

Uporabnost poskusa *in vitro*  
kalitve peloda pri razlagi  
razmnoževanja krito semenk.

dr. Liliana Vižintin,  
Biotehniški center  
Naklo

Je ena izmed biotehnoloških metod rastlinskih tkivih kultur.

Metoda je enostavna, ne zahteva veliko priprav, biotehnološkega predznanja in uporabo nevarnih snovi.

Zelo uporabna kot laboratorijska vaja v sklopu razlage razmnoževanja kritosemenk pri biologiji.

Potek vaje:

### **Teoretični del:**

- spolno razmnoževanje pri rastlinah,
- cvet kot evolucijska pridobitev kritosemenk, deli cveta,
- opraševanje z živalmi in vetrom,
- oprašitev in oploditev, nastajanje semen.

### **Praktični del:**

- nabiranje rastlin, določanje vrste (fakultativno),
- opazovanje cveta (stereomikroskop ali povečevalne leče),
- opazovanje zrelega in nezrelega peloda pod mikroskopom,
- poskus *in vitro* kalitve.

# Teoretični del:

## Delovni zvezek Biologija za gimnazije, Modrijan (str. 205)

### Oprašitev in oploditev

205

Prenos pelodnega zrna, ki vsebuje moške gamete, s prašnika na brazdo pestiča imenujemo **oprašitev**.

Pri semenikah se oprašitev vedno zgodi pred oploditvijo (združitvijo ženske jajčne celice z moško gameto). Običajno pride pelodno zrnó z ene rastline na brazdo pestiča druge rastline. To imenujemo **navzkrižno oprašitev**. Včasih se lahko zgodi **samooprašitev**, ko pelo-

dno zrnó pade na brazdo pestiča iste rastline. Po oprašitvi moško jedro lahko oplodi jajčno celico. Kritosemerike imajo **dvojno oploditev**. Iz ene oplodene jajčne celice nastane zarodek (embrio), drugo moško jedro pa oplodi jedno ostrednje celice v zarodkovem mešičku (embrionalni vrečki), in iz njega se razvije zaloga hranilnih snovi (endosperm) za rast zarodka.

#### Rast pelodovega meščka in dvojna oploditev

Pelodno zrnó je nezrel moški gametofit, ki nastane z mejozo mikospornih celic v pelodni vrečki prašnika. Oprašitev je prenos pelodnega zrna s prašnika na brazdo pestiča. Pri vetrocvetkih pelodna zrna prenaša veter, pri žužiccvetkih pa žužjike. Ko pelodno zrnó pristane na leppljivi površini brazde, se razvoj moškega gametofita lahko konča. Pelodno zrnó vzklí in iz njega zraste pelodov mešček vzdolž vratu do semenske zasnove z zarodkovim mešičkom v plodnici. Rast usmerjajo kemične snovi (največkrat kalaj). Pelodov mešček vstopi v zarodkov mešček skozi odprtino, ki jo imenujemo **mikropila**. Prido do **dvojne oploditve**. Ene moška ali spermatna celica se združi z jajčno celico v zigoto, druga spermatna celica pa se združi z dvema polnima jedroma, ki ležita v embrionalni vrečki. Iz njih nastane triploidni (3n) sekundarni endosperm. Ker je v isti plodnici običajno več jajčnih celic, je za oploditev in dokončani razvoj potrebnih več pelodnih zrn.

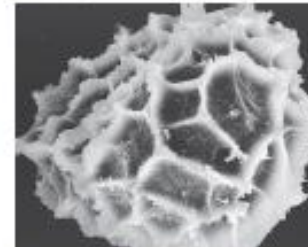
Pelodna zrna različnih vrst rastlin se razlikujejo po obliki in velikosti. Po pelodnih zrnih lahko zlahka določimo rastlinske rodove, kar uporablja razmeroma novo področje forenzne botanike, ki z botaničnimi dokazi raziskuje okoliščine kriminalnih dejanj. Ker se pelodi različnih rastlinskih vrst razlikujejo, je oploditev mogoča le med genetsko podobnimi rastlinami. Nekatere vrste (npr. trobentica) imajo dve vrsti peloda, kar preprečuje samooprašitev.



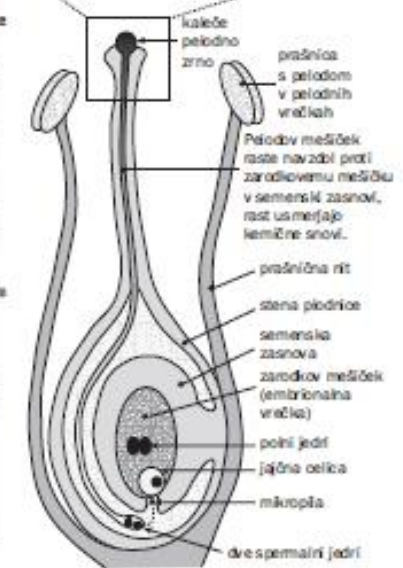
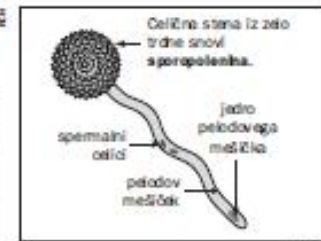
Pelodna zrna med kalitvjo.



