

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Janez KOSEL

BIOTEHNOLOŠKI POSTOPKI ZA KALITEV IN *IN VITRO* DOZOREVANJE PELODA BEZGA (*Sambucus nigra* L.)

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Janez KOSEL

**BIOTEHNOLOŠKI POSTOPKI ZA KALITEV IN *IN VITRO*
DOZOREVANJE PELODA BEZGA (*Sambucus nigra* L.)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**BIOTECHNOLOGICAL PROCEDURES FOR GERMINATION AND
IN VITRO MATURATION OF ELDERBERRY POLLEN (*Sambucus
nigra* L.)**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biotehnologije. Opravljeno je bilo na Univerzi v Ljubljani, Biotehniški fakulteti, Oddelku za agronomijo, Katedri za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin.

Študijska komisija Oddelka za biotehnologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. BOHANEČ Boruta, za somentorico pa dr. VIZINTIN Lilijano.

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
- Članica: dr. Lilijana VIZINTIN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,
Oddelek za agronomijo
- Članica: prof. dr. Jana ŽEL
Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo,
Nacionalni inštitut za biologijo

Datum zagovora:

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

Janez KOSEL

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 634.747:57.086.83:57.085.2(043.2)
KG	Črni bezeg/ <i>Sambucus nigra</i> /pelod/ <i>in vitro</i> kulture/zorenje/ mikrospore/kalitev zrelega peloda
KK	AGRI F30
AV	KOSEL, Janez,
SA	BOHANEČ, Borut (mentor)/VIŽINTIN, Lilijana (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2009
IN	BIOTEHNOLOŠKI POSTOPKI ZA KALITEV IN <i>IN VITRO</i> DOZOREVANJE PELODA BEZGA (<i>Sambucus nigra</i> L.)
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 43, [3] str., 10 pregl., 7 sl., 2 pril., 96 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Ker bezeg (<i>Sambucus nigra</i>) postaja vedno bolj pomembna rastlina v raziskavah preventivne medicine, je bil cilj našega dela optimizacija postopkov <i>in vitro</i> kalitve in zorenja bezgovega peloda. Najprej smo določevali razvojno stopnjo mikrospor in peloda, pri čemer smo barvali z naslednjimi barvili: 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), acetokarmin in propidijev jodid (PI). Metoda barvanja s PI se je izkazala za najbolj uspešno tako za zrel kot nezrel pelod. Živost peloda smo uspešno preverjali preko metode barvanja z 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil-tetrazolijevim bromidom (MTT). <i>In vitro</i> kalitev zrelega peloda smo preizkušali v različnih gojiščih, tako v suspenzijski kulturi kot na stekelcih, vendar so bili najboljši rezultati dobljeni le v suspenzijski kulturi gojišča pripravljene po Brewbaker – Kwacku (BK) v petrijevih ploščah. Po optimizaciji pH vrednosti in sladkorja v gojišču smo ugotovili, da lahko kalivost zrelega peloda močno pospešimo s stresanjem petrijevih plošč na stresalniku. S tem smo ovrgli hipotezo nekaterih raziskovalcev, ki so trdili, da pelod črnega bezga ne more kaliti takoj oziroma, da potrebuje zato minimalno dve uri časa. Nadalje smo preučili možnost <i>in vitro</i> zorenja enojedrnih mikrospor v različnih gojiščih, od katerih sta bila primerna le spremenjeno gojišče BK in gojišče pripravljeno po Brewbaker – Kwack – Kosel (BKK) s pH vrednostjo 5,5. Čeprav so bile kalivosti <i>in vitro</i> dozorelega peloda nizke, smo v teh dveh gojiščih opazili tudi številne razlike v sami velikosti mikrospor. Poskuse smo zaključili z določitvijo časovnega poteka razvoja enojedrnih mikrospor med <i>in vitro</i> zorenjem v gojišču BKK s pH 5,1 oziroma pH 5,5. V gojišču s pH vrednostjo 5,1 smo dosegli do 64 % kalivost. Po našem vedenju je to prvi uspešni poskus <i>in vitro</i> zorenja enojedrnih mikrospor vrste <i>Sambucus nigra</i> .

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 634.747:57.086.83:57.085.2(043.2)
CX	elderberry/ <i>Sambucus nigra</i> /pollen/ <i>in vitro</i> culture/maturation/ microspores/germination of mature pollen
CC	AGRIS F30
AU	KOSEL, Janez,
AA	BOHANEČ, Borut (supervisor)/VIŽINTIN, Lilijana (co-supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Program in Biotechnology
PY	2009
TI	BIOTECHNOLOGICAL PROCEDURES FOR GERMINATION AND <i>IN VITRO</i> MATURATION OF ELDERBERRY POLLEN (<i>Sambucus nigra</i> L.)
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	X, 43, [3] p., 10 tab., 7 fig., 2 ann., 96 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	The aim of this thesis was to optimize the procedure for <i>in vitro</i> germination and maturation of elderberry pollen, the elderberry (<i>Sambucus nigra</i> L.) being an ever more important plant in preventive medicine research. As a first step, the development stage of the microspores and pollen was assessed by staining with different dyes such as 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), acetocarmine and propidium iodide (PI). The staining method with PI proved to be the most successful so for the case of mature as immature pollen. The viability of the pollen was successfully verified by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) staining method. <i>In vitro</i> germination of mature pollen was tested in different growth media in suspension culture and on glass microscope slides, however the best results were achieved in Brewbaker – Kwack (BK) growth suspension medium in petri dishes. After the optimization of pH value and sugar in the growth medium, it was found that the germination of the mature pollen can be substantially accelerated by incubating petri dishes on a laboratory rotator. This fact seems to refute the hypothesis made by some researchers that the elderberry pollen cannot germinate right away i.e. it needs a minimum time of 2 hours for that. In the continuation the <i>in vitro</i> maturation of uninucleate microspores was tested in different growth media from which only the modified BK and Brewbaker – Kwack – Kosel (BKK) growth medium with a pH value 5.5 proved to be suitable. Although the germination rates of <i>in vitro</i> matured pollen were relatively low, a number of differences were noted in the size of microspores in these two growth media. Finally the time development scale of uninucleate microspores during the <i>in vitro</i> maturation process in the BKK medium with pH 5.1 and pH 5.5 was observed. In the growth medium with pH 5.1 a 64% germination rate was achieved. According to available literature, this is the first successful attempt of <i>in vitro</i> maturation of uninucleate microspores of the species <i>Sambucus nigra</i> .

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	IX
Okrajšave in simboli	X
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZGODOVINA ČRNEGA BEZGA	3
2.2 ČRNI BEZEG V MEDICINI	3
2.3 TAKSONOMSKA UVRSTITEV BEZGA	4
2.4 BIOLOGIJA BEZGA	4
2.5 RAZVOJ PELODA	5
2.6 ŽIVOST PELODA	7
2.7 KALITEV ZRELEGA PELODA V <i>IN VITRO</i> POGOJIH	7
2.8 ZORENJE PELODA V <i>IN VITRO</i> POGOJIH	10
3 MATERIAL IN METODE	12
3.1 MATERIAL	12
3.2 METODE	12
3.2.1 Priprava gojišč	12
3.2.2 Določanje razvojne stopnje mikrospor	12
3.2.2.1 Barvanje z DAPI	13
3.2.2.2 Barvanje z acetokarminom	13
3.2.2.3 Barvanje s propidijevim jodidom	13
3.2.3 Določanje živosti zrelega peloda in mikrospor	13
3.2.3.1 Barvanje z MTT	14
3.2.4 Metode <i>in vitro</i> kalitve zrelega peloda	14
3.2.4.1 Optimizacija inkubacije	15
3.2.4.1.1 Optimizacija inkubacije na stekelcih	15
3.2.4.1.2 Optimizacija inkubacije v suspenzijski kulturi	16
3.2.4.2 Optimizacija gojišča	16
3.2.4.3 Preverjanje gojišč za <i>in vitro</i> zorenje mikrospor	16

3.2.5	Dokazovanje zorenja peloda	16
3.2.6	Metode <i>in vitro</i> zorenja enojedrnih mikrospor	17
3.2.6.1	Optimizacija gojišča	18
3.2.6.2	Časovni potek razvoja peloda med <i>in vitro</i> zorenjem	19
4	REZULTATI	21
4.1	DOLOČANJE RAZVOJNE STOPNJE MIKROSPOR	21
4.2	DOLOČANJE ŽIVOSTI ZRELEGA PELODA IN MIKROSPOR	23
4.3	<i>IN VITRO</i> KALITEV ZRELEGA PELODA	24
4.3.1	Optimizacija inkubacije	24
4.3.2	Optimizacija gojišča za <i>in vitro</i> kalitev peloda	25
4.3.2.1	Optimizacija pH vrednosti gojišča	25
4.3.2.2	Optimizacija sladkorja v gojišču	26
4.3.3	Preverjanje gojišč za <i>in vitro</i> zorenje mikrospor	27
4.4	<i>IN VITRO</i> ZORENJE ENOJEDRNIH MIKROSPOR	28
4.4.1	Optimizacija gojišča za <i>in vitro</i> zorenje mikrospor	28
4.4.2	Časovni potek razvoja peloda med <i>in vitro</i> zorenjem	29
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	31
5.1	RAZVOJNA STOPNJA MIKROSPOR	31
5.2	ŽIVOST PELODA	31
5.3	<i>IN VITRO</i> KALITEV ZRELEGA PELODA	32
5.4	<i>IN VITRO</i> ZORENJE ENOJEDRNIH MIKROSPOR	33
6	POVZETEK	35
7	VIRI	36
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Gojišča za <i>in vitro</i> kalitev zrelega peloda in za <i>in vitro</i> zorenje nezrelega peloda bezga	20
Preglednica 2: Primerjava metod barvanja z acetokarminom in z DAPI	22
Preglednica 3: Živost svežih mikrospor in svežega zrelega peloda bezga	24
Preglednica 4: Kalivost zrelega peloda bezga v suspenzijski kulturi z gojišči BK (Muccifora in sod., 2003), GK1, GK2 in NLN po 17 urah inkubacije	24
Preglednica 5: Kalivost (%) zrelega peloda po 17 urni inkubaciji v primeru izolacije iz anter in po 4 urni inkubaciji v primeru izolacije s stresanjem cvetov. Inkubacija je potekala na stekelcih v vlažnostni komori pri 24 °C (v inkubatorju) v gojiščih BK in GK1	25
Preglednica 6: Kalivost (%) zrelega peloda na stekelcih po eno do dvourni inkubaciji v vlažnostni komori pri 24 °C (v inkubatorju) v spremenjenem gojišču BK z različnimi pH vrednostmi	25
Preglednica 7: Kalivost zrelega peloda bezga v suspenzijski kulturi s spremenjenim gojiščem BK (z različnimi pH vrednostmi) po 5 in po 20 urah inkubacije. V spodnjem delu preglednice so navedene minimalne, maksimalne in povprečne dolžine pelodnih cevč kalečega peloda v µm	26
Preglednica 8: Kalivost zrelega peloda bezga v suspenzijski kulturi s spremenjenim gojiščem BK (15 % saharoza ali 15 % maltoza ali 15 % glukoza) po 1 uri inkubacije na stresalniku. V spodnjem delu preglednice pa so navedene minimalne, maksimalne in povprečne dolžine pelodnih cevč kalečega peloda v µm	27
Preglednica 9: Kalivost zrelega peloda bezga v suspenzijski kulturi s spremenjenim gojiščem BK (pH 5,1 in pH 6,0), T1, M1 in M2 po 1 uri inkubacije na stresalniku	28
Preglednica 10: Kalivost <i>in vitro</i> dozorelega peloda v suspenzijski kulturi z gojiščem BKK in s spremenjenim gojiščem BK na stresalniku po koncu inkubacijskega obdobja (več kot en teden)	29

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Obarvanje a) enojedrnih mikrospor in b): zrelega peloda z barvilom DAPI	21
Slika 2: Obarvanje a) enojedrnih mikrospor in b): zrelega peloda z acetokarminom	21
Slika 3: Obarvanje a) enojedrnih mikrospor in b): zrelega peloda z barvilom PI	22
Slika 4: Zaprti popki razvrščeni glede na njihov premer (1.0 mm, 1.5 mm, 1.8 mm, 2.0 mm in 2.5 mm) s spodaj pripadajočimi razvojnimi stopnjami mikrospor; a) mikropore v tetradi, b) mikrospora v enojedrni razvojni stopnji, c) mikrospori v enojedrni in začetni dvojedrni razvojni stopnji, d) povečana dvojedrna mikrospora z ojačano pelodno steno in e) zrel pelod s tremi jedri	23
Slika 5: Obarvanje a) mikrospor in b) zrelega peloda bezga z barvilom MTT, črna puščica označuje obarvan pelod, bela puščica pa neobarvanega	23
Slika 6: Vzorec izoliranih enojedrnih mikrospor bezga a) brez barvila in b) obarvan z barvilom MTT	29
Slika 7: Grafična predstavitev <i>in vitro</i> zorenja enojedrnih mikrospor bezga v 12 dnevnom časovnem intervalu v gojišču BKK a) s pH 5.1 in b) s pH 5,5	30

KAZALO PRILOG

- PRILOGA A: Kalivost *in vitro* dozorelega peloda v suspenzijski kulturi z gojišči MA90, SA90, MA120, SA120, T1, M1 in M2 na streslaniku po koncu inkubacijskega obdobja (več kot en teden)
- PRILOGA B: Časovni potek razvoja peloda med *in vitro* zorenjem enojedrnih mikrospor bezga v 12 dnevnem časovnem intervalu v gojišču BKK s pH 5.1 in pH 5,5

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

PI	propidijev jodid
MTT	3 – 4,5 dimetiltiazol-2-il-2,5 difenil – tetrazolijev bromid
DAPI	4,6 diamidino-2-fenil-indol
FDA	fluorescein diacetat
r.p.m.	obrati na minuto
MES	2-(N-morfolino) etansulfonska kislina

1 UVOD

Črni bezeg (*Sambucus nigra* L.) je kulturna rastlina v številnih evropskih državah. Jagode črnega bezga se uporabljajo za barvanje sadnih sokov, za pripravo bezgovega vina in želatine, cvetje pa za pripravo sirupa in vina (Atkinson in Atkinson, 2002). Bezeg ima dolgo tradicijo uporabe v ljudskem zdravilstvu. Jagode in cvetje se tradicionalno uporabljajo kot sredstvo za znojenje in odvajanje, kot zdravilo proti želodčnim bolečinam, vnetju obnosnih votlin, zaprtosti, driski, vnetju grla, prehladu in revmatizmu (Charlebois, 2007). Zaradi številnih terapevtskih učinkov na zdravljenje novodobnih kroničnih bolezni pa postaja črni bezeg vse bolj pomemben v modernih raziskavah in preventivni medicini.

Molekularna genetika in rastlinska biotehnologija sta postali zelo pomembni v žlahtnjenju rastlin. Skoraj vse objavljene metode za genetsko transformacijo vključujejo stopnjo, kjer je potrebna regeneracija rastlin iz transformiranih celic ali tkiva. Uspeh transformacije je zato močno odvisen od samega genotipa rastline. V preteklosti so številni avtorji transformirali pelod ali pelodne cevke in tako pridelali transgene rastline. Zrel pelod so transformirali z inkubacijo v DNA raztopini (Hess, 1987), z elektroporacijo (Matthews in sod., 1990), z biolistiko (van der Leede-Plegt in sod., 1995) in s kokultivacijo z *Agrobacterium tumefaciens* (Hess in Dressier, 1989). DNA raztopine z *Agrobacterium tumefaciens* so dodajali tudi direktno na brazdo, in sicer pred ali po opraitvi (Luo in Wu, 1989). Številne od zgoraj navedenih metod so bile v drugih laboratorijih neponovljive in posledično ovržene (Langridge in sod., 1992; Stöger in sod., 1992).

Vse te tehnike temeljijo na predpostavki, da se transgena DNA, ki vstopi v pelod, avtomatično integrira v zarodno linijo in se ohranja s prenašanjem na potomce. Vendar zrel pelod vsebuje dve vrsti celic, vegetativno in generativno, slednja pa se deli še na dve spermalni celici. Vegetativna celica ni del zarodne linije in le transgena DNA, ki bo vnešena v spermalni jedri, ima možnost prenosa v naslednjo generacijo.

Metoda transformacije moške zarodne linije poteka tako, da transgeno DNA integriramo v eno-jedrno mikrospore, ki jih nadalje v *in vitro* pogojih dozorimo do zrelega dvo- ali troceličnega peloda, tega pa uporabimo za *in vivo* opraitev. Na koncu od nastalega celokupnega semena odberemo transgeno seme. Glavna prednost te metode je, da se izognemo *in vitro* regeneraciji, ki sicer omejuje možnost genske transformacije številnih pomembnih rastlinskih vrst.

Naslednja prednost metode je, da je celotni proces, ki vodi do potrjene transgene rastline, zelo kratek. Na primer *in vitro* zorenje mikrospor tobaka traja 6 dni, seme pa pridobimo v treh do štirih tednih po opraitvi. Selekcija transformantov in pridobitev transgene semenske rastline pa lahko traja 2-3 tedne. Torej celotni proces poteče v približno enem mesecu in pol.

Tretja prednost je, da med kratko *in vitro* maturacijo potečeta manj kot dva celična cikla, v nasprotju z dolgo trajajočimi *in vitro* regeneracijskimi protokoli, ki jih pogosto spremlja še nezaželena somaklonska variacija.

Četrta prednost je v tem, da če za gensko transformacijo izberemo enocelično tarčo, kot je na primer enojedrna mikrospora, se samodejno izognemo himerizmu, ki je sicer glavna ovira pri metodah genske transformacije meristemov (Potrykus, 1991). Himerizem pomeni, da je rastlina sestavljena iz dveh ali več genetsko različnih populacij celic.

Morebitna peta prednost je neodvisnost od genotipa rastline. Touraev in sod. (1997) so opravili uspešno *in vitro* maturacijo številnih kultivarjev tobaka in pšenice in niso opazili nobenih razlik v odzivanju mikrospor. Poskuse na pšenici potrjujejo tudi Stauffer in sod. (1991). Maturacijski protokol optimiziran za en genotip, je lahko potemtakem uporaben tudi za ostale genotipe iste rastlinske vrste. Poznano je namreč dejstvo, da celo med vrstami znotraj družine, na primer Poaceae, ni velikih razlik v moškem gametofitnem razvoju in fiziologiji (Shivanna in Johri, 1985). *In vitro* zorenje enojedrnih mikrospor je proces, ki posnema normalni gametofitni razvoj in bi ga lahko v teoriji uporabili pri vseh višje razvitih rastlinskih vrstah. Vendar zaradi dosedanjih tehničnih omejitev je metoda najprimernejša za tiste vrste, ki imajo veliko število pelodnih zrn na cvet in veliko število semen na cvet ali socvetje.

S to metodo pa lahko tudi direktno opazujemo morfološke, biofiziološke in biokemijske spremembe, ki se sicer dogajajo med *in vivo* zorenjem peloda.

