

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Anita RIŽNIK

**PROUČITEV POSTOPKOV POSPEŠENEGA GENERACIJSKEGA
CIKLA PRI OLJNIH BUČAH (*Cucurbita pepo* L. subsp. *pepo* var.
stryriaca Grebenšč.) S KULTURO NEZRELIH EMBRIJEV *in vitro* IN
POSKUS MEDVRSTNEGA KRIŽANJA *C. pepo* x *C. maxima***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**STUDY OF ACCELERATED GENERATION CYCLE IN OILSEED
PUMPKINS (*Cucurbita pepo* L. subsp. *pepo* var. *stryriaca* Grebenšč.)
WITH IMMATURE EMBRYO CULTURE *in vitro* AND AN
EXPERIMENT OF INTERSPECIFIC HIBRIDISATION OF *C. pepo* x
*C. maxima***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Raziskovalno delo je nastalo v okviru univerzitetnega programa Biotehnologija na Biotehniški fakulteti. Eksperimentalni del naloge je bil narejen na Biotehniški fakulteti, Oddelku za agronomijo, Katedri za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin.

Študijska komisija Biotehniške fakultete je za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Boruta Bohanca in recenzentko prof. dr. Jano Žel.

Komisija za oceno in zagovor:

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

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

Član: prof. dr. Jana ŽEL
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Datum zagovora: 8. 11. 2011

Izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela

Podpisana se strinjam z objavo diplomske naloge v polnem tekstu na straneh Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, enaka tiskani verziji.

Anita Rižnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 635.62:631.527:575.2.085.2(043.2)
KG	žlahtnjenje rastlin / oljne buče / <i>Cucurbita pepo</i> / <i>Cucurbita maxima</i> / reševanje embrijev/ <i>in vitro</i> metoda / medvrstna križanja
KK	AGRI F30
AV	RIŽNIK, Anita
SA	BOHANEČ, Borut (mentor)
KZ	SI-1000, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2011
IN	PROUČITEV POSTOPKOV POSPEŠENEGA GENERACIJSKEGA CIKLA PRI OLJNIH BUČAH (<i>Cucurbita pepo</i> L. subsp. <i>pepo</i> var. <i>stryriaca</i> Grebenšč.) S KULTURO NEZRELIH EMBRIJEV <i>in vitro</i> IN POSKUS MEDVRSTNEGA KRIŽANJA <i>C. pepo</i> x <i>C. maxima</i>
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 53 str., 11 pregl., 26 sl., 41 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V letih 2010 in 2011 smo proučevali pospešitev postopkov generacijskega cikla križanja znotraj vrste pri oljnih bučah <i>Cucurbita pepo</i> L. subsp. <i>pepo</i> var. <i>stryriaca</i> Grebenšč (uporabili smo sorti 'GL Opal' in 'Slovenska golica') ter analizirali uspešnost medvrstnega križanja med <i>Cucurbita pepo</i> 'GL Opal' in <i>Cucurbita maxima</i> 'Noč čarovnic'. Izvedli smo tri serije opráševanja – v septembru 2010 ter februarju in maju 2011. Ves rastlinski material je bil posajen v rastlinjaku, ki je bil poleti hlajen, pozimi pa ogrevan in umetno osvetljevan. Z gojenjem buč pozimi, v zavarovanem prostoru, smo želeli izkoristiti mrzel del leta. Opráševanje smo izvedli do 9:00 ure. Oprášitev je bila uspešna v 30 % do 60 % uspešna. Plodove, stare od 19 do največ 37 dni, smo pobrali in iz semen izolirali embrije, ki smo jih proučevali z metodo <i>in vitro</i> reševanja nezrelih embrijev. Za gojenje embrijev smo uporabili E20A gojišče (povzeto po Sauton A., Dumas De Vaulx R. (1987)) in modificirano gojišče Murashige in Skoog (1962), povzeto po Šiško (2003). Slednje se je razlikovalo v stopnji iniciacije in prestavljanju embrijev. Najlažja je bila izolacija embrijev, pri katerih je od oprášitve do izolacije preteklo med 3 in 4 tedne, vendar je bila regeneracija starejših embrijev hitrejša. Regeneracija embrijev v mlade rastline je bila do 67 % uspešna. S postopki gojenja buč v mrzli polovici leta in vključitvijo <i>in vitro</i> reševanja embrijev bi lahko v enem letu vzgojili 4 generacije buč. Uspešnost medvrstnega križanja med <i>C. pepo</i> in <i>C. maxima</i> smo želeli potrditi s pretočno citometrijo. Zaradi nejasnih rezultatov smo izvedli še sekvenčno analizo ITS regij starševskih rastlin (<i>C. pepo</i> 'GL Opal', <i>C. pepo</i> 'Slovenska golica' in <i>C. maxima</i> 'Noč čarovnic'). Rezultati so pokazali, da ves uporabljen rastlinski material pripada vrsti <i>C. pepo</i>, kar pomeni, da je sorta 'Noč čarovnic' dejansko napačno deklarirana. To pojasni tudi nenavadno visoko kompatibilnost.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 635.62:631.527:575.2.085.2(043.2)
CX plant breeding / oil pumpkin / *Cucurbita pepo* / *Cucurbita maxima* /
embryo rescue / *in vitro* culture / interspecific hybridization
CC AGRIS F30
UA RIŽNIK, Anita
AA BOHANEČ, Borut (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Study Programme of Biotechnology
PY 2011
TI STUDY OF ACCELERATED GENERATION CYCLE IN OILSEED PUMPKINS
(*Cucurbita pepo* L. subsp. *pepo* var. *stryriaca* Grebenšč.) WITH IMMATURE
EMBRYO CULTURE *in vitro* AND AN EXPERIMENT OF INTERSPECIFIC
HIBRIDISATION OF *C. pepo* x *C. maxima*
DT Graduation Thesis (University studies)
NO X, 53 p., 11 tab., 26 fig., 41 ref.
LA sl
AL sl/en
AB In the years 2010 and 2011 the acceleration of generational cycle procedures of interspecific hibridisation in oilseed pumpkins *Cucurbita pepo* L. subsp. *pepo* var. *stryriaca* Grebenšč (we used sorts 'GL Opal' and 'Slovenska golica') was studied and analyses regarding the successfulness of interspecific hibridisation between *Cucurbita pepo* 'GL Opal' and *Cucurbita maxima* 'Noč čarovnic' were performed. Three series of pollination were carried out – in September 2011 and in February and May 2011. All the vegetable material was planted in a greenhouse, which was cooled during summer and heated and artificially lit during winter. The pumpkin cultivation during winter enabled us to take advantage of the cold part of the year. The pollination was carried out until 9 a.m. The successfulness of it turned out to be from 30 to 60 %. 19- to maximum 37-day-old crops were collected and the embryos, observed with the method of *in vitro* immature embryo saving, were isolated from the seeds. The culture mediums used to cultivate the embryos were E20A (S. also Sauton A., Dumas De Vault R. (1987)) and the modified culture medium Murashige and Skoog (1962), cit. in Šiško (2003). The latter differed in the level of initiation and in transposition of the embryos. The easiest isolation occurred in the embryos where 3 or 4 weeks had passed from pollination to isolation, but the regeneration was faster in older embryos. The successfulness of the regeneration of embryos into young crops was up to 67 %. By using the procedures of pumpkin cultivation in the cold part of the year and by including the *in vitro* embryo saving, 4 pumpkin generations could be cultivated. The successfulness of interspecific hibridisation of *C. pepo* and *C. maxima* was to be confirmed with flow cytometry. Due to unclear results a sequence analysis of the ITS parent plant regions (*C. pepo* 'GL Opal', *C. pepo* 'Slovenska golica' and *Cucurbita maxima* 'Noč čarovnic') was additionally performed. The results have shown that all the used vegetable material belongs to the species *C. pepo* which means that the sort 'Noč čarovnic' actually has an incorrect declaration. This also explained the unusually high compatibility

KAZALO VSEBINE

	Str.
Ključna Dokumentacijska Informacija (KID)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 ROD <i>Cucurbita</i> L.	2
2.1.1 Cvetovi buč	3
2.1.2 Tehnika križanja	3
2.1.2.1 Medvrstna križanja in medvrstna inkompatibilnost	4
2.1.3 Plod in seme	5
2.2 <i>In vitro</i> REŠEVANJE EMBRIJEV	6
2.2.1 Zgodovina	6
2.2.2 Načini izolacije embrija	7
2.2.2.1 Izolacija popolnoma razvitega embrija	7
2.2.2.2 Izolacija delno razvitega embrija	7
2.3 <i>IN VITRO</i> REŠEVANJE EMBRIJEV PRI BUČAH	7
2.4 BOLEZNI BUČ IN ŠKODLJIVCI	8
2.5 FIZIOLOŠKE MOTNJE V RAZVOJU RASTLIN IN PLODOV BUČ	8
2.6 PRETOČNA CITOMETRIJA	9
2.7 MOLEKULSKA ANALIZA	10
3 MATERIALI IN METODE	12
3.1 LOKACIJA POSKUSA IN POGOJI	12
3.2 UPORABLJENE SORTE BUČ	13
3.3 POTEK KRIŽANJA	14
3.4 POBIRANJE PLODOV	15

3.5	LABORATORIJSKO DELO (Priprava gojišča, izolacija embrijev)	16
3.5.1	Predhodna priprava ploda	16
3.5.2	Priprava gojišča	16
3.5.3	Izolacija embrijev	19
3.5.4	Potek rasti rastline buč iz embrijev, ponovna zasaditev	21
3.6	PRETOČNA CITOMETRIJA	21
3.6.1	Analiza podatkov, pridobljenih s pretočno citometrijo	21
3.7	MOLEKULSKA ANALIZA	22
3.7.1	Izolacija DNK	22
3.7.2	Merjenje koncentracije DNK s fluorometrom	22
3.7.3	Verižna reakcija s polimerazo	23
3.7.4	Analiza fragmentov DNK z gelsko elektroforezo	24
3.7.5	Sekvenčna reakcija	25
3.7.6	Obdelava sekvenc	26
4	REZULTATI	27
4.1	UPORABLJEN RASTLINSKI MATERIAL	27
4.2	CVETENJE IN RAZVOJ PLODOV	27
4.3	<i>IN VITRO</i> REŠEVANJE EMBRIJEV	30
4.3.1	Izolacija embrijev	30
4.3.2	Rast embrijev in aklimatizacija	30
4.3.3	Uspešnost <i>in vitro</i> reševanja embrijev	32
4.4	PRETOČNA CITOMETRIJA	35
4.5	SEKVENČNA ANALIZA ITS REGIJ	36
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	38
5.1	PRIMERJAVA UPORABLJENEGA RASTLINSKEGA MATERIALA	38
5.1.1	<i>C. pepo</i> 'GL Opal' (Semenarna Agrosa, F1 generacija)	38
5.1.2	<i>C. pepo</i> 'Slovenska golica' (Semenarna Ljubljana)	38
5.1.3	<i>C. maxima</i> 'Noč čarovnic' (Semenarna Ljubljana, F1 generacija)	39
5.1.4	Medvrstni križanec – <i>C. pepo</i> 'GL Opal' x <i>C. maxima</i> in <i>C. maxima</i> x <i>C. pepo</i> 'GL Opal'	39
5.2	ANALIZA CVETENJA IN RAZVOJA PLODOV	39

5.2.1	Vpliv zavarovanega prostora in letnega časa na vegetativno rast, cvetenje ter razvoj plodov	40
5.3	IN VITRO REŠEVANJE EMBRIJEV	42
5.3.1	Izolacija embrijev	42
5.3.2	Rast embrijev in aklimatizacija	43
5.3.2.1	Vpliv gojišča	43
5.3.2.2	Analiza uspešnosti <i>in vitro</i> reševanja embrijev	44
5.3.2.3	Vpliv časa, ki je potekel med opraskanjem in izolacijo embrijev	44
5.4	IZRAČUN ŠTEVILA GENERACIJ BUČ V ENEM LETU	45
5.5	BOLEZNI, ŠKODLJIVCI IN FIZIOLOŠKE MOTNJE	45
5.6	PRETOČNA CITOMETRIJA	46
5.7	DOLOČANJE ITS SEKVENC	46
5.8	SKLEPI IN NADALJNJE DELO	47
6	POVZETEK	48
7	VIRI	50

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Sestava iniciacijskega gojišča in gojišča za prestavljanje	16
Preglednica 2: Sestava bazalnega MS gojišča	17
Preglednica 3: Sestava gojišča E20A	18
Preglednica 4: Izmerjene koncentracije DNK s fluorometrom	23
Preglednica 5: DNK sekvence parov začetnih oligonukleotidov za posamezen gen in pričakovana dolžina namnoženega fragmenta	23
Preglednica 6: Število uspešnih oprasitev vseh analiziranih križanj v prvi, drugi in tretji seriji	28
Preglednica 7: Velikost embrijev glede na čas od oprasitve	30
Preglednica 8: Uspešnost <i>in vitro</i> reševanja embrijev v prvi seriji	32
Preglednica 9: Uspešnost <i>in vitro</i> reševanja embrijev v drugi seriji	33
Preglednica 10: Uspešnost <i>in vitro</i> reševanja embrijev v tretji seriji	34
Preglednica 11: Velikost genoma starševskih komponent in pridobljenih križancev	35

KAZALO SLIK

Slika 1: Razporejenost semenskih zasnov na različnih delih plodnice buče	4
Slika 2: Sestava transkripcijske enote (rDNK ponavljajoče se strukturne enote)	11
Slika 3: Lokacija prve serije – poskusni rastlinjak	12
Slika 4: Lokacija druge serije – poskusni ogrevan rastlinjak	13
Slika 5: Lokacija tretje serije – poskusni rastlinjak	13
Slika 6: Zaščiten ženski cvet sorte 'GL Opal' dan pred cvetenjem	14
Slika 7: Odprt moški (levo) in ženski cvet (desno)	14
Slika 8: Oprašen, zaščiten in označen ženski cvet	15
Slika 9: Plod sort <i>C. pepo</i> 'GL Opal' (ženska komponenta) in <i>C. maxima</i> (moška komponenta) po sedmih dneh od oprašitve	15
Slika 10: Prečni prerez plodu buče z vidnimi linijami semen	19
Slika 11: Vzдолžni prerez plodu buče s prerezanimi semeni	20
Slika 12: Semena <i>C. pepo</i> primerna za izolacijo embrijev (28 dni od oprašitve)	20
Slika 13: Embrij (26 dni po oprašitvi) na rezilu skalpela	20
Slika 14: Delež uspešnih oprašitev vseh analiziranih križanj v prvi, drugi in tretji seriji	28
Slika 15: Izenačenost plodov – ženska komponenta <i>C. pepo</i> 'GL Opal'	29
Slika 16: Neizenačenost plodov – ženska komponenta <i>C. maxima</i> .	29
Slika 17: Neizenačeni in majhni plodovi v drugi seriji – v prvi vrsti je ženska komponenta <i>C. maxima</i> , v drugi vrsti je ženska komponenta (<i>C. maxima</i> x <i>C. pepo</i> 'GL Opal')	29
Slika 18: Rast embrijev v petrijevki s 25 prostorčki 7 dni po izolaciji	31
Slika 19: Rast embrijev v posodici s filtrom 14 dni po izolaciji	31
Slika 20: Rast embrijev v posodici s filtrom 21. dan po izolaciji	31
Slika 21: Uspešno aklimatizirane rastlinice buč	31
Slika 22: Histogram vsebnosti jedrne DNK medvrstnega križanca med <i>C. maxima</i> in <i>C. pepo</i> 'GL Opal' ter standardna bele detelje <i>Trifolium repens</i> L..	36
Slika 23: Ločitev DNK na gelski elektroforezi	37
Slika 24: Nenormalno razvit plod, pridobljen iz cveta, oprašenega en dan pred odprtjem	40
Slika 25: Zaradi visoke vlage sta se na odmrlih venčnih čistih pojavili plesen in gniloba	41
Slika 26: Albino območja na rastlinicah buč	43

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

IAA	Indol-3-ocetna kislina
E20A	Gojišče povzeto po Sauton A., Dumas De Vaulx R. (1987)
MS	Mešanica makro in mikroelementov - Murashige and Skoog (1962)
pg	pikogram
DAPI	4,6 – diamino-2-fenilindol
PI	propidijev jodid
RNK	ribonukleinska kislina
ITS	internal transcribed spacer
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	bazni par
DNK	deoksiribonukleinska kislina
CTAB	cetiltrimetil amonijev bromid
EDTA	etilendiamin tetraocetna kislina

1 UVOD

Čas od oprašitve do nastanka ploda in viabilnih semen je pri bučah dolgotrajen. V sklopu žlahniteljskih postopkov pogosto izvajamo samoopraševanja in povratna križanja, kar pomeni, da določene lastnosti vnašamo z enega vira v drug genotip. Običajno za vsak vnos izvedemo pet generacij križanj. V tem primeru je zaželeno, da je generacijski čas čim krajši.

V enem letu običajno vzgojimo eno generacijo oljnih buč, saj izkoristimo le topli del leta. Če uvedemo še vzgojo rastlin v hladnem delu leta v rastlinjaku s pomočjo ogrevanja, osvetljevanja in nadziranja vlažnosti, lahko s tem pridobimo še eno generacijo. S pomočjo biotehnoloških postopkov, zlasti z metodo *in vitro* reševanja embrijev, lahko ta proces še pospešimo. V tem primeru ni potrebno čakati na zrelost plodov in semen, kar zelo skrajša cikel od oprašitve do regeneracije nove rastline.

