

DOI: 10.2478/acas-2013-0025

**Agrovoc descriptors:** ananas comosus, pineapples, gynogenesis, haplomehtods, androgenesis, haploidy, homozygotes, heterozygotes, irradiation, pollen, tissue culture, vegetative propagation, plant propagation, callus

**Agris category code:** f02

## Tehnike indukcije haploidov in podvojenih haploidov

Jana MUROVEC<sup>1</sup>

Received August 26, 2013; accepted September 10, 2013.

Delo je prispelo 26. avgust 2013, sprejeto 10. september 2013.

### IZVLEČEK

Haploidi so samostojne rastline (sporofiti) z gametnim (haploidnim, n) številom kromosomov. Čeprav se spontano v naravi redko pojavijo, so dandanes poznane številne tehnike s katerimi lahko sprožimo njihov nastanek. Indukcija in regeneracija haploidnih (in podvojenih haploidnih) rastlin omogoča pridobivanje popolnoma homozigotnih linij v eni generaciji, kar lahko bistveno pospeši žlahtniteljski proces in genetske študije. Prav zato se haploidi intenzivno uporabljajo pri številnih vrstah za katere so poznani uspešni protokoli kot so pšenica, ječmen, koruza, tobak, čebula, kumara, oljna ogrščica in druge kmetijsko pomembne križnice. Prispevek povzema glavne lastnosti haploidov in podvojenih haploidov, načine njihove indukcije in regeneracije s poudarkom na njihovi uporabnosti v žlahtnjenju rastlin.

**Ključne besede:** Ginogeneza, androgeneza, mikrospora, homozigotnost, heterozigotnost, obsevan pelod, rastlinske tkivne kulture, ploidnost

### ABSTRACT

#### TECHNIQUES FOR HAPLOID AND DOUBLED HAPLOID PRODUCTION

Haploids are plants (sporophytes) that contain a gametic chromosome number (n). They rarely occur spontaneously in nature but several techniques are nowadays available for their production. Induction and regeneration of haploids (doubled haploids) enables the production of completely homozygous lines in one generation, thus shortening this process by many years. They are broadly used in breeding programs of plant species for which efficient protocols have been developed, such as barley, wheat, maize, tobacco, onion, cucumber, rapeseed and other *Brassica* species. This article presents the main characteristics of haploids, doubled haploids and inducing techniques, with an emphasis on their role in plant breeding.

**Key words:** Gynogenesis, androgenesis, microspore, homozygosity, heterozygosity, irradiated pollen, plant tissue culture, ploidy level

### 1 UVOD

Danes obsega žlahtnjenje rastlin poleg tradicionalnih tehnik kot so selekcija, načrtna medsortna in medvrstna križanja ter inducirane mutacije, tudi sodobnejše - biotehnoške - metode med katere spadajo *in vitro* vzgoja zdravih rastlin, reševanje nedozorelih embrijev težavnih križanj, *in vitro* opraševanje, fuzija protoplastov, *in vitro* mutageneza, poliploidizacija, genske transformacije in proizvodnja podvojenih haploidnih rastlin.

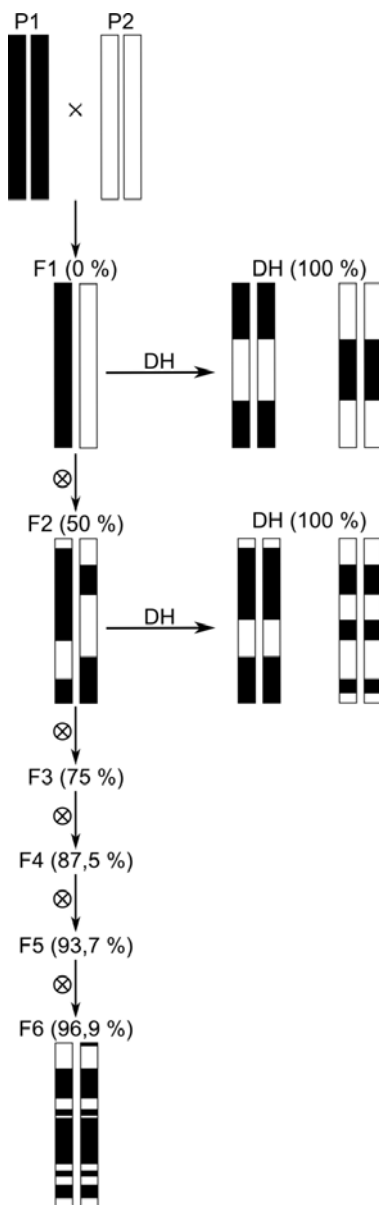
Haploidi in podvojeni haploidi (DH) so se v žlahtnjenju rastlin začeli uporabljati v drugi polovici prejšnjega stoletja pri koruzi (Forster in sod., 2007) in se sedaj uporabljajo za žlahtnjenje številnih kmetijskih rastlin. V zadnjih letih se je raziskovanje indukcije haploidov (in DH) razširilo iz žit in zelenjadnic na okrasne (Bal in Touraev, 2009; Ferrie in Caswell, 2011; Murovec in Bohanec, 2013), aromatične in zdravilne rastline (Ferrie, 2009) in zato je pričakovati, da se bo