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je optimizacija metod *in vitro* zorenja in kalitve peloda črnega bezga. Pri tem je bilo potrebno osvojiti postopke določanja razvojne stopnje, živosti in zrelosti peloda. Želeli smo optimizirati obstoječa gojišča in inkubacijske pogoje za hitro in uspešno *in vitro* kalitev peloda. Slednje pogoje smo hoteli preiskusiti tudi za *in vitro* zorenje enojedrnih mikrospor. Z namenom nadaljnje optimizacije *in vitro* zorenja smo gojišču dodajali in spreminjali hranila, tako nastalo gojišče za *in vitro* zorenje pa smo primerjali z gojišči optimiziranimi za druge rastlinske vrste. Pri našem delu smo se oprli predvsem na izkušnje in delo raziskovalcev, ki so objavili raziskave o *in vitro* zorenju in kalitvi peloda drugih rastlinskih vrst, ker med pregledom literature nismo zasledili nobene objave, ki bi poskušala v *in vitro* pogojih dozoreti pelod vrste *Sambucus nigra*.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZGODOVINA ČRNEGA BEZGA

Botanično ime '*Sambucus*' prvič najdemo v rokopisih rimskega prirodoslovca Plinija (23-79 n.š.). Ime izvira iz starogrške besede '*Sambuca*', to je strunsko glasbilo narejeno iz bezgovega lesa (Knowles, 2008). Gojeni in divji bezeg se v Evropi, severni Afriki in v nekaterih predelih Azije že stoletja izrablja za medicinske, kozmetične in kulinarne namene. Stari Rimljani so sok iz bezgovih jagod uporabljali za barvanje las. V srednjem veku je bil bezeg čaščen kot čarobno drevo, ki je ščitilo ljudi in živino pred boleznimi in hudobnimi duhovi (Charlebois, 2007). Iz bezgovega listja so izdelovali pripravke za odstranjevanje peg in za zaščito ter mehčanje kože. Iz jagod so pridelovali marmelade, vina in čaje, cvetje pa so cvrli v testu in ga postregli kot prilogo različnim jedem. Tudi severnoameriški Indijanci imajo bogato tradicijo uporabe bezga, zlasti za zdravljenje vročine in revmatizma. Že v začetku 19. stoletja pa so v Evropi in Ameriki bezgovo cvetje popisali v tedanji farmakopeji.

2.2 ČRNI BEZEG V MEDICINI

Tradicionalne in moderne raziskave so osredotočene predvsem na kremnobeke cvetove in na modročrne jagode črnega bezga. Skorja, listi in korenine vsebujejo cianogene glikozide, ki so potencialno strupeni, saj se ob njihovem razpadu sprosti vodikov cianid. Jagode črnega bezga so v primerjavi z ostalim sadjem zelo bogate z antocianini in drugimi polifenoli, kot sta rutin in klorogenska kislina (Gebhardt in sod., 2009). Antocianini so v vodi topni pigmenti, ki imajo na flavonoidno strukturo vezane sladkorne enote, in se v bezgu večinoma nahajajo kot cianidin-3-*O*-sambubiozid, cianidin-3-*O*-sambubiozid-5-*O*-glukozid, cianidin-3-*O*-glukozid in cianidin-3,5-*O*-diglukozid, odkrili pa so tudi manjše količine delfinidin-3-rutinozida in petunidin-3-rutinozida (Thole in sod., 2006). Cao in Prior (1999) sta ugotovila, da se cianidin-3-*O*-sambubiozid in cianidin-3-*O*-glukozid uspešno vsrkata v človeško krvno plazmo, in sicer kar neposredno v svojih glikozidnih oblikah. Antocianinom se pripisujejo številne zdravilne vloge pri preprečevanju karcinogeneze, pri preprečevanju rasti rakastega obolenja in pri različnih protivnetnih procesih. Nedavna objava kaže (Hecht in sod., 2006), da so cianidin glikozidi najverjetnejše bioaktivne učinkovine, ki ovirajo aktivnosti transkripcijskih faktorjev AP-1 in NF- κ B v mišjih epidermalnih celicah. Prav slednja transkripcijska faktorja imata odločilno vlogo pri pospeševanju karcinogeneze celic. Podobno so Meiers in sod. (2001) ugotovili, da so antocianini brez vezanih sladkornih enot močni zaviralci receptorjev za epidermalni rastni faktor (EGF), ki pa je tudi pomemben za začetek karcinogeneze. Dodatno so nekatere biokemijske študije (Thole in sod., 2006) pokazale, da vsebujejo bezgove jagode različne snovi (fenolne in nefenolne), ki spodbujajo aktivnost encima kinon reduktaze in zavirajo aktivnosti encimov ciklooksigenaze-2 in ornitin dekarboksilaze in s tem v celoti preprečujejo proces karcinogeneze. Bagchi in sod. (2004) so nadalje ugotovili, da standardizirani ekstrakt OptiBerry IH 141, ki je narejen tudi iz bezgovih jagod, učinkovito preprečuje izražanje vaskularnega endotelijskega rastnega faktorja (VEGF) v človeških kerationciti. Faktor VEGF ima kritično vlogo pri vaskularizaciji in napredovanju tumorjev. Omenimo še, da so Katsube in sod. (2003)

ugotovili, da antocianini sprožijo apoptozo v tumorskih celicah HL-60, in sicer tako, da delujejo prooksidativno na aktivacijo reaktivnih kisikovih radikalov v teh celicah. Apoptozne tumorske celice takoj prepoznajo makrofagi in jih odstranijo še preden pride do celične lize in posledičnega lokalnega vnetja. Poleg zgoraj omenjenih učinkov proti raku, antocianinom pripisujejo tudi številne druge zdravilne vloge, saj po mnenju nekaterih avtorjev (Zakay-Rones in sod., 2004) antocianini spodbudijo izločanje citokinov iz humanih monocitov in s tem okrepijo imunski odziv proti virusom gripe. Bobek in sod. (2001) pa so na podganah dokazali, da ekstrakt črnega bezga poveča rezistenco organizma proti vnetju debelega črevesja. Nadalje so Gray in sod. (2000) opazili, da vsebuje cvetje črnega bezga vodotopne snovi, ki neposredno spodbudijo metabolizem glukoze v mišjih trebušnih mišicah in povečajo izločanje inzulina iz klonalnih pankreatičnih β -celic. Dodatno so Chatterjee in sod. (2004) ugotovili, da ekstrakt iz bezgovih jagod zavira rast *Helicobacter pylori* in povečuje občutljivost te bakterije na antibiotik klaritromicin.

2.3 TAKSONOMSKA UVRSTITEV BEZGA

Bezèg, tudi bèzeg (*Sambucus*) je rod hitrorastočih grmovnic ali nizkih dreves in vsebuje med 5 do 30 različnih vrst. Je geografsko široko razširjen s središčem diverzitete v vzhodni Aziji in Severni Ameriki. Ena od njegovih najbolj razširjenih vrst je *Sambucus racemosa*. Dolgo časa so rod *Sambucus* uvrščali v družino kovačnikovk (Caprifoliaceae) (Cronquist, 1981), vendar so ga zaradi kasnejših filogenetskih ugotovitev (Donoghue in sod., 2001) premestili v družino pižmičevk (Adoxaceae) skupaj z rodovi *Viburnum* L., *Adoxa*, *Sinadoxa* in *Tetradoxa*. Rastline, ki spadajo v družino pižmičevk, imajo nasprotno razvrščene nazobčane liste, od 5 do več majhnih cvetov v cimoznem socvetju in koščičast plod.

2.4 BIOLOGIJA BEZGA

Črni bezeg je listnat grm ali redkeje manjše do 10 m visoko drevo s premerom debla med 30 in 60 cm. Ima ravne in pokončne poganjke iz osrednjega debla, ukrivljene veje pa so pogosto rjavo-sive barve, z velikimi in številnimi plutnimi bradavicami in belim strženom v lubju. Nasprotno, neparno pernatih listi so sestavljeni iz petih do devetih lističev (redko treh ali enajstih), vsak sestavljeni list je dolg od 5-30 cm, lističi pa so dolgi od 3-9 cm in so jajčasto-suličaste oblike z nazobčanim robom. Spodnja lističa sta pritrjena s kratkimi peclji ostali lističi pa so sedeči. Listni pecelj je dolg 3-4 cm, aksilarni brsti so trikotne oblike, rdečkaste barve in so 2-3 mm dolgi. Aksilarni brsti pozno spomladi nosijo velika in zelo razvejana ščitasto oblikovana socvetja, sestavljena iz številnih majhnih, dišečih, kremno-belih ali rumenkastih cvetov. Iz njih se poleti razvijejo 6-8 mm veliki jagodasto, koščičasti plodovi temnomodre ali črne barve, ki vsebujejo 3-5 sploščenih semen. Kremnobeli, petštevni, dvospolni cvetovi so žarkasto simetrični (aktinomorfični) in veliki do 5 mm v premeru. Vsebujejo 5 prašnikov, cvetni pestič pa nosi od 3 - 5 brazd. Cvetni pelod je bledorumene barve, elipsoidne oblike in ima grčasto eksino (Atkinson in Atkinson, 2002).

Cvetovi nimajo nektarja, vseeno pa njihov močan vonj privablja določene obiskovalce. Najpogostejši opráševalci so dolgorogi hrošči (Cerambycidae) še posebej hrošči kozorogi (*Cerambyx scopolii* Fuessly), pogoste opráševalke pa so tudi muhe in včasih čebele (Bolli, 1994). Koncalova in sod. (1983) so ugotovili, da je 1,22 % cvetnih popkov samoprašnih (so avtogamne rastline), Bolli (1994) pa navaja, da je za proces oploditve najpogostejša samooprašitev preko peloda iz sosednjih cvetov ali socvetji iste rastline.

Bezeg najbolje raste na tleh, bogatih z dušikom, predvsem blizu bivališč, sega od nižin do gorskih predelov. Običajno ozeleni v marcu ali aprilu, cveti pa od maja do junija. Jagode se začnejo razvijati v juliju in zorijo do septembra. Bezeg običajno cveti v svojem tretjem ali četrtem letu starosti.

2.5 RAZVOJ PELODA

Razvoj peloda poteka v prašnicah in se začne z delitvijo diploidnih sporofitnih celic. Pri tem nastanejo materinske celice peloda in inicialke za tvorbo notranje stene prašnice imenovane tapetum. Materinske celice se nato dvakrat mejotično delijo in nastanejo tetrade haploidnih celic. Celice v tetradah se sprostijo v posamezne enojedrne mikropore po delovanju encima kalaze, ta pa se sintetizira v tapetumu (McCormick, 1993). Nastala mikrospora se začne hitro povečevati, na zunanji strani se ji tvori stena imenovana eksina, medtem pa centralno jedro mikropore potuje proti periferiji celice, in sicer na mesto, ki se nahaja nasproti pelodne pore. Tekom rasti se številne manjše vakuole združujejo v eno samo vakuolo, ki zaradi povečanega volumna pritiska citoplazmo ob steno nasproti pelodne pore (Bedinger, 1992). Po nekaj dneh rasti se mikrospora asimetrično mitotično deli, pri čemer se tvori dvojedno pelodno zrno sestavljeno iz dveh celic, in sicer iz večje vegetativne in manjše generativne, ki se v celoti nahaja znotraj vegetativne celice. V 70 % rastlinskih družin (na primer Solanaceae, Liliaceae) se zrel dvojedni pelod sprosti iz prašnic in naslednja mitotična delitev generativne celice na dve spermalni celici poteče šele ob klitju peloda na pestični brazdi. V drugih rastlinskih družinah (na primer Brassicaceae and Poaceae) pride do delitve generativnega jedra že znotraj prašnic (McCormick, 1993). V razvojni fazi med dvo- in trojednim pelodom se kopiči škrob, naraste tudi koncentracija mRNA za kasnejšo translacijo med kalitvijo peloda. Sledi dehidracija peloda (do 40-58 % vlažnosti), sprostitvev peloda iz prašnice, ponovna rehidracija po interakciji s pestično brazdo in kalitev skozi pelodno poro in pestični vrat do semenske zasnove (Bedinger, 1992).

Muccifora in sod. (2003) so s transmisijskim elektronskim mikroskopom preučili ultrastrukuro zrelega, triceličnega peloda bezga (*Sambucus nigra* L.). Pelodno zrno je izopolarno, trikolporatno, široko 12,5 μm in dolgo 25 μm . Vegetativna celica popolnoma obdaja obe spermalni celici in ima vegetativno jedro zaklinjeno med njima. Njena citoplazma je bogata s prostimi ribosomi, vsebuje številne paličasto oblikovane mitohondrije, grobi endoplazmatski retikulum, številne očitno neaktivne diktosome golgijevega aparata sestavljene iz 5-8 cistern, lipidna telesca, majhne vakuole z notranjimi vezikli in dve različni vrsti plastidov, in sicer grobe izodiametrične plastide, kjer se skladiščijo škrobna zrna, in manjše nezrele plastide. Spermalni celici sta medseboj tesno

povezani s citoplazmatskimi mostovi in obdani z vlaknastimi polisaharidi. Celici imata malo citoplazme in slabo razvite majhne organele.

Vegetativna celica iz peloda bezga ima visoko metabolično zmožnost, to pa je značilnost predvsem triceličnih in tudi nekaterih dvoceličnih pelodov drugih rastlinskih vrst. Številni dobro razviti mitohondriji so tako značilna lastnost triceličnih pelodnih zrn iz različnih rastlin, z izjemo rastlin *Tradescantia paludosa* in *Tradescantia virginiana*, ki pa imata dvocelični pelod. Podobno so grobi endoplazmatski retikulum odkrili v triceličnem pelodu vrste *Euphorbia dulcis* in v dvoceličnem pelodu vrste *Capparis spinosa*.

Normalni gametofitni razvoj peloda lahko v *in vitro* pogojih preusmerimo v embriogenetski sporofitni razvoj. Preklop iz gametofitnega v sporofitni razvoj najpogosteje spodbudimo v enojedrni ali dvojedrni mikrospori. Po indukciji sporofitnega razvoja sledijo številne delitve, ki vodijo do nastanka haploidne rastline po dveh poteh, in sicer preko direktne embriogeneze ali pa preko tvorbe kalusa. Sehgal in sod. (1982) so iz cvetnih popkov črnega bezga izolirali prašnice z enojedrnimi mikrosporami in jih aseptično prenesli na gojišče MS (Murashige in Skoog, 1962) z dodanim kinetinom (0,5 ppm) in 2,4-D (1 ppm). Stres potreben za preklop v sporofitni razvoj so inducirali s fluorescentno svetlobo. Indukcija kalusa jim je uspela v 20 % primerov, vendar so ugotovili, da ga je večina izvirala iz vezivnega tkiva. Pri nekaterih enojedrnih mikrosporah pa so opazili simetrično delitev jedra na dve enaki jedri in po 24 dni trajajoči inkubaciji so dobili mnogo-celične pelodne embrioide. Simonovik (2007) je na črnem bezgu uporabila isto metodo z gojiščem NLN (Nitsch in Nitsch, 1969) dopoljenim z organskimi in anorganskimi dodatki. Tri tedne po vcepitvi v gojišče se je iz 50 % prašnic razvil kalus, ki je izviral iz prašnikove niti ali drugih delov somatskega tkiva. V 0,25 % prašnic (7 prašnic od skupaj 2725) se je kalus uspel inducirati iz mikrospor. Kalus pridobljen iz mikrospor je bil čiste bele barve, kalus iz različnih somatskih tkiv pa je rasel počasi in je na koncu gojitve porjavel.

Če hočemo nezrele mikropore dozoreti do zrelega peloda ali če hočemo dobiti pelodne embrioide, moramo pred tem določiti razvojno stopnjo peloda. Pri določevanju razvojne stopnje moramo z barvili, ki se vežejo na molekulo DNA, določiti število in velikost jeder, ki se nahajajo znotraj peloda. DAPI (4,6 diamidino-2-fenil-indol) je fluorescenčno barvilo, ki so ga učinkovito uporabili pri barvanju mikrospor vrste *Antirrhinum majus* (Barinova in sod., 2002, 2004), *Nicotiana tabacum* (Tupy in sod., 1991), *Arabidopsis thaliana* (Van Damme in sod., 2006), *Zea mays* (Heuer in sod., 2000), *Orychophragmus violaceus* (Zhao in sod., 2007), *Leymus chinensis* (Teng in sod., 2005) in *Sambucus nigra* (Simonovik, 2007). Barvanje z DAPI je ena od učinkovitejših metod določevanja razvojnih stopenj mikrospor, saj se jedra močno obarvajo in oddajajo svetlobo daljše valovne dolžine. Nekateri drugi avtorji so uporabili tudi barvilo hematoksilin, in sicer za vrste *Oryza sativa* (Gupta in sod., 1987) in *Zea mays* (Kindiger in Beckett, 1985). Hematoksilin je primeren za analizo kromosomov številnih rastlinskih vrst (Guerra, 1999). Tudi barvanje z barvilom acetokarmin je pogosto uporabljena metoda (Sehgal in sod., 1982; Benito in sod., 1988), vendar je obarvanost peloda pogosto slaba, zaradi majhnih kontrastov med jedrom in citoplazmo.

2.6 ŽIVOST PELODA

Živost peloda lahko preverjamo z različnimi tehnikami, največkrat pa se uporablja barvanje z laktofenol anilin modrim (Hayman, 1956), z redoks indikatorjem TTC (2,3,5-trifenil tetrazolijev klorid) (Stanley in Linskens, 1974), s trifenilmetan "Anilin modrim" (Smith-Huerta in Vasek, 1984) in s fluorescein-diacetatom v kombinaciji s propidijevim jodidom (FDA-PI) (Heslop-Harrison in Heslop-Harrison, 1970). Z barvilom anilin modrim odkrivamo prisotnost polisaharida kaloze v pelodni steni ali v pelodni cevki, s tetrazolijevimi solmi, kot sta na primer TTC in MTT (2,5-difenil monotetrazolijev bromid), obarvamo pelod v odvisnosti od aktivnosti encima dehidrogenaze, barvila z jodom uporabljamo za določevanje količine nakopičenega škroba in fluorescein diacetat za določevanje aktivnosti encima esteraze in ugotavljanje poškodovanosti plazmatske membrane (Wang in sod., 2004). Izbor metode za preverjanje živosti peloda je najbolj odvisen od same letine ali rastlinske vrste. Muccifora in sod. (2003) so ugotavljali živost peloda bezga z barvanjem s fluorescein-diacetatom (FDA) po metodi avtorja Heslop-Harrison (1979). Rezultati so pokazali, da je bila živost svežega peloda 95 %. Za pelod, ki je bil 3 ali 4 leta hranjen pri temperaturi -20°C , pa je bila živost med 78,2 % in 43 %. To je še posebej zanimivo zato, ker za tricelični pelod na splošno velja, da ima kratko življenjsko dobo, in sicer od le nekaj minut pa do par dni.

2.7 KALITEV ZRELEGA PELODA V *IN VITRO* POGOJIH

Trenutno poznane *in vitro* kalitvene tehnike so kalitev v kulturi visečih kapljic, kalitev v kulturi sedečih kapljic, kalitev v suspenzijski kulturi in pa kalitev na površini trdnega gojišča. Tehnike z visečimi ali sedečimi kapljicami so omejene na majhno količino peloda in niso najprimernejše za fiziološke in biokemijske študije (Burke in sod., 2004). Na kalitev in razvoj pelodne cevke prvenstveno vplivajo temperatura, relativna vlažnost zraka, stopnja osvetlitve in pa samo gojišče za kalitev. Torej je potrebno za vsako rastlinsko vrsto posebej določiti optimalne pogoje za *in vitro* kalitev.

Kakani in sod. (2005) so za dvanajst kultivarjev bombaža ugotavljali minimalne, optimalne in maksimalne temperature za kalitev in razvoj pelodne cevke. Različni kultivarji so imeli različne temperaturne intervale (v povprečju so bile T_{\min} , T_{opt} in T_{\max} 15.0, 31.8 in 43.3°C) in kultivarji z višjo optimalno temperaturo niso vedno kazali najvišje maksimalne temperature, vendar so vseeno najboljše kalili tudi pri visokih temperaturah. Podobne vplive povišane temperature na *in vitro* kalitev so odkrili pri kumarah (Matlob in Kelly, 1973), koruzi (Binelli in sod., 1985) in arašidih (Kakani in sod., 2002). Avtorji soglašajo, da razlike v genotipih izvirajo iz dejstva, da pelodna zrna pri višjih temperaturah slabše izrabljajo saharozo, čeprav je kopičenje škroba in sladkorjev pogosto celo večje kot pa pri normalnih temperaturah.