Pri diplomski nalogi smo se ukvarjali s pospešitvijo generacijskega časa pri oljnih bučah *Cucurbita pepo* L. subsp. *pepo* var. *styriaca* Grebenšč. pri različnih pogojih (letni čas, zavarovan prostor). Vse te postopke smo nadgradili s prenosom nezrelih embrijev v tkivno kulturo. Za poskus smo uporabili križanje in metodo *in vitro* reševanja nastalih embrijev dveh sort vrste *C. pepo* - 'GL Opal' (F1, Agrosaata), v nadaljevanju *C. pepo* 'GL Opal', in 'Slovenska golica' (Semenarna Ljubljana), v nadaljevanju *C. pepo* 'Slovenska golica'.

Dodatno smo preučili možnost medvrstnega križanja med vrstama *C. pepo* 'GL Opal' in *Cucurbita maxima* 'Noč čarovnic' (F1, Semenarna Ljubljana), v nadaljevanju *C. maxima*, ter spremljali učinek z metodo *in vitro* reševanja nezrelih embrijev. Uspešnost medvrstnega križanja smo preverili z metodo pretočne citometrije in z molekulskimi metodami.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ROD *Cucurbita* L.

Rod *Cucurbita* L. spada v družino Cucurbitaceae in obsega 5 kultiviranih in okoli 10 divjih vrst (Ivančič, 2002). Te spadajo med eno najstarejših vrst plodovk na svetu. Razlikujejo se po obliki rasti (plezajoča ali sedeča rast), po obliki plodov (podolgovati, okrogli, ploščati, gobasti, hruškasti) in namenu uporabe (jedilne, krmilne, okrasne) (Osvald in Kogoj – Osvald, 2003).

Kultivirane vrste so:

Cucurbita argyrosperma

Cucurbita ficifolia – smokvolista buča

Cucurbita pepo – navadna krmna buča

Cucurbita maxima – orjaška buča

Cucurbita moschata – muškatna buča

Cucurbita pepo L. subsp. *pepo* var. *stryriaca* Grebenšč. je poimenovanje za štajersko oljno bučo, oljno golico. Njeni najpomembnejši lastnosti sta visoka vsebnost olja in golo (nelignificirano) seme (Ivančič, 2002). Poimenovanje je vpeljal Grebenščikov (1950).

Pri diplomski nalogi smo uporabili sorti 'GL Opal' in 'Slovenska golica' (obe sorti spadata med oljne buče) in vrsto *C. maxima*, sorto 'Noč čarovnic'.

'GL Opal' je izboljšan hibrid oljne buče, ki dosega večje število plodov na hektar. Sorta je odpornejša na bučni mozaični virus kot ostale sorte. Plodovi zorijo enakomerneje ter so po velikosti enaki (Oljne buče, 2011). 'Slovenska golica' je v Sloveniji najbolj razširjena sorta oljnih buč. Poganja vreže, za rast pa potrebuje dobro pognojena tla. Zreli plodovi so srednje veliki, ploščato okrogli, rumeno - zeleno progasti (Plodovke, Buča Slovenska ..., 2011). Orjaška buča oz. *C. maxima*, ki jo zaradi uporabe imenujemo tudi 'Noč čarovnic', je hibrid, ki doseže maso plodu do 8 kg. Buče so okrogle oblike, oranžne barve, rahlo rebraste. Uporablja se v prehrani (Plodovke, Buča 'Noč čarovnic' ..., 2011).

Seme buč kali pri minimalni temperaturi 14 °C, optimalna temperatura kalitve pa je med 22 - 24 °C. Za vegetativno rast je potrebna dnevna optimalna temperatura 25 - 27 °C ter nočna 15 - 18 °C. Minimalna temperatura vegetativne rasti ne sme pasti pod 12 °C, za nastanek plodu pa pod 15 °C. Oljne buče lahko zaradi globokega koreninskega sistema prenesejo kratka obdobja nizke temperature. Ustrezna vlažnost, primerna za oljne buče, je do 80 % vlažnosti tal in do 70 % zračne vlažnosti (Pavlek, 1985).

Z gojenjem buč pod folijo ali steklom povečamo izkoristek sončne energije. Ta energija se namreč pri prehodu skozi kritino (ob ogrevanju predmetov) in tal preoblikuje iz kratkovalovnih svetlobnih žarkov v dolgovalovno toploto. To pride prav v zimskem času, ko je intenzivnost osvetlitve majhna, obenem pa s tem privarčujemo na toplotni energiji. S samo uporabo pokrival nam pozimi ne uspe zavarovati občutljivih rastlin pred zmrzaljo. Celo v ogrevanem rastlinjaku je težko ustvariti ugodno mikroklimo za uspešen razvoj in dobro rast gojenih rastlin. Prednost osvetlitve in ogrevanja se poleti spremeni v neugodnost, saj so lahko temperature v zavarovanem prostoru previsoke (do 50 °C) za normalno rast rastlin. Prostor je potrebno zračiti in senčiti (Osvald in Kogoj – Osvald, 1994).

2.1.1 Cvetovi buč

Buče imajo najpogostejšo obliko spolne izraženosti rastlin – monoecijo. To pomeni, da so moški in ženski cvetovi enospolni in na isti rastlini. Cvetovi so veliki in izrazito rumene barve. Nahajajo se na krajših ali daljših pecljih, ki izraščajo iz pazduh listov. Najprej se na rastlini pojavijo moški cvetovi, nato ženski, razmerje le-teh je odvisno od genetskega ozadja rastline in okoljskih dejavnikov (Ivančič, 2002). Kalloo (1988) in Ugrinovič (2000) navajata, da se več ženskih cvetov razvije pri nižjih temperaturah, manjšem gnojenju z dušikom, zadostnih količinah vlage in ob krajših dnevih.

Moški cvetovi imajo čašo, venec in moški spolni organ, v katerem se nahajajo medovniki. Spominjajo na zvončasto obliko s petimi kraki, kar kaže na to, da so nastali s spojitvijo petih venčnih listov. Cvet ima tri prašnike s prašnicami, ki so spojene skupaj v eno homogeno strukturo. Ženski cvetovi so na krajših in debelejših pecljih kot moški. Sestavljeni so iz čaše, venca, pestiča in medovnika. Vrat pestiča je kratek in mesnat ter na vrhu razcepljen v tri dele, ki jih zaključujejo dvodelne brazde. Plodnica je podrasla (epiginska), njena oblika je genetsko pogojena (Ivančič, 2002).

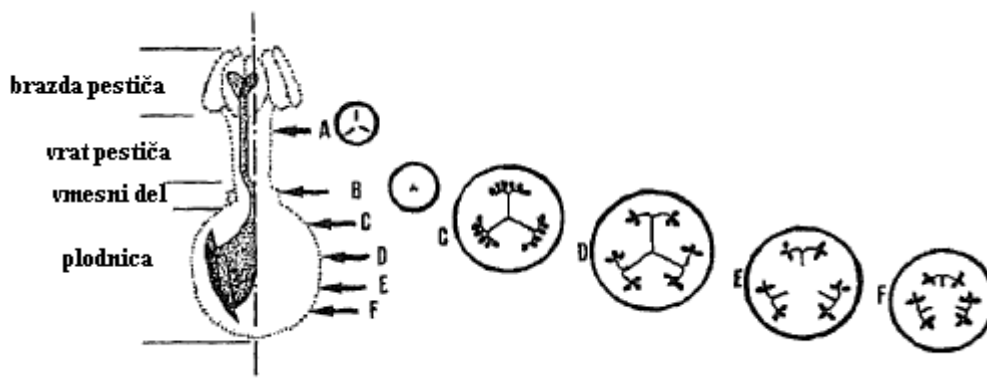
Cvetenje poteka le zjutraj, to se pravi nekaj ur v dnevu. Avtorji navajajo cvetenje od 5:30 - 6:00 do 12:00 ure (Nepi in Pacini, 1993). Na odpiranje cvetov vplivajo vlaga, temperatura in sončna svetloba. Pri toplejših dnevih je odpiranje buč zgodnejše, pri hladnejših in deževnih poznejše. Brazda pestiča je v času cvetenja popolnoma dovzetna za pelod, kmalu po opraitvi pa postane svetlo rjava in začne veneti (Ivančič, 2002).

2.1.2 Tehnika križanja

Zaradi ločenosti moškega in ženskega cveta je križanje pri bučah enostavno. Cvetove je potrebno en dan pred odprtjem zapreti, da se cvet ne odpre in žuželke ne morejo vanj. Vedeti moramo, kateri cvetovi se bodo odprli naslednji dan. Okoli cveta spnemo obroček iz papirja in ob tem pazimo, da ne poškodujemo cvetnega venca in spolnih organov.

Oprašitev opravimo do desete ure naslednjega dne, v toplejših dnevih še bolj zgodaj. Cvet previdno odpremo in z moškim cvetnim organom podrgnemo po brazdah pestiča ter ponovno zapremo s papirnatim obročkom. Ženski cvet opremimo z etiketo – napišemo datum križanja ter moško in žensko komponento (Ivančič, 2002). Uspešen razvoj plodu lahko opazimo že po nekaj dneh (lastna opazanja).

Iz semenskih zasnov se po uspešni oprašitvi razvijejo semena, iz plodnice pa plod. Slika 1 prikazuje značilno razporejenost semenskih zasnov na različnih prerezih plodnice.



Slika 1: Razporejenost semenskih zasnov na različnih delih plodnice buče (Nepi in Pacini, 2001: 30)

2.1.2.1 Medvstna križanja in medvrstna inkompatibilnost

Medvrstna križanja v rodu *Cucurbita* so uporabljena v primerih, ko želimo prenos lastnosti iz ene vrste v drugo ali določiti sorodnost med dvema vrstama (Kwack in Fujieda, 1987). Lastnosti, ki jih najpogosteje želimo vnesti, so barva in oblika plodov, povečana produktivnost, odpornost na bolezni, prilagojenost na specifična okolja in kvaliteta plodov. Te prenesemo iz divje ali kultvirane vrste v drugo kultivirano vrsto (Ferriol in Pico, 2008). Pogosto se pojavi medvrstna inkompatibilnost.

Medvrstna inkompatibilnost je nesposobnost združitve normalne moške z normalno žensko gameto in s tem nastanka zigote. Najpomembnejši vzrok za nenormalno združitev je v razlikah v rasti pelodne cevke med različnimi vrstami (predzigotične ovire), vendar se lahko ovire pojavijo tudi pri oploditvi in po oploditvi (postzigotične ovire) (Kwack in Fujieda, 1987). Vse to lahko povzroči plodove brez ali z malo semeni, ustavitev razvoja semena ali sterilnost hibridne rastline (Šiško, 2002). Kwack in Fujieda (1987) poročata o najpogostejši postzigotični oviri – neskladnosti med embrijem in endospermom. Razvoj endosperma je bil pri medvrstnem križanju buč enak kot pri križanju znotraj vrste, medtem ko je bil razvoj embrija pri medvrstnem križanju počasnejši. Razlike so bile tudi v velikosti plodov. Avtorja navajata, da so bili plodovi medvrstnih križancev veliki približno 800 g, plodovi križanja znotraj vrste pa okoli 1200 g. Za nastanek semen brez embrija je po

njunem mnenju – poleg inkompatibilnost med embrijem in endospermom – vzrok še v nepravilni kalitvi peloda, neuspešni oploditvi.

Bolj oddaljene evolucijske vrste je težje križati med seboj. Nekaj avtorjev poroča o uspelem križanju med vrstama *C. pepo* in *C. maxima*.

Rakoczy-Trojanowska in Malepszy (1986) navajata, da je križanje med *C. maxima* in *C. pepo* možno tedaj, ko za žensko rastlino uporabimo *C. maxima* ali *C. pepo*. Omenjena avtorja sta dobila 10 hibridnih rastlin *C. maxima* x *C. pepo* in 4 hibridne rastline *C. pepo* x *C. maxima*. Rastline so bile povečini moško sterilne. O sterilnosti potomcev pri križanju *C. pepo* in *C. maxima* poročata tudi Robinson in Decker-Walters (1997).

Rakoczy-Trojanowska in Malepszy (1989) sta zapisala tudi, da so embriji med *C. pepo* in *C. maxima* imeli povečane kotiledone ter albino območja in so bili brez vidnih meristemskih oblik (visible meristem tips).

Prav tako o uspešnem križanju med *C. pepo* in *C. maxima* poročajo Šiško in sod. (2003). Uspešnost oprašitve je bila v primeru križanja *C. pepo* x *C. maxima* 43,5 %, v primeru križanja *C. maxima* x *C. pepo* pa 36,6 % (Šiško, 2002).

2.1.3 Plod in seme

Plod, ki je zelo velik, uvrščamo v skupino, imenovano *pepo* (zaprt sočni plod). V starejši literaturi ga uvrščajo med jagode. Plodovi se močno razlikujejo med različnimi vrstami po obliki, velikosti in barvi (Šiško, 2002). Plod doseže maksimalno velikost že 16. dan po oprašitvi (Nepi in Pacini, 2001).

Tudi seme se močno razlikuje po velikosti, barvi, obliki, robu itd. Na splošno so semena ploščata in ovalna.

V plodu se v povprečju razvije več kot 200 semen, vendar so odstopanja. Če je oploditev na dan cvetenja slaba (malo oplojenih semenskih zasnov), se bodo razvili različno deformirani plodovi (manjši, ukrivljeni ali na enem delu zoženi). Prav tako se oprašitev lahko izvede en dan pred cvetenjem buče, vendar je v tem primeru število semen na plod manjše, prav tako je manjši tudi plod. Tako je bila masa plodov analiziranih z Nepi in Paccini (2001), katerih oprašitev je bila izvedena na dan odprtja cvetov, v povprečju 1128,76 g, medtem ko je bila masa plodov oprašenih en dan pred odprtjem cvetov 941,56 g. V plodovih oprašenih na dan cvetenja je bilo v povprečju 281,56 semen, pri tistih oprašenih en dan pred cvetenjem pa 171,98 (Nepi in Paccini, 2001). Lelley in sod. (2009) poročajo, da je število semen odvisno od števila semenskih zasnov (ovul). Ker oprašitev nikoli ni 100-odstotna, je končno število semen vedno manjše. Poročajo tudi, da je število semen buč odvisno od genotipa, v povprečju pa varira od 275 do 425 semen.

Semena *C. pepo* so zaščitena z ovojem, ki vsebuje 5 celičnih plasti, pri čemer so najmanj 3 močno lignificirane. Obstajajo mutante Styrian, katerih semenska lupina je popolnoma brez vsebnosti lignina. Ker plasti celic ne vsebujejo lignina, posledično propadejo. Izrazi se plast s protoklorofilom (prekurzorjem klorofila), zato so nelignificirana semena buč zelena. Gen, ki omogoča nalaganja lignina v semenski lupini, je dominanten. V primeru križanja semen z lignificirano in nelignificirano semensko lupino dobimo razmerje 3:1 = lignificirana semena:nelignificirana semena. Pri nelignificiranih semenih obstajajo variacije semen z nizko vsebnostjo lignina. Odsotnost lignina postane vidna 20. dan po opravitvi (Lelley in sod., 2009).

2.2 *In vitro* REŠEVANJE EMBRIJEV

Reševanje embrijev je *in vitro* metoda izolacije popolnoma ali delno razvitega embrija in gojenje le-tega na hranljivem gojišču. Cilj uporabe te metode je vzgoja rastline.

Izolacija poteka v sterilnih razmerah. Običajno je, da so plodovi v notranjosti sterilni, zato je pri plodovkah dovolj, da steriliziramo zunanost ploda ter nato ohranjamo sterilno okolje. V primeru rastlin s prostimi semeni je te potrebno sterilizirati. Pri reševanju nedozorelih embrijev je izolacija iz ovule enostavna, saj so tkiva še mehka. Pri semenu, ki je zaključil rast oz. smo ga celo posušili, je tkivo trdo, zato je potrebno nekajurno do nekajdnevno tretiranje z vodo – odvisno od vrste. Embrije izoliramo in gojimo na hranljivem gojišču. V gojišču je potrebno optimizirati koncentracije hranil, mikro in makro elementov, vitaminov in hormonov. Zakoreninjenje je neposredno, redkokdaj je potreben tudi prenos na gojišče za tvorjenje kalusa. Iz embrija se razvije rastlina, ki jo prenesemo v običajen humus (Chawla, 2002).

2.2.1 Zgodovina

Prvi uspešen poskus izolacije in vzgoje embrijev *in vitro* je uspel Hannigu (1902), ki je preučeval embrije dveh križnic – redkvice in hrena. Nato so se raziskave na tem področju stopnjevale. Leta 1924 je Dietrich vzgajal embrije in spoznal, da dozoreli embriji zrastejo neposredno v rastlino prav tako kot nedozoreli. Imel je namreč pomisleke, da se bodo nezreli embriji najprej razvili v zrel embrij in šele nato v rastlino (Dietrich, 1924). Laibach je nato leta 1925 medvrstno križal dve vrsti lanu (*Linum perenne* in *Linum austriacum*) in embrije gojil na vlažnem filtrskem papirju ob dodatku saharoze. Ta medvrstni križanec namreč ne razvije viabilnih semen, nedozoreli embriji pa so se na gojišču razvili v rastlino (Chawla, 2002). Castetter (1930) je med prvimi opisal medvrstno križanje pri rodu *Cucurbita*, tehnike kulture embrijev pa so prvič v poskus z bučami vključili in opisali leta 1954 (Wall, 1954).

2.2.2 Načini izolacije embrija

2.2.2.1 Izolacija popolnoma razvitega embrija

V primeru izolacije popolnoma razvitega embrija iz zrelega semena izoliramo dokončno razvit embrij. To metodo uporabimo, kadar bi nezrel embrij, prenesen na gojišče, razvil mehanizme dormance in ne bi rasel. Prav tako je tehnika uporabna, če seme ne kali normalno. Mehanizmi dormance semena niso prisotni v embriju, temveč v okoliškem tkivu (testi). Z izolacijo embrija se dormanca ne prenese (Chawla, 2002).