Pelod trobentice pod vršnim elektronskim mikroskopom.



Pelod regrata pod vršnim elektronskim mikroskopom.



# Teoretični del:

BIOLOGIJA,  
shematski  
pregledi,  
W.R.Pickerin,  
Tehniška  
založba  
Slovenije,  
Ljubljana  
2002.

### Oprašitev

**Cvetovi, ki jih oprašuje veter, so značilni za trave in gozdna drevesa, ki rastejo v gostih sestojih in pokrivajo večje površine.**

**Cvetovi, ki jih oprašujejo žuželke, so značilni za rastline, ki rastejo posamič ali v manjših skupinah.**

**Ovčji list pokriva in ščiti druge dele cveta.**

**Praščne nitke so dolge in upogljive, tako so prahčice izpostavljene vetru.**

**Prašne vrečke so gibljivo vzorec na nit, da lahko veter odnese pelod.**

**Pelod nastaja v velikih koščicah, ker je pomnož z vetrovno naključnost. Pelodna zrna so glavka in imajo kolirne področja. So rahlo in lahka, da jih veter lahko nameta.**

**Brazde so dolge in poredne. Pogosto zveležijo cveta. Na to veliko površino se lani pelod.**

**Venčni listi so rjavkasti ali zeleni in zelo reducirani ne privlačijo žuželk, in ne zadržajo prahu. Tako kot rahli žalbi listi so luskasti, in ko nabreknejo, odmaknejo dva področja lista, da se cvet odpre.**

**Cvetovi ne držijo in nimajo nektarja – to bi bilo izključeno "smešter", saj ne bi pripomnelo k oprašitvi.**

**Praščne nitke so toge, da vzdržijo pritisk opraševalke, sorazmerno kratke in imajo včasih večje, ki obklopijo prenos peloda na žuželko.**

**Prašne vrečke so znotraj cvetnega odzvala in so pogosto lahke, da držijo pripravljeno pelod za opraševalke.**

**Pelod je večji in ima lepšje izrastke, s katerimi se opreje žuželko. Peloda je mrtvi, saj je opraševanje z žuželkami bolj uspešno.**

**Brazde je v cvetu na mestu, ki zagotavlja uspešen stik s telesom opraševalke. Površina brazde je sorazmerno ravnina, da je pomnož peloda nastančen. Pogosto je odzvala – opečana, da je opraševalki ne poškodujejo.**

**Venec je žilovaten in velik. Pravažija žuželke in ima pogosto tise ali drčice, ki delujejo kot mekavne pruge (včasih vidne le v ultravijolični svetlobi), ki jo zadržujejo žuželke. Venčni listi so oblikovani tako, da privlačijo žuželke (pri nekaterih cvetovih) opozarjajo sarnice žuželke, ali pa so opečani, da delujejo kot protaščilce za opraševalce, ali pa jih so cveti vedijo do razmnoževanja delov cveta.**

**Venji in/ali nektar privlačijo in vgradijo žuželke. Nektarje so pogosto dolgi, različnih barv, nekateri pa je razredčena sladkorna raztopina izaharoz in laktoze z veliko energijsko vrednostjo.**

**V plodniku je le ena semenska zrna.**

**V plodniku so semenska zrna.**

**Cvetilce**

### Zgradba cveta, ki ga oprašujejo žuželke

**PEŠTIČ – GINECEJ (ženski del cveta)**

**Brazde sprejemo pelod. Imajo receptorje za beljakovine, ki so v velikih pelodnih zrnih.**

**Stena plodnice ščiti semensko zrna (ali več semenskih zrnov). Po oploditvi se razvije v semenje plodu.**

**Embrionalna vrečka vsebuje hranilo splošno celico in dve majhni jedri.**

**Nektar je greda celic z nakopičenimi hranilom.**

**Ovčji listi ščitijo semensko zrna. Po oploditvi se razvijejo v semensko lupjino testo.**

**Mikropila je področje, kjer navadno vstopi pelodna cev.**

**ČASNI LISTI obklopijo čelo.**

**Nastopajo v enakem številu kot venčni listi. Časni listi so obarvani, postarvati pa so zeleni. V cvetnem popku ščitijo bistveno dele cveta. Po oprašitvi lahko odpadajo ali pa ostanejo in pomagajo pri razvijanju semen (kot "pustica" pri rožnatih).**

**VENČNI LISTI obklopijo cvetni venec.**

**Venčni listi so pri žuželkovedskih obravnavah, običajno dlati in oblikovani tako, da privlačijo opraševalce. Pri vetrovcvetkih so rjavkasti ali posevni marjake. Pri dvovaličnih cvetih so rjavkasti ali postarvati in imajo listi ali postarvati lističe, pri dvovaličnih pa po vrje.**