Za številne rastlinske rodove (*Secale*, *Iris*, *Carex*, *Eleocharis*, *Cytisus*, *Digitalis*, *Plantago*, *Lonicera*) so ugotovili, da če so bila pelodna zrna izpostavljena določeni relativni vlažnosti za določen čas (15 min–24 ur) tik pred kalitvijo, je to vplivalo na njihovo kalitev v gojišču, in sicer različno glede na rastlinsko vrsto (Shivanna in Heslop-Harrison, 1981). Nadalje so Sato in sod. (1998) za vrsto *Brassica rapa* ugotovili, da je 60

% relativna vlažnost za 5 ur pri 20 °C močno izboljšala *in vitro* kalivost peloda. Bistveno višja (95 %) relativna vlažnost pa je kalivost peloda korenito poslabšala, saj se je pelod spremenil iz svoje prvotne oblike v kroglasto obliko. Zato domnevajo, da spremembe v relativni vlažnosti zraka vplivajo na stanje membran vegetativne celice.

Gojišče za kalitev mora biti osnovano tako, da nadomesti vse razlike med *in vitro* okoljem in med naravnimi pogoji, ki so prisotni na brazdi. Brewbaker in Kwack (1963) sta pripravila gojišče, ki se danes široko uporablja v poskusih *in vitro* kalitve, saj ustreza več kot 86 vrstam rastlin (Jayaprakash in Sarla, 2001). Sestavljeno je iz saharoze, H_3BO_3 , $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ in KNO_3 . Saharoza ima pomembno vlogo pri uravnavanju osmotskega stanja in pri prehranjevanju peloda (Shivanna in Johri, 1985). 20 % delež saharoze v gojišču je običajno optimalen, nižje koncentracije pa so neučinkovite, medtem ko so višje koncentracije saharoze (30 % ali več) škodljive, saj delujejo zaviralno na rast pelodne cevke in lahko povzročijo propad pelodnega zrna (Lee in sod., 1985). Borova kislina spodbuja rast pelodne cevke, vpliva na metabolizem in prenašanje sladkorjev (pri tem se tvori sladkorno-boratni kompleks), povečuje vsrkavanje kisika in tvorjenje pektina, ki je nujen sestavni del stene pelodne cevke, in vpliva na sintezo ter distribucijo polisaharida kaloze (Sidhu in Malik, 1985). Kalitev in rast pelodne cevke sta procesa, ki sta vodena preko kalcijevega gradienta v citoplazmi. V posebnem predelu peloda, kjer bo prišlo do nastanka pelodne cevke, se zaradi omejenega kalcijevega vtoka ustvari gradient, ki sega od konice pa do podlage nastajajoče se cevke. Vtok kalcija v pelod in v pelodno cevko poteka preko Ca^{2+} -prepustnih ionskih kanalov. Če je kalcija preveč, pride do prekinitve citoplazmatskih tokov in mikrofilamentnih sistemov v območju nastajanja pelodne cevke. Če pa je kalcija premalo in se gradient v citoplazmi razprši, pa se aktinski mikrofilamenti in citoplazmatski tokovi pomaknejo proti konici nastajajoče se cevke (Miller in sod., 1996). Poleg kalcija ima tudi kalij pomembno regulatorno vlogo pri kalitvi peloda. Obermeyer in Blatt (1995) sta ugotovila, da je tok kalija iz zunanosti v notranost nekalečega peloda lahko vzrok za sprožitev osmotskega transporta vode v pelod. Posledična rehidracija peloda pa je potrebna za nadaljno kalitev le tega. Fan in sod. (1999) so na pelodnih protoplastih vrste *Brassica* pokazali, da večina snovi vstopa v pelod preko notranjih K^+ -kanalov. Na te kanale pa ima močan regulatorni vpliv prav zunanji Ca^{2+} .

Dumont-BèBoux in Von Aderkas (1997) sta za *in vitro* kalitev peloda vrste *Pseudotsuga menziesii* (severno-ameriški bor) uporabila gojišče pripravljeno po Brewbaker in Kwack (1963) dopolnjeno s saharozo ali polietilen glikolom (PEG). Na gojišču s saharozo so bile pelodne cevke kratke in zvite, na gojišču s PEG pa so bile dolge in ravne, vendar je bila njihova rast upočasnjena. PEG je znan po tem, da upočasni privzem vode, ker najverjetneje vpliva na permeabilnost plazmatske membrane (Read in sod., 1993). Tako bi lahko z dodajanjem PEG oblažili poškodbe peloda, do katerih pogosto pride med procesom rehidracije. Do poškodb pride zaradi tega, ker se med rehidracijo peloda gelizirana membrana spremeni v tekočo-kristalinično membrano (Hoekstra in sod., 1992).

Pomemben vpliv na *in vitro* kalitev imajo tudi flavonoli, to so brezbarvni sekundarni rastlinski metaboliti imenovani flavonoidi, med katere spadajo kaempferol, kvercetin in

miricetin. Izkazalo se je, da imajo ključno vlogo v reprodukciji kritosemenk. Različni avtorji so že pokazali, da lahko spodbudijo kalitev in rast pelodne cevke v primeru rastlinske vrste tobaka (Ylstra in sod., 1992), okrasne petunije in koruze (Mo in sod., 1992; Vogt in sod., 1995). Zanimivo je, da ostale vrste flavonoidov, kot je na primer flavanon imenovan naringenin, nimajo nobenega vpliva na kalitev in na rast pelodne cevke.

Song in sod. (1999) so na vrsti paradižnika (*Lycopersicon esculentum* Mill.) preučevali vpliv visokih temperatur in poliaminov (spermidin in spermin) na *in vitro* kalitev peloda. Po pričakovanjih se je kalivost močno zmanjšala pri 35 °C. Ko pa so gojišču dodali poliamine, se je ta ponovno izboljšala, in sicer na raven, ki je bila enaka kalivosti pri optimalni temperaturi. Številne študije kažejo na vpletenost poliaminov v procese zorenja in kalitve peloda različnih rastlinskih vrst. Chibi in sod. (1994) so opazovali aktivnosti poliamin biosinteznih encimov (arginin dekarboksilaza in ornitin dekarboksilaza) in ugotovili so, da se biosinteza poliaminov močno poveča v zgodnji stopnji kalitve peloda. Spet druge študije so dokazale, da je prišlo do korenitega poslabšanja *in vitro* kalivosti ob dodatku inhibitrojev za poliamin biosintezne encime (Rajan, 1989).

Muccifora in sod. (2003) so preučevali *in vitro* kalivost triceličnega peloda črnega bezga, za kar so uporabili gojišče pripravljeno po Brewbaker in Kwacku (1963). Največjo 88 odstotno kalivost so dosegli v suspenzijski kulturi s 15 % koncentracijo saharoze po 22 urah inkubacije. Glede na to, da so optimalne koncentracije saharoze za dvocelični pelod med 10%-20% in da so optimalne koncentracije za tricelični pelod bistveno večje (do 50 %), je bezgov pelod bolj podoben vrstam z dvoceličnim pelodom. Ugotovili so, da začne bezgov pelod kaliti šele po 2 urah inkubacije. Tudi to opažanje je nezaničilno za tricelični pelod, za katerega velja, da kali takoj (Hoekstra in Bruinsma 1975). Po 22 urah so pelodne cevke dosegle dolžino večjo od 1000 µm, kar je zopet značilnost dvoceličnih pelodov, saj cevke triceličnega peloda redko presežejo dolžino 500 µm (Johri in Shivanna, 1977). Že dejstvo, da je gojišče pripravljeno po Brewbaker in Kwacku (1963) primerno za *in vitro* kalitev triceličnega peloda *Sambucus nigra*, kaže na to, da so zahteve za kalitev in posledično fiziološke značilnosti kalitve peloda *Sambucus nigra* zelo podobne dvoceličnemu pelodu. To gojišče je namreč primerno predvsem za dvocelični pelod in le redko za trocelični (Leduc in sod., 1990). Muccifora in sod. (2003) so nadalje ugotavljali tudi vplive različnih soli v tem gojišču. Ko v gojišču ni bilo kalija, je kalivost padla za 50 %. Podoben učinek se je pojavil tudi, ko v gojišče niso dodali borove kisline. To je v nasprotju s pričakovanji, saj je poznano, da kalij in borova kislina ne vplivata bistveno na kalitev triceličnega peloda (Heslop-Harrison, 1979). Ko gojišču niso dodali magnezija, je bila kalitev popolnoma onemogočena. Zopet je to v nasprotju s triceličnim pelodom za katerega velja, da se kalitev brez magnezija le zmanjša za določen delež (Leduc in sod., 1990). Enak učinek so dosegli s kalcijem, vendar pri tem je potrebno omeniti, da so tako dvocelični kot tricelični pelodi različnih rastlinskih vrst izjemno občutljivi na kalcij (Shivanna in Johri, 1985).

2.8 ZORENJE PELODA V *IN VITRO* POGOJIH

Predhodne študije na tobaku (Aziz in Machray, 2003; Kyo in Harada, 1986; Benito in sod., 1988; Tupy' in sod., 1991; Touraev in Heberle-Bors, 1999), lilijah (Tanaka in sod., 1980; Clement in sod., 1996), tulipanih (Tanaka in Ito, 1981), navadnem odolinu (Barinova in sod., 2002), oljni repici (Custers in sod., 1994), pšenici (Stauffer in sod., 1991), koruzi (Pareddy in Petolino, 1992) in na kitajski vijolični kreši (latinsko ime: *Brassica violacea*; Zhao in sod., 2007) so dokazale, da so mikrospore razvojno neodvisne od obdajajočega tkiva znotraj prašnikov in to že takoj po sprostitvi iz kalozne stene tetrad. Njihov avtonomni celični razvoj je odvisen samo od hranil iz sporofitnega tkiva. Hranila lahko enostavno nadomestimo z *in vitro* gojenjem izoliranih mikrospor v optimiziranem gojišču, pri čemer upoštevamo, da se zahteve po hranilih spreminjajo skozi obdobje zorenja.

Za uspešno *in vitro* zorenje mikrospor do zrelega peloda, ki je sposoben kalitve in razvoja pelodne cevke, moramo optimizirati gojišče in spremljajoče fizikalne faktorje (na primer temperatura, relativna vlažnost). Obstaja verjetnost, da optimizirani inkubacijski pogoji za *in vitro* kalitev zrelega peloda ustrezajo procesu, ali vsaj ne omejujejo procesa zorenja nezrelih mikrospor iste rastlinske vrste. Če to velja, potem lahko najprej optimiziramo pogoje za *in vitro* kalitev zrelega peloda in šele potem preidemo na optimizacijo pogojev za *in vitro* zorenje mikrospor. Sledeči potek eksperimentov je smislen, če upoštevamo, da običajen *in vitro* kalitveni test traja od nekaj minut pa do največ enega dneva, v nasprotju s poskusom *in vitro* zorenja, ki lahko poteka teden dni ali celo več časa. Vseeno pa moramo zaradi zahtevnejšega in dolgotrajnejšega procesa zorenja mikrospor gojišče za *in vitro* kalitev dopolniti s pomembnimi hranili, kot so na primer ogljikovi hidrati (saharoza, maltoza), dušik (laktalbumin hidrolizat), aminokislina (glutamin, prolin), nukleozidi (uridin, citidin), vitamini (inozitol, vitamini pripravljene po Whiteu, 1963) in minerali (soli pripravljene po Murashigeju in Skoogu, 1962). Včasih moramo dodati tudi rastne hormone, ki jih lahko vnašamo neposredno v očiščeni obliki (kinetin, naftalenocetna kislina, giberelinska kislina) (Clement in sod., 1996) ali pa posredno znoraj kompleksnega vira, kot je na primer kokosovo mleko (Benito in sod., 1988; Zhao in sod., 2007). Kokosovo mleko vsebuje mešanico številnih aminokislin, hormonov in encimov, in tako vpliva na pomnoževanje in diferenciacijo celic, to pa koristi predvsem spodbujanju kalitve v mikrosporah (Cao and Liu 1996). Z uporabo hormonov in drugih dodatkov pa lahko tudi dosežemo nezaželjeni preklon iz gametofitnega v sporofitni embriogenetski razvoj.

Barinova in sod. (2002) so ugotovili, da imajo sladkorji, pufri in pH vrednost gojišča najpomembnejši vpliv na maturacijo mikrospor vrste *Antirrhinum majus*. Saharoza je najpogosteje uporabljen sladkor za *in vitro* zorenje mikrospor (Touraev in Heberle-Bors, 1999). Vseeno pa mikrospore nekaterih vrst, kot so na primer ječmen (Scott in Lyne, 1994), kitajska vijolična kreša (Zhao in sod., 2007) in navadni odoljin (Barinova in sod., 2002) niso sposobne preživeti v gojišču s saharozo in so izgubile živost kmalu po izolaciji iz prašnic. Optimizirano gojišče za uspešno maturacijo peloda vrste *Antirrhinum majus*, ki so ga pripravili Barinova in sod. (2002), je vsebovalo 0,4 M maltozo, pufer MES in pH 6,5. Nižje koncentracije maltoze od 0,4 M so povzročile beljenje mikrospor,

višje koncentracije pa so nezaželjeno pospešile razvoj mikrospor. Barinova in sod. (2004) so nadalje ugotovili, da pH gojišča igra odločilno vlogo pri razvoju mikrospor navadnega odolina in tobaka. Ko je bil pH večji ali manjši od 7.0, se je ustavila genska ekspresija in prišlo je do zmanjšane akumulacije škrobnih zrn. Pri pH 8.0-8.5 pa se je povečal delež mikrospor, ki so preklopile v embriogenetski razvoj. Podobno so Custers in sod. (1994) opazili, da je povišana temperatura (33 °C) spodbudila prekop v embriogenetski razvoj v mikrosporah vrste *Brassica napus*. Medtem ko pri tobaku na prekop v razvoju najbolj vpliva dušik in sladkorji v gojišču (Touraev in sod., 2001).

Razvoju peloda v *in vitro* pogojih moramo slediti z optičnim opazovanjem povečevanja volumna peloda, z barvanjem jeder peloda s posebnimi barvili in s spremljanjem nalaganja škroba v pelodu (Clement in sod., 1996). Uspešnost in kvantifikacijo zorenja mikrospor do zrelega peloda pa lahko določimo s poskusi kalivosti in z barvili za določanje živosti peloda.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

Rastlinski material, uporabljen pri raziskavah, smo pridobili iz bezgovih dreves (*Sambucus nigra*), ki so rasla v bližnji okolici Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Cvetove smo pobirali le v pomladanskem času, in sicer od maja pa do sredine junija meseca.

Pri poskusih *in vitro* kalitve zrelega peloda smo uporabili le odprta socvetja, pobrana v dopoldanskem času. Socvetja smo vnesli v škatlo z vlažnimi papirnatimi brisačami in jih čim prej uporabili za poskus. V primeru napovedanega slabega vremena smo nekaj odprtih socvetij v PVC vrečkah v škatli s papirnatimi brisačami hranili v hladilniku pri 4 °C.

Pri poskusih *in vitro* zorenja mikrospor smo uporabili zaprta socvetja. Ker smo te poskuse večinoma izvajali na koncu junija in v juliju, so se do takrat že vsi cvetni popki na bezgovem drevju v okolici Biotehniške fakultete odprli, nekateri pa so že popolnoma odcveteli. Za veliko rastlinskih vrst velja, da na višjih nadmorskih višinah cvetijo pozneje kot v nižinah. Enako velja tudi za bezeg. Tako smo 18. 6. 2008 na Krimu nabrali zaprta socvetja in jih zavite v PVC vrečke shranili v stiroporastih škatlah z lomljenim ledom v hladilniku pri 4 °C. Tako smo si ustvarili zalogo za vse kasnejše poskuse *in vitro* zorenja mikrospor.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava gojišč

Vsa gojišča, ki smo jih uporabljali tako za *in vitro* kalitev zrelega peloda kot tudi za *in vitro* zorenje mikrospor, so bila tekoča. Pripravili smo po 100 ml ali pa po 250 ml posameznega gojišča, in sicer iz predhodno narejenih založnih raztopin, bidestilirane vode in sladkorja. Nekatere dodatke (kot so na primer glutamin, uridin in citidin) smo posebej stehali na precizni tehtnici. pH vrednost gojišča smo naravnali z dodajanjem 1 N HCl ali 1 N NaOH in jo merili z elektronskim pH metrom. Gojišča smo vedno sterilno filtrirali (pore velikosti 0,02 µm; sterilni filterski vakuum sistem) v komori za sterilno delo in jih hranili v hladilniku pri 4 °C.

3.2.2 Določanje razvojne stopnje mikrospor

Hoteli smo določiti razvojne stopnje mikrospor in sicer z barvanjem jeder, določevanjem velikosti in oblike mikrospor. Jedra smo barvali z acetokarminom in DAPI. Ugotoviti smo želeli, v kakšnih cvetnih popkih se nahajajo mikropore v zgodnji enojedrni fazi (eno jedro v sredinskem položaju), ki bi jih nadalje uporabili pri poskusih *in vitro* zorenja mikrospor. Zanimale so nas seveda tudi druge razvojne stopnje.

Najprej smo nabrali socvetja različnih razvojnih stopenj, ki so vsebovala različno velike zaprte popke. Odrngane popke smo razvrstili v kupčke od najmanjših do največjih in jim izmerili premer. Nato smo iz posameznih kupčkov odvzeli 1- 2 popka in pripravili mikroskopski preparat. Manjše popke smo s skalpelom (rezilo mora biti za posamezni preparat čisto) razrezali v kapljici barvila na objektnem stekelcu, pri večjih popkih pa smo pod stereomikroskopom s pomočjo igel in pincete izolirali antere in jih razrezali v kapljici barvila. Odstranili smo vse vidne koščke v kapljici in s kapalko dodali še nekaj kapljic barvila. Dobljene preparate smo pokrili s krovnim stekelcem. V primeru barvanja z acetokarminom (nefluorescenčna tehnika) smo preparate opazovali pod mikroskopom z navadno svetlobo. Pri barvanju z DAPI pa smo za opazovanje preparatov potrebovali posebne svetlobne filtre.

3.2.2.1 Barvanje z DAPI (4,6 diamidino-2-fenil-indolom)

Obarvanje jedra je posledica vezave DAPI na jedrno DNK. Pod UV svetlobo začne fluorescirati svetlomodro, kar lahko opazujemo pod mikroskopom opremljenim s posebnimi svetlobnimi filtri. Preiskusili smo metodo barvanja po Custers (2003). Barvilo DAPI smo v obliki praška raztopili v 50 % etanolu do koncentracije 1,5 mg/ml in ga nadalje redčili do koncentracije 2,5 µg/ml v posebnem jedrno ekstrakcijskem pufuru. Pufur je sestavljen iz 10 mM Tris-HCl (pH7.0), 10 mM spermin-tetrahidroklorida, 10 mM NaCl, 200 mM heksilenglikola in iz 1% (v/v) Triton X100. Nastalo mešanico smo redčili 1:1 v glicerinu. Barvilo smo shranjevali na 4 °C v temi. Kadar barvamo z barvilom DAPI, moramo vse preparate v temi hraniti čez noč, in sicer v hladilniku pri 4 °C. Pri barvanju moramo biti tudi zelo previdni, saj je barvilo kancerogeno.

