

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Nuša BOROVIČAR

**PREPOZNAVANJE MEJOTSKIH STADIJEV PRI  
ČEMAŽU (*Allium ursinum* L.)**

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij

Ljubljana, 2013



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Nuša BOROVIČAR

**PREPOZNAVANJE MEJOTSKIH STADIJEV PRI ČEMAŽU**  
*(Allium ursinum L.)*

DIPLOMSKO DELO  
Visokošolski strokovni študij

**RECOGNITION OF MEIOTIC PHASES IN RAMSONS**  
*(Allium ursinum L.)*

GRADIATION THESIS  
Higher Professional Studies

Ljubljana, 2013

S tem diplomskim delom zaključujem Visokošolski strokovni študij agronomije. Delo je bilo deloma opravljeno na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete v Ljubljani. Poskus je bil izveden v botaničnem laboratoriju Oddelka za agronomijo, Katedri za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala višjega predavatelja mag. Tomaža Sinkoviča.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: viš. pred. mag. Tomaž SINKOVIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Zlata LUTHAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana Nuša Borovničar se strinjam z objavo naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete v Ljubljani. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Nuša BOROVIČAR

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Vs  
DK UDK 582.273.16: 581.162.1 (043.2)  
KG čemaž/mejoza/genetika/citologija/citoplazma/citološki preparati/stadiji  
mejoze/kromosomi/  
KK AGRIS F63  
AV BOROVIČAR, Nuša  
SA SINKOVIČ, Tomaž (mentor)  
KZ SI - 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo  
LI 2011  
IN PREPOZNAVANJE MEJOTSKIH STADIJEV PRI ČEMAŽU (*Allium ursinum*  
L.)  
TD Diplomsko delo (Visokošolski strokovni študij)  
OP IX, 32 str., 1 pregl., 11 sl., 19 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI V letu 2008 je bil izdelan poskus s čemažem (*Allium ursinum* L.) v botaničnem laboratoriju Katedre za aplikativno botaniko ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko. Glavni namen poskusa je bil izdelati začasne mikroskopske preparate in z njimi ugotoviti, kakšen bo potek mejoze v mladih, razvijajočih se prašnicah. Pripravili smo 25 stekleničk s po 20 cvetnimi popki, ki smo jih v razmerju 3 : 1 etanola in očetne kisline fiksirali. Spremljali in določali smo mejotske stadije in potrdili mejotske faze bivalentov (profaza I - zigoten, diakineza in anafaza I), diad (telofaza I) in tetrad (telofaza II).

## KEY WORD DOCUMENTATION

DN Vs  
DC UDK 582.273.16: 581.162.1 (043.2)  
CX ramsons/meiosis/genetics/cytology/cytoplasma/cytological slides/meiotic phases/chromosomes/  
CC AGRIS F63  
AU BOROVIČAR, Nuša  
AA SINKOVIČ, Tomaž  
PP SI - 1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy  
PY 2011  
TI RECOGNITION OF MEIOTIC PHASES IN RAMSONS (*Allium ursinum* L.)  
DT Graduation Thesis (Higher Professional Studies)  
NO IX, 32 p., 1 tab., 11 fig., 19 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB In the year 2008 an experiment with ramsons (*Allium ursinum* L.) was carried out in the Botanic laboratory, the Chair of applied botany, ecology, physiology and information science. The main purpose of the experiment was to perform temporary microscopic slides for recognition of meiotic phases in anthers of ramsons. 25 flasks were prepared, each of them contained 20 anthers. They were fixed with the proportion 3:1 of ethanol and acetic acid. With the experiment we followed up and identified the meiotic stages and there were confirmed meiotic phases of bivalents (prophase I - zygotene, diakinesis and anaphase I), diades (telophase I) and tetrades (telophase II).

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key Word Documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN NAMEN DIPLOMSKE NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 OPIS IN ZNAČILNOSTI ČEMAŽA	3
2.2 SISTEMATSKA PRIPADNOST ČEMAŽA ( <i>Allium ursinum</i> L.)	4
2.3 MEJOZA	4
<b>2.3.1 Celično jedro ali nucleus</b>	<b>4</b>
2.3.1.1 Dezoksiribonukleinska kislina - DNK	5
2.3.1.2 Ribonukleinska kislina - RNK	6
2.3.1.3 Vloga DNK in RNK	6
2.3.1.4 Zgradba interfaznega jedra	6
2.3.1.5 Kromosomi	7
2.3.1.6 Spremembe molekule DNK (mutacije)	8
<b>2.3.2 Delitev celičnega jedra</b>	<b>8</b>
<b>2.3.3 Delitev citoplazme</b>	<b>10</b>
2.4 DRUŽINA LUKOVK (Alliaceae)	11
2.5 SPLOŠNO O MIKROSKOPIRANJU	11
<b>2.5.1 Zgradba kromosomov vidna s svetlobnim mikroskopom</b>	<b>12</b>
2.6 MIKROFOTOGRAFIJA	13
2.7 PRIPRAVA MATERIALA ZA RAZISKOVANJE	13
<b>2.7.1 Fiksiranje</b>	<b>13</b>
<b>2.7.2 Osnove barvanja</b>	<b>14</b>
<b>2.7.3 Jemanje materiala</b>	<b>14</b>
<b>2.7.4 Priprava materiala za izdelovanje preparatov</b>	<b>14</b>
<b>2.7.5 Analiza preparata</b>	<b>15</b>
<b>2.7.6 Pribor za izdelovanje preparatov</b>	<b>15</b>
<b>2.7.7 Čiščenje in shranjevanje preparatov</b>	<b>15</b>

	str.
<b>3 MATERIAL IN METODE DELA</b>	16
3.1 IZVEDBA POSKUSA	16
3.1.1 Vremenske razmere	17
3.2 METODE DELA	17
3.2.1 Hranjenje vzorcev	19
<b>4 REZULTATI</b>	20
4.1 RAZVOJ POPKOV	20
4.2 PARJENJE HOMOLOGNIH KROMOSOMOV V BIVALENTE	22
4.3 LOČEVANJE HOMOLOGNIH KROMOSOMOV V ANAFAZI PRVE MEJOTSKE DELITVE	24
4.4 RAZVRŠČANJE HOMOLOGNIH KROMOSOMOV V PARE, CELIČNE DIADE	25
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	27
5.1 RAZPRAVA	27
5.2 SKLEPI	29
<b>6 POVZETEK</b>	30
<b>7 VIRI</b>	31
<b>ZAHVALA</b>	



## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Povprečna dolžina popkov pri čemažu	str. 20
--	------------

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Laboratorijski vzorci cvetnih popkov čemaža v stekleničkah	18
Slika 2: Rastišče čemaža na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete 1. teden v marcu	18
Slika 3: Rastišče čemaža na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete 2. teden v marcu	18
Slika 4: Rastišče čemaža na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete 3. teden v marcu	19
Slika 5: Rastišče čemaža na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete 4. teden v marcu	19
Slika 6: Razvoj popkov pri čemažu ( <i>Allium ursinum</i> L.) - povprečna dolžina v mesecu marcu in aprilu (1., 2., 3., 4. teden), zgoraj - stolpičasti prikaz, spodaj - linearni prikaz	21
Slika 7: Mejotski stadiji pri čemažu. Vidni so bivalenti, cvetni popki so bili nabrani 14. 3. 2008	22
Slika 8: Mejotski stadiji pri čemažu, bivalenti. Cvetni popki so bili 17. 3. 2008	23
Slika 9: Mejotski stadiji pri čemažu. Vidna je anafaza prve zoritvene delitve. Cvetne popke smo nabrali 25. 3. 2008	24
Slika 10: Mejotski stadiji pri čemažu, diade. Cvetni popki so bili nabrani 3. 4. 2008	25
Slika 11: Mejotski stadiji pri čemažu. Vidne so diade in tetrade. Cvetni popki so bili nabrani 9. 4. 2008	26

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava	Pomen
1. DNK	Dezoksiribonukleinska kislina
2. RNK	Ribonukleinska kislina
3. NPR	Nukleoplazmatsko razmerje
4. A	Adenin
5. G	Guanin
6. T	Timin
7. C	Citozin
8. U	Uracil
9. rRNK	Ribosomalna ribonukleinska kislina
10. mRNK	Obveščevalna (messenger) ribonukleinska kislina
11. tRNK	Prenašalna (transfer) ribonukleinska kislina
12. ATP	Adenozin 5-trifosfat
13. HCl	Klorovodikova kislina
14. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Žveplova (VI) kislina
15. nm	Nanometer
16. μm	Mikrometer

## 1 UVOD

Čemaž (*Allium ursinum* L.) je trajnica, ki zraste do 25 cm visoko. Ima podolgovato, z belo prozorno kožico ovito čebulico in navadno dva prizemna lista, ki sta ploska in suličasta. Steblo je pokončno in robato. Ima bogato cvetoče kobule, z belimi zvezdastimi cvetovi. Razmnožuje se s čebulicami, ki nastajajo v zemlji in s črnim semenom, ki ga raznašajo mravlje. Raste na vlažnih humusnih tleh, na vlažnih legah in v senčnih listnatih, predvsem bukovih pa tudi mešanih gozdovih. Raste skoraj po celi Evropi, na Kavkazu in severni Aziji. Zaradi močnega česnovega duha, zaznamo čemaž večinoma še preden ga ugledamo. Njegov okus je podoben česnovemu, vendar je bolj oster in pekoč.

Poleti in pozimi nabiramo čebulice čemaža, aprila in maja pa je najugodnejši čas za nabiranje listov. S sušenjem izgubi rastlina, ki je bogata z eteričnimi olji, svojo učinkovitost in zdravilne učinkovine. Te vsebujejo vinilsulfid, vinilpolisulfid in sledi merkaptana, soli, sluzi in sladkor (Wraber, 1990).

Čemaž so poznali že stari Rimljani, dajali so mu celo prednost pred česnom. Sicer je čemaž poznan kot domače zdravilo, njegova uporaba je podobna uporabi česna. Uživamo lahko na različne načine pripravljene liste, popke in cvetove. Uporablja se ga proti poapnenju žil, pri povišanem krvnem tlaku in jetrnih boleznih. Zdravilno učinkuje tudi na želodec in črevesje (Ašič, 2007).