2.2.2.2 Izolacija delno razvitega embrija

Nerazvit embrij *in vitro* izoliramo v tistih primerih križanj, pri katerih vemo, da embrij ne bi dozorel zaradi ovir, ki nastanejo po oploditvi. Pojavi se nekompatibilnost med endospermom ali semensko ovojnico in embrijem. Endosperm sicer oskrbuje embrij s hranili, minerali in ostalimi snovmi, potrebnimi za njegovo rast, vendar lahko izloča toksine, ki negativno vplivajo nanj. Embrij moramo pravočasno odstraniti iz semena in prenesti na hranljivo gojišče, če ga želimo ohraniti pri življenju (Chawla, 2002). Prav tako izolacijo delno razvitega embrija uporabimo v primeru, ko želimo skrajšati medgeneracijski čas.

2.3 IN VITRO REŠEVANJE EMBRIJEV PRI BUČAH

Pri bučah se pogosto izvajajo žlahniteljski postopki, pri katerih prenesemo zelene gene iz ene vrste v drugo vrsto. Pogosto se za skrajšanje cikla uporabi metoda reševanja embrijev.

Pod mikroskopom so embriji vidni že 21. dan po opraitvi. Pri križancih znotraj vrste je prisotnost embrija običajna, medtem ko je pri medvrstnih križanjih embrij prisoten glede na vrsto uporabljenih ženskih in moških komponent (Kwack in Fujieda, 1987).

Šiško in sod. (2003) poročajo o gojenju embrijev na hranljivem gojišču z dodatkom Murashige & Skoog (v nadaljevanju MS) soli, 1 mg/l nikotinske kisline, 2 mg/l tiamina, 1 mg/l piridoksina, 100 mg/l mio-inozitola, 15 g/l saharoze, 7 g/l agarja, pri pH=7.0. Izolacija je potekala 29 - 36 dni po opraitvi. Embriji dodani na omenjeno iniciacijsko gojišče so bili po 10 - 14 dneh, ko so razvili kotiledone, prestavljeni na gojišče obogateno z dodatkom 0,1 g/l kinetina in 0,01 mg/l indol očetne kisline (IAA) ter povečanjem koncentracije saharoze na 20 g/l. Rast je potekala pri 15/9 fotoperiodi in pri temperaturi 21 - 23 °C in osvetlitvi 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. Po 2 - 3 tednih so embriji razvili poganjke in korenine.

Rakoczy-Trojanowska in Malepszy (1986) za najboljši čas izolacije embrijev med *C. maxima* in *C. pepo* (*C. maxima* kot ženska in moška komponenta) navajata čas 20 do 25

dni po opraskitvi. V obeh primerih sta križance pridobila s pomočjo tehnike reševanja embrijev. Uporabila sta gojišče z dodatkom MS soli, v prvi fazi brez dodatka hormonov, nato pa z dodatkom 1,5 mg/l avksina IAA za indukcijo rasti korenin.

Za *in vitro* reševanje embrijev se prav tako uporablja gojišče E20A. Razvila sta ga Sauton in Dumas De Vaulx (1987). Gojišče se razlikuje od običajnega MS gojišča predvsem po dodanih aminokislinah.

2.4 BOLEZNI BUČ IN ŠKODLJIVCI

V rastlinjaku so buče izpostavljene predvsem povišani vlagi, ki omogoča optimalen razvoj boleznim in škodljivcem.

Bolezni buč so baterijskega, virusnega ali glivičnega izvora. Pojavijo se lahko že v času vznika, povzročajo jih talne glive iz rodu *Pythium*, *Fusarium*, *Phytophthora* ter *Sclerotinia sclerotium*, *Rhizoctonia solani* (najpogostejše) in *Thielaviopsis basicola*. Najpogostejše se organizmi razvijejo ob prenizki temperaturi in preveliki vlažnosti, saj sta vznik in kalitev počasna. V kasnejših stadijih se pojavlja fuzarijsko in verticilijsko venenje bučnic, ki ga povzročajo nekatere glive iz rodu *Fusarium* in nekatere iz rodu *Verticillium*. Pojavljajo se še antraknoza, ki jo povzroča *Colletotrichum orbiculare*, krastavost, ki jo povzroča *Cladosporium cucumerinum*, bela in črna gniloba, katerih povzročitelja sta *Didymella bryoniae* ter *Sclerotinia sclerotiorum* ter kumarna plesen, povzročena s *Pseudoperonospora cubensis*. Buče prizadenejo še pepelovka bučnic, bakterijski ožig, bakterijska ovelust ter nekaj virusov – mozaik buč, rumeni mozaični virus bučk, mozaik lubenic itd. (Celar, 2000; Lelley in sod., 2009).

Škodljivci so nevarni predvsem pri pridelavi v zaprtih prostih. Med gospodarsko nevarne štejemo predvsem navadno pršico (*Tetranychus urticae*). Ti svetlorumeni, skoraj prozorni škodljivci uničijo rastlino do te mere, da listje porumeni in se posuši. Težave povzročajo tudi listne uši. Poleg morfoloških motenj (zvijanje listov itd.) so listne uši nevarne tudi zato, ker prenašajo viruse. Prav tako je težaven rastlinjakov ščitkar (*Trialeurades vaporariorum*), ki sesa rastlinske sokove, zato rastline zaostajajo v rasti. Na bučah lahko opazimo tudi resarje (tripse) in mušice (Milevoj, 2000).

2.5 FIZIOLOŠKE MOTNJE V RAZVOJU RASTLIN IN PLODOV BUČ

Najpogostejše se pojavljajo težave, povezane z oskrbo s hranili, reakcijo tal, vlago v tleh in zraku, onesnaženostjo, temperaturo in osvetlitvijo. Napadene rastline so bolj dovzetne za napade bolezni in škodljivcev.

Preveč ali premalo posameznega hranila se pokaže v deformacijah in razbarvanju. Bučnice so nasploh občutljive tudi na vrednost pH, ki mora biti okoli 5,8-6,8. Pri pH, ki odstopa od optimalnega, so hranila težje dostopna, kar vodi tudi do odmiranja delov rastlin. Preobilno gnojenje z dušikom lahko povzroči bujno vegetativno rast in zamakne cvetenje. Premalo dušika lahko povzroči počasnejšo rast, rumenenje starejših listov in zaviranje razvoja novih plodov. Pri pomanjkanju kalcija (Ca) se pojavi vrhnja gniloba ploda. Prvi znaki se pokažejo kot prosojne rjave pege, ki se nadaljujejo v temnejše vdrte pege. Ob napadu bakterij in gliv se lahko razvije mokra gniloba. Pri pomanjkanju Ca začno odmirati mladi poganjki. Magnezij vpliva na barvo listov, le-ti postanejo sivozeleni, razbarvanje intervenalnega prostora se nadaljuje in tkivo postane rumeno ter nato rjavo. Na rast vplivata tudi mangan in molibden. Slednji vpliva na razbarvanje listov, obenem se listi začnejo sušiti ob robovih. Pri visokih koncentracijah ogljikovega dioksida (CO₂) se kažejo poškodbe kot na primer uvenelost in sušenje (Ugrinovič, 2000; Zitter in sod. 1998).

Razlog za razvoj grenkih plodov pri bučah je običajno seme. Če je morda prišlo do križanja s katero izmed okrasnih buč, ki vsebuje veliko kukurbitacina, se lahko dominantni alel vključi v genom gojene vrste. V rastlinjaku se pogosto pojavi gutacija, ki pripomore k pegavosti plodov. Vzrok je prevelika zračna vlažnost. Vodni stres (prevelika količina vode ali suša) vpliva na metabolizem rastline. Upočasni se vegetativna rast, generativni razvoj, fotosinteza, transpiracija, pojavlja se kasnejše cvetenje, odpadanje cvetov in preoblikovanje ženskih cvetov v moške. Plodovi, ki se pojavijo v času suše, so manjši in deformirani. Ob preveliki oskrbljenosti prsti z vodo se pojavijo nizke koncentracije kisika v predelu korenin. Buče začnejo rumeneti in zaostajajo v rasti. (Ugrinovič, 2000; Zitter in sod. 1998).

Kaljenje in cvetenje je v veliki meri odvisno od temperature. Če so rastline buč ob cvetenju izpostavljene temperaturi, nižji od 17 °C, se bo povečal odstotek moških cvetov. Tudi pri nizkih temperaturah (nižjih od 10 °C) se na listih pojavijo bele lise. Plodovi so majhni in deformirani. Pri temperaturah nad 32 °C se rast upočasni, pri temperaturah nad 38 °C pa listi postanejo svetlozeleni in rumenkasti, ženski cvetovi se spreminjajo v moške, pojavlja se odpadanje plodov in cvetov. Deformirane plodove povzroči tudi nihanje temperatur (Ugrinovič, 2000; Zitter in sod. 1998).

2.6 PRETOČNA CITOMETRIJA

Pretočna citometrija je pogosto uporabljena in zelo učinkovita metoda za ugotavljanje velikosti jedrnega genoma (Doležel in sod., 1989). Prav tako jo uporabljamo za ugotavljanje aktivnosti celičnega cikla, ploidnosti, aneuploidnosti in variabilnosti genomov rastlin z enakim kromosomskim številom (Marie in Brown, 1993).

C-vrednost, ki se nanaša na količino DNK v nepodvojenem haploidnem genomu določene vrste, je vpeljal Swift (1959). Celični cikel je zaporedje faz mitoze, G1 faze, S faze (DNK sinteza) in G2 faze. Vsebnost DNK odraža položaj celice v celičnem ciklu. Diploidne celice G1 vsebujejo 2C jedrni DNK nivo, v G2 fazi pa je jedrni nivo 4C.

Postopek pretočne citometrije ni zahteven. Liste mladih rastlinic vzorca in standarda mehansko nasekljamo ob dodatku pufra, da se izloči DNK. Postopek se v naslednjih fazah razlikuje glede na način barvanja z 4,6 – diamino-2-fenilindolom (DAPI) (postopek povzet po Otto in sod. 1981) ali s propidijevim jodidom (PI) (postopek povzet po Doležel in sod. 1989). Ta dva fluorokroma sta najpogostejše uporabljena v primerjavi z etidijevim bromidom, mitamicinom, kromomicinom in fluorokromom Hoeshst 33258 (Doležel in sod. 1998).

Postopek po Otto in sod. (1981) vključuje uporabo dveh pufrov. Prvi, ki ga dodamo materialu ob sekljanju, vsebuje 0,1 M citronske kisline in 0,5 % Tween-20. Nastalo suspenzijo prefiltriramo skozi 30 µm najlonski filter. Pufer za barvanje, ki ga dodamo v 4-kratnem volumnu glede na prvi pufer, vsebuje barvilo DAPI in 0,4 M natrijev hidrogen fosfat. DAPI je fluorokrom, katerega prednost je visoka specifičnost za DNK in fluorescenčna intenziteta.

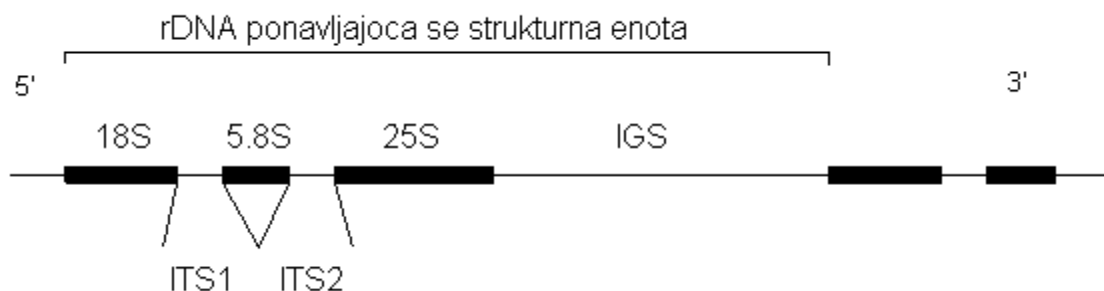
Postopek modificiran po Doležel in sod. (1989) zahteva uporabo poliaminskega pufra-LB01[Tris 15 mM, Na₂EDTA 2 mM, spermine x 4HCl 0,5 mM, KCl 80 mM, NaCl 20 mM, Triton X-100 0.1% (v/v), pH 7,5 z 1 N HCl]. Nastalo suspenzijo barvamo s 50 µg/ ml propidijevega jodida z dodatkom 50µg/ ml ribonukleaze.

Čeprav so dolgo zatrjevali, da je variabilnost v količini DNK znotraj vrste konstantna, novejše raziskave kažejo, da obstajajo razlike v velikosti genoma tako pri bučah (Lane Rayburn in sod., 2008), kot pri ostalih rastlinah (Lane Rayburn in sod., 1989).

Šiško in sod. (2003) so prvi analizirali velikost genoma 11 vrst iz rodu *Cucurbita*. Uporabili so PI in DAPI. DAPI je uporabnejši za medvrstne križance, saj producira histogram z višjo CV vrednostjo. Omenjeni avtorji so določili vrednosti velikosti genoma s pomočjo fluorokroma DAPI 0.719 ± 0.008 pg (2C) za *C. pepo* var *ovifera*, $0,719 \pm 0,006$ pg (2C) za *C. pepo* var *fraterna* in $0,694 \pm 0,007$ pg (2C) za *C. maxima*.

2.7 MOLEKULSKA ANALIZA

Trije geni, ki kodirajo 18S, 5,8S in 25S citoplazemsko ribosomsko RNK, se v genomu evkariontov pojavljajo v velikem številu kopij. Skupaj tvorijo transkripcijsko enoto, ki se pojavlja v tandemskem zaporedju na enem ali več kromosomskih lokusih.



Slika 2: Sestava transkripcijske enote (rDNK ponavljajoče se strukturne enote)

Število transkripcijskih enot se močno razlikuje od vrste do vrste. Kopij v haploidnem genomu je tako od okoli 600 do 31000. Število kopij varira tudi znotraj vrste. DNK, ki leži med 18S in 5,8S in 25S, se imenuje ITS (internal transcribed spacer) regija. ITS1 leži med 18S in 5,8S, ITS2 pa med 5,8S in 25S. IGS (intergenic spacer) regija povezuje dve sosednji transkripcijski enoti. Sekvence genov, ki določajo 18S in 5,8S in 25S, so zelo ohranjene med vrstami. Regiji ITS1 in ITS2 sta bolj variabilni in tako primerni za študije variabilnosti rastlinskih vrst.

Začetne oligonukletotide za namnoževanje ITS1 in ITS2 običajno pozicioniramo v mestih 18S in 25S. S tem pomnožujemo obe ITS regiji in 5,8S gen. Pridobljene podatke uredimo s programsko opremo (npr. Codon Code Aligner) ter analiziramo v MEGA5 in BLAST orodju.

Pri bučah o ITS regijah poročajo Jobst in sod (1998). Izmerili so, da je dolžina ITS1 regije pri *C. pepo* 187-189 bp, ITS2 regija pa 250-252 bp. Pri *C. maxima* je bila izmerjena dolžina ITS1 regije 193-194 bp, ITS2 regije pa 252-254 bp. Dolžina ITS1 regije je tudi pri ostalih analiziranih vrstah krajša od ITS2 regije, pri družini Cucurbitaceae je ta razlika od 50 do 60 bp. Omenjeni avtorji navajajo, da je variabilnost v območju ITS2 regije večja kot v ITS1 regiji. Pri omenjenem rodu niso opazili velikih razlik v odstotku GC baz v obeh regijah.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 LOKACIJA POSKUSA IN POGOJI

Poskus je bil sestavljen iz treh ponovitev (serij) v različnih delih leta, vsaka ponovitev je vsebovala delo v rastlinjaku in laboratoriju. Oba dela sta potekala na Biotehniški fakulteti v Ljubljani, na Oddelku za agronomijo, Katedri za genetiko in žlahtnjenje rastlin.

Prva serija buč je bila posajena v rastlinjaku, v začetku avgusta 2010. Opraševanje je potekalo od 8. septembra 2010. Opraševali smo vsakih nekaj dni, vendar se je izkazalo, da je primerneje opraševati vsak dan. *In vitro* reševanje embrijev smo opravili 30 dni po prvem opraševanju. Rastlinjak je bil hlajen z ventilacijo, saj so temperature ob sončnem dnevu presegale 40 °C. Prostor je bil vlažen zaradi obilnih padavin pred, med in po opraševanju.



Slika 3: Lokacija prve serije – poskusni rastlinjak

Druga serija je bila posajena v rastlinjak konec novembra, opraševanje je potekalo v mesecu februarju, in sicer od 2. februarja. Opraševali smo vsak dan. Zaradi zimskega časa sta bili temperatura in osvetlitev nadzorovani. Pobiranje plodov in izolacijo embrijev smo opravili 37 dni po prvem opraševanju. Za daljši interval smo se odločili zato, ker so bili plodovi vsaj 3-krat manjši kot v prvi seriji.



Slika 4: Lokacija druge serije – poskusni ogrevan rastlinjak

Buče tretje serije so bile zasajene 20. februarja 2011 v ogrevan rastlinjak ter nato prenesene v večje zasaditvene lonce v rastlinjak brez ogrevanja. Opraševanju, ki smo ga izvedli v začetku maja (vsak dan), je sledilo pobiranje plodov čez približno mesec dni.



Slika 5: Lokacija tretje serije – poskusni rastlinjak

Buče vseh serij so rastle v zasaditvenih loncih premera 25 cm, ki so bili locirani na s folijo zaščitene tleh in na premičnih mizah višine 1,5 metra.

3.2 UPORABLJENE SORTE BUČ

Za križanje smo uporabili oljne buče *C. pepo* L. (sorti 'Slovenska golica' in 'GL Opal' F1) ter vrsto *C. maxima* (sorto 'Noč čarovnic', F1).