<sup>1</sup> dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Katedra za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, Slovenija, e-naslov: jana.murovec@bf.uni-lj.si

kmalu njihova uporaba razširila tudi na te ekonomsko manj pomembne vrste.

Prednost žlahtnjenja rastlin z uporabo tehnik indukcije haploidov je v hitrejši proizvodnji popolnoma homozigotnih rastlin, ki se pri tujeprašnicah uporabljajo kot starševske linije za pridobivanje hibridov, pri samoprašnicah pa že predstavljajo komercialno linijo. Zaradi enkratnega nastanka popolne homozigotnosti, se takoj izrazijo vsi škodljivi recesivni geni, ki bi pri samoopraševanju povzročali inbriding depresijo. Tako indukcija haploidov služi tudi kot selekcijski pritisk proti škodljivim recesivnim genom. Žlahtnjenje se kakor pri klasičnih metodah začne z izborom in križanjem starševskih rastlin in se nadaljuje z indukcijo haploidov iz različnih generacij, kakor je prikazano na sliki 1. Žlahtnitelji najpogosteje pridobivajo haploidne linije iz F1 generacije, katerih gamete predstavljajo F2 generacijo. Kljub temu mnogi priporočajo kasnejši pričetek pridobivanja haploidnih linij (iz F2 donorskih rastlin), saj je na ta način omogočena še ena mejotska preureditev kromosomov in s tem večja variabilnost. Nekateri žlahtnitelji se celo odločajo za haploidizacijo šele po nekaj letih selekcije in samoopraševanja na polju in s podvojenimi haploidi le stabilizirajo najbolj

perspektivne linije. Pridobivanje haploidov iz poliploidnih rastlin (npr. iz tetraploidnega krompirja) omogoča njihovo križanje z diploidnimi divjimi sorodnimi vrstami, s tem prenos zanimivih genov med vrstami in žlahtnjenje na diploidnem nivoju. Pri žlahtnjenju s pomočjo induciranja mutacij na haploidem nivoju je hitrejše in lažje odkrivanje recesivnih sprememb, saj se le-te zaradi homozigotnosti izrazijo takoj in tudi vsakršna mutacija se takoj fiksira v genom. Haploidni protoplasti so idealno orodje za študij genetike somatskih celic, aplikacijo indukcije mutacij (veliko število individualnih genotipov, odsotnost himernosti, izraženost mutiranih genov), za fuzijo protoplastov (nastanek alodiploidnih organizmov namesto alotetraploidnih), prenos DNK (takojsnje izražanje vključenih genov in s tem povezana hitrejša selekcija). Zaradi popolne homozigotnosti in z njo povezane možnosti večkratnega spolnega razmnoževanja preko semen brez segregacije v naslednjih generacijah, so podvojeni haploidi zelo primerni tudi za mapiranje genov in genomske študije. Zaradi popolne homozigotnosti, se v zadnjih letih haploidi uporabljajo tudi za sekvenciranje celotnih genomov kot na primer pri *Citrus clementina* Hort. ex Tan. (Aleza in sod., 2009).



**Slika 1:** Primerjava pridobivanja homozigotnih linij s samoopraševanjem (levo) in s postopki indukcije haploidov (desno). Številke prikazujejo pričakovane odstotke homozigotnosti posameznih generacij.

**Figure 1:** Comparison between self-pollination (left) and doubled haploid induction for production of homozygous lines. The numbers represent the expected homozygosity of each generation.