Mejoza je način delitve celic, pri kateri pride do zmanjšanja števila kromosomov na polovico. Zanj je značilno, da zaporedje mejotskih faz in dogajanja poteka večinoma podobno kot pri mitozni razen, da poteka mejoza v dveh korakih, dveh zaporednih delitvah, ki ju imenujemo prva ali redukcijska in druga ali zoritvena delitev. V prvi delitvi se število kromosomov zmanjša na polovico, z diploidnega na haploidno, zaradi česar imenujemo to delitev redukcijska delitev. Po prvi mejotski delitvi nastaneta dve jedri oziroma celici s haploidnim številom kromosomov. Druga zoritvena delitev poteka enako kot mitotična. Delitveno vreteno, ki se oblikuje v profazi, povleče v metafazi kromosome v ekvatorialno ravnino celice. V začetku anafaze II se vsak dvokromatidni kromosom razdeli v dva enokromatidna, ki ju delitveno vreteno potegne na nasprotna pola. V telofazi se kromosomi despilarizirajo, oblikujeta se jedrca in pa jedrna ovojnica, poteče tudi delitev citoplazme. Med prvo in drugo mejotsko delitvijo je kratka vmesna interfaza, ki poteka brez faze S, zato se dedni material ne podvoji kot pri mitozni. Pri mejozi tako nastanejo štiri jedra, vsako s polovičnim - haploidnim številom kromosomov (Stušek in sod., 1998).

## 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA IN NAMEN DIPLOMSKE NALOGE

Namen tega diplomskega dela je bilo izdelati začasne mikroskopske preparate in z opazovanjem le teh pod svetlobnim mikroskopom ugotoviti naslednje:

- kakšen bo potek mejoze v mladih, razvijajočih se prašnicah (anterah),
- optimalni čas nabiranja cvetnih popkov čemaža,
- kakšna je dolžina cvetnih popkov, ki je primerna za opazovanje različnih faz mejoze.

Nameravali smo pripraviti preparate mečkance, jih fiksirati in obarvati z barvilom acetokarmin, ter opazovati pod svetlobnim mikroskopom redukcijsko delitev v različnih fazah.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Cvetne popke čemaža smo nabirali na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete v Ljubljani leta 2008.

- Predvidevali smo, da bodo cvetni popki v obdobju med mesecem marcem in aprilom primerno razviti, ker takrat mejoza hitro poteka.
- Predvidevali smo tudi, da na enem mikroskopskem preparatu ne bo vseh stadijev mejoze, zaradi tega bomo morali proučevati različno razvite in različno dolge cvetne popke.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 OPIS IN ZNAČILNOSTI ČEMAŽA

Čemaž je trajnica iz družine lukovk. Je v ozkem sorodstvu s česnom in čebulo. Poganjati začne že zgodaj spomladi, v marcu, pa tudi že v februarju. Iz majhne bele čebulice zrastejo na kratkem stebelu praviloma dva do štirje sočni in mesnati zeleni, vzporedno - žilnati in suličasti listi, ki so dolgi od 15 - 20 cm in široki do 7 cm. Listi so lahko viseče upognjeni. Čemaž cveti od aprila do junija. Stebelce s cvetom raste navpično iz listne rozete. Cvet sestoji iz svetlega kobula z 1 - 2 cm velikimi cvetovi v obliki zvezde, ki imajo premer 12 - 20 mm. Te imajo šest belih, ostrih, naprej usmerjenih ali topih perigonovih listov, ki sedijo na ravnih, 1 - 2 cm dolgih cvetnih pecljih.

Ob tvorbi semen v juniju postajajo listi rahlo rumeni in z zrelostjo semena dokončno odmrejo. Istočasno je povsem razvita čebulica, ki je dolga 4 - 5 cm. Spolno se čemaž razmnožuje s črnimi semeni, s premerom 2 - 3 mm, na katerih so majhni mesnati obeski. Ti so razlog, da semena raznašajo mravlje, ki tako posredno skrbijo za uspešno razmnoževanje čemaža. Stopnja oprasitve pri čemažu je majhna.

Čemaž ima kratko vegetacijsko dobo, ki se začne z odganjanjem čebulice v februarju ali marcu, konča pa se že ob koncu junija. Takrat dozori semena, listi pa porumenijo in propadejo. V preostanku leta čemaža ne opazimo. Za rast čemaža so zelo ugodni bukovi gozdovi, dobro uspeva na vlažnih, humoznih in apnenčastih tleh ter predvsem v senčnih legah. Tla morajo imeti nevtralno ali bazično reakcijo, ne uspeva na zelo kislih in zelo bazičnih tleh. Tla morajo vsebovati še zadostno količino dušika (Cortese, 2002). V gozdu zaznamo nahajališče čemaža zaradi njegovega vonja že od daleč. Podobno kot pri česnu najdemo v njegovih eteričnih oljih veliko število različnih žveplovih spojin. Na splošno so listi čemaža občutljivi na višje temperature in suh zrak. Zato ga je potrebno hraniti pri temperaturi 2 - 10 stopinj C in pri veliki vlažnosti zraka (Ašič, 2007).

S povečanim povpraševanjem po čemažu se povečuje tudi njegova vrtnarska pridelava. Če upoštevamo posebne zahteve rastline, je tak način pridelave možen. V zadnjih letih se je vrtnarstvo zelo osredotočilo na pridelavo čemaža na prostem, relativno enostavno ga pridelamo tudi na domači njivi ali vrtu. Njegova pridelava pa je možna tudi s sajenjem majhnih čebulic (Cortese, 2002).

V severni Ameriki uspeva čemažev sorodnik *Allium tricoccum* AIT. Imenujejo ga tudi divji por (Wild leek). Tako kot pri nas spomladi, so tudi tam, npr. gozdovi Kanade,

Missourija, Minnesote in Karoline porasli s to priljubljeno rastlino. Listi, aroma in sestavine so si podobni. Uživa se celo rastlino, podobno kot pri nas por. Pri žetvi rastline torej ne odrežejo, pač pa izkopljejo. Ker je priljubljena rastlina, so njena divja nahajališča zelo ogrožena. To je tudi razlog, da se pridelovalci že več let ukvarjajo z gojenjem divjega pora (Cortese, 2002).

## 2.2 SISTEMATSKA PRIPADNOST ČEMAŽA (*Allium ursinum* L.)

Razdelitev vrste je naslednja (Cortese, 2002):

Kraljestvo:	Plantae (rastline)
Podkraljestvo:	Tracheobionta
Deblo:	Magnoliophyta (kritosemenke)
Razred:	Liliopsida (enokaličnice)
Podrazred:	Liliidae
Red:	Asparagales (beluševci)
Družina:	Alliaceae (lukovke)
Rod:	<i>Allium</i> (luk)
Vrsta:	<i>A. ursinum</i> L.

## 2.3 MEJOZA

### 2.3.1 Celično jedro ali nucleus

Celično jedro je celični organel, ki se nahaja v celicah evkariontskih organizmov. Pri prokariontih ni organiziranega morfološkega jedra, imajo pa ekvivalent jedra, ki ni z membranami oddeljen od okolišnje citoplazme.

Snovi, ki so potrebne za rast in razvoj jedra, se nahajajo v citoplazmi. Celično jedro ima pomembne naloge pri ohranjanju in prenosu dednega materiala, pri sintezi beljakovin in procesih celičnega dihanja. Ima tudi vlogo pri kontroli rasti in razmnoževanju celic.

Na splošno ločimo tri različna stanja jedra, pri katerem so oblike in funkcije jedra različne: interfazno jedro, mitotsko jedro in delovno (metabolno) jedro. Interfazno jedro se nahaja v obdobju med dvema delitvama pri celicah, ki so zmožne delitve. Mitotsko jedro je jedro v procesu delitve, ko prihaja do identične vzdolžne delitve dednega materiala in razdelitve na dve novi jedri. Delovno ali metabolno jedro je prisotno v

odraslih diferenciranih celicah, ki so izgubile zmožnost delitve in sodeluje predvsem pri presnovi celice (Sinkovič, 2006).

Oblika jedra je pri celicah različna in je odvisna predvsem od oblike ter funkcije celice. Pri meristematskih in parenhimatskih celicah, na splošno pri izodiametričnih celicah, je jedro kroglasto ali elipsoidno. Lahko je tudi podolgovato ali pa ima nepravilno obliko. Prav tako se oblika jedra lahko spreminja v sami celici, kar je odvisno od njenega fiziološkega stanja.

Tudi velikost jedra je lahko različna, na splošno je sorazmerna prostornini citoplazme. V celicah enakih tkiv obstaja razmerje med velikostjo jedra in velikostjo citoplazme. To razmerje se imenuje nukleoplazmatsko razmerje (NPR). Pri spremembi tega razmerja se prične ali pa konča jedrna delitev.

Premer jedra se v celicah višjih rastlin giblje med 10 do 50  $\mu\text{m}$ . Pri nižjih rastlinah so jedra manjša, pri večini gliv je velikost jedra od 1 do 5  $\mu\text{m}$ . Jedra v zigotah so večja kot v somatskih celicah.

V zarodnih celicah rastlin, ki so napolnjene s citoplazmo, se jedro nahaja praviloma v sredini celice. V starih diferenciranih celicah z velikimi vakuolami ali z eno veliko centralno vakuolo se jedro skupaj s citoplazmo tesno pomakne ob celično steno.

Najpogosteje se v celici nahaja eno jedro. Razmeroma pogosto srečamo tudi dvojedrne celice. Obstajajo pa tudi celice z velikim številom jeder.

Jedro je gostejše od citoplazme in ima tudi večjo viskoznost. Njegova specifična teža je 1,03 do 1,1. Lom svetlobe je nekoliko večji kot v citoplazmi. Vsebuje največ beljakovin in nukleinskih kislin: dezoksiribonukleinsko kislino (DNK) in ribonukleinsko kislino (RNK); količina lipidov, encimov in mineralnih snovi pa je manjša od količine v citoplazmi. Vsebuje veliko bazičnih beljakovin (protamini in histoni), ki so bogate z bazičnimi aminokislinami (lizinom, histidinom in argininom), in z nukleinskimi kislinami tvorijo nukleoproteide. DNK je najpomembnejša sestavina jedra - je nosilec genske informacije, ki se prenaša iz ene generacije celic v drugo. DNK ima sposobnost podvajanja, nadzira pa tudi sintezo beljakovin in encimske procese v celicah. Nahaja se v zaviti obliki v kromatinu v kromosomih (Sinkovič, 2006).

#### 2.3.1.1 Dezoksiribonukleinska kislina - DNK

DNK je nosilec dedne informacije, je heteropolimer, katerega osnovna enota je nukleotid (mononukleotid). Vsaka molekula DNK je sestavljena iz dveh polinukleotidnih verig, ki se v obliki dvojne vijačnice ovijata v nasprotni smeri. Osnovna enota mononukleotid je



sestavljena iz sladkorja pentoze: deoksiriboze, fosforjeve kisline in ene dušikove organske baze. V molekuli DNK so pari komplementarnih dušikovih baz: adenin (A) - timin (T) in citozin (C) - gvanin (G) povezani med seboj z vodikovimi vezmi.