Križanje znotraj vrste *C. pepo* je potekalo med genotipoma 'GL Opal' in 'Slovenska golica', medvrstno pa recipročno med vrstama *C. pepo* 'GL Opal' in *C. maxima*.

Križanje pridobljenih potomcev (*C. maxima* x *C. pepo* 'GL Opal') X (*C. maxima* x *C. pepo* 'GL Opal') v prvi seriji še ni potekalo, saj še nismo imeli medvrstnih križancev. V drugi seriji ni potekalo križanje med *C. pepo* 'GL Opal' x *C. pepo* 'Slovenska golica'. Vzrok je bil pomanjkanje ženskih cvetov, saj smo zasadili premalo materiala vrste *C. pepo*.

3.3 POTEK KRIŽANJA

Dan pred cvetenjem smo moške in ženske cvetove, za katere smo sklepali, da se bodo naslednji dan odprli, ovili s papirjem. Tako se cvet ni mogel odpreti in morebitne žuželke v rastlinjaku niso mogle opraviti opraitve.



Slika 6: Zaščiten ženski cvet sorte 'GL Opal' dan pred cvetenjem



Slika 7: Odprt moški (levo) in ženski cvet (desno)

Na dan cvetenja smo iz cvetov odvili papir in po ženski brazdi pestiča podrgnili moški prašnik. Cvet smo ponovno ovili s papirjem in na ženski cvet privezali majhen košček plastike ter nanj z vodoodpornim pisalom napisali žensko in moško komponento ter datum opraitve. Cvetove smo nato redno pregledovali in spremljali tako delež opraitenih cvetov, kot tudi gnitje in plesen.



Slika 8: Oprašen, zaščiten in označen ženski cvet

Po približno tednu dni smo že lahko videli, ali se plod pravilno razvija, in iz tega sklepali, ali je bila oprašitev uspešna.



Slika 9: Plod sort *C. pepo* 'GL Opal' (ženska komponenta) in *C. maxima* (moška komponenta) po sedmih dneh od oprašitve

Nekaj cvetov smo oprašili dan pred odprtjem ženskega cveta. Venčne liste ženskega cveta smo previdno odprli in s prašnikom (iz odprtega moškega cveta) podrgnili po brazdi. Cvet smo zaščitili z obročkom iz papirja in ustrezno označili.

3.4 POBIRANJE PLODOV

Po oprašitvi je mnogo plodov propadlo. Lepo razvite plodove smo odstranili iz starševske rastline po vnaprej določenem času. Iz prebrane literature smo ugotovili, da je to približno 30 dni po oprašitvi. Ker je bil naš osnovni namen naloge izolacija različno starih embrijev in spremljanje razvoja le-teh, smo pobrali plodove različnih starosti, vendar ne mlajših kot 19 in starejših kot 37 dni. Plod smo iz starševske rastline odrezali na sredini peclja ploda. Plodove smo prenesli v laboratorij.

3.5 LABORATORIJSKO DELO (Priprava gojišča, izolacija embrijev)

3.5.1 Predhodna priprava ploda

Plodove prenesene iz zunanjega okolja smo najprej oprali z vodo, da smo odstranili prst in razredčili bakterije in plesni. Polili smo jih z 70 % raztopino etanola in večkrat obrisali. V zadnji fazi smo plod poškropili s 70 % etanolom in ga prižgali. Sklepali smo, da smo s tem uničili vse mikroorganizme na površini ploda. Prav tako smo iz prebrane literature (Šiško, 2002) sklepali, da je plod sterilni tudi znotraj in površinska sterilizacija semen in embrijev ni potrebna. Delo je nato potekalo v brezprašni komori, kjer so bili omogočeni sterilni pogoji.

3.5.2 Priprava gojišča

Predhodno smo si pripravili gojišče. Pri prvi seriji smo uporabili dva gojišča – E20A (Sauton in Dumas De Vault, 1987) in gojišče z dodatkom soli Murashige in Skoog (1962) (v nadaljevanju MS gojišče), ki smo ga povzeli po Šiško in sod. (2003). MS gojišče za iniciacijo embrijev se je razlikovalo od gojišča za prestavljanje. E20A gojišče je bilo enako za iniciacijo embrijev in prestavljanje. V kasnejših serijah smo zaradi uspešnosti MS gojišča (iniciacijskega in za prestavljanje) uporabljali le še omenjeno gojišče.

Preglednica 1: Sestava iniciacijskega gojišča in gojišča za prestavljanje (Šiško in sod., 2003)

	Iniciacijsko gojišče	Gojišče za prestavljanje
Bazalno MS gojišče	4,3 g/l	4,3 g/l
Tiamin	2 mg/l	2 mg/l
Nikotinska kislina	1 mg/l	1 mg/l
Piridoksin	1 mg/l	1 mg/l
Mio-Inozitol	100 mg/l	100 mg/l
Kinetin	/	0,1 mg/l
IAA	/	0,01 mg/l
Saharoza	15 g/l	20 g/l
Agar	8 g/l*	8 g/l*
pH	6	6

* Gojišče se razlikuje v koncentraciji agarja v primerjavi z gojiščem, povzeto po Šiško in sod. (2003).

Preglednica 2: Sestava bazalnega MS gojišča

<u>MAKROELEMENTI</u>	
KNO ₃	1900,0 mg/l
NH ₄ NO ₃	1650,0 mg/l
KH ₂ PO ₄	170,0 mg/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	180,54 mg/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	332,02 mg/l
<u>MIKROELEMENTI</u>	
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,9 mg/l
KI	0,83 mg/l
H ₃ BO ₃	6,2 mg/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6 mg/l
FeNaEDTA	36,7 mg/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025 mg/l
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25 mg/l
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025 mg/l

MS gojišče smo pripravili tako, da smo najprej stehali ustrezno količino MS makro in mikroelementov, mio-inozitola in saharoze. Pripravili smo založno raztopino tiamina, nikotinske kisline, piridoksina (tiamin: nikotinska kislina: piridoksin=2:1:1) ter jo v ustrezni količini dodali v gojišče. Prav tako smo naredili založno raztopino hormona kinetina in IAA. Hormone smo dodali le MS gojišču za prestavljanje. Sestavinam smo prilili nekaj destilirane vode in vse skupaj premešali na magnetnem mešalu. Nato smo v merilno bučko zlili vso raztopino ter dodali toliko destilirane vode, da je bil volumen točen. Raztopini smo nato umerili pH z dodajanjem kisline in baze. Po umerjanju smo dodali agar, ki deluje kot strjevalec. Vse skupaj smo prelili v litrske steklenice. Gojišče smo avtoklavirali pri temperaturi 121 °C. Še vroče iniciacijsko gojišče smo v brezprašni komori razlili v posodico s 25 prostorčki. V vsako komorco smo z avtomatsko pipeto odpipetirali 2 ml gojišča, počakali, da se strdi in nato ovili s filmom za ovijanje (parafilmom). Gojišče za prestavljanje smo razlili v posodice s filtrom, v vsako cca. 60 ml. Ovitje s parafilmom v tem primeru ni bilo potrebno.

Preglednica 3: Sestava gojišča E20A (Sauton in Dumas De Vaulx, 1987)

MAKROELEMENTI	
KNO ₃	1075 mg/l
NH ₄ NO ₃	619 mg/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	206 mg/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	156,5 mg/l
KH ₄ PO ₄	71 mg/l
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	25 mg/l
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	19 mg/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	17 mg/l
KCl	3,5 mg/l
MIKROELEMENTI	
MnSO ₄ ·H ₂ O	11,1065 mg/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,8125 mg/l
H ₃ BO ₃	1,575 mg/l
KI	0,3475 mg/l
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,094 mg/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,008 mg/l
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,008 mg/l
VITAMINI IN AK	
Mio - inozitol	50,30 mg/l
Piridoksin HCl	5,500 mg/l
Nikotinska kislina	0,700 mg/l
Tiamin HCl	0,600 mg/l
Ca – pantotenat	0,500 mg/l
Biotin	0,005 mg/l
Glicin	0,100 mg/l
ŽELEZO	
Na ₂ EDTA	0,0187 g/l
HORMONI	
IAA	0,014 g/l
OGLJIKOVI HIDRATI	
Saharoza	20 g/l
STRJEVALEC	
Agar	8 g/l
pH	6

Gojišče E20A smo pripravili s pomočjo založnih raztopin mikro in makro elementov. Naredili smo si tudi založne raztopine nikotinske kisline, tiamina v klorovodikovi kislini (HCl) in piridoksina v HCl. Prav tako smo pripravili založne raztopine železa v dveh oblikah in hormonov (vsakega posebej). Sledilo je tehtanje ustrezne količine saharoze in mio-inozitola. Odpipetirali smo zahtevane količine mikro in makro elementov, založne raztopine železa, hormonov ter vitaminov. Vse sestavine smo dali v litrski plastični merilni vrč. Sestavinam smo dolili nekaj destilirane vode in vse skupaj mešali na magnetnem mešalu. Vse smo prilili v merilno bučko in dolili toliko vode, da je bil volumen točen. Umerili smo pH na 5,8. Po umerjanju smo dodali strjevalec agar in dobro premešali. Vse smo zlili v litrske steklenice in avtoklavirali. Gojišče smo po avtoklaviranju nekoliko ohladili in skozi filter sterilno dodali aminokisline – Ca-pantotenat, biotin, glicin. Dodatek aminokislin pred avtoklaviranjem bi povzročil njihovo denaturacijo. Gojišče smo razlili v petrijevke s 25 prostorčki in v posodice s filtrom.

3.5.3 Izolacija embrijev

Plod buče smo po sterilizaciji prenesli v brezprašno komoro. Najprej smo ga prerezali s kuhinjskim nožem, ki smo ga predhodno sterilizirali z etanolom in ognjem. Prvi rez smo opravili prečno, da smo videli, kje so linije semen, nato pa še vzdolžno na tri dele. Če smo najprej naredili vzdolžni rez, smo s tem prerezali veliko semen in posledično embrijev.



Slika 10: Prečni prerez plodu buče z vidnimi linijami semen



Slika 11: Vzdolžni prerez plodu buče s prerezanimi semeni

Iz buče smo s pomočjo pincete pobrali vsa semena, ki so kazala normalen razvoj. Sterilizacije semen z dikloroizocianurno kislino nismo uporabljali, saj viri kažejo, da to ni potrebno. (Šiško, 2002).



Slika 12: Semena *C. pepo* primerna za izolacijo embrijev (28 dni od opraitve)

Vsako seme smo nato prerezali ter izolirali embrij. Najboljšo tehniko za izolacijo smo ugotovili s poskušanjem. Kot najuspešnejša se je izkazala kombinacija uporabe igle in skalpela. Uporaba lupe ni bila potrebna, saj so embriji izrazito bele barve in lepo odstopajo od okoliškega tkiva. Embriji, ki niso vidni s prostim očesom, niso primerni za hitro regeneracijo v rastlino.



Slika 13: Embrij (26 dni po opraitvi) na rezilu skalpela

Embrije smo dali na iniciacijsko MS gojišče ali gojišče E20A, ki je bilo razlito v posodice s 25 prostorčki. V vsako komorco smo dali en embrij. Petrijevke smo postavili v rastno komoro s 22/23 °C in ciklusom dan : noč = 16 ur : 8 ur.

3.5.4 Potek rasti rastline buč iz embrijev, ponovna zasaditev

Po približno 10 dneh oz. ko so embriji bili veliki toliko, da so segali do vrha komorce ter že kazali znake fotosinteze (bili so zeleni), smo jih prestavili v posodice s filtrom. Temperaturo in ciklus dan/noč smo ohranili takšna kot na začetku. MS gojišče za prestavljanje se je razlikovalo od iniciacijskega MS gojišča. E20A gojišče je bilo v obeh stopnjah enako. Po dodatnih 20 dneh smo najboljše rastline že sadili v prst. Mnogo rastlin je propadlo. Te pridobljene križance smo pozneje uporabili za križanja.

3.6 PRETOČNA CITOMETRIJA

Za ugotavljanje uspešnosti medvrstnih križancev smo uporabili določitev velikosti genomov s pretočnim citometrom Partec. Izmerili smo velikost obeh starševskih genomov in jih primerjali z genomi pridobljenih potomcev (križancev).

Najprej smo določili pravilnost delovanja citometra s pomočjo standarda – bele detelje (*Trifolium repens* L.), ki ima velikost jedrnega genoma 2,07 pg/2C. Za analizo vzorca buč smo odrezali košček svežega lista buče. Delo je potekalo v brezprašni komori, saj smo uporabili tkiva iz tkivnih kultur. K vsakemu vzorcu buče smo dodali približno enako količino lista detelje (standarda) in pufer 1, ki je vseboval 0,1 M citronske kisline in 0,5% Tweena. Z ostro britvico smo sestavine sesekljali. Vzorec smo prefiltrirali skozi 30 µm filter in mu dodali 4-kratno količino pufera 2, ki je vseboval DAPI in 0,4 M natrijev hidrogen fosfat. Tako pripravljene vzorce smo analizirali s pretočnim citometrom, kot rezultat smo dobili histogram vsebnosti jedrne DNK.

3.6.1 Analiza podatkov, pridobljenih s pretočno citometrijo

S pomočjo programske opreme proizvajalca Partec smo pridobili koeficient variabilosti in mediano posameznih vrhov. Vsebnost DNK pri posameznem vzorcu smo izračunali s pomočjo standarda bele detelje, ki ima znano vrednost DNK (2C=2,07 pg). Dobili smo vrednosti v pikogramih (pg).

$$2C\ DNK_b = m_b \times 2C\ DNK / m \quad \dots(1)$$

2C DNK_b – vrednost absolutne količine DNK (pg / 2C) buče

2C DNK – vrednost absolutne količine DNK (pg / 2C) bele detelje

m_b - vrednost mediane 2C vrhov buče

m – vrednost mediane 2C vrhov bele detelje

3.7 MOLEKULSKA ANALIZA

Podatki, pridobljeni z metodo pretočne citometrije, niso dali zanesljivih podatkov, da smo pri križanjih dobili medvrstne križance, zato smo le-to preverili s pomočjo DNK analize.

3.7.1 Izolacija DNK

Kot vzorec 1 smo označili *C. maxima*, kot vzorec 2 *C. pepo* 'GL Opal' ter kot vzorec 3 *C. pepo* 'Slovenska golica'.

Postopek izolacije DNK je potekal v več fazah. Rastlinski material smo zdrobili v terilnici z dodatkom 1 ml na 68 °C segretega 2% ekstrakcijskega pufra CTAB [2%(w/v) CTAB: 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA (pH 8,0), 100 mM Tris-HCl (pH 8,0)]. CTAB razgrajuje membrane in tvori kompleks z DNK. Nastalo suspenzijo smo prelili v označene mikrocentrifugirke in inkubirali 1,5-2 h na 68 °C. Med inkubacijo smo mikrocentrifugirke večkrat premešali. Po inkubaciji smo dodali 700 µl zmesi kloroform:izoamilalkohol=24:1 in močno premešali. Faze smo skoncentrirali s centrifugiranjem 10-15 minut pri >10000 *g* in 4 °C. Nastalo vodno fazo smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko in dodali 0,1 volumen (70 µl) 3M natrijevega acetata (NaOAc) (pH 5,2) in 1 volumen (700 µl) ledeno mrzlega izopropanola ter dobro premešali. DNK se je začela obarjati in izločevati iz raztopine. Vzorce smo postavili v zamrzovalnik za 30 min, na 18 °C. Ponovno smo centrifugirali 10-15 minut pri >10000 *g* in 4 °C. Previdno smo odlili supernatant, pelet (oborina) je ostal na dnu. Oborino smo sprali s 500 µl 70 % EtOH in pelet s tresenjem ločili od mikrocentrifugirke. Centrifugirali smo 10-15 minut pri >10000 *g* in 4 °C. Odstranili smo ves EtOH in oborino posušili na zraku. Oborini (DNK peletu) smo dodali 60 µl TE pufra [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)] in čez noč postavili v hladilnik na 4 °C, da se je DNK raztopila.

3.7.2 Merjenje koncentracije DNK s fluorometrom

Vzorcu smo določili koncentracijo s pomočjo fluorometra DyNA Quant 200 (proizvajalec Amersham Biosciences), ki meri koncentracijo DNK s pomočjo fluorokroma Hoechst 33258. Ta interkalira med dvoverižno DNK molekulo in po osvetlitvi z 365 nm oddaja svetlobo dolžine 460 nm.

Pred postopkom merjenja koncentracije vzorca smo fluorometer umerili z 2 ml delovne raztopine (10x TNE pufra [0,1M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 7,4)] z 0,1 µg/ml barvila H33258). Na aparaturi smo pritisnili ZERO. V naslednjem koraku smo skupaj z delovno raztopino v kiveto dodali še 2 µl standarda (DNK telečjega timusa (1 mg/ml) premešali in pritisnili gumb CALIB. Vstavili smo vrednost 1000, saj smo

uporabljali standard z 1000 ng/μl koncentracijo, ki smo ga pripravili v 10 x TNE pufru. Pritisnili smo ENTER. Pred vsakim merjenjem koncentracije vzorca smo ponovno odpipetirali 2 ml delovne raztopine in preverili ničlo. Če so se pojavila odstopanja, smo vrednost naravnali na nič. Za merjenje koncentracije vzorca smo odpipetirali 2 μl vzorca, premešali in zmerili koncentracijo v ng/μl.