## 2 TEHNIKE INDUKCIJE IN REGENERACIJE HAPLOIDOV (in PODVOJENIH HAPLOIDOV)

Haploidi so samostojne rastline (sporofiti) z gametnim (haploidnim) številom kromosomov. Od odkritja prvega spontanega haploida vrste *Datura stramonium* L. leta 1922 pa do danes, so razvili postopke indukcije haploidov za več kot 250 rastlinskih vrst (Maluszynski in sod., 2003). Najbolj uspešni in široko uporabljeni so protokoli

indukcije haploidov pri ječmenu (*Hordeum vulgare* L.), pšenici (*Triticum aestivum* L.), oljni ogrščici (*Brassica napus* L.), tobaku (*Nicotiana tabacum* L.) in koruzi (*Zea mays* L.). Pri teh rastlinskih vrstah intenzivno preučujejo tudi gene odgovorne za prehod iz gametofitnega v sporofitni

razvoj mikrospor (Hosp in sod., 2007; Segui-Simarro in Nuez, 2008).

Na uspeh indukcije haploidov vplivajo:

- genotip in starost matičnih rastlin,
- rastne razmere in pred-tretiranje matičnih rastlin (temperatura, osvetlitev),
- razvojna faza gamet,
- pred-tretiranje gamet (temperaturni in/ali osmotski šok, stradanje mikrospor, obsevanje z gama žarki)
- pH in sestava gojišča (predvsem dodani rastni regulatorji),
- temperatura, osvetlitev in fotoperioda v rastni komori.

Haploidi nastali iz diploidnih rastlin vsebujejo samo eno garnituro kromosomov, so monoploidi ( $2n=1x$ ), medtem ko jih haploidi nastali iz poliploidnih vrst vsebujejo več. Tako na primer haploid iz tetraploidnega ( $2n=4x$ ) krompirja vsebuje dve kromosomski garnituri ( $2n=2x$ ) in ga imenujemo dihaploid. Po istem principu je haploid iz heksaploidnega ( $2n=6x$ ) kivija triploid ( $2n=3x$ ) in vsebuje tri garniture kromosomov. Dihaploidi, trihaploidi itd. zaradi večjega števila kromosomskih garnitur niso homozigotni. Pogosto se izraz dihaploid napačno uporablja tako v slovenski kakor v tuji literaturi za označevanje podvojenih haploidov. Le-ti so popolnoma homozigotne diploidne rastline, ki nastanejo iz haploidov po podvajanju števila kromosomov. So končni cilj in uporabni produkt vseh tehnik indukcij haploidov in se kot taki uporabljajo pri žlahtnjenju rastlin in genetskih študijah.

Med postopki androgeneze in ginogeneze lahko pride tudi do spontanega podvajanja kromosomov in se zato poleg haploidov regenerira tudi določen delež spontanih DH. Pojav je pogost pri androgenezi, kjer je delež spontanih DH do 90 % (Maluszynski in sod., 2003) in ga povzroča predvsem fuzija jeder (Sunderland, 1974; Kasha in sod., 2001; Testillano in Risueno, 2009). Med *in vitro* ginogenezo in po različnem opravevanju je spontano podvajanje kromosomov redek pojav in ne presega 10-15 % (Maluszynski in sod., 2003). Najvišji delež spontanih DH med *in vitro* ginogenezo so Alan in sodelavci (2004) odkrili pri čebuli (15 %).

Nizek odstotek induciranih in regeneriranih haploidov oz. DH, odvisnost uspeha od genotipa matičnih rastlin in s tem povezane omejitve pri prenosu tehnik iz modelnih genotipov v komercialno zanimive sorte, ter težavnost podvajanja kromosomov haploidov, še vedno predstavljajo določene ovire pri uporabi DH v žlahtnjenju rastlin, kjer je potrebna hitra proizvodnja fertitnih DH iz vseh zanimivih križancev.

Haploide lahko pridobivamo iz moških gamet (t.i. androgeneza) s pomočjo kulture prašnic ali kulture izoliranih mikrospor in iz ženskih gamet. Nastanek haploidov iz ženskih gamet lahko sprožimo *in vitro* (ginogeneza) ali *in situ* z različnimi vrstami opravevanja.