**Medenik je žilno vrhota, ki izloča nektar, sledijo nastopajo, ki je hrana za opraševalce (žuželke ali ptice).**

**PRASHNIKI – ANDRECEJ (moški del cveta)**

**PRASHNI PREZET PRASHNICE (opogotnja dela prashnika)**

**Tapetum prehranjuje zarodne celice.**

**Prašna vrečka vsebuje pelodna zrna.**

**Vlaknata plast**

**Blizna je skupna zrna zunanja ovojščina.**

**Jedro pelodne celi.**

**Vrh prašne niti (v njej je žil).**

**Ustje, kjer se prašna vrečka odpre.**

**Plodno zrna vsebuje generativno jedro, ki da močjo spolni celici.**

**Generativno jedro**

**ČVENČEJE so različni deli cvetnega peclja. Na njem so nareščeni venčni listi, prašniki in postarvati v različnih. Lahko obklopijo celotno in obklopijo vrhota deli peclja, kot pri jabolni ali jagodnjaku.**

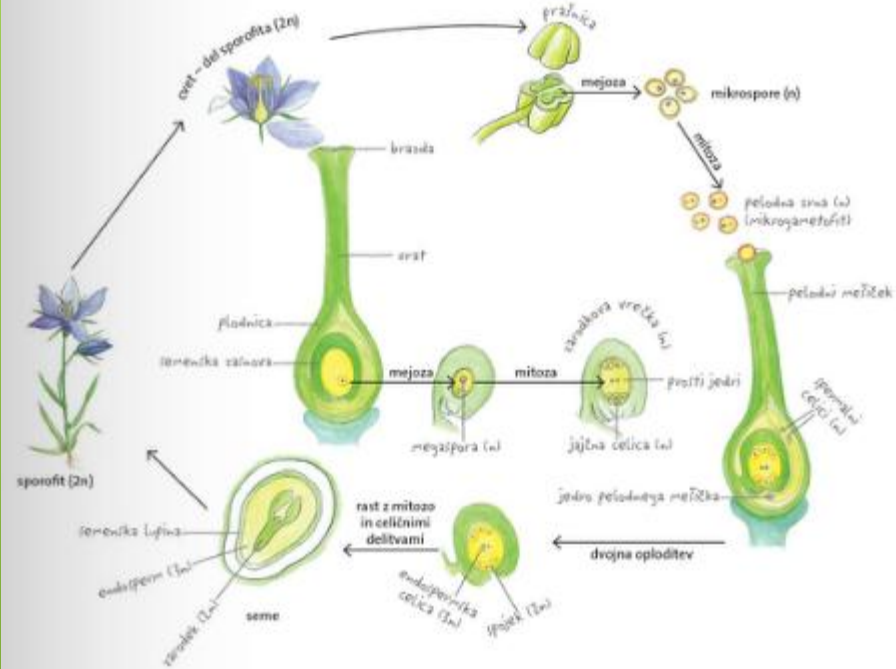
# Teoretični del:

Učbenik  
Čudovite  
oblike,  
Zgradba in  
delovanje  
evkariontskih  
organizmov za  
gimnazije (H.  
Lenasi, M.  
Kreft, T. Turk,  
M. Dermastia,  
Rokus Klett,  
Ljubljana 2013