Preglednica 4: Izmerjene koncentracije DNK s fluorometrom in izračun deleža DNK in vode, da je koncentracija DNK 10 ng/μl

Vzorec	Koncentracija DNK	Volumen DNK	Volumen vode
1. <i>C. maxima</i>	878 ng/μl	1,4 μl	98,60 μl
2. <i>C. pepo</i> 'GL Opal'	1034 ng/μl	0,97 μl	99,03 μl
3. <i>C. pepo</i> 'Slovenska golica'	668 ng/μl	1,50 μl	98,50 μl

Vso DNK smo ustrezno redčili, da smo dobili koncentracijo 10 ng/μl (preglednica 4).

3.7.3 Verižna reakcija s polimerazo

Specifično namnoževanje ITS1 in ITS2 regij jedrne rDNK je poteklo v verižni reakciji s polimerazo (PCR) z začetnima oligonuklotidoma ITS1 in ITS4 (preglednica 5).

Preglednica 5: DNK sekvence parov začetnih oligonukleotidov za posamezen gen in pričakovana dolžina namnoženega fragmenta

Začetni oligonukleotidi	Sekvenca 5'-3'	Pričakovana dolžina fragmenta
ITS1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	19 bp
ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	20 bp

V reakcijsko mešanico, katere končni volumen je bil 50 μ l, smo za en vzorec odpipetirali:

- 5 μ l 10 x koncentriranega reakcijskega PCR pufra [10 mM Tris HCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl pH 8,3], da smo dobili 1 x koncentriran reakcijski PCR pufer,
- 3 μ l 25 mM $MgCl_2$, da je bila končna koncentracija 1,5 mM $MgCl_2$,
- 4 μ l 10 mM dNTP, da je bila končna koncentracija 0,8 mM dNTP,
- 5 μ l 10 μ M začetne oligonukleotide ITS1 (proizvajalec IDT), da je bila končna koncentracija le teh 1 μ M,
- 5 μ l 10 μ M začetne oligonukleotide ITS4 (proizvajalec IDT), da je bila končna koncentracija le teh 1 μ M,
- 0,1 μ l 5U/ μ l Taq DNK polimeraze (proizvajalec Promega), da je bila končna koncentracija 1 U na reakcijo,
- 7 μ l 10ng/ μ l genomske DNK, da je bila končna količina 70 ng,
- destilirano vodo (do volumna 50 μ l).

Vse sestavine razen DNK smo zmešali v 4-kratnem volumnu (za 3 vzorce in kontrolo), centrifugirali ter nato v mikrocentrifugirki zmešali s posameznim vzorcem DNK, premešali ter ponovno centrifugirali. V kontrolni poskus smo namesto DNK dodali vodo. Encime in reakcijsko mešanico smo hranili na ledu.

PCR reakcijo smo izvedli v cikličnem termostatu 2720 Thermal cycler (proizvajalec Applied Biosystems) z naslednjim temperaturnim profilom:

- začetna denaturacija 5 minut pri 94 °C,
- 13 ciklov: 35 sekund pri 93 °C, 55 sekund pri 53 °C, 45 sekund pri 72 °C,
- 13 ciklov: 35 sekund pri 93 °C, 55 sekund pri 53 °C, 59 sekund pri 72 °C,
- 9 ciklov: 35 sekund pri 93 °C, 55 sekund pri 53 °C, 118 sekund pri 72 °C,
- zaključno podaljševanje verige: 10 min pri 72 °C in ohlajanje na 4 °C.

3.7.4 Analiza fragmentov DNK z gelsko elektroforezo

Ločitev namnoženih vzorcev je potekla na 1,4-odstotni gelski horizontalni elektroforezi. Metodo smo uporabili za preverjanje čistosti vzorca in uspešnosti PCR metode.

V steklenico smo zatehtali 0,7 g SeaKem® LE agaroze in dolili 1 x TBE [890 mM Tris, 890 mM H_3BO_3 , 10 mM EDTA]. Zmes smo topili v mikrovalovni pečici. Steklenico smo ohladili na 58 °C in dodali 2,5 μ l etidijevega bromida (10 mg/ml), ki smo ga porazdelili z vrtenjem steklenice. Raztopino smo zlili v model z vstavljenim glavnikom. Ko se je gel strdil, smo glavnike odstranili, položili v elektroforetsko posodo in prelili z 1 x TBE pufrom.

2 μ l namnožene DNK smo zmešali z 3 μ l nanašalnega barvila [12,5 % ficol 400, 0,2 % (w/v) brom fenol modro, 6,7 % (v/v) 10 x TBE] in centrifugirali na 1000 obratov/min. Skupaj z vzorci (vzorec 1 *C. maxima*, vzorec 2 *C. pepo* 'GL Opal', vzorec 3 *C. pepo*

'Slovenska golica') smo na gel nanesti še negativno kontrolo pomnoževanja DNK (vse komponente reakcijske mešanice razen DNK, ki smo jo nadomestili z destilirano vodo) ter velikostni standard (proizvajalec Fermentas) z 14 različno dolgimi fragmenti. Vse skupaj smo izpostavili 100 V električnemu polju.

Gel je vseboval 0,05% etidijev bromid, ki je omogočal detekcijo fragmentov DNK pod UV svetlobo (302 nm). Gele smo fotografirali s polaroidnim fotoaparatom.

3.7.5 Sekvenčna reakcija

Na agarozni elektroforezi smo dobili pozitivne rezultate ITS markerjev. PCR fragment smo očistili s pomočjo ExoSAP-IT kita (proizvajalec USB-Biochemicals) [0,1 µl EXO-SAP encim, 1,4 µl 1x PCR pufer, 0,5 µl fastAP]. V novo tubico smo odpipetirali 5 µl PCR produkta in dodali 2 µl ExoSAP-IT pripravljenega kita. Mešanico smo inkubirali 40 min pri 37 °C. Eksonukleaze razgradijo začetne oligonukleotide, alkalna fosfataza pa razgradi preostale nukleotide. Po reakciji smo produkt inkubirali še 15 min pri 80 °C za inaktivacijo ExoSAP-IT kita.

Sekvenčna reakcija določanja nukleotidnega zaporedja, ki smo jo uporabili, je bila zasnovana na osnovi BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kits (proizvajalec Applied Biosystems) in enega začetnega oligonukleotida (ITS1 ali ITS4). Polovico (3,5 µl) PCR produkta smo namnoževali z ITS1 začetnim oligonukleotidom, drugo polovico z ITS4 začetnim oligonukleotidom.

Pripravljeno sekvenčno reakcijo smo termostatirali v PCR napravi:

- začetna denaturacija 96 °C, 3 minute,
- 99 ciklov: 10 sekund pri 96 °C, 10 sekund pri 55 °C in 4 minute pri 60 °C,
- končno inkubiranje: 7 min pri 72 °C in ohlajanje na 12 °C.

Sekvenčno reakcijo smo očistili s precipitacijo (dodajanjem) 2,5 µL 125 mM EDTA (pH 8,0) in 30 µl absolutnega etanola. S čiščenjem odstranimo nevgrajene fluorescentne terminatorje, ki lahko povzročijo težave pri določitvi pravilnega zaporedja. Po kratkem centrifugiranju smo reakcijo odpipetirali v 96-mestno ploščo, jo prekrili s folijo in 5-10x obrnili. Ploščo smo inkubirali 15 min na sobni temperaturi in zaščiteno pred svetlobo. Sledila je 55-minutna centrifugacija plošče pri najvišji hitrosti in temperaturi 4 °C. Etanol smo odlili s hitrimi gibi in ponovno centrifugirali – tokrat obrnjeno navzdol. Ploščo smo ponovno inkubirali 5 min na sobni temperaturi in zaščiteno pred sončno svetlobo. DNK v plošči smo raztopili v 12 µl formamida in prilepili s folijo.

Vzorci so tako bili pripravljeni na določanje nukleotidnega zaporedja, ki je bilo izvedeno na napravi ABI 3130xl (proizvajalec Applied Biosystems), ki se nahaja na Oddelku za zoologijo, Biotehniške fakultete, na Rodici pri Domžalah.

3.7.6 Obdelava sekvenc

Sekvence smo obdelali v programu Codon Code Aligner. Vsaka sekvenca ITS1-5,8rRNA-ITS2 je bila sekvencirana z leve in desne strani (glede na uporabljen ITS1 ali ITS4 začetni oligonukleotid). Dva ujemajoča se para smo združili in primerjali. Ročno smo izbrisali konce sekvenciranih delov. Na mestih znotraj sekvenc, kjer so se pojavljala mesta z neznanimi ali napačno določenimi sekvencami, smo te ročno popravili glede na izrisano sliko. Sledila je primerjava sekvenc v BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) orodju, ki je prosto dostopen na spletu (BLAST, 2011). Na osnovni strani smo izbrali možnost »Nucleotide blast« ter v nadaljevanju možnost »Nucleotide collection« (pri določitvi »database«). Vnesene sekvence je program BLAST avtomatsko primerjal s sekvencami v bazi. Določili smo vrsto rastlinskega materiala in odstotek ujemanja.

4 REZULTATI

V letu 2010 in 2011 smo izvedli križanja znotraj vrste *C. pepo* in medvrstno križanje med *C. pepo* in *C. maxima*. Veliko plodov je po opraitvi propadlo. Preostale smo prenesli v laboratorij ter iz semen izolirali embrije. Te smo preučevali z metodo *in vitro* reševanja embrijev.

4.1 UPORABLJEN RASTLINSKI MATERIAL

Pri diplomski nalogi smo uporabili dve sorti vrste *C. pepo* – 'GL Opal' in 'Slovenska golica' ter vrsto *C. maxima*.

Izvedli smo:

- križanje znotraj vrste *C. pepo* 'GL Opal' x *C. pepo* 'Slovenska golica',
- medvrstno križanje *C. pepo* 'GL Opal' x *C. maxima* in *C. maxima* x *C. pepo* 'GL Opal',
- križanje pridobljenih regenerant iz predhodnih križanj (*C. maxima* x *C. pepo* 'GL Opal') x (*C. maxima* x *C. pepo* 'GL Opal').

4.2 CVETENJE IN RAZVOJ PLODOV

Zasadili smo 3 serije buč - v mesecu avgustu, decembru in februarju. Vse serije so bile posajene v zavarovan prostor. Opraševanje je potekalo približno 1,5 - 2 meseca po zasaditvi rastlin, ko so se začeli pojavljati moški in ženski cvetovi.

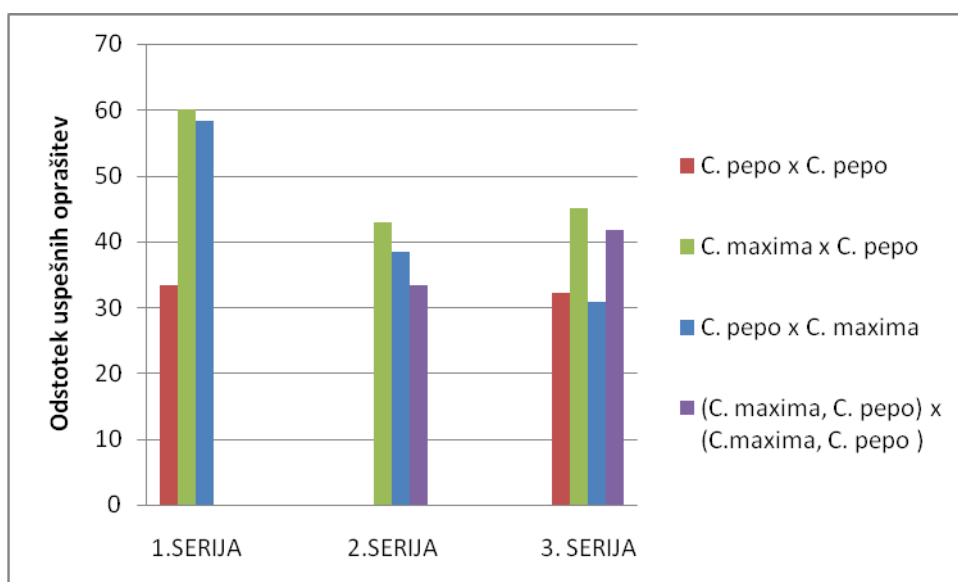
Oprašitev smo opravili ob približno 9:00 uri.

Plodovi na rastlini *C. pepo* 'GL Opal' so dosegli maksimalno velikost 20. dan po opraitvi, plodovi na rastlini *C. maxima* pa vsaj 10 dni kasneje. Največje plodove smo dobili v tretji seriji, vendar so bili primerljivi s prvo serijo. Plodovi v obeh serijah so vsebovali približno 230 semen. Mnogo manjše plodove smo dobili v drugi seriji, v kateri so plodovi vsebovali le do 30 razvitih semen.

Praktično smo dokazali, da oprašitev ženskega cveta en dan pred odprtjem ni mogoča. Od 31 cvetov je bila oprašitev uspešna pri enem. Razviti plod je kazal anomalije v obliki in kasneje propadel. Teh plodov nismo vključili v število uspešnih oprašitev.

Preglednica 6: Število uspešnih oprasitev vseh analiziranih križanj (OPR – izvedena oprasitev, PLOD – nastanek plodu) v prvi, drugi in tretji seriji

	<i>C. pepo</i> 'GL Opal' x <i>C. pepo</i> 'Slovenska golica',			<i>C. maxima</i> x <i>C. pepo</i> 'GL Opal'			<i>C. pepo</i> 'GL Opal' x <i>C. maxima</i>			<i>C. maxima</i> x <i>C. pepo</i> 'GL Opal') X (<i>C. maxima</i> x <i>C. pepo</i> 'GL Opal').		
	OPR.	PLOD	%	OPR	PLOD	%	OPR.	PLOD	%	OPR.	PLOD	%
1. SERIJA	12	4	33%	10	6	60%	12	7	58%	//	//	//
2. SERIJA	//	//	//	7	3	43%	13	5	38%	18	6	33%
3. SERIJA	28	9	32%	20	9	45%	13	4	31%	12	5	42%



Slika 14: Delež uspešnih oprasitev vseh analiziranih križanj v prvi, drugi in tretji seriji



Slika 15: Izenačenost plodov – ženska komponenta *C. pepo* 'GL Opal' (plodovi 30, 25, 21 in 19 dni po oprašitvi)



Slika 16: Neizenačenost plodov – ženska komponenta *C. maxima*. Plodovi na desni so najstarejši, na levi najmlajši.



Slika 17: Neizenačeni in majhni plodovi v drugi seriji – v prvi vrsti je ženska komponenta *C. maxima*, v drugi vrsti je ženska komponenta (*C. maxima* x *C. pepo* 'GL Opal')

4.3 IN VITRO REŠEVANJE EMBRIJEV

4.3.1 Izolacija embrijev

Embrije smo primerjali glede na velikost na določen dan po opraitvi. Najkrajši čas po opraitvi, ko je bil embrij viden s prostim oesom, je bil 22. dni tako v primeru, ko je bila ženska komponenta *C. maxima* kot tudi tedaj, ko je bila ženska komponenta *C. pepo*. Embriji v primeru, ko smo izvajali medvrstna križanja, niso bili manjši kot pri križanjih znotraj vrste *C. pepo*.

Preglednica 7: Velikost embrijev glede na čas od opraitve

Čas od opraitve	22 dni	24 dni	26 dni	28 dni	30 dni	32 dni
Velikost embrija	1 mm	3 mm ± 1 mm	5 mm ± 1,5 mm	0,9 cm ± 1,5 mm	1,1 cm ± 1,5 mm	Embrij velik kot seme (1,5 cm ± 1,5 mm)

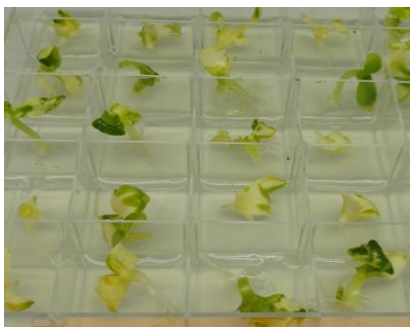
* Izračunana je povprečna velikost embrijev na določen čas od opraitve v vseh serijah.

Zaradi manjšega števila semen je bilo embrijev v drugi seriji manj, vendar se po velikosti niso razlikovali v primerjavi s prvo in tretjo serijo. Opazili pa smo, da so bili embriji, ki so nastali pri križanju pridobljenih regenerant - (*C. maxima* x *C. pepo* 'GL Opal') X (*C. maxima* x *C. pepo* 'GL Opal'), manjši.

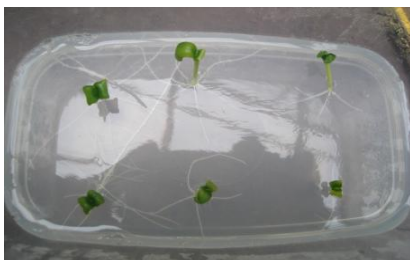
4.3.2 Rast embrijev in aklimatizacija

Po izolaciji embrijev smo jih prenesli na dva različna gojišča (MS in E20A). MS gojišče se je od gojišča E20A razlikovalo v stopnji iniciacije embrijev in v stopnji prestavljanja. Gojišče E20A je bilo v obeh stopnjah enako.

Embriji so začeli rasti takoj zatem, ko smo jih položili na gojišče. Klični listi so pričeli zeleneti, tvorile so se koreninice. 14 dni po izolaciji so bili embriji, pri katerih je od opraitvanja do izolacije poteklo približno 28 dni, tako veliki, da smo jih dali na gojišče za prestavljanje. Manjši embriji so se razvijali počasneje.