## 2.1 *In vitro* indukcija haploidov (ginogeneza)

Značilnost *in vitro* ginogeneze je kultura neoprašenih socvetij, cvetov, plodnic ali njihovih delov na primernem hranilnem gojišču, ki ob ugodnih fizikalnih pogojih sproži nastanek haploidnih rastlin. Za to je v večini primerov potrebna inokulacija nezrelh ženskih gametofitov (Musial in sod., 2001; Gémes-Juhász in sod., 2002), ki, za razliko od mikrospor, v tkivni kulturi dozori (Musial in sod., 2005). Večinoma se haploidi regenerirajo iz jajčnih celic (Ferrant in Bouharmont, 1994; Musial in sod., 2005; Thomas, 2004).

Pri večini rastlinskih vrst je metoda manj uspešna od androgeneze, predvsem zaradi majhnega števila semenskih zasnov (potencialnih haploidnih embrijev) na cvet in nizkih odstotkov uspeha. Poleg tega je tudi odstotek spontano podvojenih haploidov bistveno nižji kakor pri androgenezi. Zaradi naštetega se *in vitro* ginogeneza raziskuje predvsem pri vrstah, kjer androgeneza ni bila uspešna, kot so čebula (Bohanec in Jakše, 1999; Alan in sod., 2004), sladkorna pesa (Ferrant in Bouharmont, 1994) in drugih vrstah (Bohanec, 2009). Ginogeneza je edina možnost pridobivanja haploidov iz moško sterilnih linij in ženskih klonov dvodomnih ženskih rastlin.

V žlahtnjenju se metoda *in vitro* ginogeneze uporablja pri vrstah *Gerbera jamesonii* H. Bolus, *Allium* sp., *Beta* sp. (Wedzony in sod., 2009) in kumarah (ustni vir).

## 2.2 *In situ* indukcija haploidov

### 2.2.1 Medvrstno oprraševanje

*In situ* indukcijo haploidov iz ženskih gamet lahko sproži oprraševanje s pelodom sorodne ali nesorodne vrste (rodu) po katerem pride do oploditve jajčne celice in naknadno, v zgodnji embriogenezi, do izločanja kromosomov opráševalca. Kromosomi opráševalca se pogosto izločijo tudi iz endosperma, zaradi česar le-ta ne omogoča normalne rasti in razvoja embrija. V izogib propadu embrijev jih je v takih primerih potrebno nekaj dni po opráševanju rešiti z gojenjem *in vitro*.

Metodo so odkrili pri križanju ječmena *Hordeum vulgare* L. z divjo sorodno vrsto *H. bulbosum* L. (Kasha in Kao, 1970). Zaradi slabše razvitosti endosperma je 12-15 dni po opráševanju potrebno reševanje embrijev in njihovo gojenje *in vitro*. Tako imenovana bulbosum metoda je še vedno zelo učinkovita metoda pridobivanja haploidov pri ječmenu (Devaux in Kasha, 2009), s katero so požlahtnili že preko 60 sort (Thomas in sod., 2003). Je edina metoda indukcije haploidov pri ječmenu, katere uspeh ni odvisen od genotipa in je uspešna tudi pri kultivarjih, kjer androgeneza ni. Opráševanje s *H. bulbosum* je uspešno sprožilo nastanek haploidnih embrijev tudi pri posameznih genotipih pšenice in tritikale, vendar zaradi inkompatibilnosti metoda ni širše uporabna za druga žita.

Podoben način z oploditvijo in naknadnim izločanjem kromosomov opráševalca deluje po opráševanju ječmena s pelodom koruze. Uspešno indukcijo haploidov so tako dosegli še pri opráševanju pšenice (*Triticum aestivum* L.) (Laurie in Bennett, 1988), ječmena (Furusho, 1991, cit. po Wedzony in sod., 2009), tritikale (x *Triticosecale*) (Wedzony, 2003), ovsu (*Avena sativa* L.) (Rines, 2003) in rži (*Secale cereale* L.) (Deimling in Fleihinghaus-Roux, 1996).