## Oprašitvi sledi oploditev

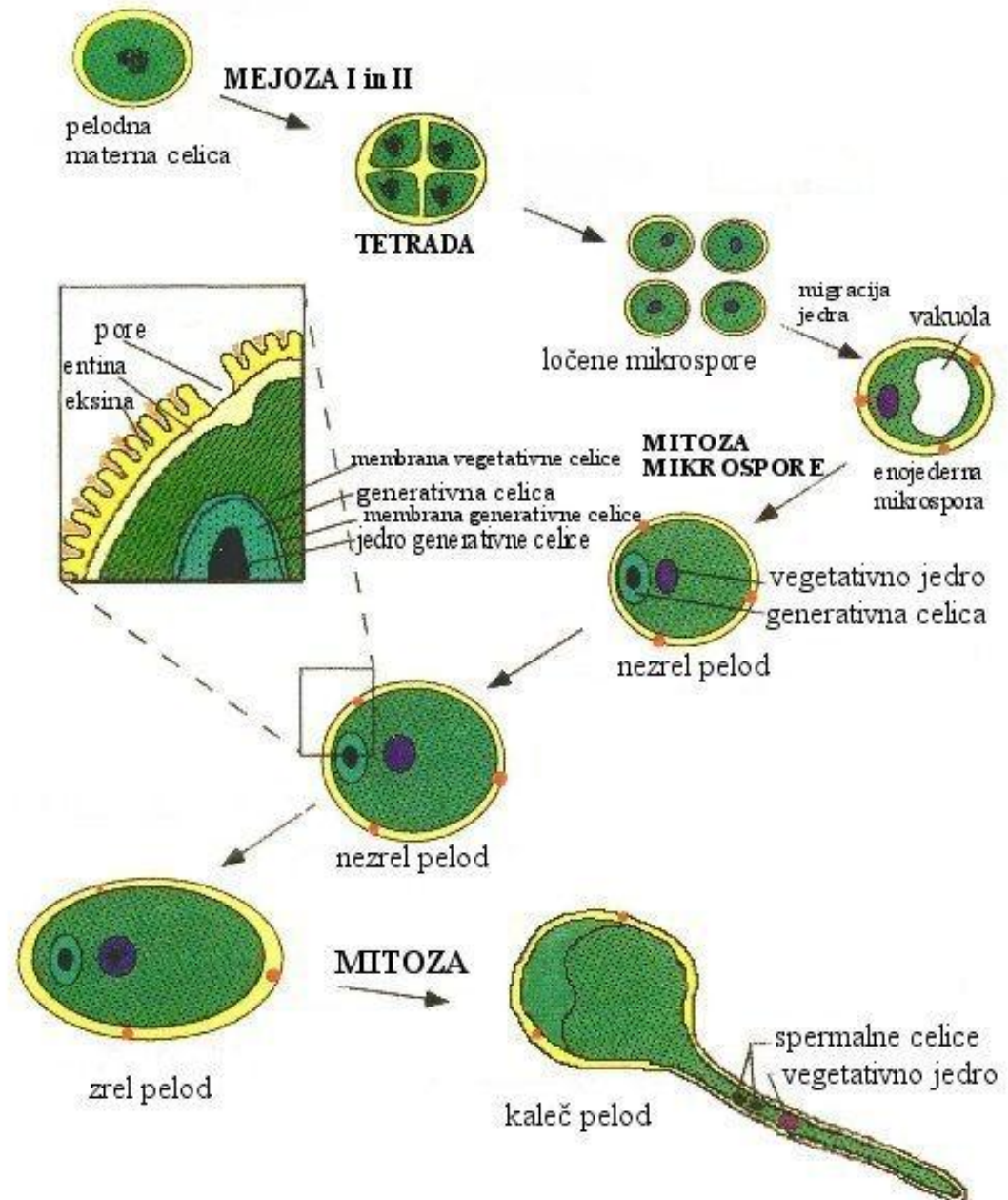
Ko pelodna zrna (haploidni mikrogametofiti) pristanejo na brazdi plodnega lista, so sestavljena iz ene velike in ene majhne celice. Citoplazma velike celice obdaja majhno, tako da se zdi kot da je celica v celici. Velika celica začne kaliti v **pelodni mešiček**, majhna pa se znova deli v dve **spermalni celici** (haploidni mikrogameti). Spermalni celici se po pelodnem mešičku premikata proti odprtini v semenski zasnovi. V semenski zasnovi je **zarodkova ali embrionalna vrečka** (haploidni megagametofit). V njej je več celic, med njimi jajčna celica (haploidna megagameta), in nekaj prostih jeder. Ko spermalni celici dosežeta zarodkovo vrečko, se ena združi z jajčno celico, druga pa se zlije s **prostimi jedri**. Ker se obe spermalni celici združita, imajo kritosemenke **dvojno oploditev**. Z združitvijo haploidne spermalne celice s haploidno jajčno celico nastane diploidni **spojek** ali **zigota**, iz katerega se razvije **zarodek** ali **embrio**. Spojek je prva celica nove sporofitne generacije. Po združitvi druge spermalne celice s prostimi jedri nastane celica, iz katere se razvije **endosperm** – hranilno tkivo za razvijajoči se zarodek. Endosperm je poliploiden ( $\rightarrow$  1. Spremembe genoma), ker se je v jedro endospermske celice zlilo več jeder.

*Izmenjava diploidne sporofitne in haploidne gametofitne generacije ter dvojna oploditev pri kritosemenkah; n označuje stopnjo ploidnosti jeder.*



# Teoretični del:

Razvoj peloda od tetran, do mikrospor in zrelega peloda (McCormick, 1993).



McCormick S. 1993. Male gametophyte development. *The Plant Cell*, 5: 1265 –1275.

# Praktični del: rastline in cvetovi: nabiranje in opazovanje cvetnih delov

## Gojene ....

buče, kumare,  
čebula,...



## Iz okolja ...

bezeg ...



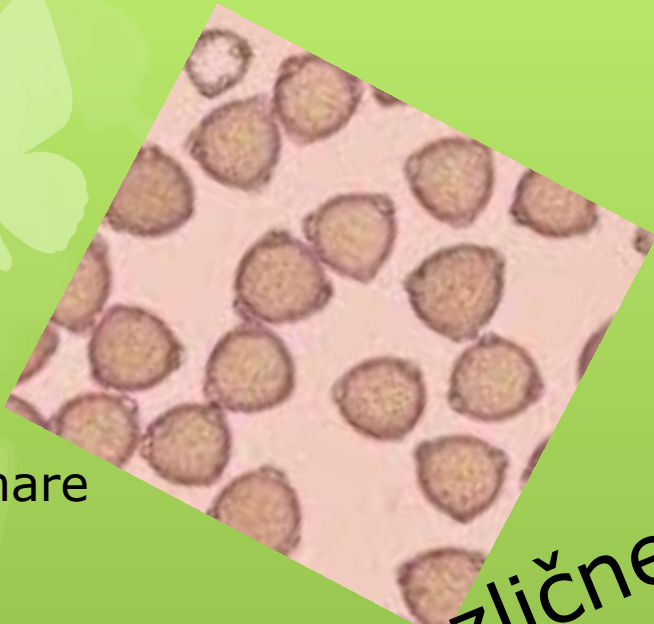
leska...