Slika 18: Rast embrijev v petrijevki s 25 prostorčki 7 dni po izolaciji



Slika 19: Rast embrijev v posodici s filtrom 14 dni po izolaciji



Slika 20: Rast embrijev v posodici s filtrom 21. dan po izolaciji



Slika 21: Uspešno aklimatizirane rastlinice buč

4.3.3 Uspešnost *in vitro* reševanja embrijev

Preglednica 8: Uspešnost *in vitro* reševanja embrijev v prvi seriji ob različnem času po opraitvi

	Število izoliranih embrijev		Število propadlih embrijev zaradi okužb		Uspešno aklimatizirane rastline		Odstotek regeneracije	
	MS	E20A	MS	E20A	MS	E20A	MS	E20A
<i>C. pepo</i> 'GL Opal' x <i>C. pepo</i> 'Slovenska golica'								
30 dni	25	25			7	9	28%	36%
26 dni	25	25			8	7	32%	28%
22 dni	25	25	25*	25*	0	0	0%	0%
19 dni	0	0					0%	0%
<i>C. maxima</i> x <i>C. pepo</i> 'GL Opal'								
30 dni	25	25	25*	25*	0	0	0%	0%
26 dni	25	25			4	3	16%	12%
22 dni	25	25			0	0	0%	0%
<i>C. pepo</i> 'GL Opal' x <i>C. maxima</i>								
30 dni	25	25	2		5	5	20%	20%
26 dni	25	25	1	3	6	4	24%	16%
22 dni	25	25			2	1	8%	4%

* Plod buče je imel notranjo okužbo. Le ta se je prenesla na izolirane embrije. Vsi izolirani embriji so bili okuženi. V tej seriji ni potekalo križanje med (*C. maxima* x *C. pepo* 'GL Opal') X (*C. maxima* x *C. pepo* 'GL Opal'), saj še nismo imeli pridobljenih regenerant.

Preglednica 9: Uspešnost *in vitro* reševanja embrijev v drugi seriji ob različnem času po opraitvi

	Število izoliranih embrijev	Število propadlih embrijev zaradi okužb	Uspešno aklimatizirane rastline	Odstotek regeneracije
	MS	MS	MS	
<i>C. maxima</i> x <i>C. pepo</i> 'GL Opal'				
35 dni	18	1	12	67%
28 dni	30	2	5	17%
22 dni	4		1	25%
<i>C. pepo</i> 'GL Opal' x <i>C. maxima</i>				
37 dni	35	5	4	11%
34 dni	23		2	9%
30 dni	10		4	40%
(<i>C. maxima</i> x <i>C. pepo</i> 'GL Opal') X (<i>C. maxima</i> x <i>C. pepo</i> 'GL Opal')				
37 dni	18	6	3	17%
35 dni	25		4	16%
30 dni	24	4	7	29%
26 dni	13		2	15%
25 dni	11		1	9%
24 dni	3		1	33%

V tej seriji nismo uporabili gojišča E20A in nismo križali znotraj vrste *C. pepo*

Preglednica 10: Uspešnost *in vitro* reševanja embrijev v tretji seriji ob različnem času po opraitvi

	Število izoliranih embrijev	Število propadlih embrijev zaradi okužb	Uspešno aklimatizirane rastline	Odstotek regeneracije
	MS	MS	MS	MS
<i>C. pepo</i> 'GL Opal' x <i>C. pepo</i> 'Slovenska golica'				
29 dni	50	15*	9	18%
28 dni	100	22*	42	42%
27 dni	100	28*	30	30%
26 dni	50	23*	28	56%
24 dni	25	7*	7	28%
<i>C. maxima</i> x <i>C. pepo</i> 'GL Opal'				
31 dni	25	1	12	48%
30 dni	25		15	60%
29 dni	50	2	19	38%
27 dni	25		9	36%
26 dni	25	1	8	32%
<i>C. pepo</i> 'GL Opal' x <i>C. maxima</i>				
30 dni	50	4	11	22%
26 dni	50	2	10	20%
24 dni	50		11	22%
(<i>C. maxima</i> x <i>C. pepo</i> 'GL Opalv') X (<i>C. maxima</i> x <i>C. pepo</i> 'GL Opal')				
33 dni	25	6	8	32%
28 dni	25	3	10	40%
27 dni	25	1	3	12%
23 dni	0	0	0	0%

* Veliko število okužb pri križanju znotraj vrste pripisujemo nepravilnemu delovanju laminarija ali avtoklava (okuženo gojišče).

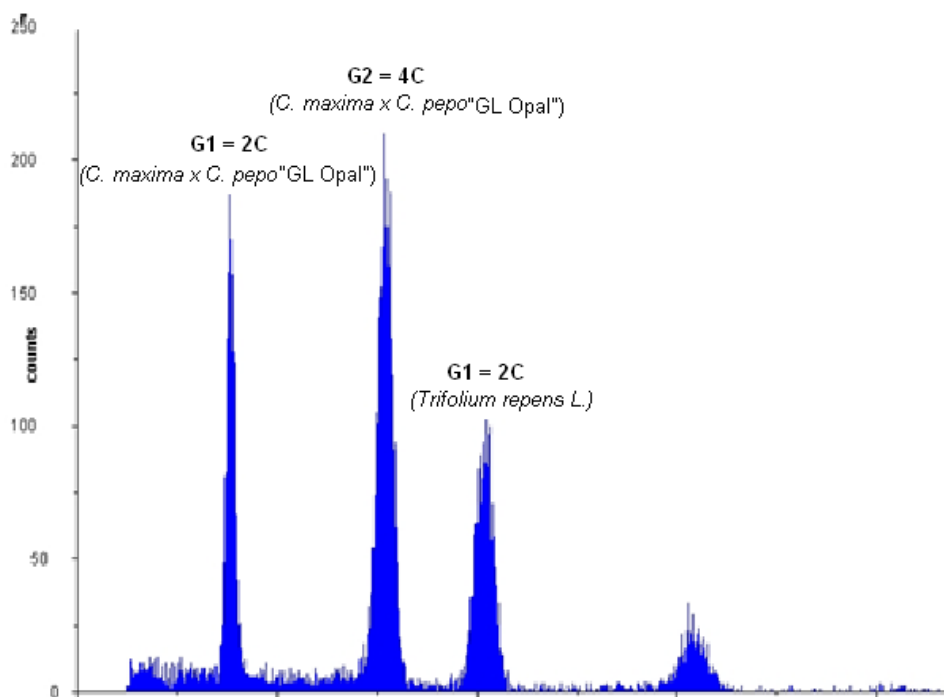
4.4 PRETOČNA CITOMETRIJA

S pomočjo pretočne citometrije smo analizirali velikost genoma starševskih komponent *C. pepo* in *C. maxima* ter medvrstnih križancev. S rezultati smo želeli potrditi, da so križanci res medvrstni.

Preglednica 11: Velikost genoma starševskih komponent in pridobljenih križancev

	Velikost genoma (pg/2C)
<i>C. pepo</i> 'GL Opal'	0,777
<i>C. maxima</i>	0,778
<i>C. pepo</i> 'GL Opal' x <i>C. pepo</i> 'Slovenska golica'	0,776
<i>C. pepo</i> 'GL Opal' x <i>C. maxima</i>	0,778
<i>C. maxima</i> x <i>C. pepo</i> 'GL Opal'	0,779
(<i>C. maxima</i> x <i>C. pepo</i> 'GL Opal') x (<i>C. maxima</i> x <i>C. pepo</i> 'GL Opal')	0,776

Rezultati meritev so podani v preglednici 11. Pri posameznem vzorcu je bilo analiziranih 10000 jeder vzorca in standarda.

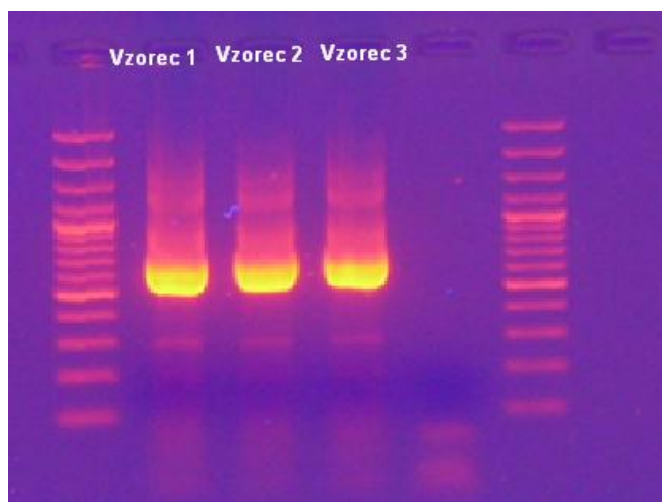


Slika 22: Histogram vsebnosti jedrne DNK medvrstnega križanca med *C. maxima* in *C. pepo* 'GL Opal' ter standardna bele detelje *Trifolium repens* L..

Na sliki 22 je prikazan histogram pretočne citometrije križanca med *C. maxima* in *C. pepo* 'GL Opal' ter standarda bele detelje *Trifolium repens* L.. Prvi vrh predstavlja G1 fazo z 2C vrednostjo, drugi je G2 faza celičnega cikla buče. Tretji vrh je G1 faza standarda. Za izračun velikosti genoma smo uporabili prvi in tretji vrh, torej G1 fazo standarda in vzorca.

4.5 SEKVENČNA ANALIZA ITS REGIJ

Po izolaciji DNK z listov buč ter namnožitvi s PCR metodo smo DNK ločili na 1,4-odstotni gelski elektroforezi (slika 23). Vzorce smo primerjali s komercialnim dolžinskim markerjem – DNK fragmenti znanih dolžin. Vzorec 1 predstavlja vzorec DNK, izolirane iz *C. maxima*, vzorec 2 *C. pepo* 'GL Opal' ter vzorec 3 *C. pepo* 'Slovenska golica'. Ločitev prikazuje, da smo s PCR metodo uspešno namnožili DNK vseh vzorcev. Negativna kontrola pomnoževanja DNK oziroma ti. slepi vzorec je bil sestavljen iz reakcijske mešanice brez DNK, ki smo jo nadomestili s sterilno destilirano vodo.



Slika 23: Ločitev DNK na gelski elektroforezi (Vzorec 1: *C. maxima*, Vzorec 2: *C. pepo* 'GL Opal', Vzorec 3: *C. pepo* 'Slovenska golica', negativna kontrola pomnoževanja DNK ter dolžinski marker)

Namnožen PCR produkt smo sekvencirali z ABI3130xl napravo. Podatke smo prenesli v program Codon Code Aligner in ročno popravili. Dobili smo sekvence (za vse tri vzorce popolnoma enake):

```
AAACGACCCGTGAACGTGTTTTCAAACCTTTTTGTGTCGGGGGGAGCATTCGTGCCCCCTTTGATGCCTAAACC  
AAAACCGGCGCAAGTCGCGCCAAGGATCTCAAACGAATAAGCTTGCCCCCTTGCCCCGGTCTCGGTGTGCGGGG  
GGCAAAGCATTCTTGTCGTATTATTACAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGA  
ACGTAGCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGGATCCCGCGAACCACCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCG  
CCCGGAGCCTTCTGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCTGCCCCACATACAACACCCACTT  
AGGTTTGTTGCATTGGCGGGGGCACATGTTGGCCTCCCGTGCGCACCGTCGCCAGGGATGGCTTAAAATTGAG  
TCCTCGGCATCTGTTGTCGTGACACTACGGTGGTTGATTCAACCTCGGTACCGTGTCTCGATCTCAGCTTGCG  
TGCTCCTCTTTGTGAG
```

Sekvence smo z obstoječimi podatki primerjali v orodju BLAST (2011).

Pri vseh treh vzorcih smo določili največje, t.j. 98-odstotno, ujemanje z vzorcem *C. pepo* (GenBank številka AJ488214.1) ITS1 - 5.8S rRNA gen - ITS2. Ujemanje z ITS1 - 5.8S rRNA gen - ITS2 vrste *C. maxima* je bilo 94 %. Večje ujemanje od 94 % smo zabeležili pri vzorcih *Cucurbita ficifolia* (GenBank številka AM981170.1), *Cucurbita moschata* (GenBank številka FJ915108.3), *Langenaria siceraria* (GenBank številka FJ951142.1) in *Cucurbita lundelliana* (GenBank številka AM981172.1), katerih nismo uporabili v eksperimentu.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Križanja znotraj vrste in medvrstna križanja se pri bučah pogosto uporabljajo. Žlahtnitelji vnašajo genetske vire iz ene rastline v drugo, rezultate pa želijo videti čim hitreje. Kot zelo uporabna metoda pri bučah se je že pred pol stoletja izkazala metoda *in vitro* reševanja embrijev (Wall, 1954). Prav tako je večina medvrstnih križancev rodu *Cucurbita* v novejši literaturi pridobljena s to metodo (Šiško in sod, 2003; Rakoczy-Trojanowska in Malepszy, 1986, 1989).

Z metodo *in vitro* reševanja embrijev lahko skrajšamo generacijski čas, saj ne potrebujemo čakati na zrelost plodov in posledično zrelost semen. Če želimo še več generacij na leto, lahko vključimo še gojenje buč v mrzli polovici leta v zavarovanem prostoru.

Večino vrst buč v našem klimatskem pasu običajno gojimo v nezavarovanem prostoru (na prostem), ko to dovoljujejo temperature. Temu so prilagojeni tudi žlahtniteljski cilji.

5.1 PRIMERJAVA UPORABLJENEGA RASTLINSKEGA MATERIALA

5.1.1 *C. pepo* 'GL Opal' (Semenarna Agrosaat, F1 generacija)

'GL Opal' je genotip *C. pepo* z doseženimi najboljšimi rezultati. Cvetovi so se tvorili na koncu poganjkov (vrež), ki so bili razvejani in močni. Razvoj sorte je bil najhitrejši. Stabilnost fenotipa se je pokazala v dobri vegetativni rasti in cvetenju ter kasneje v razvoju enakomernih plodov. Le-ti so bili na začetku svetlo in temno zeleni, z zorenjem so se pojavile rumene proge.

5.1.2 *C. pepo* 'Slovenska golica' (Semenarna Ljubljana)

'Slovenska golica' je v Sloveniji najbolj razširjena sorta iz vrste *C. pepo*, vendar v našem eksperimentu ni pokazala dobrih lastnosti. Rastline so razvile vreže. Moški cvetovi so bili pogosti in mlahavi, ženski so se začeli pojavljati zelo pozno in so bili manjši kot pri ostalih bučah. 'Slovenska golica' je bila zelo dovzetna za gnitje, morda je bil vzrok lociranost zasaditvenih loncev na tleh (v prvi seriji). Zaradi odsotnosti ženskih cvetov, gnitja ter slabih vrež smo v drugi seriji zasadili le nekaj rastlin, v tretji pa smo ponovno poskusili z obsežnejšim gojenjem. Cvetovi in vegetativna rast so bili takrat lepši. Pokazalo se je, da sorta najdlje ohranja vegetativno rast. Mesec dni po tem, ko so rastline genotipa 'GL Opal' in vrste *C. maxima* že propadli, so bile rastline 'Slovenske golice' še vedno močno vegetativno razraščene, prav tako so se pojavljali moški in ženski cvetovi.

5.1.3 *C. maxima* 'Noč čarovnic' (Semenarna Ljubljana, F1 generacija)

Rastline te sorte so imele grmičasto rast in rast z vrežami. Prav tako se je nestabilnost tega hibrida kazala s podolgovatimi in neenakomerno velikimi plodovi, kar ni značilen fenotip te sorte. Rast plodov je bila počasnejša v primerjavi s *C. pepo* 'GL Opal'. Ženski cvetovi so bili veliki z ogromnimi brazdami pestiča, za razliko od moških, ki so razvili najmanjši in najšibkejši moški cvet ter prašnik v primerjavi z ostalimi sortami. Plodovi so bili najprej zeleni, nato pa oranžni.

5.1.4 Medvrstni križanec – *C. pepo* 'GL Opal' x *C. maxima* in *C. maxima* x *C. pepo* 'GL Opal'

Medvrstni križanci so kazali neenakomerno rast, slabo vegetativno rast, cvetovi – tako ženski kot moški – so se pojavljali sorazmerno pogosto, vendar so bili manjši od ostalih. Rastlina je bila bolj dovzetna za napad rastlinjakovega škitkarja kot sadike ostalih sort. Mnogo rastlin medvrstnih križancev se je med rastjo posušilo brez razloga. Plodovi so bili majhni in neizenačeni v rasti. Medvrstni križanci niso bili sterilni, kot navajajo nekateri viri (Rakoczy-Trojanowska in Malepszy, 1986; Robinson in Decker-Walters, 1997).

5.2 ANALIZA CVETENJA IN RAZVOJA PLODOV

Cvetenje buč je potekalo dopoldne do 11:00 ure, kot poročajo tudi Nepi in Pacini (1993) ter Ivančič (2002), nato so cvetovi začeli veneti in postajati rjavi. Ženski cvetovi so nastajali na koncih vrež, moški cvetovi so se tvorili na sredini od rastišča buče do konca vreže. Plodovi so zavirali nastanek ženskih cvetov. Sklepali smo, da bo razvoj enega ploda in s tem embrija manjši, če bo na rastlini preveč plodov, zato smo pustili največ tri razvijajoče se plodove na rastlino.

Vrsta *C. pepo* je maksimalno velikost plodu dosegla 20. dan po opraitvi, *C. maxima* pa vsaj 10 dni kasneje. Nepi in Pacini (2001) poročata o nastanku maksimalne velikosti plodu že 16. dan po opraitvi. Velikost plodov pri medvrstnem križanju *C. pepo* 'GL Opal' x *C. maxima* ni bila manjša kot pri križanju znotraj vrste *C. pepo* 'GL Opal' x *C. pepo* 'Slovenska golica'.

Število uspešnih opraitev je prikazano v preglednici 5 in na sliki 14.