Geni so odseki makromolekule DNK in so povprečno dolgi 600 - 1800 mononukleotidnih parov ali pa 200 - 600 trojic mononukleotidov. Vsak gen vsebuje informacijo za en protein oziroma encim, ki pospešuje določeno kemijsko reakcijo. Povzroči pa tudi izoblikovanje določenega dednega znaka ali lastnosti.

### 2.3.1.2 Ribonukleinska kislina - RNK

Z razliko od DNK tvori ribonukleinska kislina samo enojno vijačnico. Nukleotid ribonukleinske kisline vsebuje sladkor ribozo in dušikovo bazo uracil (U) namesto timina (T).

90 % ribonukleinske kisline se nahaja v citoplazmi in le 10 % v jedru. Obstajajo tri vrste RNK: rRNK - ribosomalna, mRNK - obveščevalna (messenger) in tRNK - prenašalna (tranfer) RNK (Sinkovič, 2006).

### 2.3.1.3 Vloga DNK in RNK

Vloga dezoksiribonukleinske in ribonukleinske kisline je v tem, da se genetska informacija iz zaporedja nukleotidov, ki so v komplementarnih verigah molekule DNK, pretvori v mRNK. To je proces prepisovanja genetske informacije ali transkripcija. S pomočjo informacijske mRNK, ATP, ribosomov in tRNK, ki prenašajo aminokislino, poteka translacija ali prevajanje genetske informacije oziroma sinteza beljakovin, ki poteka na ribosomih.

Podvojevanje ali duplikacija DNK poteka v obdobju med dvema delitvama (interfaza) v fazi S. Zaradi delovanja encima helikaze se pretrgajo vodikove vezi v DNK, ki se prične zato odvijati. Osrednji encim podvojevanja je DNK polimeraza, s pomočjo katerega in nukleotidov nastanejo najprej novi krajši segmenti DNK, ki jih kasneje encimi ligaze povežejo med seboj. Ena veriga DNK je torej identična starševski DNK molekuli, komplementarna vijačnica pa se tvori na novo. S podvojevanjem nastaneta dve novi dvojnovijačni molekuli DNK, ki pa sta enaki matični DNK (Sinkovič, 2006).

### 2.3.1.4 Zgradba interfaznega jedra

Celično jedro je precej zapletena struktura in jo lahko samo delno spoznamo z optičnim mikroskopom. Natančno strukturo lahko opazujemo šele z elektronskim mikroskopom.

V interfaznem jedru lahko opazujemo naslednje morfološke enote jedra:

- Jedrno ovojnico ali karioteko,
- Nukleoplazmo ali karioplazmo (jedrni sok, kariolimfo),
- Kromatin, ki se med seboj prepleta v kromatinsko mrežje,
- Kromocentri, ki so močno spiralizirani deli kromatinskih niti,
- Enega ali več jedrc ali nukleolusov,
- Jedrne ribosome, ki so manjši od citoplazmatskih ribosomov.

Jedrna ovojnica je zelo tanka ovojnica okoli celičnega jedra in je ne moremo opazovati s svetlobnim mikroskopom. Sestavljena je iz dveh membran, katerih debelina je 7 nm. Jedrna ovojnica je po svoji sestavi in kemijski zgradbi sorodna membranam endoplazmatskega retikuluma. Sestavljajo jo beljakovine, med katerimi so številni encimi, lipidi in manjša količina RNA in DNK. Za jedrno ovojnico je značilno, da ima odprtine ali pore, katerih število je odvisno od vrste rastline ali metabolne aktivnosti jedra. Jedrne pore, ki vsebujejo beljakovinske strukture, so selektivno prepustne in omogočajo aktivni transport. Skozi njih se vrši izmenjava snovi med celičnim jedrom in citoplazmo.

Nukleoplazma ali jedrni sok je bolj ali manj tekoča snov in povezuje jedrne strukture, kot so jedrce, kromatin, jedrno ovojnico in ribosome. Sestavlja jo voda, proste beljakovine, kompleksi RNK, beljakovin - encimov, ki so potrebni za presnovo beljakovin in njihovih sestavin - aminokislin.

Kromatin je osnovna strukturna enota interfaznega jedra. Na fiksiranih in obarvanih preparatih je kromatin videti kot dolge in tanke niti (evkromatin) in drobna zrnca, ki predstavljajo bolj spiralizirane dele kromatina (heterokromatin). Kemično so ti deli sestavljeni iz kompleksov DNK in beljakovin ter kompleksov RNK in beljakovin. Kromatin predstavlja osnovno maso, iz katere se kasneje tvorijo kromosomi. Te pa lahko opazujemo samo pri celičnih delitvah (Sinkovič, 2006).

#### 2.3.1.5 Kromosomi

Kromosomi so sestavine jedra, ki so vidne v fazi celične delitve in na katerih so linearno nameščeni geni. Kromosomi se delijo in podvajajo. V času delitve se vzdolžno delijo in s tem omogočajo prenos dedne snovi iz ene celice v drugo ter iz ene generacije v drugo.

Velikost kromosomov višjih rastlin niha od nekaj desetih  $\mu\text{m}$  do 32  $\mu\text{m}$  pri nekaterih predstavnicah iz družine Liliaceae (lilijevke) in Alliaceae (lukovke).

Oblika kromosomov je različna. Pri višjih rastlinah so kromosomi najpogosteje v obliki niti, paličic, lahko so tudi kroglasti. Kromosome najbolj opazujemo v času delitve celice, predvsem v metafazi in anafazi mitoze in mejoze. Zgradba kromosomov je vidna tudi v profazi celične delitve. Ponavadi imajo metafazni kromosomi po eno zožitev ali primarno konstrikcijo (centromera), s katero so razdeljeni na dva kraka, ki sta lahko enako dolga ali pa tudi ne. Na centromero se v času jedrne delitve labilno vežejo niti delitvenega vretena. Centromera predstavlja odviti (despiralizirani) in genetsko dejavni del kromosoma. Kraki kromosomov pa so v času jedrne delitve zaviti (spiralizirani) in s tem genetsko nedejavni. Poleg primarne zožitve ali centromere imajo nekateri kromosomi lahko tudi sekundarno zožitev, ta pa se nahaja na različnih mestih na kromosomu.

Kromosomi so sestavljeni iz beljakovin in DNK. Beljakovine v kromosomih so bazične beljakovine ali histoni, kisle beljakovine in preostale beljakovine. Histoni se pojavljajo v več skupinah, pomembni so kot genski regulatorji, ki zavirajo (represorji). Nekateri izmed kisljih beljakovin pa delujejo nasprotno, kot aktivatorji genov (induktorji) (Sinkovič, 2006).

#### 2.3.1.6 Spremembe molekule DNK (mutacije)

Mutacije, ki lahko nastanejo na molekuli DNA so: genske, kromosomske in genomske. Spremembe lahko nastanejo v somatskih celicah (mitoza) ali gametah (mejoza). Kromosomske spremembe ali aberacije so lahko: adicije (dodajenje), delecije (odvzemanje) in translokacije (premestitve) posameznih delov kromosomov (Sinkovič, 2006).

#### 2.3.2 Delitev celičnega jedra

Somatska delitev celičnega jedra ali mitoza poteka indirektno preko štirih faz. Med dvema delitvama je obdobje interfaze, ki je časovno najdaljša faza celičnega cikla, in traja 20 do 30 ur, medtem ko traja mitoza le 1 do 2 uri. V času interfaze poteka sinteza DNK, beljakovin, ogljikovih hidratov in lipidov, oziroma priprava na novo delitev celice.

Mitoza je obdobje, ki jo obsegajo štiri faze: profaza, metafaza, anafaza in telofaza. V profazi se prične vzdolžna delitev profaznih kromosomov na dve sestrski kromatidi, ki se v metafazi in anafazi ločita z nitmi delitvenega vretena, in tako potujeta proti poloma celice. S tem se enakomerno razdeli dedni material na hčerinski celici. V telofazi se pričneta oblikovati dve celici. Število kromosomov se po somatski celični delitvi ne spremeni, iz diploidne somatske celice nastaneta dve diploidni celici, ki sta genetsko popolnoma enaki (Sinkovič, 2006).

Za spolno razmnoževanje je značilno, da se nov osebek razvije iz celic, ki nastanejo z združitvijo dveh spolnih celic, pri čemer je bistvena združitev dveh jeder. Novo nastalo celico imenujemo spojek ali zigota. Jedro zigote ima zato dvakrat tolikšno količino dednega materiala oziroma dvakrat toliko kromosomov kot jedro posamezne spolne celice. Brez procesa, pri katerem se pred združitvijo dveh jeder zmanjša količina dednega materiala na polovico, bi jedra že po nekaj generacijah vsebovala veliko količino dednega materiala. Proces, ki omogoča ohranjanje enake količine dednega materiala iz generacije v generacijo, je delitev jedra, ki jo imenujemo mejoza.

Spolna celica ima vse svoje dedne zapise razporejene na določenem številu kromosomov, ki predstavlja en kromosomski komplet. Položaj dednih zapisov na kromosomih je navadno stalen, kar pomeni, da je določen dedni zapis vedno na določenem mestu vzdolž določenega kromosoma. Jedro spojka vsebuje torej dva, na videz enaka kompleta kromosomov, s tem pa tudi dva dedna zapisa za vsako lastnost. Celica z dvema kromosomskima kompletoma je diploidna celica. V diploidni celici so torej kromosomi v parih. Kromosoma istega para sta enake oblike, enake velikosti in nosita istovrstne dedne zapise v enakem zaporedju. Kromosome, ki se ujemajo v navedenih značilnostih, imenujemo homologni kromosomi. Združitev dveh spolnih celic je prehod s haploidnega na diploidno število kromosomov, mejoza pa omogoča ravno nasprotno. Pri mejozi se število kromosomov zmanjša na polovico.

Za mejozo sta značilni dve zaporedni delitvi, ki ju imenujemo prva (redukcijska) in druga (zoritvena) delitev. Zaporedje mejotskih faz in dogajanja v njih potekajo večinoma podobno kot pri mitozih. V profazi prve mejotske delitve se, kot pri mitozih, kromatin preoblikuje v dolge in tanke dvokromatidne kromosome, ki se postopoma krajšajo in debelijo. Jedrni ovoj se razkroji, jedrce izgine in izoblikuje se delitveno vreteno. Pomembna razlika v primerjavi z mitozo je v tem, da se homologni kromosomi razvrstijo v pare, tako da sta po dva in dva homologna kromosoma drug ob drugem. Dvojico združenih kromosomov imenujemo bivalent, včasih tudi kromatidna tetrada (Stušek in sod., 1998).