3.2.2.2 Barvanje z acetokarminom

Acetokarmin se uporablja za histološko barvanje. Vinskordeče obarvanje jedra je posledica vezave acetokarmina na jedrno DNK. Barvilo smo pripravili tako, da smo 1 g karmina raztopili v 100 ml 55 % očetne kisline in raztopino kuhali za nekaj minut. Raztopino smo nato filtrirali in jo hranili v hladilniku pri 4 °C.

3.2.2.3 Barvanje s propidijevim jodidom (PI)

Barvilo PI se veže na jedrno DNK in fluorescira rdeče barve. Najprej smo barvilo PI v obliki praška raztopili v ddH₂O do koncentracije 2 mg/ml. Nato smo v prazno epico vnesli 1 ml barvila DAPI (pripravljeno po Custers, 2003) in mu dodali 50 µl založne raztopine barvila PI (2 mg/ml). Barvilo smo shranjevali na 4 °C v temi. Kadar barvamo z barvilom PI, moramo vse preparate v temi hraniti čez noč, in sicer v hladilniku pri 4 °C.

3.2.3 Določanje živosti zrelega peloda in mikrospor

Z metodami obarvanja ugotavljamo živost na osnovi permeabilnosti membrane ali encimske reakcije. Ne moremo pa potrditi kalivosti peloda ali zrelosti mikrospor. Mogoče pa je tudi, da po določenem postopku obdelave neobarvan pelod (torej poškodovan pelod) ponovno kali. Pri poskusih smo zmeraj uporabili le svež pelod in

sveže mikrospore, saj smo hoteli ugotoviti kolikšen je približen delež peloda, ki je v določenem mikroskopskem preparatu sploh sposoben kalitve oziroma zorenja na začetku določenega *in vitro* poskusa.

Različna barvila za metode določanja živosti so uporabna na različnih rastlinskih vrstah. Metode na osnovi permeabilnosti membrane so odvisne predvsem od prodornosti barvila v notranjost peloda. Pri metodah, kjer je obarvanje odvisno od specifične encimske reakcije, pa moramo upoštevati dejstvo, da se med razvojnimi stopnjami mikrospor izražanje specifičnih encimov lahko spreminja. S spreminjanjem izražanja encimov se spreminja jakost reakcije, ki jo katalizira in posledično tudi obarvanje samega peloda. Ta problem je še posebej izražen v primeru mikrospor v zelo zgodnjih razvojnih stopnjah.

Pri zrelem in svežem pelodu smo od 4 do 5 odprtih cvetov s pinceto prenesli v kapljico gojišča na objektnem stekelcu. Potem smo s pinceto odstranili vse vidne delce in dodali par kapljic barvila. Stekelce smo ožgali nad alkoholnim gorilnikom. Med ožiganjem smo nagibali stekelce tako, da smo preparat čim hitreje pomešali in osušili (ne smemo ga zažgati ali zavreti). Nato smo preparatu dodali še 3 kapljice glicerola in ga pokrili s krovnim stekelcem. Pomembno je, da se glicerol razteza po celotni spodnji površini krovnega stekelca. Pri svežih mikrosporah smo do 5 temnozelenih zaprtih popkov s skalpelom razrezali (čisto rezilo za vsak vzorec) v kapljici gojišča na objektnem stekelcu. Odstranili smo vse vidne delce in nadaljevali enako kot pri postopku za zrel in svež pelod.

3.2.3.1 Barvanje z MTT (3 – 4,5 dimetiltiazol-2-il-2,5 difenil – tetrazolijevim bromidom)

Barvanje z MTT temelji na določanju prisotnosti in nivoja izraženosti encima dehidrogenaza. Rdeča (tudi škrlatno ali rjavo rdeča) barva peloda nakazuje prisotnost dehidrogenaze in s tem živost peloda. Poškodovani pelodi ostanejo neobarvani. Uporabili smo modificirano metodo po Rodriguez-Riano in Dafni (2000). Barvilo smo pripravili tako, da smo raztopili 100 mg MTT (Sigma) v 5 ml 5 % saharoze. Preparat lahko opazujemo pod mikroskopom z navadno svetlobo.

Pri metodi barvanja z MTT moramo biti zelo previdni, saj je barvilo karcerogeno (obvezna uporaba rokavic).

3.2.4 Metode *in vitro* kalitve zrelega peloda

Prve poskuse *in vitro* kalitve zrelega bezgovega peloda smo izvedli na gojiščih GK1, GK2 in NLN, ki so bila optimizirana za druge rastlinske vrste (Nitsch in Nitsch, 1969; Jahier, 1996) in na gojišču BK (Brewbaker in Kwack, 1963), ki je bilo že uporabljeno pri kalitvi črnega bezga (*Muccifora* in sod., 2003) (preglednica 1).

Za preiskovanje *in vitro* kalitve zrelega peloda smo vedno uporabili svež pelod iz odprtih cvetov bezgovega socvetja, ki je bil nabran v dopoldanskem času. Vzorce peloda smo pridobili iz nerazkuženih cvetov, saj zaradi kratke inkubacijske dobe ni bilo potrebno izvajati poskusov pod sterilnimi pogoji.

Že na začetku smo se poslužili dveh osnovnih metod kalitve peloda, in sicer kalitve na stekelcih in kalitve v suspenzijski kulturi. Pri poskusih kalitve na objektih stekelcih smo predvsem hoteli opazovati kalitev po kratki inkubaciji (večinoma 1 uro) oziroma hitrost odzivnosti peloda. S poskusi kalitve v suspenzijski kulturi pa smo hoteli opazovati kalivost peloda po daljšem času (do 1 dneva), dolžino pelodnih cevk in vpliv gostote peloda ter količine gojišča na kalitev.

Pri prvi metodi smo na objektno stekelce kanili kapljico gojišča in vanjo pomočili 5-8 odprtih cvetov. Cvetove smo pretresli z iglo, s pinceto pa smo odstranili vse vidne plavajoče delce. Pred 1 urno inkubacijo pri 23 °C na zraku smo dodali še 3-4 kapljice gojišča (po potrebi pa tudi med inkubacijo, da ni prišlo do izsušitve). Nato smo preparat prekrili s krovnim stekelcem in opazovali rezultate pod mikroskopom povezanim z digitalno kamero in računalnikom.

Pri drugi metodi smo na dno petrijeve plošče kanili kapljico gojišča in v njej pomočili 15-20 odprtih cvetov. Cvetove smo pretresli s konico pincete in nato iz gojišča odstranili vse vidne plavajoče delce. Na koncu smo dodali še toliko kapljic gojišča, da je bilo dno petrijevke v celoti preplavljeno. Zaprte petrijevke smo zatesnili s parafilmom in jih skupaj zavili v aluminijasto folijo ter jih približno 1 dan inkubirali v inkubatorju pri 24 °C. Po poskusu smo odprte petrijevke neposredno opazovali pod mikroskopom (na manjši povečavi). S programsko opremo Lucia Karyotyping smo iz digitalno posnetih fotografij merili dolžine pelodnih cevk v µm enotah.

3.2.4.1 Optimizacija inkubacije

3.2.4.1.1 Optimizacija inkubacije na stekelcih

Zaradi slabega odziva peloda pri začetnih poskusih kalitve na stekelcih smo slednje inkubirali od 1 ure pa do 17 ur v vlažnostni komori (kartonasta škatla, ki ima na dnu položene vlažne papirnate brisače, pokrita pa je z aluminijasto folijo), in sicer v inkubatorju pri 24 °C. Preparate smo nato prekrili s krovnim stekelcem in jih opazovali pod mikroskopom.

Pri stresanju cvetov z iglo je mogoče, da pride do poškodb peloda, zato smo poskusili pelod izolirati iz anter. V petrijevko smo s pomočjo stereomikroskopa, igel in pincete izolirali 10 anter (vsak cvet vsebuje 5 anter). Antere smo prenesli v kapljico gojišča na objektnem stekelcu in jih vsako posebej z iglo rahlo premešali, da smo razbili skupke peloda. Pri večini ponovitev smo antere na koncu odstranili iz gojišča, pri nekaterih ponovitvah pa smo jih pustili. Nato smo prvo polovico dna v vlažnostni komori prekrili s plastično folijo in nanjo položili nekaj ponovitev z anterami in nekaj ponovitev brez anter. Tudi na drugo polovico dna smo položili nekaj ponovitev z anterami in nekaj ponovitev brez anter. Vsem stekelcem smo pred 1-17 urno inkubacijo v inkubatorju pri 24 °C dodali še 2-3 kapljice gojišča.

3.2.4.1.2 Optimizacija inkubacije v suspenzijski kulturi

Pri metodi kalitve v suspenzijski kulturi smo poskušali pospešiti začetek kalitve tako, da smo petrijeve plošče zavite v aluminijasto folijo (v temi) inkubirali v inkubatorju pri 24 °C na stresalniku (na nižjih obratih). Čas inkubacije smo od poskusa do poskusa skrajševali iz dveh ur na eno uro.

3.2.4.2 Optimizacija gojišča

Tudi pri poskusih optimizacije gojišča smo izvajali različne postopke inkubacije in izolacije peloda in jih primerjali med seboj. Ker je bila na izbranem gojišču BK kalivost največja (še posebej pri metodi kalitve v suspenzijski kulturi), smo se odločili za spreminjanje pH vrednosti tega gojišča, in sicer v lestvici od pH 4 do pH 8,6. Da bi lažje spreminjali pH smo originalnemu gojišču BK dodali 500 mg/L MES (natrij-MES). Zanimal pa nas je tudi vpliv različnih vrst sladkorja na *in vitro* kalitev peloda. Tako smo saharozo v spremenjenem gojišču BK s pH 5,5 zamenjali z enakim odstotkom glukoze ali maltoze.

3.2.4.3 Preverjanje gojišč za *in vitro* zorenje mikrospor

Če omogoča gojišče dobro *in vitro* kaljivost zrelega peloda, je mogoče, da vsebuje tiste snovi, ki ustrezajo tudi mikrosporam pri *in vitro* zorenju. Zato smo z optimizirano metodo kalitve v suspenzijski kulturi preiskusili gojišča T1, M1 in M2 za *in vitro* kalitev zrelega peloda. Gojišča T1, M1 in M2 smo kasneje uporabili za poskuse *in vitro* zorenja mikrospor.

3.2.5 Dokazovanje zorenja peloda

Zrelost peloda lahko dokazujemo na različne načine, in sicer lahko spremljamo delitve in migracije jeder v pelodu, lahko merimo povečanje velikosti peloda ali pa določamo količino škroba, ki se med razvojem nabira znotraj peloda. Odločili smo se za metodo kalitvene sposobnosti *in vitro* dozorelega peloda ob koncu zorenja. Stopnjo uspešne dozoritve smo vedno enačili izključno le z deležem kalečega peloda ob koncu *in vitro* zorenja mikrospor. Kot kaleče pelode smo upoštevali samo tiste, ki so imeli pelodno cevko jasno razvidno in daljšo od premera peloda.

Da bi zagotovili pred vsakim poskusom *in vitro* zorenja mikrospor, da so mikrospore zagotovo nezrele in nesposobne za kalitev, smo izključno zahtevali le enojedrne mikrospore značilnih majhnih trikotnih oblik. Uporabili smo večinoma le socvetja s temnozelenimi od 1,8 do največ 2 mm velikimi zaprtimi popki. Ugotovili smo, da lahko tudi široko razvejana socvetja z nekoliko manjšimi popki (1,5 mm; še posebej svetlozelenimi) vsebujejo enojedrne mikrospore brez tetrad. V nasprotju pa lahko nerazvejana socvetja s sprjetimi vejicami in s popki primerne velikosti (tudi do 2 mm; še posebej temnozelenimi) vsebujejo številne tetrade in so neprimerne za izolacijo mikrospor.

Tako smo pred vsakim poskusom *in vitro* zorenja mikrospor najprej selekcionirali primerna socvetja, in sicer z barvanjem z acetokarminom. Vsakemu socvetju smo odvzeli 4-5 popkov in jih na objektnem stekelcu v kapljici acetokarmina razrezali s skalpelom (rezilo mora biti za vsako socvetje čisto). S krovnim stekelcem pokrite preparate smo si ogledali pod mikroskopom. Izbrali smo izključno tista socvetja, katerih preparati so pokazali enojedrne mikrospore.

Mogoče je, da se med enojedrnimi mikrosporami nahaja tudi nekaj dvojedrnih mikrospor, še posebej zato, ker so slednje zelo podobnih oblik in velikosti, jedri pa se lahko med seboj tudi prekrivata. Zato smo v poskusih *in vitro* zorenja poleg gojišč za *in vitro* zorenje mikrospor uporabili tudi spremenjeno gojišče BK za *in vitro* kalitev zrelega peloda, ki je omogočalo najboljšo kalitev že po 1 uri. V primeru da bi bile nezrele mikrospore pomešane z zreliimi pelodi, bi slednji v gojišču BK že po 1 uri kalili. Tako smo 1 uro po vsakem poskusu *in vitro* zorenja pod mikroskopom pregledali 2-3 petrijevi plošči s spremenjenim gojiščem BK. Dodatno varovalo pa predstavlja tudi dejstvo, da vsebujejo številna gojišča za *in vitro* zorenje mikrospor (T1, M1, M2 in BKK) popolnoma vse sestavine, ki jih vsebuje spremenjeno gojišče BK za *in vitro* kalitev zrelega peloda (v enaki množini) in tako omogočajo učinkovito kalitev zrelega peloda.

3.2.6 Metode *in vitro* zorenja enojedrnih mikrospor

Poskuse *in vitro* zorenja mikrospor smo izvedli na gojiščih MA90, SA90, MA120 in SA120, ki so bila optimizirana za druge rastlinske vrste (Bueno in sod., 2005) in na optimiziranem gojišču BK, ki je služilo kot kontrola (za dokazovanje nezrelosti peloda). Gojišče MA90 (preglednica 1) vsebuje 90 g/l manitola. Temu gojišču smo namesto manitola dodali 90 g/l saharoze ali pa 120 g/l saharoze, in smo tako dobili v prvem primeru gojišče SA90 in v drugem primeru gojišče SA120. Gojišče MA120 ima enako sestavo kot gojišče MA90, le da vsebuje 120 g/l manitola in ne 90 g/l manitola kot v primeru gojišča MA90.

Za preiskušanje *in vitro* zorenja mikrospor smo vedno uporabili le temnozelene od 1,8 do največ 2 mm velike zaprte popke iz predhodno selekcioniranih bezgovih socvetij. Socvetja smo selekcionirali z barvanjem z acetokarminom, kot je razloženo v podpoglavju "Dokazovanje zorenja peloda".

Poskuse *in vitro* zorenja smo izvajali v sterilnih pogojih. Steklovino, potrebno orodje in bidestilirano vodo za spiranje smo zavili ali pokrili z dvojnimi slojem aluminijaste folije in jih sterilizirali (razkužili) v avtoklavu (121 °C, 20 min). V nekaj erlenmajeric smo pred pokritjem z alu folijo vnesli 50 ml bidestilirane vode. Ker so mikrospore znotraj popka sterilne, lahko s sterilno izolacijo omogočimo več tedensko *in vitro* zorenje. Tako smo celoten postopek izvajali v komori za sterilno delo.

Najprej smo med obema dlanema obračali selekcionirana socvetja tako, da je večina cvetnih popkov padla na papirnati pladenj. Za eno izolacijo smo potrebovali približno toliko popkov, kot se jih nahaja v eni majhni ladjici za tehtanje. V sterilizirano erlenmajerico s 50 ml bidestilirane vode smo vnesli 0,83 g dikloroizocianurne kisline in

počakali, da se je raztopina zbistрила. Nato smo vnesli še popke (pazimo, da se popki ne dotaknejo vratu erlenmajerice in da neposredno padejo v raztopino) in magnet za mešanje, erlenmajerico pa smo zopet pokrili s folijo. Vsebino smo potem 10-13 minut mešali na magnetnem mešalniku, in sicer na zmerni hitrosti, da ni prišlo do dvigovanja nivoja tekočine. Po mešanju smo raztopino odlili tako, da smo s sterilno pinceto zadržali vse popke. Popke smo nadalje dvakrat sprali s sterilno bidestilirano vodo in jih zopet zadržali v erlenmajerici. Po tretjem spiranju smo med mešanjem (da se popki ne posedejo) celotno vsebino vlili skozi sterilno cedilce. Tako smo lahko s sterilno pinceto odstranili v cedilcu ujeti magnet in postrgali popke v srednje veliko sterilno PVC petrijevo ploščo. Plošči smo dodali nekaj gojišča za *in vitro* zorenje in začeli s sterilno britvico sekljati popke do nastanka zelenorjave suspenzije (pazimo, da se ne dotikamo roba plošče). Zaprto ploščo smo za 3 minute narahlo mešali po površini mize in vsebino hitro vlili preko sterilnega cedilca v sterilno stekleno čašo. Nato smo cedilce s pomočjo sterilne pipete še dva- do trikrat sprali z istim gojiščem, tako da smo v čaši dobili rjavordečo suspenzijo mikrospor. Polovico suspenzije smo iz čaše vlili v eno sterilno falkonko, drugo polovico pa v drugo falkonko in s pipeto dodali toliko gojišča za *in vitro* zorenje, da je znašal skupni volumen v vsaki falkonki 10 ml. Falkonke smo nato zaprli in jih centrifugirali (700 r.p.m., 5 min, 0 zaviranja). Po centrifugiranju smo s sterilnimi pipetami odstranili vso tekočino do peleta, dodali gojišče do volumna 12 ml, falkonke zaprli in jih stresali (da smo raztopili pelet). Potem smo v majhne sterilne PVC petrijeve plošče s sterilno pipeto vnesli ravno toliko suspenzije, da je bilo dno plošče v celoti prekrito. Zaprte petrijeve plošče smo zatesnili s parafilmom in jih položili v kartonasto škatlo s pokrovom. Inkubirali smo jih v temi (v škatli) v inkubatorju pri 24 °C na stresalniku (43 r.p.m.). Že po 1 uri smo 2-3 petrijevi plošči z optimiziranim gojiščem BK pregledali pod mikroskopom, da smo ugotovili fazo razvoja peloda.

3.2.6.1 Optimizacija gojišča

Ker je bilo spremenjeno gojišče BK edino, ki je po najmanj enem tednu inkubacije tu in tam vsebovalo nekaj kalečih pelodov in ker je pri skoraj vseh poskusih s tem gojiščem prišlo do velikih razlik v velikosti mikrospor, smo se odločili, da bomo na osnovi optimiziranega gojišča BK izdelali gojišča za *in vitro* zorenje mikrospor. Torej smo predvidevali, da bodo snovi, ki ustrezajo pri *in vitro* kalitvi zrelega peloda, verjetno ustrezale tudi pri *in vitro* zorenju mikrospor. Tem snovem pa smo za boljšo nutritivacijo dodali še aminokislini prolin in glutamin ter laktalbumin hidrolizat. Saharozo smo zmanjšali iz 15 % na 10 %. Nastalo gojišče za *in vitro* zorenje mikrospor smo poimenovali gojišče T1. Upoštevali smo, da mikropore pri zorenju potrebujejo vir dušika (glutamin), snovi za izgradnjo proteinov (laktalbumin hidrolizat, glutamin) in pa snovi za zaščito pred morebitno izsušitvijo mikrospor (prolin). Dodani glutamin je na primer zelo pomemben za sam nabor proteinov, ki ga ima celica na voljo za opravljanje različnih celičnih nalog.