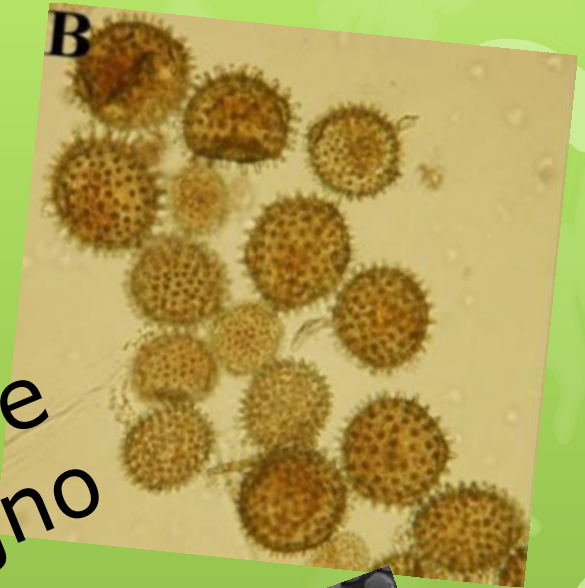


# Praktični del: pelod pod mikroskopom

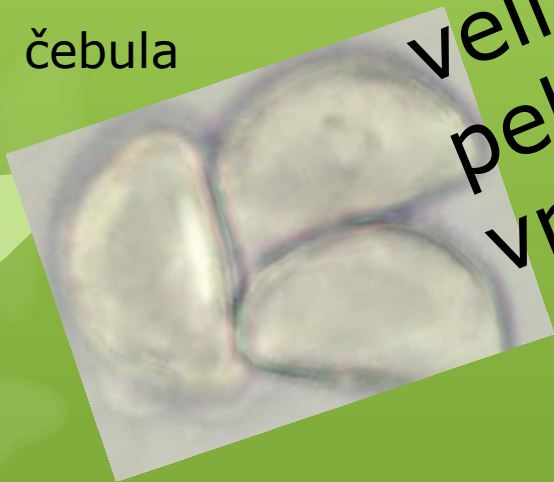
kumare



buče



čebula

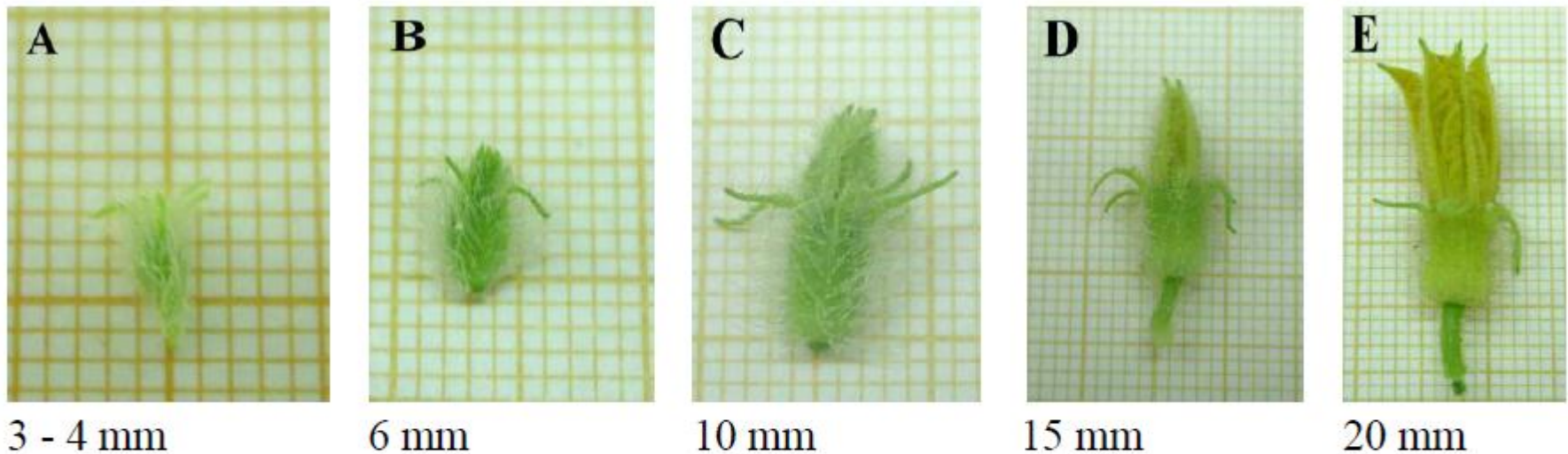


različne oblike,  
velikost, strukture  
peloda so običajno  
vrstno specifične



## Praktični del:

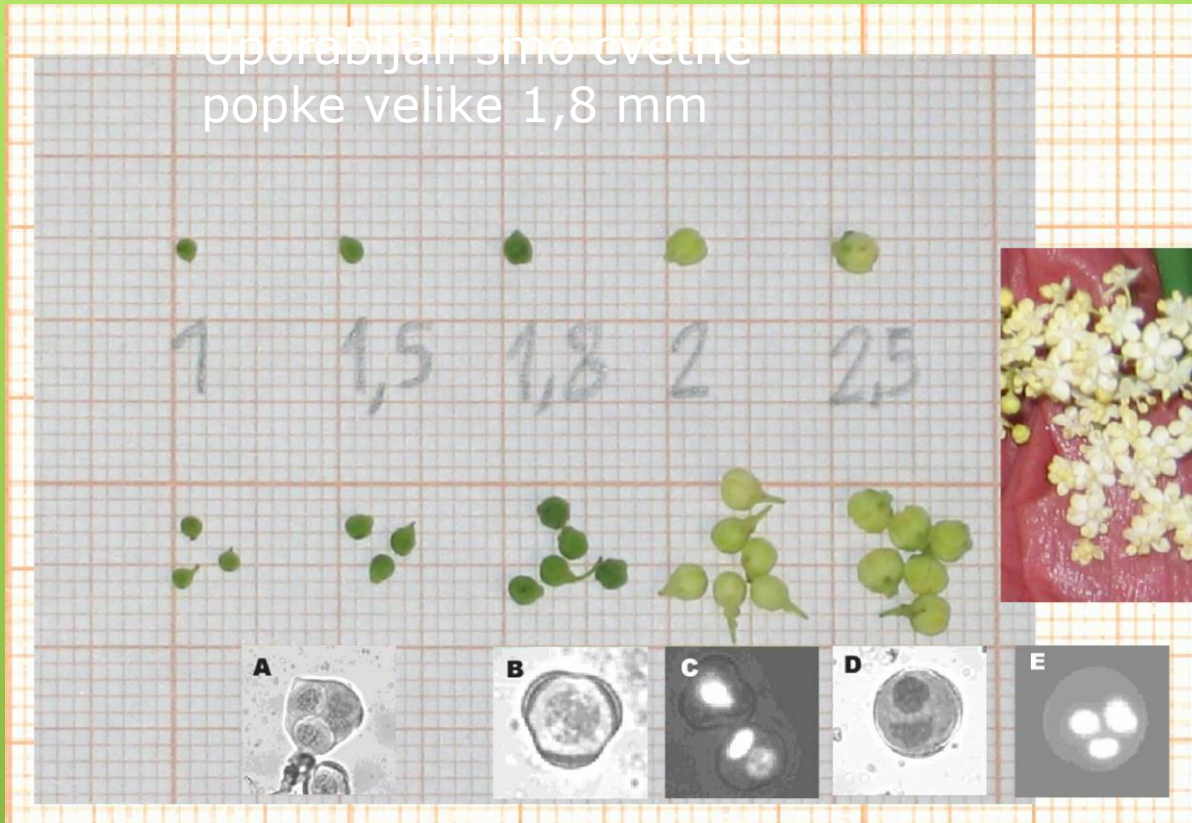
### Ugotavljanje velikosti cvetnih popkov in zrelosti peloda oz. razvojne faze



Slika 15: Zaprti cvetovi kumar različnih velikosti; a) 3 - 4 mm, b) 6 mm, c) 10 mm, d) 15 mm, e) 20 mm