Podobno kot pri mitozih ločimo tudi pri obeh mejotskih delitvah štiri faze: profazo, metafazo, anafazo in telofazo prve in druge mejotske delitve. Profaza prve mejotske delitve ali mejoze I je zelo dolga in obsega pet stadijev: leptoten, zigoten, pahiten, diploten in diakinezo. Leptoten je faza, kjer imajo kromosomi obliko tankih niti s prisotnimi kromomerami, ki predstavljajo spiralizirane dele kromosoma. V zigotenu se začne konjugacija - vzdolžno parjenje homolognih kromosomov v bivalente. Bivalenti sestojijo iz enega očetovega in materinega kromosoma, od katerih že vsak sestoji iz dveh kromatid. V pahitenu se konjugacija homolognih kromosomov konča, spiralizacija

kromosomov se poveča, kromosomi se odebelijo. Skupno število kromatidnih tetrad ustreza haploidnemu številu kromosomov (Krajnčič, 2001).

Med kromosomoma v bivalentu se izmenjajo istovrstni (homologni) deli kromatid. To poteka tako, da se kromatidi, ki pripadata različnima kromosomoma, na enakih mestih prekineta in se navzkrižno povežeta z ustreznim delom druge kromatide - kjazme. Tako nastaneta dve kromatidi, ki vsebujeta kombiniran dedni material dveh kromosomov. Proces se imenuje prekrížanje kromatid (crossing - over), pri tem se dedni zapisi enega homolognega kromosoma kombinirajo z dednimi zapisi drugega in poteka v fazi diploten. V fazi diakineza se kromosomi močno skrčijo, odebelijo in ločijo (Krajnčič, 2001).

V metafazi prve mejotske delitve se bivalenti, ki jih gradijo že popolnoma spiralizirani kromosomi, s pomočjo delitvenega vretena uredijo v ekvatorialno ravnino. V anafazi se homologna kromosoma vsakega bivalenta ločita in niti delitvenega vretena ju potegnejo proti nasprotnima poloma. Torej ne potujejo posamezne kromatide kot pri mitozí, temveč celotni dvokromatidni kromosomi. Proti vsakemu polu celice potuje polovica kromosomov. V telofazi se kromosomi despilarizirajo, izoblikuje se jedrni ovoj in končno poteče tudi delitev citoplazme.

V prvi mejotski delitvi se število kromosomov zmanjša na polovično število, z diploidnega na haploidno, zaradi česar imenujemo to delitev redukcijska delitev. Po prvi mejotski delitvi nastaneta dve jedri oziroma celici s haploidnim številom dvokromatidnih kromosomov. Med prvo in drugo mejotsko delitvijo je kratka interfaza, vendar brez faze S. Torej se dedni material ne podvoji kot pri mitozí.

Druga mejotska delitev poteka enako kot mitozá. Delitveno vreteno, ki se oblikuje v profazi, v metafazi povleče dvokromatidne kromosome v ekvatorialno ravnino delitvenega vretena. V začetku anafaze se vsak dvokromatidni kromosom razdeli v dva enokromatidna kromosoma, ki ju delitveno vreteno potegne na nasprotna pola. V telofazi se kromosomi popolnoma despilarizirajo, oblikujeta se jedrce in jedrni ovoj. Pri mejozi torej nastanejo štiri jedra, vsako s haploidnim številom kromosomov (Stušek in sod., 1998; Krajnčič, 2001).

### **2.3.3 Delitev citoplazme**

Delitev citoplazme se začne med anafazo mitoze in se konča med telofazo. Ko se delitev jedra konča, je navadno razdeljena tudi citoplazma. Tako nastaneta dve ločeni hčerinski celici.

Delitev citoplazme rastlinskih celic poteka tako, da se v ekvatorialni ravnini delitvenega vretena začnejo zbirati vezikli, ki izvirajo iz Golgijevega aparata. Ti se med seboj združujejo v celično ploščo, ki se širi od središča celice proti celični membrani in se na koncu z njo združi. Vezikli vsebujejo snovi, ki gradijo osrednjo lamelo celične stene. Pri tem nastaneta dve z membrano ločeni celici, med katerima nastaja vmesna celična stena (Stušek in sod., 1998).

## 2.4 DRUŽINA LUKOVK (Alliaceae)

Družina lukovk je ena največjih rastlinskih družin na svetu (1250 vrst). To so rastline, ki proizvajajo kemične sestavine, ki jim dajejo karakterističen vonj in okus po čebuli in česnu. Rod *Allium* - luk spada v družino Alliaceae, čeprav ga po starejši literaturi umeščajo v družino lilijevk (Liliaceae). Rod *Allium* najdemo v temperaturnih razmerah severne hemisfere, se pa nekatere vrste pojavljajo tudi v Čilu, Braziliji in tropski Afriki.

V rod *Allium* spadajo pomembne vrtnine kot so čebula, šalotka, por, česen in drobnjak. Nekatere vrste iz rodu *Allium* vključno z vrstami *A. cristophii* Trautv., *A. giganteum* Regel se uporabljajo kot mejne rastline zaradi njihovega cvetja in njihovih arhitektonskih lastnosti. Mnogi hibridi z vijoličastimi cvetovi so bili vzgojeni z okrasnim namenom. V nasprotju s tem pa druge vrste (na primer invazivna vrsta *Allium triquetrum* L.) lahko postanejo vrtni pleveli (Cortese, 2002).

## 2.5 SPLOŠNO O MIKROSKOPIRANJU

Mikroskop je optična naprava, sestavljena iz sistema leč, ki ležijo v isti optični osi. Omogoča nam, da opazujemo predmete pod večjim vidnim kotom kot s prostim očesom. Pri mikroskopu ločimo mehanske dele: noga ali podstavek, stojalo za grobo in fino premikanje objektne mizice, tubus, revolver z objektiv, objektno mizico za postavljanje preparatov, dva vijaka za premik preparata in vijak za premik kondenzorja in optične dele: objektiv, okular in kondenzor.

Objektiv je sistem leč kratke žariščne razdalje, ki projicira povečano, realno in obrnjeno sliko predmeta v zgornji del tubusa. Okular, ki je zgrajen iz zbiralne in priočesne leče, deluje kot lupa in posreduje sliko predmeta ponovno povečano in navidezno ali virtualno. V okular je lahko vgrajeno kazalo, katerega konica sega v sredino vidnega polja, in služi kot pripomoček pri demonstraciji določene sestavine v preparatu.

Kondenzor sestoji iz dveh ali treh leč, ki zbirajo in usmerjajo žarke na objekt. Pod kondenzorjem je posebna zaslonka, sestavljena iz pahljačasto nameščenih kovinskih lističev. Z zaslonko uravnavamo količino svetlobe v odvisnosti od povečave in kvalitete preparata. Zrcalo, ki je gibljivo v vseh smereh, ima ravno ali konkavno površino. Kot vir svetlobe se uporablja mikroskopska svetilka, ki je vgrajena v mikroskop. Pri mikroskopih z vgrajeno umetno lučjo zrcala ne potrebujemo. Svetlobne žarke, ki izhajajo iz objekta, objektiv zbere in projicira sliko objekta v ravnino prednjega žarišča okularja. Slika objekta je povečana, realna in obrnjena. Okular deluje kot lupa ter posreduje ponovno povečano in navidezno sliko, ki jo vidimo v oddaljenosti 25 cm od očesa.

Ločljivost mikroskopa je omejena z valovno dolžino svetlobe, ki jo uporabljamo pri mikroskopiranju. Najboljša ločljivost, ki jo s svetlobnim mikroskopom lahko dosežemo, je 0,2  $\mu\text{m}$ . Zato so povečave najboljših svetlobnih mikroskopov med 1500 in 2000 - kratne.

Z opazovanjem celic s svetlobnim mikroskopom so ugotovili, da so rastlinske in živalske celice v mnogočem podobno zgrajene. Po nekaterih značilnostih pa se obe vrsti celic med seboj tudi jasno razlikujeta. Zaradi omenjene ločljivosti tudi z najbolj zmogljivim svetlobnim mikroskopom ne moremo videti struktur, ki so manjše od 0,2  $\mu\text{m}$ . Zato je odkritje elektronskega mikroskopa omogočilo veliko večjo ločljivost, daleč preko zmogljivosti svetlobnega mikroskopa; ločljivost elektronskega mikroskopa je namreč do 1000 - krat večja kot ločljivost svetlobnega mikroskopa. Zato se je od petdesetih let prejšnjega stoletja, ko so elektronski mikroskop začeli uporabljati za raziskave na področju celične biologije, poznavanje zgradbe in delovanje celic zelo izboljšalo (Abramowitz, 1985).

### **2.5.1 Zgradba kromosomov vidna s svetlobnim mikroskopom**

S svetlobnim mikroskopom lahko opazujemo, da so kromosomi v profazi in metafazi sestavljeni iz dveh kromatid, ki so med seboj povezane s centromero. Ob koncu profaze, ko jedrce ali nukleolus in jedrna ovojnica izgineta, do sredine telofaze, je vsaka kromatida zgrajena iz spiralno zavite vrvice, ki je sestavljena iz beljakovin, DNK in ovoja ali matriksa. Kromatide imajo premer 0,2  $\mu\text{m}$  in nastanejo s spiralizacijo kromatinskih niti. Močnejše spiralizirani deli kromatide so kromomere in se pod optičnim mikroskopom vidijo kot temno obarvana zrnca.

V interfazi so kromatinske niti najbolj odvite in najdaljše, vijačnice DNK so najbolj aktivne. Med jedrno delitvijo (mitozo) pa se začno kromatinske niti spiralizirati, s tem tudi krajšati in predstavljajo kromosome. V profazi se vsak kromosom prične deliti v dve kromatidi, ki sta že nekoliko spiralizirani (zaviti). V metafazi pa so kromosomi najbolj

spiralizirani, najkrajši in najdebelejši ter razdeljeni na dve kromatidi. Anafazni kromosom pa že vsebuje po eno kromatido.

Kromosomi so sicer premajhni za natančne raziskave z optičnim mikroskopom in hkrati preveliki in s pregosto strukturo za raziskave z elektronskim mikroskopom. Vse to namreč onemogoča izvedbo specifičnih proučevanj kromosomov v zvezi z njihovo notranjo zgradbo in spiralizacijo (Sinkovič, 2006).

