listih čebule. Razlogov za slab odziv čebulic je lahko več, vendar možnost, da pri tako razvitih čebulicah podvajanje skozi koreninice ni mogoče zaradi nedostopnosti apikalnega meristema, ni izključena. Zanimivo je to, da so čebulice s porezanimi

koreninicami v povprečju bolje preživele tretiranja z APM-om kot tiste z neporezanimi koreninicami.

Preučili smo tudi fertilitnost dihaploidnih regenerantov čebule. To smo izvedli tako, da smo pri vsakem dihaploidnem regenerantu iz kobula odrezali tri naključno izbrane približno enako velike cvetove, v katerih so bili prašniki že razviti. V laboratoriju smo pelodna zrna najprej obarvali z 1 % raztopino aceto-karmina in jih nato pogledali pod mikroskopom. Pelodna zrna, ki so bila obarvana rdeče, so predstavljala živa pelodna zrna, tista, ki pa se niso obarvala, so bila nefertilna.

Pri vsakem vzorcu čebule smo v povprečju prešteli okoli 1000 pelodnih zrn. Povprečna fertilitnost vseh obravnavanih dihaploidnih regenerantov je bila 41,63 %, vendar so najboljši regeneranti dosegli tudi več kot 80 % fertilitnost (regenerant R47 je dosegel fertilitnost 96,86 %). Ti podatki nakazujejo na velik vpliv genoma na samo fertilitnost, saj so bili v obravnavanju tudi dihaploidni regeneranti, ki so imeli 0 % fertilitnosti.

## 7 VIRI

- Alan A.R., Brants A., Cobb E., Goldschmied P.A., Mutschler M.A., Earle E.D. 2004. Fecund gynogenetic lines from onion (*Allium cepa* L.) breeding materials. *Plant Science*, 167: 1055-1066.
- Bohanec B. 2002. Doubled-haploid Onions. V: *Allium Crop Science: Recent Advances* (eds. Rabinowitch, H.D., Currah, L.). Wallingford, CAB International: 145-158.
- Bohanec B., Jakše M., Ihan A., Javornik B. 1995. Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants. *Plant Science*, 104: 215-224.
- Bohanec B., Jakše M., Havey M.J. 1999. Effects of genotype on onion gynogenesis and attempts of genome doubling at embryo stage – a progress report. V: *Gametic Embryogenesis in Monocots. COST-824 Workshop*, Jokionen, Finland: 37-38.
- Campion B., Alloni C. 1990. Induction of haploid plants in onion (*Allium cepa* L.) by in vitro culture of unpollinated ovules. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 20: 1-6.
- Campion B., Azzimonti M.T. 1988. Evolution of ploidy level in haploid plants of onion (*Allium cepa* L.) obtained through in vitro gynogenesis. V: 4<sup>th</sup> *Eucarpia Allium Symposium*. United Kingdom: 85-89.
- Campion B., Azzimonti M.T., Vicini E., Schiavi M., Falavigna A. 1992. Advances in haploid plant induction in onion (*Allium cepa* L.) through in vitro gynogenesis. *Plant Science*, 86: 97-104.
- Campion B., Perri E., Azzimonti M.T., Vicini E., Schiavi M. 1995. Spontaneous and induced chromosome doubling in gynogenic lines of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Breeding*, 114: 243-246.
- Campion B., Schiavi M. 1994. Production of doubled haploid lines of onion (*Allium cepa* L.): Progress report and problems. V: *Proceedings of IPBA*. Rogla, december 5-7: 25-33.
- Geoffriau E., Kahane R., Bellamy C., Rancillac M. 1997. Ploidy stability and in vitro chromosome doubling in gynogenic clones of onion (*Allium cepa* L.). *Plant Science*, 122: 201-208.
- Grzebelus E., Adamus A. 2004. Effect of anti-mitotic agents on development and genome doubling of gynogenic onion (*Allium cepa* L.) embryos. *Plant Science*, 167: 569-574.
- Jakše M. 1994. The application of biotechnology to onion (*Allium cepa* L.). *Research Reports Biotechnical Faculty of the University of Ljubljana. Agriculture*, 63: 79-89.
- Jakše M., Bohanec B. 1994. Induction of gynogenic haploids in onion (*Allium cepa* L.) and genetic analysis of regenerants. V: *Abstracts VIII International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*. Firenze: 139.