Figure 15: Closed cucumber flowers of various size; a) 3 - 4 mm, b) 6 mm, c) 10 mm, d) 15 mm, e) 20 mm

Uporabljali smo cvetne  
popke velike 1,8 mm



a) mikrospore 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.

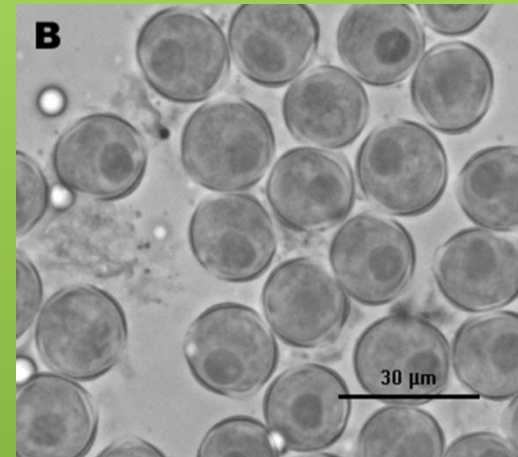
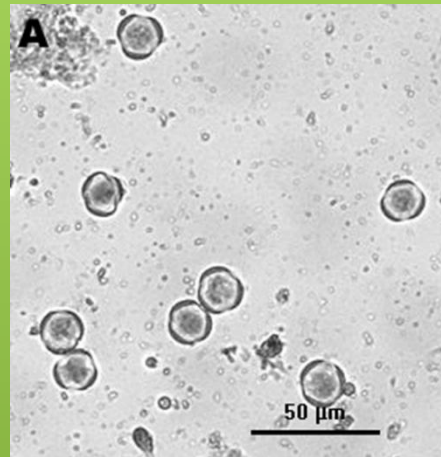
# Metode barvanja za določanje razvojne faze

Preglednica 1: Pregled preizkušenih metod določanja razvojne stopnje mikrospor.