## 2.6 MIKROFOTOGRAFIJA

Včasih so kromosome večinoma prisovali s slike vidne pod mikroskopom. Nato se je začelo fotografirati na način, kjer je bilo potrebno paziti na dolžino ekspozicije, odprtost zaslonke itd. Danes je vse to rešeno s pomočjo fotoavtomatike. V kolikor ni fotoavtomatike, je potrebno narediti več posnetkov z različnimi časi ekspozicije. Veliko boljše je fotografiranje s pomočjo fotoavtomatike, ker se dolžina slikanja določa avtomatsko. Zadostuje en posnetek, vendar je boljše, če se naredi več posnetkov. Pred vsakim posnetkom je potrebno preveriti ostrino slike, ter da sta v sredini vidnega polja vidna dva koncentrična kroga (Petrovič in Vučenović, 1992).

## 2.7 PRIPRAVA MATERIALA ZA PREPOZNAVANJE

### 2.7.1 Fiksiranje

Fiksiranje je proces, katerega namen je zaustaviti in ohraniti celične strukture v stanju, ki je čim bližje naravnemu živlenskemu stanju. Dobro fiksirno sredstvo je tisto, ki najbolj ohrani celično strukturo. V fiksiranem materialu je zelo težko ohraniti stanje podobno kot v živem organizmu. Pomembno je, da se s fiksiranjem doseže to, kar je za določena raziskovanja nujno potrebno, npr: če je potrebno definirati število kromosomov, je važno, da se ti pravilno razporedijo, da se lahko pravilno obarvajo in da je citoplazma svetlejša. Fiksiranje mora ohraniti strukturo kromosomov. Omogočiti pa mora tudi dobro obarvanje preparatov, saj so slabše obarvani preparati lahko rezultat slabega fiksiranja. Najpogosteje se za fiksiranje uporabljajo tekoče mešanice različnih reagentov. Pri izdelavi mešanic je potrebno vedeti, katere reagente lahko kombiniramo. Tako ne smemo kombinirati dveh reagentov z enakimi slabimi lastnostmi.

Pazljivo je potrebno izbrati fiksirno sredstvo, s pomočjo katerega dobimo zelene rezultate in poznati hitrost prodiranja fiksirnega sredstva v celične strukture. Male organizme fiksiramo cele, medtem ko je potrebno večje organizme razdeliti na manjše dele.



Uporabljamo večinoma mešanice različnih reagentov. Teh tekočin je zelo veliko, vendar pa so glavne sestavine formalin, očetna ali kromova tekočina ali pa mešanica teh osnovnih sestavin. Po fiksiranju je potrebno obarvati celične strukture tako, da pride do njihovega diferenciranja, kar olajša in omogoča njihovo proučevanje pod mikroskopom (Petrovič in Vučenović, 1992).

### **2.7.2 Osnove barvanja**

Celični organi se po fiksiranju le malo razlikujejo v lomnem količniku svetlobe, zato je opazovanje različnih celičnih struktur pod mikroskopom oteženo. Pomembno je, da se po fiksiranju izvede barvanje celičnih struktur, s čimer pride do njihovega razločevanja in možnosti opazovanja pod mikroskopom. Različni rastlinski organi se različno obarvajo, sposobnost obarvanja pa je odvisna tudi od načina fiksiranja kot tudi od predhodne priprave preparata.

Acetokarmin je barvilo, ki se uporablja in je posebno primerno za barvanje kromosomov. Redno se ga uporablja v raziskavah za določanje stadija delitve celic ter za pregled kromosomov kot tudi za pregled trajnih preparatov (Petrovič in Vučenović, 1992).

### **2.7.3 Jemanje materiala**

Pripravljen material za preiskavo se nahaja v odgovarjajočem stadiju delitve. Določi se izdelava začasnega acetokarminskega preparata. Pri čemažu uporabljamo cvetne popke.

Cvetni popki se fiksirajo 24 h. Nato popke izperemo v destilirani vodi in jih prestavimo v 70 % etilni alkohol. Tako pripravljen material lahko stoji nekaj minut, lahko pa tudi do nekaj mesecev. V primeru, da material hranimo dlje časa, ga moramo hraniti v hladilniku. Lahko fiksiramo le posamezne antere (Petrovič in Vučenović, 1992).

### **2.7.4 Priprava materiala in izdelovanje preparatov**

Material, ki se nahaja v hladilniku, prestavimo v petrijevko. Z dvema iglama vzamemo cvetni popek in nato antero zmečkamo tako, da se vse celice razporedijo v kapljici acetokarmina. Potem se vsi odvečni deli antere odstranijo, preparat pa se pokrije s krovnim steklom, nato pa ga blago segrevamo nad plamenom gorilnika. S segrevanjem se preparat intenzivneje obarva; z izparevanjem acetokarmina se krovno steklo čvrsto prilepi na predmetno stekelce.

Preparat moramo potrebno pazljivo segrevati, da ne počrni ali da ne počí steklo. Pripravljen preparat postavimo na mikroskopsko mizico in začnemo z mikroskopiranjem (Petrovič in Vučenović, 1992).

### **2.7.5 Analiza preparata**

Za prepoznavanje faz mejoze uporabimo sveže preparate. Analiza se izvaja na celicah, ki imajo kompletno število kromosomov za rastlino, ki jo analiziramo. Za en preparat je potrebno analizirati več celic (Petrovič in Vučenović, 1992).

### **2.7.6 Pribor za izdelovanje preparatov**

Za izdelavo preparatov moramo imeti najmanj tri kadi, stekleničko s pokrovčkom, kapalko in pinceto. Kadi za preparate, ki so lahko steklene ali plastične, morajo obvezno imeti pokrov in pregrade za preparate. Steklenička s pokrovčkom mora imeti širše grlo. Tako kapalka kot tudi paličica morata biti stekleni. Steklenička mora biti ves čas zaprta.

Potrebne kemikalije so očetna kislina, absolutni etilni alkohol in destilirana voda. Poleg kemikalij potrebujemo tudi filtrirni papir, ki mora biti hrapavo grob, ker ima boljšo vpojnost. Izdelan preparat lahko pregledamo pod mikroskopom.

Najmanj 24 ur moramo preparat pustiti, da se osuši, še boljše pa je, če ga pustimo nekaj dni ali tednov. Med sušenjem se morajo preparati nahajati na ravni površini in na odprtem mestu. Prvih nekaj dni jih moramo pustiti na filtrirnem papirju na mizi, nato pa jih lahko shranimo v deloma zaprtih škatlah, ki morajo stati na ravni površini. Pokrov škatle se ne sme dotikati krovnega stekelca. Preparati so popolnoma suhi šele čez nekaj mesecev (Petrovič in Vučenović, 1992).

### **2.7.7 Čiščenje in shranjevanje preparatov**

Pred analiziranjem preparatov morajo biti objektna in krovna stekelca dobro očiščena. Željeno je, da se preparati pred čiščenjem čim bolj osušijo. Za čiščenje se uporablja absolutni etilni alkohol; papirno vato nekoliko navlažimo in s tem pazljivo obrišemo preparat.

Očiščene preparate je potrebno zložiti v ustrezne vrste v posebne škatle, omarice ali fascikle. Škatle je potrebno ustrezno označiti, tako da oznake beležijo vsebino in vrstni red materiala, shranjenega v škatlah (Petrovič in Vučenović, 1992).

### 3 MATERIAL IN METODE DELA

#### 3.1 IZVEDBA POSKUSA

Analiza, pri kateri smo proučevali cvetne popke čemaža, je potekala na Katedri za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko Oddelka za agronomijo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Po nabiranju cvetnih popkov je sledilo fiksiranje rastlinskega materiala v Carnoa fiksativu, ki smo ga po enem dnevu zamenjali s 70 % etanolom.

Na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete v Ljubljani smo 5. marca 2008 prvič nabrali cvetne popke in jih dali v stekleničke s sveže pripravljenim fiksirjem. Popki brez peclja so bili dolgi 2 cm, popki s pecljem pa od 1,5 do 2 cm. Nato smo stekleničke prenesli v hladilnik s temperaturo 4 stopinje C, kjer so ostale en mesec. Vzorce smo nabirali tedensko in zaključili z nabiranjem 16. aprila 2008.

Preparate smo izdelali po naslednjem vrstnem redu:

- Cvetne popke čemaža smo odprli v petrijevki.
- Nato smo prašnice pogledali pod lupo.
- Antere smo položili na objektno steklo, čez katero smo kanili dve do tri kapljice acetokarmina.
- Nato smo jih pokrili s krovnim steklom.
- S topim delom svinčnika smo potolkli krovna stekla preko filter papirja.
- Odvečno barvilo smo popivnali s filter papirjem.
- Preparate smo pogreli na gorilniku.
- Tako pripravljene preparate pa smo pogledali z raziskovalnim mikroskopom znamke Olympus Provis pri 400 - kratni povečavi.
- Pri preparatih, kjer so bile dobro vidne diade, tetrade in preparatih, kjer so bile dobro vidni bivalenti, je temu sledilo še slikanje preparatov.
- Slikanje preparatov smo izvedli z digitalno kamero.

Posamezni vzorec je vseboval do 20 cvetnih popkov čemaža. Cvetne popke smo razdelili v 25 stekleničk.

### 3.1.1 Vremenske razmere

Leto 2008 je bilo toplejše od dolgoletnega povprečja.

V mesecu marcu je povsod v Sloveniji padlo več padavin kot običajno in tudi sončnega vremena je bilo meseca marca manj kot v dolgoletnem povprečju. April je bil toplejši od dolgoletnega povprečja.

Padavine so opazno presegle dolgoletno povprečje, čeprav jih je bilo na vzhodu države manj kot običajno. V letu 2008 je bilo največ padavin v zahodni Sloveniji in sicer nad 2000 mm. Najmanj padavin, pod 100 mm, pa je padlo v severovzhodnem delu Slovenije. V Ljubljani so namerili 1490 mm, kar je za 7 % več od dolgoletnega povprečja.

Leta 2008 je bilo v Ljubljani nadpovprečno trajanje sončnega obsevanja. Sonce je sijalo 1824 ur, kar je za 7 % več od dolgoletnega povprečja (Agencija RS za okolje, 2008).

### 3.2 METODE DELA

Za vzorce smo pripravili 25 stekleničk s pokrovčkom, v katere smo vložili cvetne popke čemaža različnih dolžin. Vsaka steklenička je vsebovala po 20 cvetnih popkov, ki so bili dolgi do 2,5 cm. V stekleničko smo dodali fiksir: etanol in očetno kislino v razmerju 3 : 1. Po fiksiranju smo preparate obarvali z acetokarminom. Na sliki 1 je prikaz stekleničk s cvetnimi popki, na slikah 2, 3, 4 in 5 je prikaz rastišča čemaža.