Iz izračuna uspešnih opraitev lahko ugotovimo, da se je največ plodov v vseh serijah razvilo pri križanju med *C. maxima* s *C. pepo* 'GL Opal' (60 % v prvi seriji in 43 % in 45 % v drugi in tretji seriji). Tega nismo pričakovali, saj gre za medvrstno križanje. Prav tako nam je predvsem v prvi seriji uspelo dobiti velik odstotek križancev med *C. pepo* 'GL Opal', in *C. maxima* (58 %). Križanje znotraj vrste smo izvedli v prvi in tretji seriji, vendar

rezultati niso bili v okviru pričakovanj. V obeh serijah je bil odstotek uspešnih oprasitev nekoliko nad 30 %, kar je najmanj od vseh analiziranih križanj. Prav tako je bilo uspešno medvrstno križanje med pridobljenimi regenerantami, ki smo ga izvedli v drugi in tretji seriji – 33 % in 42 %.

Uspešnost oprasitev je v vseh primerih med 30 % in 60 %, kot najboljša pa se je izkazala prva serija.

Čeprav Nepi in Paccini (2001) navajata, da je oprasitev mogoča dan pred odprtjem cvetov, nam tega ni uspelo izvesti. Od 31 plodov, ki bi se morali razviti iz cvetov, oprasenih en dan pred odprtjem, jih je 30 propadlo, en od plodov pa je kazal anomalije v obliki (slika 24), pozneje pa je tudi ta propadel. Teh cvetov nismo vključili v analizo odstotka uspešnih oprasitev (preglednica 6).



Slika 24: Nenormalno razvit plod, pridobljen iz cveta, oprasenega en dan pred odprtjem

5.2.1 Vpliv zavarovanega prostora in letnega časa na vegetativno rast, cvetenje ter razvoj plodov

Vse rastline buč, ki smo jih uporabili za križanje, so bile posajene v rastlinjak. V poletnih mesecih je bil ta hlajen, v zimskih pa ogrevan. V drugi seriji je bila z umetnim osvetljevanjem nadzorovana tudi dolžina dneva.

Letni čas je močno vplival na vegetativno rast rastlin, cvetenje ter razvoj plodov.

Prva serija je bila posajena v jesenskem času. Namen posaditve te serije je bil proučiti najboljše sorte *C. pepo* in *C. maxima*. Prav tako smo pri tej seriji pridobili znanje tehnike križanja. Cvetovi so se pojavljali relativno pogosto. Veliko težavo je v jesenskem času predstavljala vlaga, ki je omogočala optimalen razvoj plesnim, glivam, bakterijskim

okužbam. V normalnih razmerah so se venčni listi s pestičem po opraitvi posušili in odpadli. Če je bila vlaga v rastlinjaku previsoka, sta se na posušeni venčnih listih pojavili plesen in gniloba, ki sta se prenesli na že razviti plod (slika 25). Le-ta je odpadel. V tej seriji je bil najvišji odstotek uspešnih opraitev.



Slika 25: Zaradi visoke vlage sta se na odmrlih venčnih listih pojavili plesen in gniloba

Namen druge serije je bil preveriti uspešnost gojenja in razmnoževanja buč v ogrevanem in dodatno osvetljenem rastlinjaku v zimskem času. Z gojenjem v zavarovanem prostoru bi lahko na leto vzgajali več generacij buč. V skladu s pričakovanji se je ob izvajanju tega poskusa pojavilo precej težav. Rastline so v primerjavi z drugimi serijami kazale nepravilnosti v vegetativni rasti, cvetenju in razvoju plodov. Cvetovi so se pojavljali na začetku vrež in na šibkih stranskih vrežah, ki so izraščale iz glavne vreže. Ti cvetovi so bili manjši od običajnih, prav tako so imeli mnogo napak v sami zgradbi cveta (venčni listi, brazda, plodnica, pestič). Opraitev med analiziranimi sortami je potekla, vendar smo po prerezu plodov videli, da je število normalno razvitih semen na plod mnogo manjše (v povprečju 25 semen na plod) v primerjavi s prvo in tretjo serijo (v povprečju 230 semen na plod). Sklepali smo, da je bilo opraitenih le nekaj semenskih zasnov. Plodovi so bili vsaj 3-krat manjši kot pri ostalih serijah. Razviti plodovi so po premeru merili cca. 8 cm, v poletnih mesecih pa v povprečju 25 cm. Sklepali smo, da je za rast plodov odločilnega pomena svetloba. Čeprav smo dolžino dneva podaljšali z umetnim osvetljevanjem, svetloba ni bila primerna, da bi omogočala normalen razvoj cvetov, plodov in semen. Prav tako je eden izmed možnih vzrokov tudi padec temperature pod 10° C, ki je nastopil zaradi okvar grelnega sistema, kar je vodilo v fiziološke motnje pri rastlini. Težavo nastanka deformiranih in manjših plodov zaradi padca temperature navajajo tudi Zitter in sod. (1998). V drugi seriji so se pojavljale številčne populacije rastlinjakovega ščitkarja.

Najboljše rezultate vegetativne rasti in števila cvetov je kazala tretja serija. Cvetovi – tako ženski kot moški – so se pojavljali vsak dan. Vreže, ki so jih tvorile buče, so bile močne, listi veliki. Plodovi *C. pepo* ('GL Opal' in 'Slovenska golica') so bili veliki in izenačeni (slika 15), pri plodovih *C. maxima* pa so se pojavljale razlike v fenotipu (okrogli plodovi, podolgovati plodovi). Neizenačenost plodov *C. maxima* se je pojavljala v vseh serijah

(slika 16). Prav tako kot v prvi seriji je imel genotip 'GL Opal' hitrejši razvoj kot genotip 'Slovenska golica'.

5.3 IN VITRO REŠEVANJE EMBRIJEV

5.3.1 Izolacija embrijev

Po uspešni oprasitvi vsako seme vsebuje embrij. Pri medvrstnih križancih je razvoj embrija pogojen z medvrstno inkompatibilnostjo. Pri tem eksperimentu so semena medvrstnih križancev in križancev znotraj vrste razvile embrije.

Semena genotipov *C. pepo*, ki smo jih uporabili, nimajo lignificirane lupine – semena so »gola«, od tod ime golica. Pri *C. pepo* so bila semena 25. dan po oprasitvi nekoliko zelena, z zorenjem plodov je intenzivnost zelene barve semen naraščala. Zeleno obarvanje nastane zaradi protoklorofila (prekurzor klorofila) v klorenehimskem sloju (Lelley in sod., 2009). Semena *C. maxima* so bila bela, z zorenjem plodov pa je semenska lupina zaradi vedno večje vsebnosti lignina postajala trša, kar je močno oteževalo izolacijo embrijev. Zanimivo bi bilo vpeljati tretiranje semen s snovjo, ki bi razgradila lignin, kljub temu pa ne bi poškodovala embrija.

Metoda razkuževanja ploda z etanolom in ognjem (flambiranjem) se je izkazala za uspešno. Delež okužb je bil zanemarljiv, razen pri dveh bučah v prvi seriji in v tretji seriji pri embrijih izoliranih iz *C. pepo* 'GL Opal' x *C. pepo* 'Slovenska golica'. Vzrok v prvi seriji je bila notranja okužba (gnitje) dveh plodov buče, ki smo jo opazili šele po izolaciji embrijev. V tretji seriji je bil verjeten vzrok okuženost gojišča ali nepravilno delovanje laminarija. Dodatno razkuževanje semen in embrijev v ostalih primernih ni bilo potrebno. Sklepamo, da je plod v notranjosti steril. Prav tako je bila uspešna izolacija embrijev z uporabo pincete, igle in skalpela.

Embriji so bili s prostim očesom vidni 22. dan po oprasitvi tako v semenih, kjer je bila ženska komponenta *C. maxima* kot tudi *C. pepo*. Veliki so bili 1 milimeter. Kwack, Fujieda (1987) sta embrije pod mikroskopom videla 21. dan po oprasitvi. Več dni po oprasitvi so embriji začeli pospešeno rasti. 26. dan po oprasitvi so merili že pol centimetra, 30. dan že več kot centimeter, 32. dan po oprasitvi so bili embriji veliki kot seme buče (1,5 cm). Velikost embrijev se med različnimi serijami ni razlikovala toliko, da bi bila potreba dodatna analiza, prav tako ni bilo razlik v primerjavi z medvrstnim križanjem ali križanjem znotraj vrste. Kot pa sem omenila, je bilo normalno razvitih semen v drugi seriji približno 9 x manj, posledično pa tudi število embrijev.

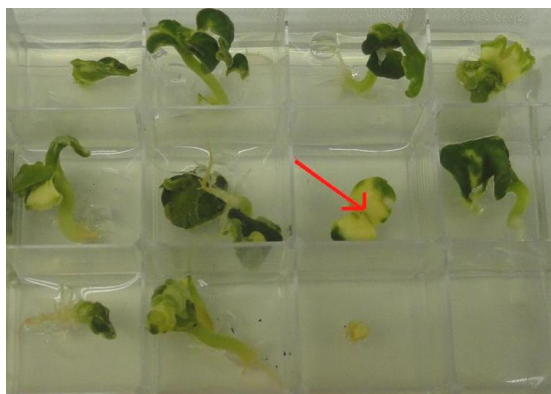
Razlika v velikosti embrijev se je pojavila v plodovih, ki so nastali pri križanju (*C. maxima* x *C. pepo* 'GL Opal') x (*C. maxima* x *C. pepo* 'GL Opal'). Zamik velikosti je bil približno 5

dni. Torej, če je embrij, katerega ženska komponenta je bila *C. pepo* ali *C. maxima*, meril 26. dan po opraitvi 0,5 cm, je embrij, pri katerem je bila ženska komponenta (*C. maxima* x *C. pepo* 'GL Opal'), meril toliko šele 31. dan po opraitvi.

5.3.2 Rast embrijev in aklimatizacija

Takoj, ko smo embrije dali na gojišče, so začeli zeleneti. Čeprav nekateri viri (Šiško in sod, 2003) poročajo o temni rastni komori v začetku regeneracije embrijev, smo jih mi takoj prenesli na 22 - 23 °C in fotoperiodo dan:noč = 16ur:8ur. 14 dni po *in vitro* izolaciji embrijev so ti že razvili stebelce in prve koreninice. Klična lista sta postopno ozelenela in začela kazati znake fotosinteze. Manjši embriji (mlajši kot 28 dni od opraitvanja) so za enako razvitost potrebovali nekaj dni več. V primeru poškodbe embrija med izolacijo se je na mestu ranitve začel tvoriti kalus ter rjavo obarvanje tkiva.

V vseh serijah so se na listih mladih rastlinic pojavljala albino območja (slika 26). Obarvanost ni bila odvisna od gojišča (MS ali E20A), niti od genetskega ozadja embrija. Rakoczy-Trojanowska in Malepszy (1989) poročata o albino območjih kotiledonov pri potomcih med *C. pepo* in *C. maxima*.



Slika 26: Albino območja na rastlinicah buč

5.3.2.1 Vpliv gojišča

Uporabili smo dve različici hranljivih gojišč za tkivne kulture – MS gojišče in E20A gojišče. Oba se nekoliko razlikujeta v sestavi (preglednici 2 in 3). Gojišče MS je bilo slabše v prvih fazah razvoja embrijev. Le-ti so prej ozeleneli na E20A gojišču. V poznejših stopnjah se je rast izenačila oz. so embriji na MS gojišču prehiteli velikost embrijev na E20A gojišču. Po izračunih je bil na koncu odstotek aklimatiziranih križancev buč, ki so rasle na MS gojišču, večji kot na E20A gojišču. Zaradi dobrih rezultatov MS gojišča smo v drugi in tretji seriji uporabljali le še tega.

5.3.2.2 Analiza uspešnosti *in vitro* reševanja embrijev

Iz tabel o uspešnosti *in vitro* reševanja embrijev ne moremo podati jasnega zaključka, koliko časa mora preteči od oprasitve do izolacije embrijev, da bo odstotek aklimatizacije najvišji.

V prvi seriji (preglednica 7) vidimo, da semena stara 19 dni še niso imela embrijev. Najvišji odstotek aklimatiziranih embrijev smo dosegli pri 30 dni starih embrijih *C. pepo* 'GL Opal' x *C. pepo* 'Slovenska golica' in sicer 36%. V tej seriji je bila okužba prisotna na vseh embrijih *C. pepo* 'GL Opal' x *C. pepo* 'Slovenska golica' starih 22 dni in vseh embrijih *C. maxima* x *C. pepo* 'GL Opal' starih 30 dni. Oba plodova, iz katerih smo izolirali te embrije, sta imela notranjo gnitje, kar se je preneslo tudi na embrije. Serija je kazala sorazmernost med starostjo embrija in uspešnostjo aklimatizacije – starejši embriji so se v primerjavi z mlajšimi uspešneje aklimatizirali v rastlinice.

V drugi seriji je bil prav tako najvišji odstotek (67 %) uspešno aklimatiziranih rastlin pri križanju *C. pepo* 'GL Opal' in *C. pepo* 'Slovenska golica'. V tej seriji smo izolirali starejše embrije, saj so bili plodovi občutno manjši. Serija ni kazala sorazmernosti med starostjo embrija in uspešnostjo aklimatizacije.

V tretji seriji je bil najvišji odstotek uspešno aklimatiziranih rastlin pri *C. maxima* x *C. pepo* 'GL Opal' 60 %, in sicer pri 30 dni starih embrijih. Nekoliko nižja, 56-odstotna uspešnost, nam je uspela pri križanju *C. pepo* 'GL Opal' in *C. pepo* 'Slovenska golica', pri 26 dni starih embrijih. Sorazmernosti med starostjo embrija in uspešnostjo aklimatizacije ni bilo.

5.3.2.3 Vpliv časa, ki je potekel med oprasovanjem in izolacijo embrijev

Izolacija embrijev med 22. in 28. dnevom po oprasitvi je bila možna in lažja kot izolacija večjih embrijev. Kotiledona večjih embrijev smo s skalpelom, iglo in pinceto večkrat ranili, kar je vodilo v nastanek kalusa, rjavenja in drugih anomalij na mestu poškodb.

Regeneracija večjih embrijev v rastlinice je bila hitrejša, zato smo jih lahko prej aklimatizirali. 28 ali več dni star embrij je tako v povprečju potreboval 1 mesec, da je bil primeren za aklimatizacijo v humus, mlajši tudi do 14 dni več.

Zaradi že omenjene lignificirane semenske ovojnice je bila še posebej težavna izolacija velikih embrijev pri ženski komponenti *C. maxima*.

5.4 IZRAČUN ŠTEVILA GENERACIJ BUČ V ENEM LETU

Z običajnim gojenjem buč lahko v našem klimatskem pasu vzgojimo eno generacijo buč na sezono. Buče začnemo na prosto saditi konec aprila. Plodove lahko pobiramo do konca septembra. Sadike buč potrebujejo približno 2 meseca, da dosežejo fazo cvetenja. Najprej se pojavijo moški, nato ženski cvetovi. Po oprašitvi se začnejo tvoriti plodovi, ki po maksimalno 2 mesecih dosežejo stopnjo zrelosti. Sledi sušenje semen, saj neposredna zasaditev ni mogoča. S sušenjem prekinemo dormanco, ki buči preprečuje, da bi kalila že v plodu. Izračunamo lahko, da potrebujemo najmanj 4 mesece, da bi semena lahko ponovno posadili. Potrebovali bi še dodatna 2 meseca, da bi rastline iz teh semen ponovno cvetele. Med dvema fazama cvetenj tako potečejo najmanj 4 meseci.

Če vključimo postopek *in vitro* reševanja embrijev in buče gojimo v zavarovanem prostoru, lahko postopek skrajšamo. V tem primeru od cvetenja buč do ponovnega cvetenja potrebujemo le 3 mesece. 1 mesec po cvetenju so plodovi primerni za izolacijo semen in embrijev, 1 mesec po rasti na gojišču pa lahko embrije že sadimo v humus. Ker imajo rastlinice na tej stopnji v povprečju 4 liste, lahko pričakujemo cvetenje čez približno 1 mesec. Dodati je potrebno še, da moramo semena posaditi le prvič. S tem izgubimo še dva meseca. Vendar ta faza pozneje ni več potrebna, saj vse generante dobimo neposredno iz embrijev.

Če nadziramo temperaturo in osvetljevanje v hladnih mesecih v zaprtem prostoru, izkoristimo še ta del leta.

S tehniko *in vitro* reševanja embrijev in uporabo zavarovanega prostora lahko na leto teoretično vzgojimo 4 generacije buč.

5.5 BOLEZNI, ŠKODLJIVCI IN FIZIOLOŠKE MOTNJE

Buče smo gojili v zavarovanem prostoru v loncih premera 25 cm. Znano je, da je koreninski sistem buč tako razvejan, kot so razvejane vreže nad zemljo. Kot poročata Osvald in Kogoj – Osvald (2003) glavna korenina sega do globine 40 do 50 cm, nekatere korenine se lahko razvijejo do globine 5 metrov. Buče gojene v zasaditvenih loncih 25 cm niso mogle razviti primerne koreninskega sistema. Po nekaj mesecih rasti jim je primanjkovalo osnovnih hranil in ustrezen pH tal.

Prav tako v rastlinjaku ni bila primerna vlažnost. V prvi seriji so bile obilne padavine ravno med opraševanjem. Plodovi buč so začeli gniti. Prav tako so bili zasaditveni lonci zelo skupaj, kar je še pospešilo razvoj bolezni.

V drugi seriji so se razmnožile številčne populacije rastlinjakovega ščitkarja. Zelo verjetno je, da so regenerirani potomci *C. maxima* x *C. pepo*, ki smo jih posadili v prst, propadli

ravno zaradi tega škodljivca. Na listih teh buč so se pojavljale bele lise, ki so bile vzrok sesanja sokov.

Poleg omenjenih težav so predvsem v drugi seriji buče imele močne fiziološke motnje, ki smo jih pripisovali neprimerni osvetlitvi in morebitnim padcem temperature pod 10 °C.