Ker so bili rezultati na gojišču T1 slabši kot tisti iz optimiziranega gojišča BK, smo se odločili, da bomo močno zmanjšali količino vnešenega laktalbumin hidrolizata, in tako ugotovili ali ima ta negativni učinek na zorenje mikrospor. Zopet smo povečali količino saharoze iz 10 % na 15 %. Iz gojišča smo odstranili tudi prolin, dodali pa smo rastni stimulator inozitol (gojišče M1) ali pa nukleozida citidin in uridin (gojišče M2). Med *in*

in vitro zorenjem se namreč jedro v mikrosporah deli in za podvojitve DNK molekule so potrebni nukleotidi. V gojiščih M1 in M2 smo za približno polovico znižali koncentracijo glutamina. Vendar smo zopet z *in vitro* poskusi ugotovili, da tudi na gojiščih M1 in M2 ni bilo videti niti sledu o morebitnem zorenju mikrospor. Zato smo iz gojišča M2 odstranili celoten laktalbumin hidrolizat in mu tokrat dodali dvakrat večjo koncentracijo že uporabljenih nukleozidov. Tako dobljeno gojišče smo poimenovali gojišče BKK.

3.2.6.2 Časovni potek razvoja peloda med *in vitro* zorenjem

V zadnjem poskusu *in vitro* zorenja mikrospor smo uporabili gojišče BKK s pH vrednostjo 5,5 in 5,1. Začetni enojedrni stadij mikrospor smo preverili z barvanjem s PI. Vsak dan smo za oba tretmaja (gojišče BKK s pH 5,1 ali s pH 5,5) pripravili po tri mikroskopske preparate, in sicer vsakega iz druge petrijeve plošče. Pri tem smo preparat za določeno petrijevo ploščo pripravili z uporabo avtoklaviranih pipet v brezprašni komori. Tako smo po pripravi preparata petrijevo ploščo vrnili na inkubacijo. Želeli smo ugotoviti, kdaj pride do dvo- oziroma do trojedrne razvojne stopnje in kdaj pride do kalitve dozorelega peloda tekom *in vitro* zorenja. Pri računanju deleža določene razvojne stopnje smo vedno pregledali po vsaj 100 pelodnih zrn v vsakem mikroskopskem preparatu. Po dvanajstih dneh smo inkubacijo prekinili in neposredno pod mikroskopom na manjši povečavi (4x objektiv) pregledali petrijeve plošče. S končnim pregledom vseh petrijevih plošč smo določili le delež kalečih pelodnih zrn, razvojne stopnje nekalečega peloda pa ne.

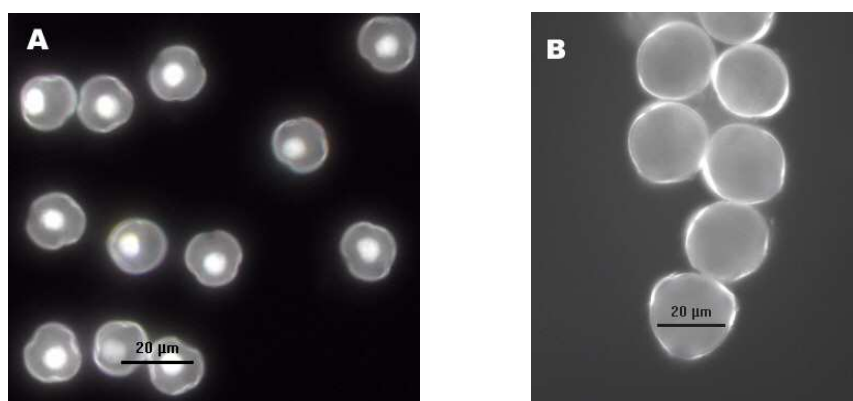
Preglednica 1: Gojišča za *in vitro* kalitev zrelega peloda in za *in vitro* zorenje nezrelega peloda bezga

Sestavine [mg/l]	Gojišča za <i>in vitro</i> kalitev zrelega peloda					Gojišča za <i>in vitro</i> zorenje nezrelega peloda				
	BK	GK1	GK2	NLN	BK (spremenjeno)	MA90	T1	M1	M2	BKK
Makroelementi										
Ca (NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	300			500	300		300	300	300	300
MgSO ₄ ·7H ₂ O	200			61	200	250	200	200	200	200
KNO ₃	100			125	100		100	100	100	100
KCl						1490 (=1,49 g/l)				
CaCl ₂ ·2H ₂ O						146				
KH ₂ PO ₄				125		140				
Mikroelementi										
H ₃ BO ₃	100		5	10	100		100	100	100	100
CuSO ₄ ·5H ₂ O				0,025						
CoCl ₂ ·6H ₂ O				0,025						
MnSO ₄ ·H ₂ O				18,95						
NaFeEDTA				36,7						
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O				0,25						
ZnSO ₄ ·7H ₂ O				10						
Organske snovi, vitamini										
Saharaza	15·10 ⁴ (=150 g/l)	15·10 ⁴ (=150 g/l)	15·10 ⁴ (=150 g/l)	13·10 ⁴ (=130 g/l)	15·10 ⁴ (=150 g/l)		1·10 ⁵ (=100 g/l)	15·10 ⁴ (=150 g/l)	15·10 ⁴ (=150 g/l)	15·10 ⁴ (=150 g/l)
Laktalbumin hidrolizat							1·10 ⁴ (=10 g/l)	1000 (=1 g/l)	1000 (=1 g/l)	
Manitol						9·10 ⁴ (=90 g/l)				
MES (Na)					500		500	500	500	500
Uridin									250	500
Citidin									130	260
Mio-inozitol				100				100		
Nikotinska kislina				10						
Piridoksin HCl				0,5						
Tiamin HCl				0,5						
Prolin							440			
Glutamin							440	200	200	200
pH vrednost gojišča										
pH	6,3	6,5	6,7	5,8	5,1	7	5,6	5,5	5,5	5,1/5,5

4 REZULTATI

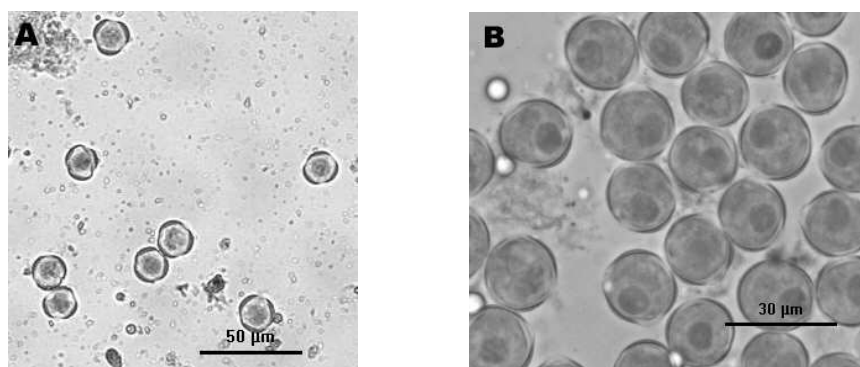
4.1 DOLOČANJE RAZVOJNE STOPNJE MIKROSPOR

Obarvanje mikrospor z DAPI je bilo uspešno, saj je bilo mogoče lepo videti jedro oziroma jedra znotraj mikrospor. Na sliki 1a vidimo enojedrne mikrospore bezga z natančno in močno obarvanimi jedri. Metoda barvanja z DAPI pa se ni izkazala za uspešno v primeru barvanja zrelega peloda. Jedra se niso obarvala, ker je pelodna stena preprečila prodiranje barvila v notranjost pelodnega zrna. To se vidi na sliki 1b.



Slika 1: Obarvanje a) enojedrnih mikrospor in b): zrelega peloda z barvilom DAPI

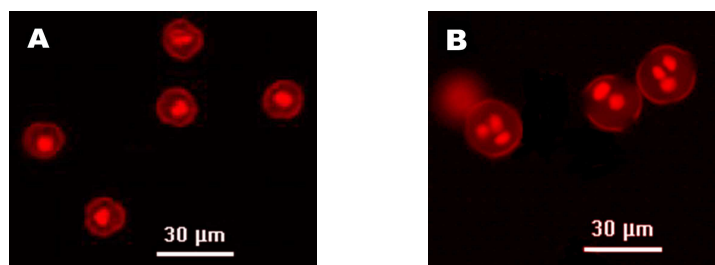
Obarvanje z acetokarminom je bilo uspešno v primeru bezgovih mikrospor, saj so se jedra dobro obarvala. Na sliki 2a vidimo enojedrne mikrospore bezga z razločno obarvanimi jedri. Barvanje z acetokarminom je bilo uspešno tudi v primeru barvanja zrelega bezgovega peloda. Jedra so se dokaj dobro obarvala, čeprav sta vidni le dve jedri od skupaj treh jeder, ki se nahajajo v zrelem bezgovem pelodu. Na sliki 2b lahko vidimo zrel pelod pobarvan z acetokarminom.



Slika 2: Obarvanje a) enojedrnih mikrospor in b): zrelega peloda z acetokarminom

Obarvanje s PI je bilo zelo uspešno tako v primeru bezgovih mikrospor (slika 3a) kot v primeru zrelega peloda (slika 3b). V obeh primerih so se jedra močno in natančno

obarvala. Izkazalo se je, da pelodna stena ne preprečuje prehajanja barvila do citoplazme, vpliva pa na sam čas prodiranja barvila.



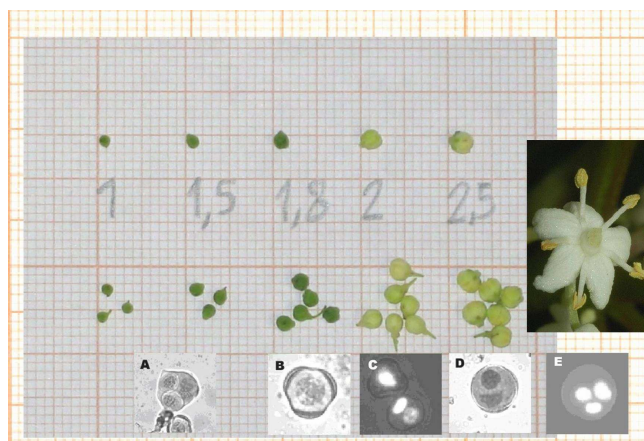
Slika 3: Obarvanje a) enojedrnih mikrospor in b): zrelega peloda z barvilom PI

V preglednici 2 smo prikazali pregled obeh preiskušanih metod barvanja glede na njune prednosti in slabosti.

Preglednica 2: Primerjava metod barvanja z acetokarminom in z DAPI

Metoda	Prednosti	Slabosti	Uspešnost
DAPI	jedra v mikrosporah se natančno obarvajo	barvilo ne prodira skozi debelejšo pelodno steno; flourescenčna metoda, dokaj zamudna	Uspešna metoda za barvanje nezrelega peloda
Acetokarmin	barvilo prehaja tudi preko debelejše pelodne stene; neflourescenčna metoda, široka uporaba, zelo enostavna metoda	obarvanje jedra pri zrelem in nezrelem pelodu ni tako razločno in močno	Zelo hitra metoda za barvanje zrelega in nezrelega bezgovega peloda
PI	barvilo prehaja preko debelejše pelodne stene, natančno obarva jedra	flourescenčna metoda; zamudna metoda	Zelo uspešna metoda za barvanje zrelega in nezrelega bezgovega peloda

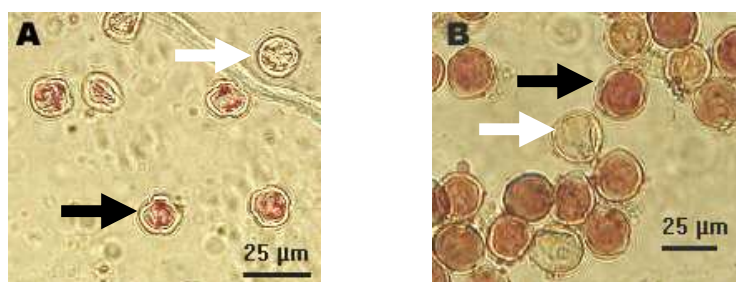
S tako preiskušanimi metodami smo želeli ugotoviti v kako velikih zaprtih cvetnih popkih se nahajajo enojedrne mikrospore. Prav te smo namreč želeli uporabiti pri poskusih *in vitro* zorenja mikrospor. Na sliki 4 lahko vidimo zaprte popke, ki so razvrščeni glede na njihov premer (1.0 mm, 1.5 mm, 1.8 mm, 2.0 mm in 2.5 mm; od leve proti desni). Na spodnjem delu slike so prikazane različne razvojne stopnje mikrospor, ki so razvrščene od tetrad pa do zrelega trojedrnega peloda (od leve proti desni). Tako smo ugotovili, da se enojedrne mikrospore nahajajo v popkih s premerom od 1,8 mm pa do maksimalno 2,0 mm. V popkih, ki imajo premer večji ali enak 2,0 mm, pa že najdemo mikrospore v dvojedrni razvojni stopnji. Popki s premerom 2,5 mm imajo bistveno večje mikrospore, ki vsebujejo vsaj dve jedri. Popki, ki pa so v premeru manjši ali enaki od 1,5 mm, vsebujejo le nekaj enojedrnih mikrospor, zelo veliko pa se jih nahaja še v tetradah (po štiri skupaj).



Slika 4: Zaprti popki razvrščeni glede na njihov premer (1.0 mm, 1.5 mm, 1.8 mm, 2.0 mm in 2.5 mm) s spodaj pripadajočimi razvojnimi stopnjami mikrospor; a) mikrospore v tetradi, b) mikrospora v enojedni razvojni stopnji, c) mikrospori v enojedni in začetni dvojedni razvojni stopnji, d) povečana dvojedna mikrospora z ojačano pelodno steno in e) zrel pelod s tremi jedri

4.2 DOLOČANJE ŽIVOSTI ZRELEGA PELODA IN MIKROSPOR

MTT metoda barvanja sodi med neflourescenčne metode in temelji na odkrivanju encimske aktivnosti. Metabolno aktiven pelod z delujočim encimom dehidrogenazo se z barvilom obarva rdeče, medtem ko se poškodovani pelod zaradi odsotne encimske aktivnosti ne obarva. Na sliki 5a vidimo sveže mikrospore bezga, kjer se izrazito ločujejo encimsko aktivne rdeče obarvane mikrospore od neaktivnih neobarvanih mikrospor. Na sliki 5a pa lahko vidimo obarvan in neobarvan zrel svež pelod.



Slika 5: Obarvanje a) mikrospor in b) zrelega peloda bezga z barvilom MTT; črna puščica označuje obarvan pelod, bela puščica pa neobarvanega

Z uporabo te metode smo določali delež živosti svežih mikrospor in svežega zrelega peloda. Tako smo hoteli določiti kolikšen delež peloda je sploh odziven na *in vitro* poskuse v laboratoriju. Ugotovili smo, da je živost svežega peloda zelo visoka, in sicer 87,6 % pri mikrosporah in 85,9 % pri zrelem pelodu. Poskus določevanja živosti mikrospor in peloda smo trikrat ponovili in vsakič pod mikroskopom pregledali po vsaj 100 pelodnih zrn/mikrospor (preglednica 3).

Preglednica 3: Živost svežih mikrospor in svežega zrelega peloda bezga

Poskus	Živost (%) peloda bezga	
	mikrospore	zrel pelod
1	82,8	81,9
2	90,5	88,2
3	89,3	87,6
Povprečje	87,6	85,9

4.3 IN VITRO KALITEV ZRELEGA PELODA

Prve poskuse *in vitro* kalitve zrelega peloda bezga smo opravili v tekočih gojiščih optimiziranih za druge rastlinske vrste in v gojišču BK, ki je bil že uporabljen pri kalitvi bezga (Muccifora in sod., 2003). Poskuse smo izvajali z dvema metodama, in sicer z metodo kalitve na stekelcih in z metodo kalitve v suspenzijski kulturi. Ker so bili rezultati kalitve na stekelcih bistveno slabši od rezultatov kalitve v suspenzijski kulturi, smo v preglednici 4 podali le rezultate slednje metode. Pri vseh poskusih predstavljenih v preglednici 4 smo pelod izolirali v gojišče s stresanjem cvetov s konico pincete. Inkubacija peloda v petrijevih ploščah je potekala 17 ur v inkubatorju pri 24 °C v temi (aluminijasta folija). Delež kalivosti v gojišču BK je bil 76,0 %, v gojišču GK2 pa 65,5 %. V gojiščih GK1 in NLN pa je bila kalivost podobna, in sicer v prvem primeru 52,6 % in v drugem primeru 48,4 %. Poskus kalitve smo za vsako gojišče štirikrat ponovili in vsakič pod mikroskopom pregledali po vsaj 100 pelodnih zrn.

Preglednica 4: Kalivost zrelega peloda bezga v suspenzijski kulturi z gojišči BK (Muccifora in sod., 2003), GK1, GK2 in NLN po 17 urah inkubacije

Poskus	Kalivost (%) zrelega peloda bezga po metodi kalitve v petrijevkah (po 17 urah)			
	BK	GK1	GK2	NLN
1	72,7	51,8	61,0	44,6
2	87,7	68,2	67,5	51,4
3	67,2	47,9	66,7	54,7
4	76,2	42,6	66,9	43,2
Povprečje	76,0	52,6	65,5	48,4

4.3.1 Optimizacija inkubacije

Zaradi slabega odziva peloda pri začetnih poskusih kalitve na objektnih stekelcih smo se odločili za daljšo inkubacijo stekelc v vlažnostni komori, in sicer v inkubatorju pri 24 °C. Pri tem poskusu (preglednica 5) smo primerjali različne metode izolacije peloda glede na uspešnost *in vitro* kalitve. Za kalitev smo uporabili dve gojišči, in sicer gojišče BK in GK1. Pelod smo izolirali iz anter ali pa s stresanjem cvetov z iglo. Pelod, ki smo ga izolirali iz anter smo v vlažnostni komori inkubirali z dodanimi anterami ali brez. Pri tem pelodu smo preverili tudi vpliv vlage, kjer smo del peloda inkubirali v vlažnostni komori na PVC foliji, drugi del peloda pa v vlažnostni komori brez folije (večja vlaga). Iz preglednice 4 vidimo, da je bila kalivost peloda na foliji brez anter 0 %. Ko pa smo pelod

inkubirali brez folije in z anterami, pa je bila kalivost 14,9 %. Pelod inkubiran na foliji z anterami in pa brez folije in brez anter je imel podobno kalivost, in sicer v prvem primeru 5,2 % in v drugem primeru 4,3 %. Zrel pelod, izoliran s stresanjem cvetov, je veliko bolje kalil, in sicer od 29,2 % v gojišču GK1 in do 33,5 % v gojišču BK. Vse poskuse z izolacijo peloda iz anter smo izvedli v gojišču BK. Pri vsakem poskusu smo vsakič pregledali po vsaj 100 pelodnih zrn.

Preglednica 5: Kalivost (%) zrelega peloda po 17 urni inkubaciji v primeru izolacije iz anter in po 4 urni inkubaciji v primeru izolacije s stresanjem cvetov. Inkubacija je potekala na stekelcih v vlažnostni komori pri 24 °C (v inkubatorju) v gojiščih BK in GK1

Kalivost (%) peloda na stekelcih po 17 urni inkubaciji v vlažnostni komori						
BK					GK1	
Poskus	izolacija iz anter				izolacija s stresanjem cvetov	izolacija s stresanjem cvetov
	na foliji, brez anter	na foliji, z anterami	brez folije, brez anter	brez folije, z anterami		
	0	5,2	4,3	14,9	33,5	29,2

4.3.2 Optimizacija gojišča za *in vitro* kalitev peloda

4.3.2.1 Optimizacija pH vrednosti gojišča

Spreminjali smo pH vrednost gojišča BK, ker je imelo to gojišče največjo kaljivost v prejšnjih poskusih. Najprej smo opravili poskuse, pri katerih smo ugotavljali kako pH vrednost gojišča vpliva na *in vitro* kalitev zrelega peloda na stekelcih. Pelod smo izolirali po metodi stresa cvetov z iglo. *In vitro* kalitev je potekala 1-2 uri v vlažnostni komori, in sicer v inkubatorju pri 24 °C. Iz preglednice 6 je razvidno, da je bila kalivost pri pH 5,1 največja, in sicer 24,4 %. Pri pH 4,0 je bila kalivost 20,0 %, medtem ko pri vseh drugih pH vrednostih gojišča kalivosti nismo opazili. Za vsako pH vrednost smo poskus trikrat ponovili in vsakič prešteli po vsaj 100 pelodnih zrn.