Slika1: Laboratorijski vzorci cvetnih popkov čemaža v stekleničkah



Slika 2: Rastišče čemaža na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete 1. teden v marcu



Slika 3: Rastišče čemaža na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete 2. teden v marcu





Slika 4: Rastišče čemaža na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete 3. teden v marcu



Slika 5: Rastišče čemaža na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete 4. teden v marcu

### **3.2.1 Hranjenje vzorcev**

Stekleničke z vzorci smo shranili v hladilniku pri 4 stopinjah C.

Mečkance anter smo opazovali enkrat tedensko v botaničnem laboratoriju.

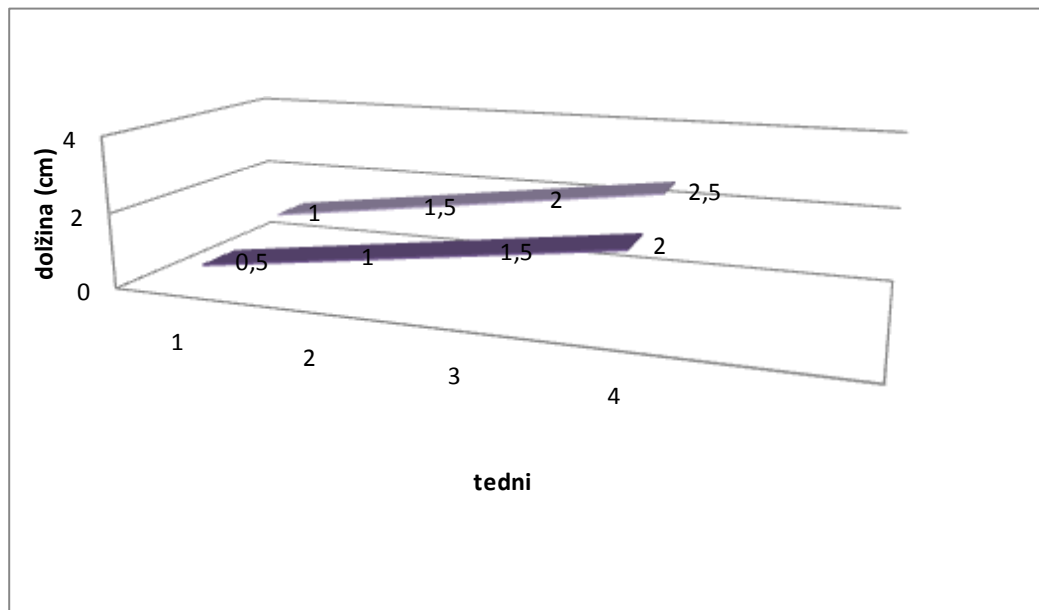
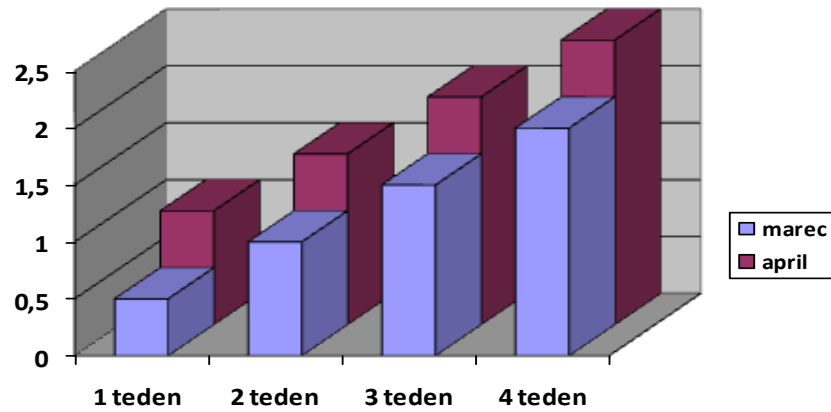
## 4 REZULTATI

### 4.1 RAZVOJ POPKOV

Na preglednici 1 in na sliki 6 je prikazan razvoj - povprečna dolžina popkov pri čemažu v mesecu marcu in aprilu.

Preglednica 1: Povprečna dolžina popkov pri čemažu

	<b>1. teden</b>	<b>2. teden</b>	<b>3. teden</b>	<b>4. teden</b>
<b>Marec</b>	<b>0,5 cm</b>	<b>1 cm</b>	<b>1,5 cm</b>	<b>2 cm</b>
<b>April</b>	<b>1 cm</b>	<b>1,5 cm</b>	<b>2 cm</b>	<b>2,5 cm</b>



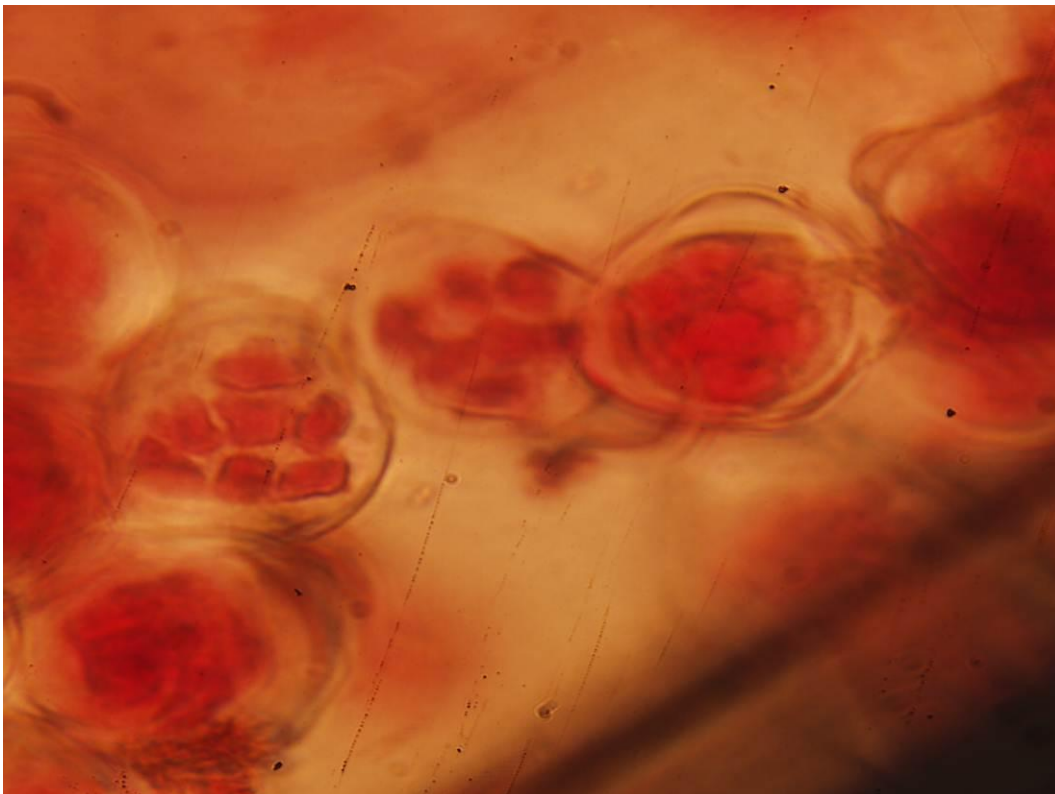
Slika 6: Razvoj popkov pri čemažu (*Allium ursinum* L.) - povprečna dolžina v mesecu marcu in aprilu (1., 2., 3., 4. teden), zgoraj- stolpičasti prikaz, spodaj - linearni prikaz



## 4.2 PARJENJE HOMOLOGNIH KROMOSOMOV V BIVALENTE

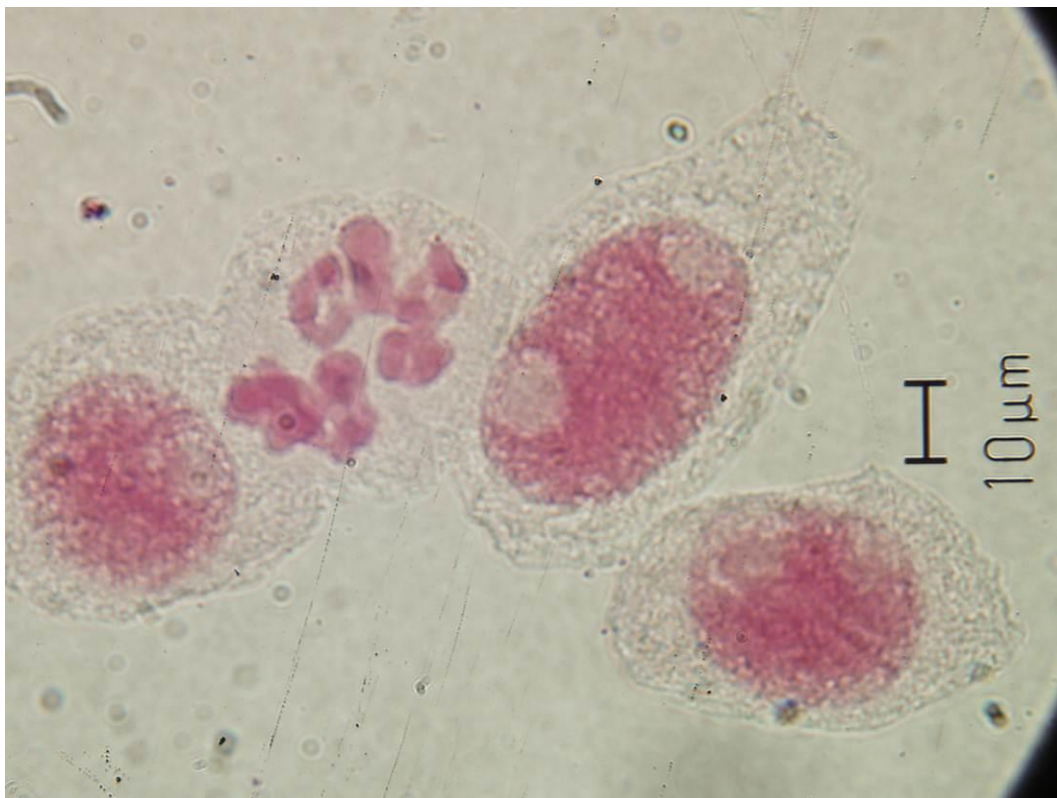
Spodaj navedeni rezultati prikazujejo mejotske stadije pri začasnih preparatih, ki smo jih opazovali s svetlobnim mikroskopom znamke Olympus Provis pri 400 - kratni povečavi. Rezultati so sestavljeni iz treh delov, kjer se vidijo mejotske faze s prikazom bivalentov, anafaze, ter diad in tetrad.

Prvo opazovanje parjenja homolognih kromosomov v bivalente (to poteka v prvi redukcijski delitvi ali mejozi I, v fazi profaze, v zigotenu) je bilo opazovanje vzorcev nabranih 14. 3. 2008. Slika 7 prikazuje preparat cvetnih popkov čemaža, barvanih z acetokarminom, v fazi mejoze I. Vidni so bivalenti homolognih kromosomov.