- Jakše M., Bohanec B. 2001. Studies of alternative approaches for genome doubling in onion. V: COST Action 825. Biotechnological Approaches for Utilization of Gametic Cells. - Final Meeting, Bled, 1-5 July 2000. Bohanec B. (ur.). Luxembourg, Office for Official Publications of the EC: 101-104.
- Jakše M., Havey M.J., Bohanec B. 2003. Chromosome doubling procedures of onion (*Allium cepa* L.) gynogenic embryos. Plant Cell Report, 21:905-910.
- Jakše M. 2004. Vrtnarstvo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 50 str. (interno gradivo).
- Keller J. 1990. Culture of unpollinated ovules, ovaries and flower buds in some species of the genus *Allium* and haploid induction via gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.). Euphytica, 47: 241-247.
- Muren R. 1989. Haploid plant induction from unpollinated ovaries in onion. HortScience, 24, 5: 833-834.
- Osvald J. 2004. Splošno vrtnarstvo in zelenjadarstvo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 182 str. (interno gradivo).
- Onion. 2006. Wikipedia, the free encyclopedia. GNU Free Documentation License, (31. avg. 2006).  
<http://en.wikipedia.org/wiki/Onion> (2. sep. 2006).
- Partec. Partec PAS. 2006. Partec GmbH.  
<http://www.partec.de/products/pas.html> (2. sep. 2006).
- Singh R.J. 2002. Plant cytogenetics. 2nd edition. Boca Raton, CRC Press: 463 str.
- Wood A. Compendium of pesticide common names. 2006. (avg. 2006).  
<http://www.alanwood.net/pesticides/amiprofos-methyl.html> (2. sep. 2006).
- Weich W.E., Levall M.W. 2003. Doubled haploid production of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). V: Doubled haploid production in crop plants. A manual. Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (eds.). Dordrecht, Boston, London, Kluwer academic publishers: 255-263.

## **ZAHVALA**

Najlepše se zahvaljujem mami Majdi in očetu Damijanu, ki sta zaslužna za to, kar sem danes. Sestri Mateji za vso podporo.

Iskrena hvala profesorjem Marijani Jakše, Borutu Bohancu in Katji Vadnal za vse koristne nasvete in potrpežljivost z mano.

Zahvala gre tudi vsem prijateljem, ki so mi stali ob strani.

## Priloga A

Pregled ploidnosti vseh vzorcev čebulic in izločitev spontanih dihaploidov (2n) pred postopkom podvajanja

Vzorec čebule	Ploidnost	Vzorec čebule	Ploidnost
y1	n	y248	n
y1091	n	y250	n
y119	n	y266	n
y121	n	y273A	n
y122	n	y273B	n
y126	n	y280	n
y129	n	y283	n
y13	n	y286	n
y1369	n	y289	n
<b>y137</b>	<b>2n</b>	y290	n
y1373	n	y291a	n
y1377	n	y291b	n
y1379	n	y293	n
y139	n	y295	n
y1405	n	y298	n
y142	n	y300	n
y145	n	y301	n
y148	n	y304	n
y1493	n	y305	n
y1512	n	<b>y305</b>	<b>2n</b>
y16	n	y309	n
y161	n	y317	n
y17	n	y319	n
y173	n	y319A	n
y173b	n	y323	n
y178a	n	y329	n
y180	n	y330	n
y184	n	y332	n
y193	n	y333	n
y199B	n	y334	n
y200A	n	y335	n
y208	n	y345	n
y208	n	y350	n
y216	n	y350+	n
y218	n	y358	n
y220	n	y359	n
y220B	n	y363	n
y24	n	y364	n
y24 (cvet)	n	y366	n
y241	n	y377	n

se nadaljuje



nadaljevanje		Vzorec čebule		Ploidnost
Vzorec čebule	Ploidnost			
		<b>y525</b>		<b>2n</b>
y383A	n	y533		n
y386	n	y535		n
y391	n	y537		n
y399A	n	y550		n
y404	n	y552		n
y413	n	y560		n
y415	n	<b>y562</b>		<b>2n</b>
y422	n	y565		n
y423	n	y569		n
y433	n	y574		n
y434	n	y580		n
y435	n	y582		n
y436	n	y589		n
y438	n	y594		n
y440	n	y598		n
y440 (cvet)	n	<b>y613</b>		<b>2n</b>
y441	n	y615		n
y449	n	y617a		n
y453	n	y619		n
y458	n	y632		n
y464A	n	y632B		n
y467A	n	y640		n
y467B	n	y642		n
y469	n	y644		n
y472	n	y667A		n
y473	n	y668		n
y479	n	y675		n
y481	n	y677		n
y482	n	y704		n
y483	n	y705A		n
y483	n	y716		n
y486	n	y718		n
y493	n	y719		n
y495	n	y721		n
<b>y497</b>	<b>2n</b>	y722		n
y499B	n	y724B		n
y499B	n	y736		n
<b>y503</b>	<b>2n</b>	y743		n
y505	n	y750		n
y508	n	y752		n
y515	n	y756		n
y516	n	y760		n
y518a	n	y767		n
y520	n	y771		n
y522	n	y773		n
y524	n			se nadaljuje

nadaljevanje		Vzorec čebule		Ploidnost
Vzorec čebule	Ploidnost			
y775	n	y825		n
y776	n	y829		n
y784	n	y835		n
y785	n	y839		n
y786	n	y845a		n
y791	n	y845b		n
y792	n	y856		n
y795	n	y860		n
y796	n	y861		n
y797	n	y864		n
y799	n	y867		n
y804	n	y882		n
y812	n	y9		n
y813	n	y905		n
y815	n	y990		n