Preglednica 6: Kalivost (%) zrelega peloda na stekelcih po eno do dvourni inkubaciji v vlažnostni komori pri 24 °C (v inkubatorju) v spremenjenem gojišču BK z različnimi pH vrednostmi

Kalivost (%) peloda na stekelcih po 1-2 urni inkubaciji v vlažnostni komori v spremenjenem gojišču BK					
Poskus	pH 4,0	pH 5,1	pH 6,0	pH 7,0	pH 8,6
1	27,7	23,2	0	0	0
2	17,0	22,3	0	0	0
3	15,2	27,8	0	0	0
Povprečje	20,0	24,4	0	0	0

Vpliv pH vrednosti spremenjenega gojišča BK na kalitev peloda smo preučevali tudi z metodo *in vitro* kalitve v suspenzijski kulturi. Pri poskusih prikazanih v preglednici 7

smo pelod izolirali v petrijeve plošče po metodi stresanja cvetov s konico pincete, inkubacija peloda pa je potekala v inkubatorju pri 24 °C v temi (aluminijasta folija). Kalivost peloda smo preverjali po 5 urah in po 20 urah inkubacije. Vse poskuse kalitve smo trikrat ponovili in vsakič prešteli po vsaj 100 pelodnih zrn. Po prvem pregledu (po 5 urah inkubacije) je bila kalivost pri pH 4,0 približno 15 %. V gojišču s pH 5,1 in s pH 6,0 pa je bila kalivost podobna, in sicer v prvem primeru 58,2 % in v drugem primeru 56,6 %. V gojiščih s pH 7,0 in 8,6 pa po 5 urah inkubacije nismo opazili nobene kalivosti. Po drugem pregledu (po 20 urah inkubacije) pa je bila kalivost v gojišču s pH 4,0 približno 30 %, torej 2x večja kot po 5 urah inkubacije. Največjo kalivost smo opazili pri pH 5,1 in ta je znašala 74,1 %. Tudi pri pH 6 se je kalivost po 20 urah inkubacije povečala na 67,9 %. Po daljši inkubaciji pa je prišlo do kalitve peloda tudi pri pH 7,0, pri tem je delež kalečega peloda znašal 34,1 %. Pri teh poskusih smo merili tudi dolžine pelodnih cevč, in sicer s programsko opremo Lucia Karyotyping. Pri vsakem poskusu smo izmerili pelodne cevke vsaj stotih pelodnih zrn. V povprečju so bile najdaljše pelodne cevke na gojišču s pH vrednostjo 6,0; in sicer 204 µm po 5 urah in 356 µm po 20 urah inkubacije. Na gojišču s pH vrednostjo 5,1 so bile pelodne cevke nekoliko krajše, in sicer 171 µm po 5 urah in 311 µm po 20 urah inkubacije. Pri pH 4,0 pa se je povprečna dolžina močno zmanjšala, in sicer na 87 µm po 5 urah in na 138 µm po 20 urah inkubacije. Pri pH 7,0 je bila povprečna dolžina pelodnih cevč po 20 urah inkubacije 164 µm.

Preglednica 7: Kalivost zrelega peloda bezga v suspenzijski kulturi s spremenjenim gojiščem BK (z različnimi pH vrednostmi) po 5 in po 20 urah inkubacije. V spodnjem delu preglednice so navedene minimalne, maksimalne, in povprečne dolžine pelodnih cevč kalečega peloda v µm

	Kalivost (%) zrelega peloda v petrijevkah (po 5 in po 20 urah) s spremenjenim gojiščem BK									
	pH 4,0		pH 5,1		pH 6,0		pH 7,0		pH 8,6	
Poskus	po 5 urah	po 20 urah	po 5 urah	po 20 urah	po 5 urah	po 20 urah	po 5 urah	po 20 urah	po 5 urah	po 20 urah
1	11,0	25,0	54,9	75,2	57,0	60,9	0,0	30,7	0,0	0,0
2	18,1	44,3	59,2	72,9	53,9	71,4	0,0	55,9	0,0	0,0
3	17,2	21,0	60,6	74,3	58,8	71,3	0,0	15,6	0,0	0,0
Povprečje	15,5	30,1	58,2	74,1	56,6	67,9	0,0	34,1	0,0	0,0
	Dolžina pelodne cevke [µm]									
Min	42	44	81	194	101	143	0	59	0	0
Max	122	271	220	404	324	602	0	330	0	0
Povprečje	87	138	171	311	204	356	0	164	0	0

4.3.2.2 Optimizacija sladkorja v gojišču

Pri poskusih optimizacije sladkorja smo saharozo v spremenjenem gojišču BK zamenjali z glukozo in maltozo v enakem odstotku. pH vrednost smo za spremenjeno gojišče BK naravnali na 5,1; 5,5 ali 6,0. Gojiščem z maltozo oz. glukozo smo pH naravnali na 5,5. Pelod smo izolirali v petrijeve plošče po metodi stresanja cvetov s konico pincete, inkubacija peloda pa je potekala na stresalniku v inkubatorju pri 24 °C, in sicer v temi. Kalivost peloda smo preverili po eni uri inkubacije. Vse poskuse smo trikrat ponovili in vsakič pregledali po vsaj 100 pelodnih zrn. V preglednici 8 vidimo, da je v gojišču s

saharozo največja kalivost, in sicer 76,3 % v primeru pH 5,1; 68,1 % v primeru pH 5,5 in 58,4 % v primeru pH 6,0. V gojiščih z maltozo in glukozo smo opazili zelo slabo ponovljivost rezultatov. Povprečna kalivost v gojišču z maltozo je bila 41,5 %, v gojišču z glukozo pa 48,4 %. Tudi pri teh poskusih smo merili dolžine pelodnih cevk in smo za vsak poskus izmerili pelodne cevke vsaj stotih pelodnih zrn. Najdaljše pelodne cevke smo v povprečju izmerili v gojišču s saharozo, in sicer 39 μm pri pH 5,1; 48 μm pri pH 5,5 in 50 μm pri pH 6,0. V gojišču z maltozo in glukozo pa sta bili povprečni dolžini pelodnih cevk zelo podobni, in sicer v prvem primeru 37 μm in v drugem primeru 31 μm .

Preglednica 8: Kalivost zrelega peloda bezga v suspenzijski kulturi s spremenjenim gojiščem BK (15 % saharoza ali 15 % maltoza ali 15 % glukozo) po 1 uri inkubacije na stresalniku. V spodnjem delu preglednice pa so navedene minimalne, maksimalne, in povprečne dolžine pelodnih cevk kalečega peloda v μm

	Kalivost (%) zrelega peloda v petrijevih ploščah po 1 uri na stresalniku				
	saharozna			maltoza	glukoza
Poskus	pH 5,1	pH 5,5	pH 6,0	pH 5,5	pH 5,5
1	83,0	63,8	51,3	27,0	36,8
2	63,5	67,2	63,4	60,9	36,0
3	82,5	73,2	60,6	36,6	72,4
Povprečje	76,3	68,1	58,4	41,5	48,4
Dolžina pelodne cevke [μm]					
Min	20	27	16	19	14
Max	55	90	85	62	51
Povprečje	39	48	50	37	31

4.3.3 Preverjanje gojišč za *in vitro* zorenje mikrospor

Gojišča T1, M1 in M2, ki smo jih kasneje uporabljali v poskusih *in vitro* zorenja mikrospor, smo primerjali s spremenjenim gojiščem BK za *in vitro* kalitev zrelega peloda. PH vrednost smo za spremenjeno gojišče BK naravnali na 5.1 in 6.0; za gojišče T1, M1 in M2 pa na 5.5. Izolacija in enourna inkubacija peloda v petrijevih ploščah sta potekali enako kot pri poskusih optimizacije sladkorja v gojišču. Rezultati so predstavljeni v preglednici 9. Kalivost v spremenjenem gojišču BK s pH 5,1 je bila 77,4 %, v spremenjenem gojišču BK s pH 6,0 pa 56,1 %. V gojiščih T1, M1 in M2 pa je bila kalivost podobna, in sicer v prvem primeru 32,8 %, v drugem primeru 35,7 % in v tretjem primeru 38,4 %. Poskus kalitve smo za vsako gojišče trikrat ponovili in vsakič pregledali po vsaj 100 pelodnih zrn.

Preglednica 9: Kalivost zrelega peloda bezga v suspenzijski kulturi s spremenjenim gojiščem BK (pH 5,1 in pH 6,0), T1, M1 in M2 po 1 uri inkubacije na stresalniku

Poskus	Kalivost (%) zrelega peloda v petrijevih ploščah po 1 uri				
	BK spremenjeno		T1 pH 5,6	M1 pH 5,5	M2 pH 5,5
	pH 5,1	pH 6,0			
1	87,1	48,4	29,5	32,7	35,2
2	77,0	63,6	29,6	32,7	24,6
3	68,0	56,2	39,2	41,6	55,5
Povprečje	77,4	56,1	32,8	35,7	38,4

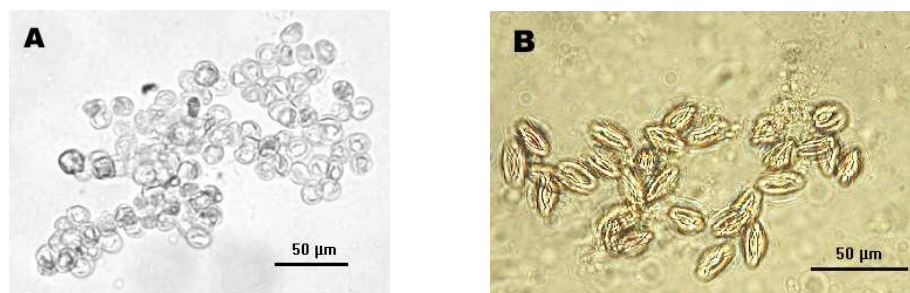
4.4 IN VITRO ZORENJE ENOJEDRNIH MIKROSPOR

4.4.1 Optimizacija gojišča za *in vitro* zorenje mikrospor

Mikrospore smo za *in vitro* zorenje izolirali iz temnozelenih od 1,8 do največ 2,0 mm velikih zaprtih cvetnih popkov iz predhodno selekcioniranih bezgovih socvetij. Pri poskusih *in vitro* zorenja mikrospor bezga smo uporabili gojišča MA90, SA90, MA120 in SA120, ki so bila optimizirana za druge rastlinske vrste in pa spremenjeno gojišče BK, ki je služilo kot kontrola za dokazovanje nezrelosti peloda. Ko smo uporabili gojišča MA90, SA90, MA120 in SA120 za *in vitro* zorenje mikrospor, nismo dobili končnih pozitivnih rezultatov (glej prilogo A). Le pri nekaterih vzorcih s temi gojišči smo opazili povečanje volumna mikrospor. Različno od tega smo pri poskusih s spremenjenim gojiščem BK pri večini vzorcev opazili povečanje volumna mikrospor. Nadalje smo pri poskusih s spremenjenim gojiščem BK opazili tudi kaleče pelode (z daljšimi in krajšimi pelodnimi cevki), ki pa sicer niso bili številni.

Tudi pri poskusih *in vitro* zorenja mikrospor, v katerih smo uporabili gojišča T1, M1 in M2, ki so bila izdelana na osnovi spremenjenega gojišča BK, nismo dobili pozitivnih rezultatov (glej prilogo A). Zanimivo je, da pri nobenem od teh poskusov nismo opazili povečanja volumna mikrospor, kar nakazuje na verjetnost prisotnosti moteče snovi v gojišču (najverjetneje laktalbumin hidrolizata).

Pri poskusih *in vitro* zorenja mikrospor se je nekajkrat zgodilo, da se je material po tednu dni inkubacije okužil in smo ga morali zavreči. Problemi pa so bili tudi z nastajanjem večjih skupkov mikrospor v gojišču (slika 6a). Po obarvanju z barvilom MTT (slika 6b), ki obarva le živ pelod, smo ugotovili, da so mikrospore v nastalih skupkih večinoma poškodovane.



Slika 6: Vzorec izoliranih enojedrnih mikrospor bezga a) brez barvila in b) obarvan z barvilom MTT

Omeniti pa na tem mestu velja, da smo dobili pri poskusih *in vitro* zorenja mikrospor, v katerih smo uporabili gojišče BKK, ki je bilo tudi izdelano na osnovi spremenjenega gojišča BK, pozitivne rezultate. Iz preglednice 10 vidimo, da je bila kalivost na gojišču BKK v intervalu od 7,8 % pa do največ 27,1 %. Povprečni delež kalečih pelodov je bil 14,4 %. Če od tega deleža odštejemo povprečni delež kalečih pelodov v spremenjenem gojišču BK (1,6 %), dobimo 12,8 % kalivost v gojišču BKK. Poskus *in vitro* zorenja mikrospor smo štirikrat ponovili in vsakič pregledali po 100 pelodnih zrn pri vsaj dveh vzorcih.

Preglednica 10: Kalivost *in vitro* dozorelega peloda v suspenzijski kulturi z gojiščem BKK in s spremenjenim gojiščem BK na streslaniku po koncu inkubacijskega obdobja (več kot en teden)

Poskus	vzorec	Kalivost (%) <i>in vitro</i> dozorelega peloda	
		gojišče BKK	spremenjeno gojišče BK
1 (16. 6. 08)	1 (11. 7. 08)	14,9	0,0
	2 (23. 7. 08)	10,5	0,0
2 (19. 6. 08)	1 (11. 7. 08)	7,8	0,0
	2 (23. 7. 08)	9,1	0,0
3 (24. 6. 08)	1 (7. 7. 08)	14,2	6,1
	2 (11. 7. 08)	27,1	5,4
	3 (23. 7. 08)	16,0	0,0
4 (27. 6. 08)	1 (11. 7. 08)	16,0	3,3
	2 (23. 7. 08)	13,9	0,0
Povprečje		14,4	1,6

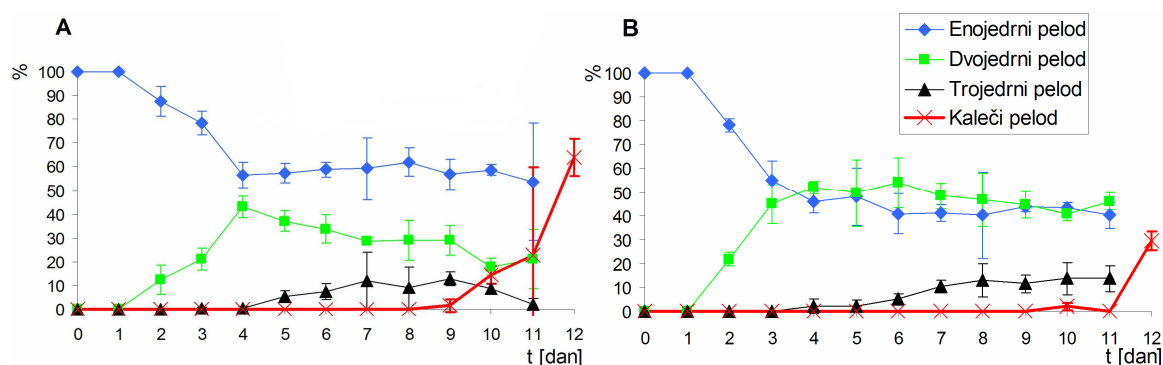
4.4.2 Časovni potek razvoja peloda med *in vitro* zorenjem

Z zadnjim poskusom *in vitro* zorenja enojedrnih mikrospor smo hoteli opisati časovni potek razvoja peloda med inkubacijo v temi v inkubatorju pri 24 °C na streslaniku (43 r.p.m.). Uporabili smo dve gojišči, in sicer gojišče BKK s pH vrednostjo 5,1 in gojišče BKK s pH vrednostjo 5,5. Z metodo barvanja s PI smo selekcionirali socvetja z zaprtimi temnozelenimi (1,8 do največ 2,0 mm velikimi) cvetnimi popki in preverili, da se v začetni suspenziji peloda nahajajo le enojedrne mikrospore. Vsak dan smo za obe pH vrednosti gojišča BKK pripravili po tri mikroskopske preparate z barvilom PI, in sicer

vsakega iz druge petrijeve plošče. Pri računanju deležev eno- dvo- ali trojedrnih oziroma kalečih pelodov smo pregledali po vsaj 100 pelodnih zrn v vsakem mikroskopskem preparatu. Po dvanajstih dneh inkubacije smo celoten poskus prekinili in pregledali vse petrijeve plošče (glej prilogo B).

Na sliki 7a vidimo grafično predstavitev časovnega poteka *in vitro* zorenja enojedrnih mikrospor v gojišču BKK s pH vrednostjo 5,1. Iz grafa vidimo, da je bila začetna suspenzija peloda sestavljena izključno iz enojedrnih mikrospor in da je tako ostalo tudi po prvem dnevu inkubacije. V časovnem intervalu naslednjih tri dni (od prvega od četrtega dne) je delež dvojedrnih pelodnih zrn linearno narasel iz 0 % na približno 43 %. Zrcalno je delež enojedrnih mikrospor upadel iz 100 % na približno 57 %. Do konca inkubacijskega obdobja je ostal delež enojedrnih mikrospor približno nespremenjen. Delež dvojedrnih pelodnih zrn je v intervalu od četrtega do sedmega dne inkubacije linearno upadel na približno 29 %. V tem istem časovnem intervalu je linearno narasel delež trojedrnih pelodnih zrn, in sicer iz 0,5 % na približno 12 %. V intervalu od sedmega od devetega dne je tako delež dvo- kot trojedrnih pelodnih zrn ostal približno nespremenjen. Oba deleža pa sta v intervalu od devetega do enajstega dne upadla, in sicer dvojedrni pelod na približno 21 % in trojedrni pelod na približno 2 %. Prve kaleče pelode smo opazili po 9 dneh inkubacije (1,5 %) od takrat naprej pa se je njihov delež eksponentno povečal na skoraj 64 %.

Na sliki 7b vidimo grafično predstavitev časovnega poteka *in vitro* zorenja enojedrnih mikrospor v gojišču BKK s pH vrednostjo 5,5. Tudi iz tega grafa je razvidno, da je začetna suspenzija peloda vsebovala le enojedrne mikrospore. V časovnem intervalu od prvega do četrtega dne je delež dvojedrnih pelodnih zrn linearno narasel iz 0 % na približno 52 %. Zrcalno je delež enojedrnih mikrospor upadel iz 100 % na približno 46 %. Do konca inkubacijskega obdobja je ostal delež enojedrnih mikrospor približno nespremenjen, delež dvojedrnega peloda pa je počasi upadel na približno 41 % z izjemo šestega dne, ko je meritev preseгла 52 %. Od tretjega do osmega dne inkubacije je linearno narasel delež trojedrnega peloda na približno 13 % in je ostal konstanten do konca inkubacijskega obdobja. Prve kaleče pelode smo opazili po 10 dneh inkubacije (2,0 %). Od takrat naprej je delež kalivosti najverjetneje naraščal in na koncu v povprečju dosegel 29,3 %, čeprav je vzorčenje na enajsti dan inkubacije pokazalo 0 % kalivost.