Slika 7: Mejotski stadiji pri čemažu. Vidni so bivalenti, cvetni popki so bili nabrani 14. 3. 2008

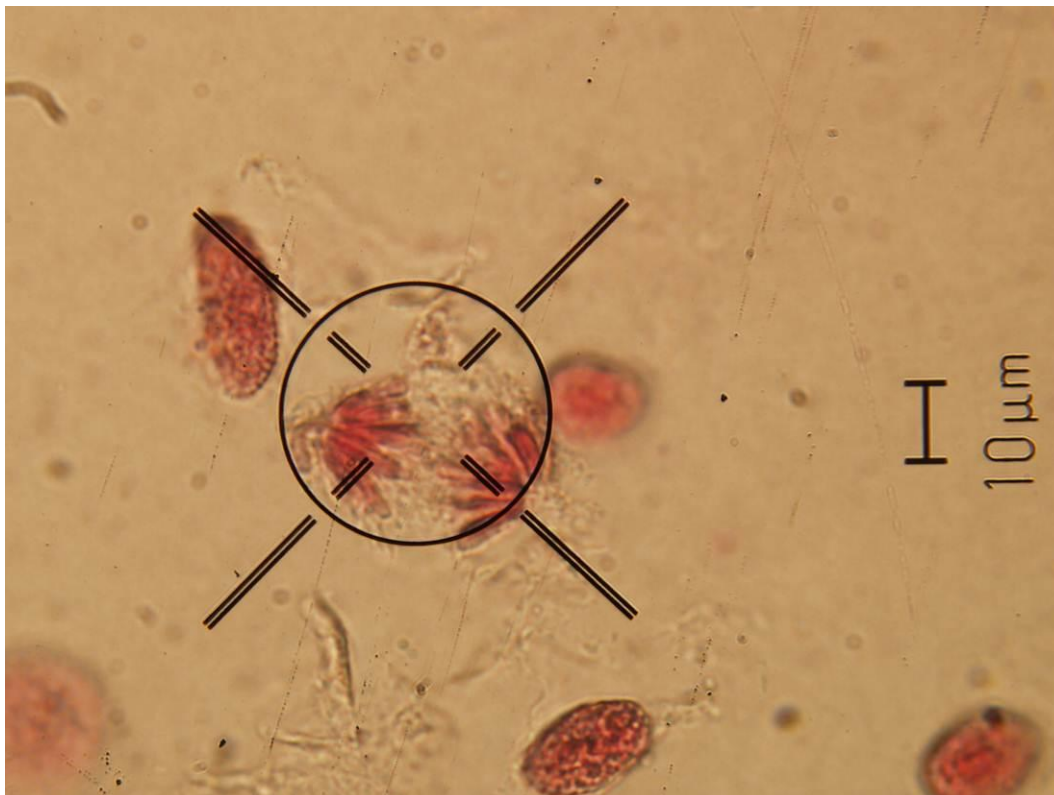
Mejotski stadij, v katerem vidimo bivalente je diakineza. V tej fazi so vidni sparjeni homologni kromosomi v bivalente. Bivalenti so sestavljeni iz očetovega in materega homolognega kromosoma, od katerih je vsak sestavljen iz dveh kromatid. Med sparjenimi homolognimi kromosomi, kjer sta dva in dva homologna kromosoma drug ob drugem, se tvori paritveni kompleks, sinaptonema, kar je prikazano na sliki 8.



Slika 8: Mejotski stadiji pri čemažu, bivalenti. Cvetni popki so bili nabrani 17. 3.2008

#### 4.3 LOČEVANJE HOMOLOGNIH KROMOSOMOV V ANAFAZI PRVE MEJOTSKE DELITVE

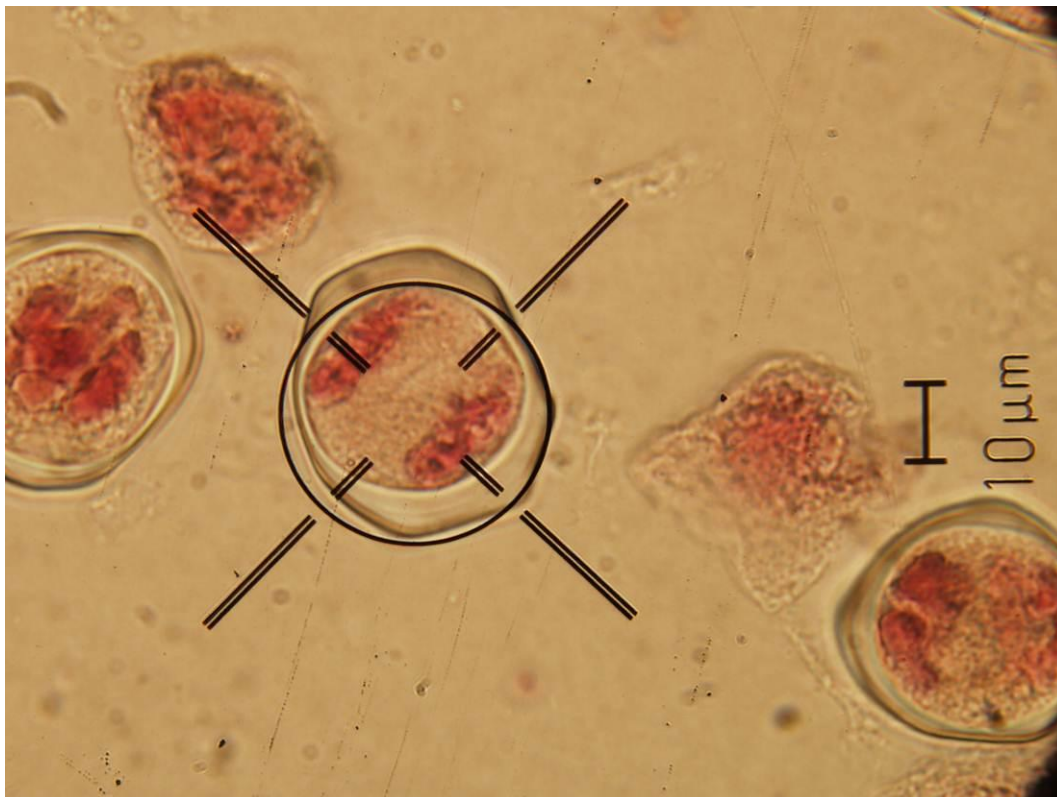
Kromosome anafaze I smo opazovali in slikali pri preparatih nabranih dne 25. 3. 2008, kar je prikazano na sliki 9. Na pripravljenem preparatu - mečkancu se vidi anafaza, kjer pride do dejanske redukcije kromosomskega števila ( $2n = 14$ ,  $n = 7$ ), pri čemer se ločijo celi kromosomi.



Slika 9: Mejotski stadiji pri čemažu. Vidna je anafaza prve zoritvene delitve. Cvetne popke smo nabrali 25. 3. 2008

#### 4.4 RAZVRŠČANJE HOMOLOGNIH KROMOSOMOV V PARE, CELIČNE DIADE

Naslednji opazovani in slikani preparati so bili vzorčeni 3. 4. in 9. 4. 2008. Na preparatih smo opazovali diade (slika 10 in slika 11) in tetrade (slika 11). Celična diada je faza, pri kateri se pričneta oblikovati dve haploidni celici kot rezultat mejoze I, celična tetrada pa je faza druge zoritvene delitve ali mejoze II, v kateri iz dveh haploidnih celic nastanejo štiri haploidne celice.



Slika 10: Mejotski stadiji pri čemažu, diade. Cvetni popki so bili nabrani 3. 4. 2008





Slika 11: Mejotski stadiji pri čemažu. Vidne so diade in tetrade. Cvetni popki so bili nabrani 9. 4. 2008

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Pri diplomski nalogi smo izvedli analizo nastajanja peloda s cvetnimi popki čemaža različnih dolžin. Namen naloge je bil priprava ustreznih mikroskopskih preparatov te rastline s ciljem opazovati ter spremljati različne mejotske faze v cvetnih popkih. Poskus smo izvedli tako, da smo pod svetlobnim mikroskopom opazovali mečkance anter.

Z našo raziskavo smo ugotovili, da na prepoznavanje mejotskih stadijev vplivajo dobro narejeni preparati. Cvetni popki čemaža, ki smo jih opazovali s svetlobnim mikroskopom, so bili tudi primerno razviti. Na mikroskopskih preparatih, ki so bili barvani z acetokarminom, so se pri poskusu dobro videli bivalenti, anafaza I, celične diade in tetrade.

Do podobnih ugotovitev je prišel tudi W. Kaspik (2003). Spremljal je različne mejotske faze v anterah čemaža (*Allium ursinum*,  $2n = 14$ ). Na preparatih so bili vidni bivalenti, iz česar lahko sklepamo, da je bila mejoza razvidna v fazah: zigoten/pahitena z vidnim homolognim kromosomom, diploten s še bolj odebeljenimi kromatidami - tetradami, diakineza, z odebelitvijo in skrčenjem kromosomov (spiralizacijo) in ločevanjem. Vidne so bile tudi: metafaza I z razporeditvijo kromosomov v ekvatorialni ravnini, metafaza II in anafaza II. Preparati so bili v tem poskusu barvani z acetokarminom in opazovani s fazno-kontrastno mikroskopijo.

Louis in Borts (2003) sta ugotovila, da je delitev mejotskih celic proces, pri katerem se ločijo homologni kromosomi in preidejo v haploidne celice. Pravilna segregacija kromosomov v mejozah je posledica redukcije njihovega števila ( $2n = 14$ ,  $n = 7$ ), kar je odvisno od njihove uspešne razporeditve v rekombinacijah (crossing - over). Ta proces vključuje množico kromosomskih kombinacij in DNK interakcij oziroma povezav.

S citogenetskimi raziskavami so ugotavljali tudi mejotske nepravilnosti, ki lahko vplivajo na plodnost semen. Tako so Bione in sod. (2000) ugotovili pri soji razmeroma majhno pojavnost mejotskih nepravilnosti. Citogenetske raziskave pri soji namreč niso pogoste, kar je predvsem posledica majhne velikosti njenih kromosomov in precejšnje podobnosti med kromosomi. Rezultati v zvezi z mejotskimi nepravilnostmi so pokazali, da ima 15 različnih variacij soje, ki rastejo na območjih dveh regij v Braziliji, majhno pojavnost mejotskih nepravilnosti, ki pa niso bile enakomerno razporejene med opazovanimi variacijami soje. Mejotske nepravilnosti, ki so jih avtorji zasledili na preparatih barvanih

z acetokarminom, so bile: nepravilnosti v kromosomski segregaciji, v kromosomskih stikih, v citoplazmatskih povezavah med celicami in nepravilnih vretenih.