Opazili smo tudi virusna obolenja, ki pa jih nismo natančneje določali.

5.6 PRETOČNA CITOMETRIJA

Metoda pretočne citometrije je zanesljiv pokazatelj potrjevanja medvrstnega potomstva. Pri rodu *Cucurbita* so metodo za večino kultiviranih vrst prvi uporabili Šiško in sod. (2003).

Rezultati pretočne citometrije, pridobljeni pri moji diplomski nalogi, niso pokazatelj, da smo dobili medvrstne križance. Pravzaprav je izmerjena količina DNK pri *C. pepo* 'GL Opal' in *C. pepo* 'Slovenska golica' popolnoma enaka kot pri *C. maxima* tj. $0,777 \pm 0,002$ (pg=2C). Torej, če smo dobili medvrstni križanec, le-tega s pretočno citometrijo v tem primeru ne moremo dokazati. Vzrokov je lahko več. Kot navajam v pregledu objav Lane Rayburn in sod. (2008) novejša raziskava kažejo, da obstajajo razlike v velikosti genoma znotraj vrste. Če primerjamo izmerjene vrednosti DNK v objavi Šiško in sod. (2003) lahko opazimo, da velikost genoma niti pri *C. pepo* niti pri *C. maxima* ni $0,777 \pm 0,002$ pg (2C). Verjetnost je, da je velikost genoma ravno v primeru našega rastlinskega materiala enaka pri obeh vrstah. Druga možnost je, da nam semenska hiša od katere smo seme kupili, pod imenom *C. maxima* prodaja *C. pepo* ali obratno. Ta verjetnost je majhna, saj sta obe vrsti imeli značilne karakteristike in takšen fenotip, kot je opisano v drugih virih. Glede na eksperimentalne podatke v diplomu, smo v tej fazi lahko bili prepričani, da v eksperimentu nismo imeli vrste *C. maxima*.

5.7 DOLOČANJE ITS SEKVENC

Zaradi rezultatov pretočne citometrije smo začeli dvomiti v uporabljen semenski material. Izvedena sekvenčna analiza ITS regij je potrdila, da vse tri uporabljene sorte buč pripadajo vrsti *C. pepo*.

Pri vseh treh vzorcih smo določili največje, 98-odstotno, ujemanje z vzorcem *C. pepo*, odsek transkripcijske enote ITS1 - 5.8S - ITS2. Ujemanje z ITS regijami vrste *C. maxima* je bilo 94 %. Večje ujemanje v primerjavi z *C. maxima* je bilo z ITS regijami *Cucurbita ficifolia* in *Cucurbita moschata*, v obeh primerih 97 %, ter z vrsto *Cucurbita lundelliana*. Zanimivo je, da je bilo večje ujemanje z vrsto *Lagenaria siceraria*, ki sploh ne spada v rod *Cucurbita*.

Glede na deklaracijo semena smo verjeli, da gre za vrsto *C. maxima* sorto 'Noč čarovnic'. Ker pa smo dobili velik delež uspešnega križanja, enake rezultate velikosti genomov starševski rastlin in potomcev ter sekvenčno zaporedje ITS regij bližje vrsti *C. pepo* kot *C. maxima*, smo ugotovili, da je deklaracija proizvajalca napačna.

S temi rezultati lahko obrazložimo velik delež uspešnega medvrstnega križanja (preglednica 6), enako velikost plodov in pripadajočih embrijev v primeru medvrstnega križanja in križanja znotraj vrste ter prisotnost embrijev v semenih vseh potomcev. Prav tako potomci križanja med domnevno *C. maxima* in *C. pepo* niso bili sterilni, kot navajajo viri (Robinson in Decker-Walters, 1997; Rakoczy-Trojanowska in Malepszy, 1986).

Razen fenotipskih podobnosti, ne najdemo drugih dokazov, da smo v poskusu uporabili vrsto *C. maxima*.

5.8 SKLEPI IN NADALJNJE DELO

Z rezultati smo prišli do spoznanja, da lahko skrajšamo generacijski čas pri križanju *C. pepo* z uporabo *in vitro* reševanja embrijev. Najprimernejši čas izolacije embrijev je okoli 28 dni po opravljanju. Če izoliramo večje embrije, je izolacija težja, medtem ko se manjši embriji počasneje aklimatizirajo v rastlinice. Za primerno se je izkazala tudi uporaba zavarovanega prostora, vendar so bili rezultati predvsem v zimskem času slabši. V enem letu lahko s temi metodami vzgojimo 4 generacije buč.

Za višji odstotek uspešnosti metode reševanja embrijev bi bilo potrebno še dodatno preučiti ustreznost gojišča s spreminjanjem koncentracij dodanih snovi. Pri izolaciji je zelo pomembna tehnika, saj lahko embrij hitro ranimo, kar vodi v nalaganje kalusa in rjavo obarvanje na mestih ranitve. Takšni embriji rastejo počasneje ali pa se sploh ne razvijejo v rastlinico.

Menili smo, da smo opravili tri serije medvrstnega križanja med *C. pepo* 'GL Opal' in *C. maxima*, vendar smo z analizo pretočne citometrije in določanjem ITS regij uporabljenih vrst ugotovili, da vrste *C. maxima* sploh nismo imeli v poskusu. S sodelovanjem s semenarno bi morali analizirati, kaj je vzrok napačne deklaracije vrste *C. maxima*. Večino rezultatov v diplomski nalogi bi bilo tako potrebno ponovno analizirati in vsa medvrstna križanja obravnavati kot križanja znotraj vrste.

6 POVZETEK

Generacijski cikel je pri večini kmetijskih rastlin dolg, na leto lahko v našem klimatskem pasu vzgojimo eno generacijo rastlin. Izkoristimo lahko le topli del leta – od aprila do septembra. V klimatskih pasovih ob ekvatorju, kjer so primerne temperature za rast rastlin čez celo leto, lahko vzgojimo več generacij.

Diplomska naloga se nanaša na pospešitev generacijskega cikla pri bučah z uporabo zaščitene prostora (rastlinjaka). Cikel smo dodatno skrajšali z uporabo metode *in vitro* reševanja embrijev.

V poskusu smo izvedli tri serije križanj znotraj vrste *C. pepo*. Uporabili smo sorti 'GL Opal' (Agrosaat, F1 generacija) ter 'Slovenska golica' (Semenarna Ljubljana).

Tehnika križanja je pri bučah zelo enostavna, saj zaradi ločenosti ženskega in moškega cveta (monoecije) ni potrebna emaskulacija. Prepoznali smo ženske in moške cvetove, ki so se naslednji dan odprli. Pred oprahitvijo smo jih zaščitili s obročkom iz papirnatega traku ter jih naslednji dan ročno oprahili do približno 10:00 ure, ko je brazda pestiča najbolj dovzetna za pelod. Cvetove smo ponovno zaščitili ter dodali označbo z žensko in moško komponento in datumom križanja. Odstotek uspešno razvijajočih plodov se je razlikoval od serije do serije ter glede na uporabljene očetovske in matrne komponente, v vseh primerih pa je bil od 31 % do 60 %. Pri diplomski nalogi smo prav tako analizirali možnost oprahitve rastlin dan pred odprtjem cveta.

Plodove, ki so se uspešno razvili, smo pobrali od 19 do 37 dni po oprahitvi. Iz plodov smo v sterilnih pogojih pobrali semena, ki jih je bilo v prvi in tretji seriji približno 230 na plod, v drugi seriji pa le do 30 na plod. Vsa razvita semena so vsebovala embrije. Ti so bili ob starosti 22 dni veliki 1 mm, 10 dni pozneje pa že 1,5 cm. Embrije smo izolirali iz semen s pomočjo pincete, igle in skalpela. Izolacija večjih embrijev je bila težavnejša, saj smo jih pogosto ranili, na mestih ranitve pa so se pojavljala albino območja, rjavenje ter nalaganje kalusa. Embrije smo položili na modificirano gojišče Murashige in Skoog (1962), povzeto po Šiško in sod. 2003. Ko so se po približno dveh tednih razvili klični listi, smo jih predstavili na MS gojišče z dodatkom kinetina in IAA. V prvi seriji smo uporabili še gojišče E20A (povzeto po Sauton A., Dumas De Vaulx R. (1987), ki je bilo enako v stopnji iniciacije in prestavljanja embrijev. Regeneracija je potekla na v rastni komori s 22 - 23 °C in ciklom dan:noč=16ur:8ur. Po enem mesecu od izolacije embrijev smo regenerirane mlade rastlinice že sadili v prst. Uspešnost regeneracije embrijev v rastline je bila od 0 % do 60 %. Iz rezultatov ne moremo določiti, ali so se starejši embriji (tisti, pri katerih je od oprahitve do izolacije poteklo več dni) uspešneje razvili v mlade rastlinice kot mlajši.

Izračunali smo, da bi v enem letu s pomočjo uporabe zavarovanega prostora in metode *in vitro* reševanja embrijev lahko vzgojili 4 generacije buč.

Pri diplomski nalogi smo prav tako poskusili medvrstno recipročno križati vrsti *C. pepo* in *C. maxima*. Križanje je bilo bolj kompatibilno kot smo pričakovali, prav tako nismo dobili sterilnih potomcev. Medvrstnost potomcev smo želeli potrditi s pretočno citometrijo. Kot notranji standard smo uporabili belo deteljo *Trifolium repens*. Izmerjene velikosti genoma starševskih rastlin (*C. pepo*- 'GL Opal' in 'Slovenska golica' in *C. maxima*) in potomcev so bile enake, zato smo naredili še sekvenčno analizo ITS regij starševskih rastlin. Rezultati so dokončno pokazali, da je deklaracija semena napačna in da v poskusu nismo imeli vrste *C. maxima*.

7 VIRI

BLAST. 2011. National Library of Medicine.

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome (31. avgust 2011)

Bolezni in škodljivci, Rastlinjakov ščitkar. 2011. Pinus TKI d.d.

http://www.pinus-tki.si/sl/Bolezni_11/ (22. julij 2011)

Castetter E.F. 1930. Species crosses in the genus *Cucurbita*. American Journal of Botany, 17: 41-57

Celar F. 2000. Bolezni bučnic. Sodobno kmetijstvo, 33: 162-165

Chawla H. S. 2002. Introduction to plant biotechnology. 2nd edition. USA, Science Publischer: 538 str.

Dieterich 1924. Über Kulture von Embryonen *ausserhalb* der Samen. Flora, 117: 379-417

Doležel J., Binarova P., Lucretti S. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry, Biologia plantarum, 31: 113-120

Doležel J., Greilhuber J., Lucretti S., Meister A., Lysak M. A., Nardi L., Obermayer R. 1998. Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. Annals of Botany, 82: 17-26

Ferriol M., Pico B. 2008. Pumpkin and winter squash. V: Series handbook of plant breeding. Vegetables I. Prohens J., Nuez F. (ur.). New York, Springer: 317-349

Grebenščikov I. 1954. Zur Kenntnis der Kürbisart *Cucurbita pepo* L. nebst einigen Angaben über Ölkübis. Züchter, 20: 194-207

Hannig E. 1904. Zur Physiologie pflanzlicher Embryonen. I. Über die Kultur von Cruciferen - Embryonen *ausserhalb* des Embryosacks. Botanische Zeitung, 62: 45 - 80

Ivančič A. 2002. Hibridizacija pomembnejših rastlinskih vrst. Maribor, Fakulteta za kmetijstvo: 775 str.

- Jobst J., King K., Hemleben V. 1998. Molecular evolution of the internal transcribed spacers (ITS1 in ITS2) and phylogenetic relationships among species of the family Cucurbitaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 9, 2: 204 - 219
- Kaloo Dr. 1988. Vegetable breeding. Florida, Boca Raton: 213 str.
- Kwack N. S., Fujieda K. 1985. Pollen tube growth and embryo development in interspecific crosses of *Cucurbita*. *Journal Of The Faculty Of Agriculture Kyushu University*, 30, 1: 1-8
- Kwack N. S., Fujieda K. 1987. Seed Abortion and Tehniques for Obtaining Hybrids in Interspecific Crosses of *Cucurbita*. *Journal of Japanese Society of Horticultural Science*, 55, 4: 455-460
- Lane Rayburn A., Auger J. A., Benzinger E. A., Hepburn A. G. 1989. Detection of intraspecific DNA content variation in *Zea mays* L. by flow cytometry. *Journal of Experimental Botany*, 40, 11: 1179 – 1183
- Lane Rayburn A., Kushad M. M., Wannerat W. 2008. Intrascpecific genome size variations in pumpkin (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo*). *HortScience*, 43, 3: 949 - 951
- Lelley T., Loy B., Murkovic M. 2009. Hull-less oil seed pumpkin. V: *Handbook of plant Breeding. Oil Crops*. Vollmann J., Rajcan I. (ur.). New York, Springer: 369 - 492
- Marie D., Brown S.C. 1993. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell*, 78: 41-51
- Milevoj L. 2002. Škodljivci buč. *Sodobno kmetijstvo*, 33: 166 - 169
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497
- Nepi M., Pacini E. 1993. Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. *Annalys of Botany*, 72: 527-536
- Nepi M., Pacini E. 2001. Effect of pistil age on polen tube growth, fruit development and seed set in *Cucurbita pepo* L, *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 70, 3: 165-172
- Oljne buče. 2011. Agrosaat.
http://www.agrosaat.si/Sorte_in_hibridi,123,0.html (5. maj 2011)

- Otto F.J., Oldiges H., Göhde W., Jain V.K. 1981. Flow cytometric measurement of nuclear DNA content variations as a potential *in vitro* mutagenicity test. *Cytometry*, 2: 189 - 191
- Osvald J., Kogoj – Osvald M. 1994. Pridelovanje zelenjave na vrtu. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 295 str.
- Osvald J., Kogoj – Osvald M. 2003. Integrirano pridelovanje zelenjave. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 241 str.
- Pavlek P. 1985. Specijalno povrčarstvo. Zagreb, Sveučilišna naklada Liber: 384 str.
- Plodovke. Buča 'Slovenska golica'. 2011. Semenarna Ljubljana.
<http://www.semenarna.si/podrobnosti-artikla-plodovke/category/bucke-ali-cukini/article/buca-slovenska-golica-cucurbita-pepo-valentin> (5. maj 2011)
- Plodovke. Buča 'Noč čarovnic', Sankt Martin F1. 2011. Semenarna Ljubljana.
<http://www.semenarna.si/podrobnosti-artikla-plodovke/category/bucke-ali-cukini/article/buca-noc-carovnic-sankt-martin-f1> (5. maj. 2011)
- Rakoczy-Trojanowska M., Malepszy S. 1986. Obtaining of hybrids within the family *Cucurbitaceae* by *in vitro* culture of immature embryos. Characteristics of hybrids from *Cucurbita maxima* x *C. pepo*. *Genetic Polonica*, 27, 3-4: 259 - 272
- Rakoczy-Trojanowska M., Malepszy S. 1989. A method for increased plant regeneration from immature F₁ and BC₁ embryos of *Cucurbita maxima* Duch. x *C. pepo* L hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 18: 191 - 194
- Robinson R. W., Decker-Walters D.S. 1997. Cucurbits. Walingford, C.A.B. International: 226 str.
- Sauton A., Dumas De Vaulx R. 1987. Obtention de plantes haploides chez le melon (*Cucumis melo* L.) per gynogenese induite per du pollen irradie. *Agronomie*, 7, 2: 141-148
- Swift H. 1959. The constancy of deoxyribose nucleic acid in plant nuclei *Genetics*. 36: 643-654
- Šiško M. 2002. Medvrstna križanja znotraj rodu *Cucurbita* L. z metodo *in vitro* reševanja embrijev. Magistrsko delo. Ljubljana. Biotehniška fakulteta: 71 str.

Šiško M., Ivančič A., Bohanec B. 2003. Genome size analysis in the genus *Cucurbita* and its use for determination of interspecific hybrids obtained using embryo-rescue technique. *Plant Science*, 165: 663 – 669

Ugrinovič K. 2000. Fiziološke motnje v razvoju rastlin in plodov bučnic. *Sodobno kmetijstvo*, 33: 170 - 172

Zitter T. A., Hopkins D.L., Thomas, C. 1998. Compendium of cucurbit diseases, APS Press: 87 str.

Wall J.R. 1954. Interspecific hybrids of *Cucurbita* obtained by embryo culture. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 63: 427 - 430

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem prof. dr. Borutu Bohancu za pomoč in nasvete pri izdelavi diplomske naloge.

Najlepša hvala prof. dr. Jani Žel za skrben pregled diplomske naloge.

Vika, brez tebe sama ne bi zmogla v rastlinjaku, Nataša, brez tebe bi obupala v laboratoriju, Lea, brez tebe delo ne bi bilo tako zabavno. Hvala. Prav tako najlepša hvala vsem ostalim sodelavcem Katedre za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin.

Iskreno se zahvaljujem staršem ter Tadeji in Damjani, ki so me bodrili ter finančno podpirali v študentskih letih.

Brez skupinskega dela ni uspeha, brez tekme ni zmage. Hvala vsem sošolkam in sošolcem za urice, ki smo jih skupaj prebili ob knjigah in na zabavah.

Tin, brez tebe bi večkrat vrgla "puško v buče". Hvala za vse lepe trenutke in spodbudne besede.

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Anita RIŽNIK

**PROUČITEV POSTOPKOV POSPEŠENEGA
GENERACIJSKEGA CIKLA PRI OLJNIH BUČAH
(*Cucurbita pepo* L. subsp. *pepo* var. *stryriaca* Grebenšč.) S
KULTURO NEZRELIH EMBRIJEV *in vitro* IN POSKUS
MEDVRSTNEGA KRIŽANJA *C. pepo* x *C. maxima***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011