Slika 7: Grafična predstavitev *in vitro* zorenja enojedrnih mikrospor bezga v 12 dnevem časovnem intervalu v gojišču BKK a) s pH 5,1 in b) s pH 5,5

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZVOJNA STOPNJA MIKROSPOR

Če želimo *in vitro* dozoreti mikrospore, jim moramo najprej določiti razvojno stopnjo, v kateri se nahajajo. S fluorescenčnim barvilom DAPI smo zelo natančno in močno obarvali eno- in dvo-jedrni pelod (slika 1a), pri večjem pelodu (premer okoli 25 μm), z dvema ali s tremi jedri, pa se je obarvala le zunanja stena (slika 1b). Eno- in dvojedrne mikrospore imajo tanko pelodno steno, skozi katero barvilo DAPI uspešno prehaja, pri zrelem pelodu pa se stena odebeli in postane neprepustna za številna barvila. V nasprotju z našimi rezultati pa je Simonovik (2007) z barvilom DAPI uspela obarvati tudi vsa tri jedra znotraj zrelega peloda vrste *Sambucus nigra*.

Barvanje z acetokarminom ima številne prednosti kot tudi slabosti v primerjavi z uporabo barvila DAPI (preglednica 2). Prednosti so to, da je barvilo nefluorescenčno (preparate opazujemo pod navadno svetlobo brez posebnih filtrov) in da je metoda enostavna in hitra ter da so sestavine v barvilu manj zdravju škodljive v primerjavi s fluorescenčnimi barvili. Glavna slabost pa je slaba prodornost barvila v notranjost peloda z debelejšo steno in posledično slaba obarvanost jedra v primerjavi s citoplazmo. Vseeno pa so se jedra mikrospor (slika 2a) in zrelega peloda (slika 2b) bezga dobro obarvala. Prisotne pa so bile težave z določevanjem števila jeder znotraj peloda, ker se vsa jedra niso enako močno obarvala in ker so se pogosto prekrivala med seboj. Tudi Sehgal in sod. (1982) so eno- in dvojedrne pelod črnega bezga uspešno obarvali z acetokarminom.

Metoda barvanja s PI v kompleksno sestavljenem pufru po Custers (2003) se je izkazala za najbolj učinkovito tako za barvanje enojedrnih (slika 3a), dvojedrnih, trojedrnih kot tudi kalečih pelodov (obarvajo se jedra, ki potujejo vzdolž pelodne cevke). Barvilo je uspešno prodiralo tudi skozi debelejšo pelodno steno zrelega peloda (slika 3b), vendar je bil za to potreben določen čas, saj so bili najboljši preparati tisti, ki so bili čez noč shranjeni v temi v hladilniku pri 4 °C. Vižintin in Bohanec (2004) sta za barvanje jeder peloda vrste *Cucumis sativus* preiskusila številne metode (barvanje s PI, z DAPI, z acetokarminom, z mitramicinom in s hematoksilinom). Večina metod se je izkazala za neuspešne ali slabo uspešne, kar nakazuje na to, da so kumare problematična vrsta za barvanje peloda. Največje uspehe sta dosegla z metodo barvanja s PI.

5.2 ŽIVOST PELODA

Živost peloda lahko določujemo z različnimi tehnikami barvanja in z *in vitro* poskusi kalitve peloda. Slednja metoda je najbolj učinkovita, saj nam daje direkten vpogled na resnično opraitveno sposobnost zrelega peloda. Bistvena prednost tehnik z barvanjem pa je hitra določitev živosti peloda. V naših poskusih smo živost svežega peloda (slika 5b) in mikrospor (slika 5a) zelo dobro ocenili z uporabo nefluorescenčnega barvila MTT. Živ pelod in mikrospore so se močno rdeče obarvali, medtem ko je mrtev pelod ostal neobarvan. Tako sveže izolirani pelod kot mikrospore (preglednica 3) so kazale visok delež živosti (87,6 % za mikrospore in 85,9 % za pelod). Nekoliko višji odstotek živosti

(95 %) so dobili Muccifora in sod. (2003), ko so svež tro-jedrni pelod bezga barvali z barvilom FDA.

5.3 *IN VITRO* KALITEV ZRELEGA PELODA

Prve poskuse *in vitro* kalitve peloda črnega bezga smo opravili v gojiščih GK1, GK2, NLN in BK, pri čemer smo delež kalivosti določili po 17. urah inkubacije v petrijevih ploščah. Najboljšo kalivost (76,0 %) smo opazili v gojišču BK (preglednica 4). V povprečju je bila kalitev v tem gojišču boljša za 10,5 % glede na gojišče GK2, za 23,4 % glede na gojišča GK1 in za kar 27,6 % glede na gojišče NLN. Naši rezultati se ujemajo z rezultati Muccifore in sod. (2003), ki so v gojišču BK po 22 urah inkubacije v petrijevih ploščah pri 23 °C dosegli 88 % kalivost peloda bezga.

Poskusi *in vitro* kalitve na stekelcih so bili neuspešni in so se hitro izsušili na sobni temperaturi. Zato smo jih poskušali inkubirati v vlažnostni komori pri 24 °C. Zanimal pa nas je tudi vpliv v gojišče dodanih prašnic in pa sam način izolacije peloda iz cvetov. Tako nam je uspelo izboljšati kalivost peloda na stekelcih, vendar le do največ 33,5 % kalivosti (preglednica 5). Pri tem se je izolacija s stresanjem cvetov izkazala za učinkovitejšo od izolacije iz anter, nekaj razlik v kalivosti pa smo opazili tudi med gojišči brez ali z dodanimi anterami v prid slednjih.

Pri poskusih optimizacije gojišča BK smo preizkušali različne pH vrednosti gojišča in spreminjali vir sladkorjev. Hitri poskusi *in vitro* kalitve na stekelcih v vlažnostni komori so pokazali (preglednica 6), da sta vrednosti pH 4,0 (20,0 % kalivost) in pH 5,1 (24,4 % kalivost) najbolj primerni za hitro kalitev peloda. Poskusi *in vitro* kalivosti v suspenzijski kulturi pri 24 °C so to dejstvo potrdili (preglednica 7). Po 5 urah je bila kalivost pri pH vrednosti 5,1 le 58,2 %, po 20 urah pa se je dvignila za kar 15,9 %. Podobno opažanje smo odkrili tudi pri pH 4,0 (iz 15,5 % se je dvignila za 14,6 %) in pH 6,0 (iz 56,6 % se je dvignila za 11,3 %), pri pH vrednosti 7,0 pa kalivosti po 5 urah še ni bilo in se je pojavila šele po 20 urah inkubacije (34,1 %). Da so pH vrednosti, ki so nižje od 7,0, bolj primerne za *in vitro* kalitev so ugotovili tudi Ylstra in sod. (1992) za pelod tobaka in Barinova in sod. (2002) za pelod vrste *Antirrhinum majus*. Pri teh poskusih smo merili tudi dolžine pelodnih cevč (preglednica 7). Najdaljšo povprečno dolžino (204 µm po 5 urah in 356 µm po 20 urah inkubacije) smo izmerili v gojišču s pH vrednostjo 6,0. Dolžina je bila pri tej pH vrednosti v povprečju daljša za 33 µm po 5 urah oziroma za 45 µm po 20 urah inkubacije glede na pH vrednost 5,1, za 117 µm po 5 urah oziroma 218 µm po 20 urah inkubacije glede na pH vrednost 4,0 in za 192 µm po 20 urah inkubacije glede na pH vrednost 7,0. V primerjavi z našimi rezultati pa so Muccifora in sod. (2003) v gojišču BK po 5 urah inkubacije izmerili kar 445 µm oziroma po 22 urah inkubacije celo 1097 µm dolge cevke kalečega peloda črnega bezga, torej za 241 µm oziroma za 741 µm daljše od naših pri pH vrednosti 6,0.

Poskusi optimizacije sladkorja za *in vitro* kalivost v suspenzijski kulturi v temi pri 24 °C na stresalniku (43 r.p.m.) so že po eni uri inkubacije pokazali najboljšo kalivost (76,3 % za pH 5,1; 68,1 % za pH 5,5 in 58,4 % za pH 6,0) v gojišču s saharozo ne glede na pH vrednost (preglednica 8). Kalivost je bila pri pH 5,5 za 26,6 % večja glede na gojišče z maltozo in za 19,7 % večja glede na gojišče z glukozo. Pri teh poskusih smo merili tudi dolžine pelodnih cevč (preglednica 8) in ugotovili smo, da so bile pelodne cevke v

gojišču s saharozo (pri pH 5,5) za 11 μm daljše glede na cevke v gojišču z maltozo in za 17 μm daljše glede na cevke v gojišču z glukozo. Podobne rezultate sta dobila tudi Vižintin in Bohanec (2004) po eni uri inkubacije zrelega peloda vrste *Cucumis sativus*, in sicer so bile v povprečju pelodne cevke v gojišču s saharozo za 36 μm daljše glede na cevke v gojišču z maltozo in za 180 μm daljše glede na cevke v gojišču z glukozo.

Čeprav so bile pelodne cevke razmeroma kratke (od 14 do 90 μm) nam je prvič uspelo doseči visok delež kalivosti peloda bezga (76,3 %) že po eni uri inkubacije. To je v nasprotju z ugotovitvami Muccifore in sod. (2003), ki trdijo, da trojedrni pelod črnega bezga kali šele po 2 urah inkubacije in da je to neznačilno za trojedrni pelod za katerega velja, da kali takoj. Iz naših rezultatov smo spoznali, da je inkubacija na stresalniku (43 r.p.m.) glavni razlog za pospešitev kalitve zrelega peloda. Vzrok je verjetno v tem, da so hranilne, sporočevalne in vzdrževalne snovi v gojišču za pelod hitreje in bolj dostopne kot v primeru inkubacije brez stresalnika.

5.4 *IN VITRO* ZORENJE ENOJEDRNIH MIKROSPOR

Za *in vitro* zorenje enojedrnih mikrospor smo uporabili 4 različice poznanega gojišča (MA90, SA90, MA120 in SA120) in pa 3 gojišča, ki smo jih razvili na osnovi spremenjenega gojišča BK (T1, M1 in M2). Pri vseh sedmih gojiščih nismo po koncu inkubacijskega obdobja dobili pozitivnih rezultatov zorenja peloda oziroma kalitve peloda (glej prilogo A) in le pri redkih vzorcih smo opazili rahlo povečanje volumna mikrospor. Ko pa smo za *in vitro* zorenje mikrospor uporabili spremenjeno gojišče BK in gojišče BKK, smo na koncu inkubacijskega obdobja opazili kaleče pelode in izrazite razlike v volumnu nekalečega peloda. V spremenjenem gojišču BK je bila 1,6 % kalivosti *in vitro* dozorelega peloda, v gojišču BKK pa 14,4 % (preglednica 10). Glede na to, da so bili rezultati v spremenjenem gojišču BK boljši od rezultatov iz gojišč, ki so bila razvita na podlagi spremenjenega gojišča BK (T1, M1 in M2), predvidevamo, da slednja vsebujejo snovi, ki ovirajo proces *in vitro* zorenja. Domnevamo, da je najverjetneje taka sestavina laktalbumin hidrolizat, ki ga gojišče BKK ne vsebuje za razliko od gojišč T1, M1 in M2 (preglednica 1). Nadalje predvidevamo, da nukleozida citidin in uridin spodbujata *in vitro* zorenje in delitev jeder znotraj peloda, saj je njuna koncentracija v gojišču BKK podvojena glede na gojišče M2.

Z zadnjim poskusom smo želeli opisati časovni potek *in vitro* zorenja enojedrnih mikrospor v gojišču BKK s pH vrednostjo 5,1 in 5,5. Iz slike 7a in 7b vidimo, da so se v časovnem intervalu od prvega do četrtega dne, pri obeh pH vrednostih, skoraj vse odzivne enojedrne mikropore delile v dvojedrne mikropore. Od četrtega dne pa do konca inkubacijskega obdobja je v gojišču s pH 5,1 ostalo v povprečju 57,85 % neodzivnih enojedrnih mikrospor, v gojišču s pH 5,5 pa 42,95 %. Torej je bil delež odzivnih enojedrnih mikrospor v gojišču s pH 5,5 v povprečju za 14,9 % večji kot v gojišču s pH 5,1. V intervalu od četrtega do devetega dne je delež dvojedrnih mikrospor v gojišču s pH 5,1 počasi upadel za 14,0 %. Od teh 14,0 % se jih je približno 11,3 % v tem intervalu postopoma razvilo v trojedrni pelod. Zelo podoben razvoj smo zasledili v gojišču s pH 5,5 v intervalu od četrtega do desetega dne, ko je delež dvojedrnih mikrospor enakomerno in počasi upadel za 11,2 %. Od 11,2 % dvojedrnih mikrospor so se najverjetneje vse v tem intervalu postopoma razvile v trojedrni pelod, saj je bilo tega

po osmem dnevu inkubacije v povprečju za kar 12,2 %. Nadalje je delež trojedrnih pelodov v gojišču s pH 5,1 v intervalu od devetega do enajstega dne upadel za 10,5 % na končnih 2,2 %. Najverjetneje je vseh 10,5 % pelodov kalilo, saj je po enajstih dneh inkubacije delež kalečih pelodov znašal že približno 23 %. Iz podatkov lahko sklepamo, da očitno nismo uspeli zaznati vseh trojedrnih pelodov, ki so bili nujno potrebni za celoten delež kalivosti (23 %). Predvidevamo, da je vzrok za tako veliko napako v tem, da se določen delež *in vitro* dozorelega trojednega peloda preprosto ni obarval z barvilom PI. Od enajstega do dvanajstega dne je kalivost skokovito narasla na približno 64 % (končna meritev iz petrijevih plošč), kar je za skoraj 35 % več v primerjavi s končno kalivostjo v gojišču s pH vrednostjo 5,5 (29,3 %). Domnevamo, da je tudi v gojišču s pH vrednostjo 5,5 prišlo do upada deleža trojednega peloda oziroma da je *in vitro* dozoreli pelod v celoti kalil, vendar na žalost nimamo podatkov o deležu trojedrnih pelodov po dvanajstih dneh inkubacije.

Zaključujemo, da smo z navedenimi poskusi uspešno optimizirali metodologijo za *in vitro* zorenje enojedrnih mikrospor vrste *Sambucus nigra*.

6 POVZETEK

Črni bezeg (*Sambucus nigra* L.) postaja vse bolj pomemben v modernih raziskavah in preventivni medicini, zaradi številnih terapevtskih učinkov na zdravljenje novodobnih kroničnih bolezni. S transformacijo moške zarodne linije črnega bezga lahko pridobimo transgeno seme oziroma transgeno rastlino, pri čemer pa se izognemo številnim težavam, ki so prisotne pri drugih tehnikah za genetsko transformacijo rastlin.

Cilj našega dela je bil optimizacija postopkov *in vitro* kalitve in zorenja bezgovega peloda. Najprej smo določevali razvojno stopnjo mikrospor in peloda, pri čemer smo barvali z barvili DAPI, acetokarminom in s PI. Metoda barvanja s PI v kompleksni puferski raztopini se je izkazala za najbolj uspešno tako za zrel kot nezrel pelod. Živost peloda smo uspešno preverjali preko metode barvanja z MTT.

In vitro kalitev zrelega peloda smo preiskovali v različnih gojiščih, tako v suspenzijski kulturi kot na stekelcih, vendar so bili najboljši rezultati dobljeni le v suspenziji gojišča BK v petrijevi plošči. Po optimizaciji pH vrednosti in sladkorja v gojišču smo ugotovili, da lahko kalivost zrelega peloda močno pospešimo z inkubacijo petrijevih plošč na stresalniku. S tem smo ovrgli hipotezo Muccifore in sod. (2003), ki so trdili, da pelod črnega bezga ne more kaliti takoj, oziroma da potrebuje zato minimalno dve uri časa.

Preučili smo možnost *in vitro* zorenja enojedrnih mikrospor v različnih gojiščih, od katerih pa sta bila primerni le spremenjeno gojišče BK in BKK s pH vrednostjo 5,5. Čeprav so bile kalivosti *in vitro* dozorelega peloda nizke, smo v teh dveh gojiščih opazili tudi številne razlike v sami velikosti mikrospor. Poskuse smo zaključili z določitvijo časovnega poteka razvoja enojedrnih mikrospor med *in vitro* zorenjem v gojišču BKK s pH 5,1 oziroma pH 5,5. V gojišču s pH vrednostjo 5,1 smo dosegli do 64 % kalivost. Po našem vedenju je to prvi uspešni poskus *in vitro* zorenja enojedrnih mikrospor vrste *Sambucus nigra*.

7 VIRI

- Atkinson M.D., Atkinson E. 2002. *Sambucus nigra* L. Journal of Ecology, 90: 895–923
- Aziz N., Machray G.C. 2003. Efficient male germ line transformation for transgenic tobacco production without selection. Plant Molecular Biology, 5: 203–211
- Bagchi D., Sen C.K., Bagchi M. in Atalay M. 2004. Anti-angiogenic, Antioxidant, and Anti-carcinogenic Properties of a Novel Anthocyanin-Rich Berry Extract Formula. Biochemistry, 69, 1: 75-80
- Barinova I., Clément C., Martiny L., Baillieul F., Soukupova H., Heberle-Bors E., Touraev A. 2004. Regulation of developmental pathways in cultured microspores of tobacco and snapdragon by medium pH. Planta, 219, 1: 141-6
- Barinova I., Zhexembekova M., Barsova E., Lukyanov S., Heberle-Bors E., Touraev A. 2002. *Antirrhinum majus* microspore maturation and transient transformation *in vitro*. Journal of Experimental Botany, 53, 371: 1119-1129
- Bedinger P. 1992. The Remarkable Biology of Pollen. The Plant Cell, 4: 879 - 887
- Benito R.M., Macke A., Heberle-Bors E. 1988. In situ seed production after pollination with *in vitro* matured, isolated pollen. Planta, 176: 145–148
- Binelli G., De Manincor E.V., Ottaviano E. 1985. Temperature effects on pollen germination and pollen tube growth in maize. Genetica Agraria, 39: 269–281
- Bobek P., Nosámová V. in Èerná S. 2001. Influence of diet containing extract of black elder (*Sambucus nigra*) on colitis in rats. Biologia, 56, 6: 643 - 648
- Bolli R. 1994. Revision of the genus *Sambucus*. Dissertationes botanicae, 223: 1-227
- Brewbaker J.L., Kwack B.H. 1963. The essential role of calcium ion pollen germination and pollen tube growth. American Journal of Botany, 50, 9: 859-865
- Bueno M.A., Pintos B., Höfer M., Martin A. 2005. Pro-Embryos induction from *Olea europaea* L. Isolated microspore culture. Acta Physiologiae Plantarum, 27, 4b: 695-701
- Burke J.J., Velten J., Oliver M.J. 2004. *In Vitro* Analysis of Cotton Pollen Germination. Agronomy Journal, 96: 359–368
- Cao G, Prior RL. 1999. Anthocyanins are detected in human plasma after oral administration of an elderberry extract. Clinical Chemistry, 45: 574 – 576
- Cao Z.Y., Liu G.M. 1996. Textbook of practical techniques on plant tissue culture. Lanzhou, Gansu Technology Publishing Company: 312 str.