Table 1: Review of tested methods for determination of microspores development stage.

metoda	testirane rastline	prednosti	slabosti	uspešnost
PI	kumare, buče, čebula	barvilo prehaja tudi preko debelejše pelodne stene,	fluorescenčna metoda,	zelo uspešna - kumare (priporočena) in čebula;  uspešna - buče
DAPI 2	kumare, čebula, tobak	barvilo prehaja tudi preko debelejše pelodne stene,	fluorescenčna metoda, potrebna je predhodna fiksacija mikrospor	zelo uspešna - čebula (priporočena);  uspešna - kumare in tobak
hematoksilin	kumare	nefluorescenčna metoda, ni potrebna posebna pozornost pri delu z reagenti	potrebna določena previdnost pri segrevanju preparata	malo uspešna - kumare
acetokarmin	kumare, čebula	nefluorescenčna metoda, široke uporabe, zelo enostavna metoda	slaba prodornost v mikropore z debelejšo steno	uspešna – čebula;  neuspešna - kumare
DAPI 1	kumare	/	/	neuspešna
mitramicin	kumare	/	/	neuspešna

# Barvanje z acetokarminom



(1g karmina in 55% očetne kisline)

Čebula – enojedrne  
mikrospore

# Praktični del: Poskus *in vitro* kalitve: priprava tekočega gojišča

## AMGLU gojišče (Benito Moreno in sod., 1988)

MS mikro in makro elementi (Murashige and S.

0,25 M saharoza

3 mM glutamin

pH 7,0

## M2 gojišče (Tupy in sod., 1991)

0,25 M saharoza

1 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

1 mM  $\text{MgSO}_4$

0,16 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$

1 mM fosfatni buffer (pH 7,0)

pH 7,0

## GY20 gojišče (spremenjeno Dumas de Vaulx cit.po Jahier, 1996)

15% saharoza

5 mg/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$

**OPTIMIZACIJA, LAHKO V  
SKLOPU PROJEKTNIH  
ALI RAZISKOVALNIH  
NALOG**

## Gojišče za kalitev peloda kumar

15% saharoza

0,25 mg/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$

1 mM  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

Predhodne študije (Muccifora in sod., 2003)

**-BK gojišče** (vsebuje 10% saharozo, 300 mg/l  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 200 mg/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 100 mg/l  $\text{KNO}_3$ , 100 mg/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ),

- **med inkubacijo ne stresamo** kulturo, enostavna izolacija

- kalitev po zelo dolgi inkubaciji (**22 ur**)

- maksimalna kalivost **88%**, **dolžina pelodne cevke 1000  $\mu\text{m}$**

Naša optimizirana metoda (Kosel, Vižintin in Bohanec, 2009)

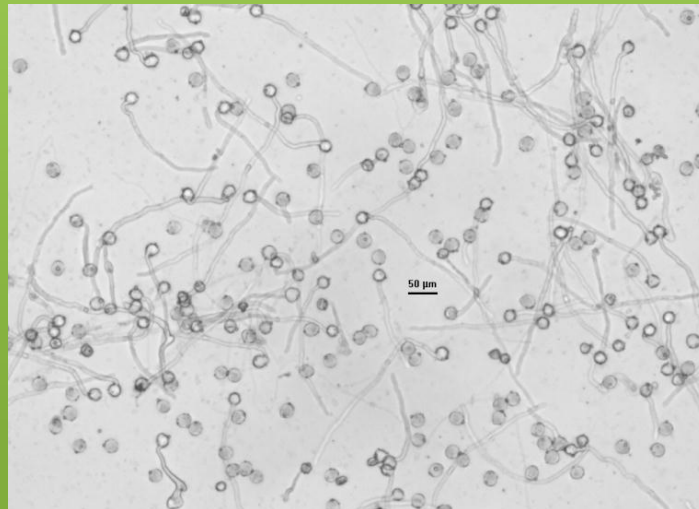
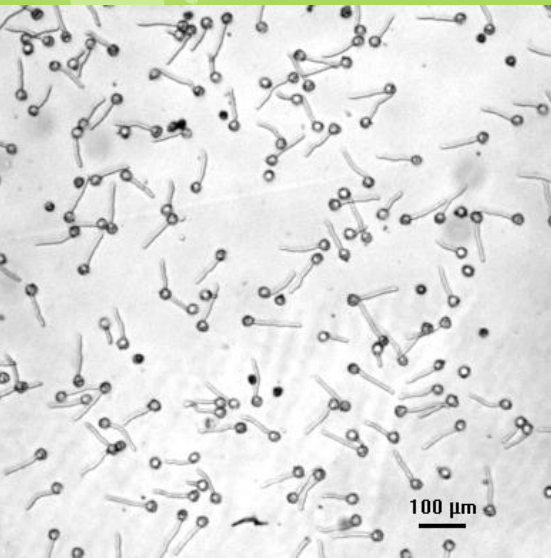
**BK-A modificirano gojišče:**  
300 mg/l  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  
200 mg/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  
100 mg/l  $\text{KNO}_3$ ,  
100 mg/l  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  
150 g/l saharoza in  
500 mg/l MES, pH 5.1 -5.5