Mejotske nepravilnosti sta pri lilijah, pri katerih se le te pojavljajo pogosto, spremljala tudi Sanso in Wulf (2007). O možnostih poprave rekombinantne DNK pa so poročali Smith (2004) ter Shrivastav s sod. (2008), kar naj bi bil ključen proces pri preživetju in popravi okvarjenih celic.

Kijazme so mesta, kjer so potekale izmenjave med homolognimi kromosomi, tako da se kromatida enega homolognega kromosoma na enem ali več mestih križa s kromatido drugega homolognega kromosoma. Na teh mestih se izmenjujejo deli med kromosomom očeta in matere. Z novo kombinacijo dednega materiala (crossing - over) se spremeni genetska sestava kromosomov. Kijazme so vidne v fazi mejoze I, v diplotenu, in so rezultat rekombinacije dveh nesestrskih kromatid v bivalentih in pri vitalnih celicah držijo kromosome skupaj (Dawe, 1998).

Tudi Petronczki in sod. (2003) so poročali, da je mejoza proces, ki temelji na natančni redukciji števila kromosomov. Medtem ko pri mitozii nastanejo diploidne hčerinske celice iz diploidnih celic, pa mejoza tvori haploidne celice iz diploidnih prekursorjev. Med pomembnimi značilnostmi mejoze, ki omogoča pravilno redukcijo števila kromosomov, je proces rekombinacije in tvorbe kijazem med homolognimi kromosomi. Naranjo s sod. (1998) pa so poročali o pomembnih razlikah med mejotskim procesom pri vrsti *Vicia graminea* glede na ostale vrste. Ta vrsta je imela med petimi južnoameriškimi vrstami (*Vicia*) iz družine Fabaceae, ki so jih proučevali, manjšo pojavnost kroglastih bivalentov in kijazem na celico, prav tako pa tudi manjšo pojavnost intersticijskih kijazem.

Wilkins in Holliday (2009) sta ugotovila, da je redukcijski proces mejoze bistven za cikel spolnega razmnoževanja. Izvor mejoze še vedno postavlja veliko vprašanj in povzroča različne razprave. Po mnenju raziskovalcev je skoraj popolnoma verjetno, da mejoza izhaja iz mitoze. Od mitoze se mejoza loči po naslednjih fazah: parjenje homolognih kromosomov, pojav izrazite rekombinacije med nesestrskimi kromatidami med parjenjem, onemogočenje ločitve sestrskih kromatid med prvo mejotično delitvijo in odsotnost kromosomskega podvojevanja med drugo mejotično delitvijo. Vse to ima za posledico, da mejoza vpliva na intergensko rekombinacijo in nudi nove različice za selekcijo. Vse to pa naj bi bila pomembna stopnja pri nastanku evkariontskih celic.

## 5.2 SKLEPI

Vlaganje cvetnih popkov čemaža (anter) v Carnoa fiksativu je enostaven in hiter način za fiksacijo rastlinskega materiala. Izdelava takih mikroskopskih preparatov ne predstavlja obremenitve za okolje, hkrati pa so preparati dovolj dobri za opazovanje različnih stadijev mejoze. Prav tako je to ustrezen način za pripravo začasnih preparatov. Mikroskopske preparate smo barvali z acetokarminom.

Poskus je pokazal, da je mejoza vidna v mladih prašnicah (anterah) cvetnih popkov čemaža.

S poskusom smo ugotovili, da se v zelo kratkem časovnem obdobju dveh do treh tednov, v mesecu marcu in aprilu, in ob dobro narejenih preparatih, vidijo nekateri stadiji mejoze. Pod raziskovalnim mikroskopom smo opazovali bivalente v prvi - redukcijski delitvi ali mejozi I: v profazi (zigoten in diakineza) in anafazi. Diade smo opazovali kot rezultat mejoze I in tetrade kot rezultat druge - zoritvene delitve ali mejoze II.

Na osnovi rezultatov lahko zaključujemo, da so bili nabrani cvetni popki v obdobju meseca marca in aprila (skupaj obdobje treh tednov), ko so bile tudi ugodne vremenske razmere, primerno razviti in primerno dolgi za opazovanje mejotskih stadijev čemaža.



## 6 POVZETEK

Čemaž je kritosemenka in enokaličnica, ki jo uvrščamo v družino lukovk (Alliaceae). V zadnjem času postaja čemaž za različne namene vedno bolj priljubljena rastlina. Vsebuje veliko vitaminov, mineralov, rudninskih snovi, zaradi česar se ga uporablja bodisi kot zdravilno rastlino, je pa tudi odličen dodatek k jedem ali k različnim dietam.

Namen predstavljene diplomske naloge je bil proučiti, kako prepoznavamo mejozo v različnih fazah čemaža (*Allium ursinum* L.). S svetlobnim mikroskopom smo opazovali različno dolge in različno razvite cvetne popke. Antere (prašnice) smo po fiksiranju s Carnoa fiksativu obarvali z acetokarminom.

Poskusne rastline so rasle na laboratorijskem polju Biotehniške fakultete v Ljubljani. Preparate in slike smo izdelali v botaničnem laboratoriju Biotehniške fakultete v Ljubljani na Katedri za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko.

Vsaka zrela spolna celica ima haploidno število kromosomov glede na somatske celice. Kromosomi so po obliki, velikosti in dednih zasnovah različni, saj vsebuje vsak kromosom različne gene. Pri redukcijski delitvi se poleg redukcije števila kromosomov opravi tudi zamenjava in nova kombinacija genov med homolognimi kromosomi očetove in matrine rastline. Pri mejozi potekata dve delitvi: prva - redukcijska delitev ali mejoza I, pri kateri nastaneta iz ene diploidne celice dve haploidni celici. Tej fazi sledi druga - zoritvena delitev ali mejoza II. Pri tem nastanejo iz dveh haploidnih celic štiri haploidne celice.

V poskusu smo pripravili 25 stekleničk s po 20 cvetnimi popki, ki smo jih v razmerju 3 : 1 etanola in očetne kisline fiksirali. Antere mečkancev iz cvetnih popkov čemaža, ki smo jih nabrali v obdobju treh tednov v mesecu marcu in aprilu, smo opazovali in slikali z raziskovalnim mikroskopom znamke Olympus Provis pri 400 - kratni povečavi.

Na pripravljenih mikroskopskih preparatih smo opazovali naslednje mejotske faze, bivalente: profaza I (zigoten, diakineza), anafaza I, diade (telofaza I) in tetrade (telofaza II). Preparati s prej opisanim postopkom so bili dobro pripravljene, saj so se dobro videle omenjene faze. Prav tako so bili cvetni popki, ki smo jih nabrali, v kratkem obdobju meseca marca in aprila, ko so bili tudi ugodne vremenske razmere za rast čemaža, primerno razviti in primerno dolgi.

Zaključujemo, da je uporabljena metoda priprave preparatov, ki je razmeroma enostavna in hitra, ustrezna za pripravo začasnih preparatov, na katerih lahko proučujemo mejotske faze čemaža.

## 7 VIRI

- Abramowitz M. 1985. Microscope basis and beyond. Lake Success, NY, Olympus Corporation, Precision Instrument Division: 26 str.
- Agencija Republike Slovenije za okolje. 2008. Meteorološki letopis 2008. ([http://www.arso.gov.si/podnebje/meteorološki letopis /2008/klima.pdf](http://www.arso.gov.si/podnebje/meteorološki%20letopis/2008/klima.pdf), maj 2010)
- Ašič S. 2007. Domača lekarna patra Simona Ašiča. Priročnik za nabiranje zdravilnih rastlin. Celje, Mohorjeva družba: 224 str.
- Bione N.C.P., Pagliarini M.S., Ferraz de Toledo J.F. 2000. Meiotic behavior of several Brazilian soybean varieties. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 3: 623- 631
- Cortese D. 2002. Čemaž: okus divjine. *Gea*, 12, 4: 66-67
- Dawe R.K. 1998. Meiotic chromosome organization and segregation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49: 371-395
- Kaspik W. 2003. Different meiotic stages in anthers of ramsons (*Allium ursinum*,  $2n = 14$ ) stained with acetic acidcarmine, phase contrast microscopy <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e09/meiose.htm> (25.5.2010)
- Krajncič B. 2001. Botanika. Razvojna in funkcijska morfologija z anatomijo. Tretja, izpopolnjena izdaja. Maribor, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo: 452 str.
- Louis E.J., Borts R.H. 2003. Meiotic recombination: too much of dispatch a good think? *Current Biology*, 13: R953- R955
- Naranjo C.A., Ferrari MR., Palermo AM., Poggio L. 1998. Karyotype, DNA content and meiotic behaviour in five South American species of *Vicia* (Fabaceae). *Annals of Botany*, 82: 757-764
- Petronczki M., Siomons MF., Nasmyth K. 2003. The molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell*, 112: 423-440

- Petrović S., Vučenović M. 1992. Praktikum iz citogenetike. Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet: 86 str.
- Sanso A.M., Wulf A.F. 2007. Meiotic irregularities in *Alstoemeria andina* var. *Venustula* (Alstroemeriaceae). *Botanical Studies*, 48: 311-317
- Shrivastav M., De Haro L.P., Nickoloff J.A. 2008. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Research*, 18: 134-147
- Sinkovič T. 2006. Botanika. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 217 str.
- Smith K.C. 2004. Recombinational DNA repair: the ignored repair systems. *BioEssay*, 26: 1322-1326
- Stušek P., Podobnik A., Gogala N. 1998. Biologija 1 - Celica. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 122 str.
- Wilkins A.S., Holliday R. 2009. The Evolution of meiosis from mitosis. *Genetics*, 181: 3-12
- Wraber T. 1990. Sto znamenitih rastlin na Slovenskem. Ljubljana, Prešernova družba: 239 str.

## **ZAHVALA**

Ob zaključku svojega dela se iskreno zahvaljujem svojemu mentorju višjemu predavatelju mag. Tomažu Sinkoviču za vso strokovno pomoč, razumevanje in vse koristne nasvete pri praktičnem in teoretičnem delu diplomske naloge.

Prav tako se iskreno zahvaljujem prof. dr. Zlati Luthar in prof. dr. Francu Batič za vse njune strokovne nasvete pri pisanju tega dela.

Posebno zahvalo dolgujem mojim staršem in starim staršem za podporo in zaupanje.

Zahvaljujem pa se tudi vsem sorodnikom in prijateljem, ki so mi na kakršen koli način pomagali v času študija in pri nastajanju tega dela.