- Charlebois D. 2007. Elderberry as a Medicinal Plant. V: *Issues in New Crops and New Uses: Creating Markets for Economic Development*. Janick J., Whipkey A. (ur.). Alexandria, VA: 284 - 292
- Chatterjee A., Yasmin T., Bagchi D., Stohs S.J. 2004. Inhibition of *Helicobacter pylori* *in vitro* by various berry extracts, with enhanced susceptibility to clarithromycin. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 265, 1-2: 19-26
- Chibi F., Matilla A.J., Angosto T., Garrido D. 1994. Changes in polyamine synthesis during anther development and pollen germination in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Physiologia Plantarum*, 92: 61-68
- Clement C., Al-Award D., Audran J.-C. 1996. *In vivo* and *in vitro* pollen maturation in *Lilium*: influence of carbohydrates. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 65: 73-82
- Cronquist A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. New York, Columbia University Press: 30 str.
- Custers J.B.M., Gordewener J.H.G., Nöllen Y., Dons J.J.M., Van Lookeren-Campagne M.M. 1994. Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. *Plant Cell Reports*, 13: 267-271
- Custers J.B.M. 2003. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.). V: *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (ur.). Dordrecht/Boston/London, Kluwer Academic Publisher: 185-193
- Donoghue M.J., Eriksson T., Reeves P.A., Olmstead R.G. 2001. Phylogeny and phylogenetic taxonomy of Dipsacales, with special reference to *Sinadoxa* and *Tetradoxa* (Adoxaceae). *Harvard Papers in Botany*, 6: 459 – 479
- Dumont-BèBoux N., Von Aderkas P. 1997. *In vitro* pollen tube growth in Douglas-fir. *Canadian Journal of Forest Research*, 27: 674-678
- Fan L.-M., Wu W.-H., Yang H.-Y. 1999. Identification and characterization of the inward K⁺ channels in the plasma membranes of *Brassica* pollen protoplasts. *Plant and cell Physiology*, 40: 859-865
- Gebhardt S.E., Harnly J.M., Bhagwat S.A., Beecher G.R., Doherty R.F., Holden J., Haytowitz D.B., Eldridge A.L., Peterson J.J., in Dwyer J.T. USDA's flavonoid database: Flavonoids in fruit. 2009 (jun. 2009).
<http://www.usda.gov/wps/portal/usdahome> (7 apr. 2009)
- Gray A.M., Abdel-Wahab Y.H.A. in Flatt P.R. 2000. The Traditional Plant Treatment, *Sambucus nigra* (elder), Exhibits Insulin-Like and Insulin-Releasing Actions *In Vitro*. *Journal of Nutrition*, 130: 15 – 20

- Guerra M. 1999. Hematoxylin: a simple, multiple-use dye for chromosome analysis. *Genetics and Molecular Biology*, 22, 1: 77-80
- Gupta H.S., Borthakur D.N. 1987. Improved rate of callus induction from rice anther culture following microscopic staging of microspores in iron alum-haematoxylin. *Theoretical and Applied Genetics*, 74: 95-99
- Hayman D.L. 1956. The genetic control of incompatibility in *Phalaris coerulescens*. *Desf. Australian Journal of Biological Sciences*, 9: 321-331
- Hecht S.S., Huang C., Stoner G.D., Li J., Kenney P.M.J., Sturla S.J. in Carmella S.G. 2006. Identification of cyanidin glycosides as constituents of freeze-dried black raspberries which inhibit anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide induced NFκB and AP-1 activity. *Carcinogenesis*, 8: 1617 – 1626
- Heslop-Harrison J. 1979. Aspects of the structure, cytochemistry and germination of the pollen of rye (*Secale cereale* L.). *Annals of Botany*, 44: 1-47
- Heslop-Harrison J., Helsop-Harrison Y. 1970. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence: intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technology*, 45: 115-120
- Hess D. 1987. Pollen based techniques in genetic manipulation. *International Review of Cell & Molecular Biology*, 107: 189-190
- Hess D., Dressier K. 1989. Tumor transformation of *Petunia hybrida* via pollen cultured with *Agrobacterium tumefaciens*. *Botanical Acta*, 102: 202-207
- Heuer S., Lörz H., Dresselhaus T. 2000. The MADS box gene ZmMADS2 is specifically expressed in maize pollen and during maize pollen tube growth. *Sexual Plant Reproduction*, 13: 21–27
- Hoekstra F.A., Bruinsma J. 1975. Respiration and viability of binucleate and trinucleate pollen. *Physiologia Plantarum*, 34: 221-225
- Hoekstra F.A., Crowe J.H., Crowe L.M. 1992. Germination and ion leakage are linked with phase transitions of membrane lipids during imbibition of *Typha latifolia* pollen. *Physiologia Plantarum*, 84: 29-34
- Jahier J. (ed.) 1996. Techniques of plant cytogenetics. Enfield, New Hampshire USA, Science Publishers: 180 str.
- Jayaprakash P., Sarla N. 2001. Development of an improved medium for germination of *Cajanus cajan* (L.) Millsp. pollen *in vitro*. *Journal of Experimental Botany*, 52, 357: 851-855

- Johri B.M., Shivanna K.R. 1977. Physiology of 2- and 3-celled pollen. *Phytomorphology*, 27: 98-106
- Kakani V.G., Prasad P.V.V., Craufurd P.Q., Wheeler T.R. 2002. Response of *in vitro* pollen germination and pollen tube growth of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes to temperature. *Plant, Cell and Environment*, 25: 1651–1661
- Kakani V.G., Reddy K.R., Koti S., Wallace T.P., Prasad P.V.V., Reddy V.R., Zhao D. 2005. Differences in *in vitro* Pollen Germination and Pollen Tube Growth of Cotton Cultivars in Response to High Temperature. *Annals of Botany*, 96: 59–67
- Katsube N., Iwashita K., Tsushida T., Yamaki K., Kobori M. 2003. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1: 68 – 75
- Kindiger B., Beckett J.B. 1985. A hematoxylin staining procedure for maize pollen grain chromosomes. *Stain Technology*, 60, 5: 265-9
- Knowles G. The Elder Tree. 2008 (dec. 2008).
<http://www.controversial.com/Elder.htm> (7. apr. 2009)
- Koncalova M.N., Hrib J., Jicinska D. 1983. The embryology of the *Sambucus* species and hybrids. V: Fertilization and embryogenesis in ovulated plants. Erdelska O. in sod. (ur.). Bratislava, *Slovak Academy of Sciences*: 43-7
- Kyo M., Harada H. 1986. Control of the development pathway of tobacco pollen in vitro. *Planta*, 168: 427–432
- Langridge P., Brettschneider R., Lazzeri P. in Lörz H. 1992. Transformation of cereals via *Agrobacterium* and pollen tube pathway: a critical assessment. *The Plant Journal*, 2: 631-638
- Leduc N., Monnier M., Douglas G.C. 1990. Germination of trinucleate pollen: formulation of a new medium for *Capsella bursa-pastoris*. *Sexual Plant Reproduction*, 3: 228-235
- Lee C.W., Thomas J.C., Buchmann S.L. 1985. Factors affecting *in vitro* germination and storage of jojoba pollen. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 110, 5: 671-676
- Luo Z.X., Wu R. 1989. A simple method for the transformation of rice via pollen tube pathway. *Plant Molecular Biology Reporter*, 6: 165-174

- Matlob A.N., Kelly W.C. 1973. Effect of high temperature on pollen tube growth of snake melon and cucumber. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 98: 296–300
- Matthews B.F., AbduI-Baki A.A., Saunders J.A. 1990. Expression of foreign genes in electroporated pollen grains of tobacco. *Sexual Plant Reproduction*, 3: 147-151
- McCormick S. 1993. Male Gametophyte Development. *Plant Cell*, 5, 10: 1265–1275
- Meiers S., Kemeny M., Weyand U., Gastpar R., Erwin von Angerer in Marko D. 2001. The Anthocyanidins Cyanidin and Delphinidin Are Potent Inhibitors of the Epidermal Growth-Factor Receptor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 958 – 962
- Miller D.D., Lancelle S.A., Hepler P.K. 1996. Actin microfilaments do not form a dense meshwork in *Lilium longiflorum* pollen tube tips. *Protoplasma*, 195: 123–132
- Mo Y., Nagel C., Taylor L. 1992. Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 7213-7217
- Muccifora S., Bellani L.M., Gori P. 2003. Ultrastructure, Viability, and *In Vitro* Germination of the Tricellular *Sambucus nigra* L. Pollen. *The International Journal of Plant Sciences*, 164, 6: 855–860
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15, 3: 473-497
- Nitsch J.P., Nitsch C. 1969. Haploid Plants from Pollen Grains. *Science*, 163, 3862: 85-87
- Obermeyer G., Blatt M.R. 1995. Electrical properties of intact pollen grains of *Lilium longiflorum*: characteristics of the non-germinating pollen grains. *Journal of Experimental Botany*, 46: 803-813
- Pareddy D.R., Petolino J.F. 1992. Maturation of maize pollen *in vitro*. *Plant Cell Reports*, 11: 535–539
- Potrykus I. 1991. Gene transfer to plants - assessment of published approaches and results. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42: 205-225
- Rajan M.V. 1989. Restriction of pollen germination and tube growth in lily pollen by inhibitors of polyamine metabolism. *Plant Science*, 59: 53-56
- Read S.M., Clarke A.E., Bacic A. 1993. Stimulation of growth of cultured *Nicotiana tabacum* W38 pollen tubes by poly(ethylene glycol) and Cu(II) salts. *Protoplasma*, 177: 1-14.

- Rodriguez-Riano T., Dafni A. 2000. A new procedure to asses pollen viability. *Sexual Plant Reproduction*, 12, 4: 241-244
- Sato S., Katoh N., Iwai S., Hagimori M. 1998. Establishment of reliable methods of *in vitro* pollen germination and pollen preservation of *Brassica rapa* (syn. *B. campestris*). *Euphytica*, 103: 29–33
- Scott P., Lyne R.L. 1994. Initiation of embryogenesis from cultured barley microspores: a further investigation into the toxic effects of sucrose and glucose. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37, 1: 61-65
- Sehgal C.B., Arora S., Narang K. 1982. Production of Pollen Embryoids in Anther Cultures of *Sambucus nigra*. *Current Science*, 51, 2: 104-105
- Shivanna K.R., Heslop-Harrison J. 1981. Membrane state and pollen viability. *Annals of Botany*, 47: 759–770
- Shivanna K.R., Johri B.M. 1985. The angiosperm Pollen, structure and function. San Francisco, John Wiley & Sons, USA: 374 str.
- Sidhu R.J.K., Malik C.P. 1985. Metabolic role of boron in germinating pollen and growing pollen tubes. V: *Biotechnology and ecology of pollen*. Mulcahy L., Mulcahy G.B., Ottaviano E. (ur.). New York, Springer Verlag: 373-378
- Simonovik B. 2007. Genetska proučitev medvrstnih križancev v rodu *Sambucus* in vzpostavitev izbranih tehnik rastlinskih tkivnih kultur pri črnem bezgu (*S. nigra* L.). Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo.
- Smith-Huerta N.L., Vasek F.C. 1984. Pollen longevity and stigma pre-emption in *Clarkia*. *American Journal of Botany*, 71: 1183-1191
- Song J., Nada K., Tachibana S. 1999. Ameliorative effect of polyamines on the high temperature inhibition of *in vitro* pollen germination in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Scientia Horticulturae*, 80: 203-212
- Stanley R.G., Linskens H.F. 1974. Viability tests. In *Pollen Biology, Biochemistry and Management*. Springer-Berlin, Verlag: 67–86
- Stauffer C., Moreno R.M.B., Heberle-Bors E. 1991. Seed set after pollination with *in vitro* matured, isolated pollen of *Triticum aestivum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 81: 576–580
- Stöger E., Benito Moreno R.M., Ylstra B., Vicente O., Heberle-Bors E. 1992. Comparison of different techniques for gene transfer into mature and immature tobacco pollen. *Transgenic Research*, 1: 71-78

- Tanaka I., Ito M. 1981. Control of division patterns in explanted microspores of *Tulipa gesneriana*. *Protoplasma*, 108: 329-340
- Tanaka I., Taguchi T., Ito M. 1980. Studies on microspore development in *liliaceous* plants. 2. The behaviour of explanted microspores of the lily, *Lilium longiflorum*. *Plant Cell Physiology*, 21: 667-676
- Teng N., Huang Z., Mu X., Jin B., Hu Y., Lin J. 2005. Microsporogenesis and pollen development in *Leymus chinensis* with emphasis on dynamic changes in callose deposition. *Flora*, 200: 256-263
- Thole J.M., Burns Kraft T.F., Sueiro L.A., Kang Y.H., Gills J.J., Cuendet M., Pezzuto J.M., Seigler D. S., in Lila M.A. 2006. A Comparative Evaluation of the Anticancer Properties of European and American Elderberry Fruits. *Journal of Medicinal Food*, 9 (4): 498 - 504
- Touraev A., Heberle-Bors E. 1999. Microspore embryogenesis and *in vitro* pollen maturation in tobacco. V: *Methods in molecular biology*. Hall R.D. (ur.). New Jersey, Plant cell culture protocols, Humana Press: 281-291
- Touraev A., Pfosser M., Heberle-Boris E. 2001. The micropore: a haploid multipurpose cell. *Advances in Botanical Research*, 35: 53-109
- Touraev A., Stöger E., Voronin V., Heberle-Bors E. 1997. Plant male germ line transformation. *The Plant Journal*, 12, 4: 949-956
- Tupy J., Rihova L., Zarsky V. 1991. Production of fertile tobacco pollen from microspores in suspension culture and its storage for *in situ* pollination. *Sexual Plant Reproduction*, 4, 4: 284-287
- van Damme D., Coutuer S., De Rycke R., Bouget F.Y., Inze D., Geelen D. 2006. Somatic cytokinesis and pollen maturation in *Arabidopsis* depend on TPLATE, which has domains similar to coat proteins. *Plant Cell*, 18: 3502-3518
- van der Leede-Plegt L.M., van de Ven B.C., Schilder M., Franken J., van Tunen A.J. 1995. Development of a pollen-mediated transformation for *Nicotiana glutinosa*. *Transgenic Research*, 4: 77-86
- Vižintin L., Bohanec B. 2004. *In vitro* manipulation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) pollen and microspores: isolation procedures, viability tests, germination, maturation. *Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 46: 177-183
- Vogt T., Wollenweber E., Taylor L.P. 1995. The structural requirements of flavonols that induce pollen germination of conditionally male fertile *Petunia*. *Phytochemistry*, 38: 589-592

- Wang Z.-Y., Ge Y., Scott M., Spangenberg G. 2004. Viability and longevity of pollen from transgenic and nontransgenic tall fescue (*Festuca arundinacea*) (poaceae) plants. *American Journal of Botany*, 91, 4: 523–530
- White P.R. 1963. A handbook of plant tissue culture. Lancaster, The Jacques Catell Press Pennsylvania: 277 str.
- Ylstra B., Touraev A., Moreno R.M.B., Stoger E., van Tunen A.J., Vicente O., Mol J.N.M., Heberle-Bors E. 1992. Flavonols stimulate development, germination, and tube growth of tobacco pollen. *Plant Physiology*, 100: 902-907
- Zakay-Rones Z., Thom E., Wollan T. in Wadstein J. 2004. Randomized Study of the Efficacy and Safety of Oral Elderberry Extract in the Treatment of Influenza A and B Virus Infections. *The Journal of International Medical Research*, 32: 132 – 140
- Zhao X., Wang W., Li Y., Xing J., Chen F., Wang S. 2007. In vitro maturation and germination of *Orychophragmus violaceus* microspores. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 91:53–60

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Borutu Bohancu in delovni mentorici dr. Lilijani Vižintin za pomoč in za koristne nasvete ter podporo pri raziskovalnem delu in pri pisanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se staršem, ki so me med delom spodbujali in me denarno podprli.

Zahvaljujem se vsem prijateljem, ki sem jih spoznal na Katedri za genetiko, biotehnologijo in žlahnjenje rastlin.

Priloga A

Kalivost *in vitro* dozorelega peloda v suspenzijski kulturi z gojišči MA90, SA90, MA120, SA120, T1, M1 in M2 na streslaniku po koncu inkubacijskega obdobja (več kot en teden)

		Kalivost (%) <i>in vitro</i> dozorelega peloda						
Poskus	vzorec	MA90	MA120	SA90	SA120	T1	M1	M2
1 (3.6.2008)	1 (9.6.2008)					0	0	0
	2 (11.6.2008)					0	0	0
	3 (2.7.2008)					0	0	0
	4 (7.7.2008)					0	0	0
	5 (11.7.2008)					0	0	0
2 (11.6.2008)	1 (2.7.2008)							0
	2 (7.7.2008)							0
	3 (11.7.2008)							0
	4 (23.7.2008)							0
3 (13.6.2008)	1 (16.6.2008)							0
	2 (7.7.2008)							0
	3 (11.7.2008)							0
	4 (23.7.2008)							0
4 (16.6.2008)	1 (2.7.2008)							0
	2 (7.7.2008)							0
	3 (11.7.2008)							0
	4 (23.7.2008)							0
5 (27.6.2008)	1 (2.7.2008)				0			
	2 (7.7.2008)				0			
	3 (11.7.2008)				0			
	4 (23.7.2008)				0			
6 (30.6.2008)	1 (2.7.2008)	0	0	0				
	2 (7.7.2008)	0	0	0				
	3 (11.7.2008)	0	0	0				
	4 (23.7.2008)	0	0	0				

Priloga B

Časovni potek razvoja peloda med *in vitro* zorenjem enojedrnih mikrospor bezga v 12 dnevem časovnem intervalu v gojišču BKK s pH 5,1 in pH 5,5

		<i>In vitro</i> zorenje enojedrnih mikrospor v gojišču BKK s pH vrednostjo 5,1 in 5,5			
t [dan]	pH	% enojedrnega peloda	% dvojedrnega peloda	% trojedrnega peloda	% kalečega peloda
0	5,1	100,0	0	0	0
	5,5	100,0	0	0	0
1	5,1	100,0	0	0	0
	5,5	100,0	0	0	0
2	5,1	87,6 ± 6,2	12,4 ± 6,2	0	0
	5,5	78,2 ± 2,8	21,8 ± 2,8	0	0
3	5,1	78,5 ± 4,9	21,2 ± 4,4	0,3 ± 0,5	0
	5,5	55,0 ± 8,3	45,0 ± 8,3	0	0
4	5,1	56,5 ± 5,3	43,0 ± 4,6	0,5 ± 0,9	0
	5,5	45,7 ± 4,4	52,1 ± 2,6	2,2 ± 3,2	0
5	5,1	57,3 ± 4,0	37,1 ± 4,2	5,6 ± 2,1	0
	5,5	48,1 ± 12,0	49,6 ± 14,1	2,3 ± 2,4	0
6	5,1	58,8 ± 3,2	33,8 ± 5,9	7,4 ± 3,3	0
	5,5	40,9 ± 8,4	53,9 ± 10,5	5,1 ± 2,3	0
7	5,1	59,2 ± 13,2	28,8 ± 1,4	12,1 ± 11,9	0
	5,5	41,2 ± 3,4	48,3 ± 5,3	10,5 ± 2,3	0
8	5,1	61,9 ± 6,0	29,1 ± 8,3	9,0 ± 8,7	0
	5,5	40,2 ± 18,1	46,8 ± 11,4	13,0 ± 6,8	0
9	5,1	56,7 ± 6,3	29,0 ± 6,1	12,7 ± 2,9	1,5 ± 2,6
	5,5	43,9 ± 2,3	44,5 ± 5,6	11,6 ± 3,6	0
10	5,1	58,7 ± 2,1	18,0 ± 3,6	8,8 ± 2,0	14,5 ± 3,8
	5,5	43,4 ± 2,2	40,9 ± 3,0	13,7 ± 6,6	2,0 ± 1,4
11	5,1	53,7 ± 24,6	21,1 ± 12,5	2,2 ± 2,3	23 ± 36,7
	5,5	40,2 ± 5,4	46,1 ± 3,8	13,7 ± 5,4	0
12	5,1	/	/	/	63,9 ± 7,8
	5,5	/	/	/	29,3 ± 3,9