- **izboljšana izolacija in metoda inkubacije v petrijevki s stresanje kulture med inkubacijo**

- kalitev po **eni uri** inkubacije

- maksimalna kalivost **77,4%**, **dolžina pelodne cevke pa približno 100  $\mu\text{m}$**

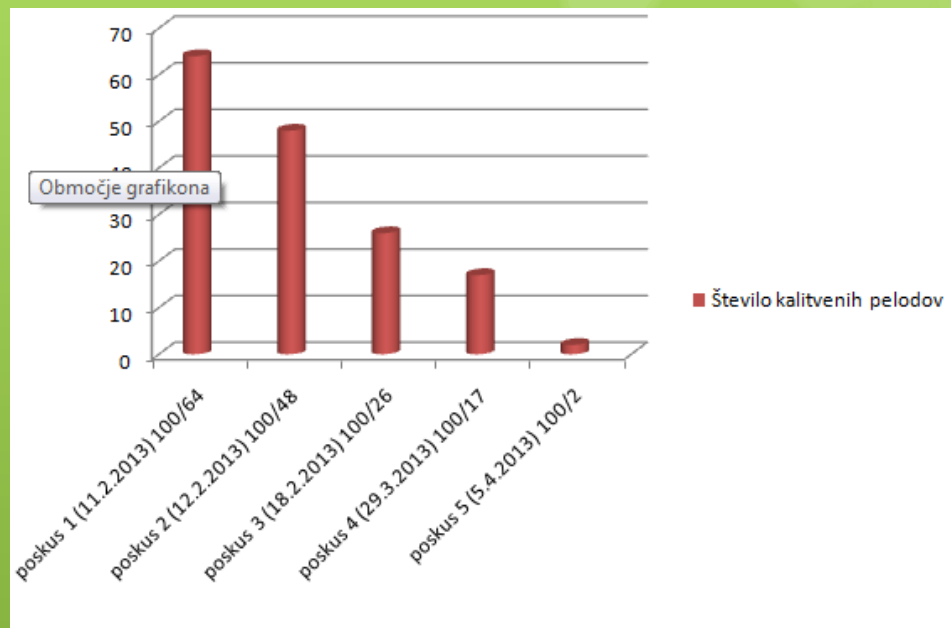
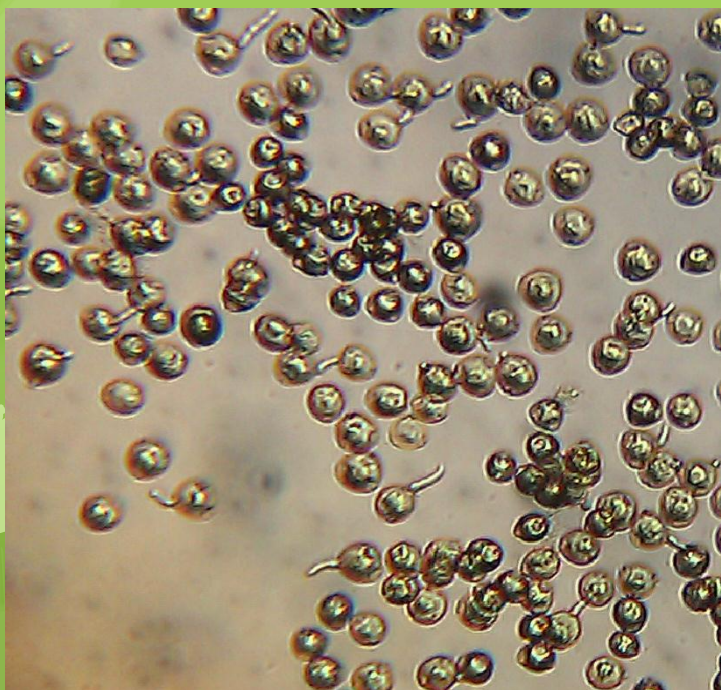
# Poskus *in vitro* kalitve: INKUBACIJA IN OPAZOVANJE KALEČEGA PELODA PO 1 URI







## Projektna naloga: *In vitro* kalitev zrelega peloda leske



**Hvala za vašo pozornost.**