Tudi pri krompirju (*Solanum tuberosum* L.,  $2n=4x$ ) medvrstno opráševanje s *S. phurea* ( $2n=2x$ ) povzroča nastanek embrijev z gametnim številom kromosomov. Ker je krompir v osnovi tetraploiden, so nastali embriji dihaploidni ( $2n=2x$ ), saj vsebujejo dve garnituri kromosomov, in niso homozigotni. Princip delovanja temelji na lastnosti določenih genotipov *S. phurea* pri katerih

obe spermalni jedri v pelodnem mešičku oplodita polarni jedri embrionalne vrečke. Tako nastane  $6x$  endosperm, ki omogoča rast in razvoj  $2x$  embrija. Čeprav je odstotek semen z dihaploidnimi embriji relativno nizek, jih je mogoče hitro in enostavno odbrati zaradi homozigotnega dominantnega markerja za vijolične pege semen, ki jih vsebujejo IVP genotipi *S. phurea* (Maine, 2003).

Indukcija haploidov z medvrstnim opráševanjem je bila uspešna tudi pri citrusih, saj je po *in vitro* opráševanju diploidne vrste *Citrus clementina* Hort. Ex Tan. cv. Nules s pelodom triploidne grenivke Oroblanco uspela regeneracija 14 haploidov (Germanà in Chiancone, 2001).

### 2.2.2 Opráševanje znotraj vrste z opráševalnimi ('inducer') linijami ali obsevanim pelodom

Poznani sta dve vrsti *in situ* indukcije haploidov iz ženskih gamet, ki temeljita na opráševanju s pelodom iste vrste. Prva metoda je poznana pri koruzi, pri kateri so odkrili opráševalno ('inducer') linijo 'Stock 6', ki je po opráševanju sprožila nastanek do 2,3 % spontanah haploidov (Coe, 1959, cit. po Bohanec, 1994). Linijo so križali s številnimi drugimi linijami in križance uporabili za opráševanje z namenom pridobivanja haploidov. Poročajo, da s sodobnimi opráševalnimi linijami dosegajo že 8-10 % uspeh (Geiger in Gordillo, 2009; Melchinger in sod., 2013). Tako kot pri krompirju, tudi pri opráševanju s koruzo opráševalne linije vsebujejo homozigotni dominantni morfološki marker (za vijolično barvo embrija in alevrona) s pomočjo katerega lahko ločijo haploidne od hibridnih embrijev. Poleg tega ni potrebno *in vitro* reševanje embrijev, saj semena s haploidnimi embriji vsebujejo normalen endosperm. Oboje olajša indukcijo haploidov in povečuje uporabnost tehnike za žlahtnjenje rastlin, saj omogoča izločanje hibridov brez dodatnih laboratorijskih analiz (Zhang in sod., 2008). V raziskavi Barreta in sodelavcev (2008) so odkrili *ggi1* lokus na kromosomu 1, ki je odgovoren za izločanje kromosomov opráševalca.

Druga možnost *in situ* ginogeneze z opráševanjem znotraj vrste je opráševanje z obsevanim pelodom. Metoda je bila uspešna pri številnih rastlinskih vrstah, kar prikazuje preglednica 1.

**Preglednica 1:** Seznam rastlinskih vrst in virov pri katerih so z opraševanjem z obsevanim pelodom spodbudili nastanek haploidnih rastlin.

**Table 1:** List of plant species and available publications about haploid induction protocols by pollination with irradiated pollen.

Vrsta	Viri
buče	Kurtar in sod., 2002, 2009; Kurtar and Balkaya, 2010; Košmrlj in sod., 2013
čebula	Dore in Marie, 1993
črni ribez	Naess in sod., 1998
divja češnja	Höfer in Grafe, 2003
hruška	Bouvier in sod., 1993
jablana	Zhang in Lespinasse, 1991; De Witte in Keulemans, 1994; Hofer in Lespinasse, 1996
kivi	Pandey in sod., 1990; Chalak in Legave, 1997; Musial in Przywara, 1998, 1999
kumara	Przyborowski in Niemirowicz-Szczytt, 1994; Faris in sod., 1999; Faris in Niemirowicz-Szczytt, 1999; Claveria in sod., 2005
lubenica	Sari in sod., 1994
mandarina	Froelicher in sod., 2007; Aleza in sod., 2009
melona	Sauton in Dumas de Vault, 1987; Cuny in sod., 1993; Katoh in sod., 1993; Lotfi in sod., 2003; Gonzalo in sod., 2011; Godbole in Murthy, 2012
nagelj	Sato in sod., 2000
oreh	Grouh in sod., 2011
krinkar	Murovec in sod., 2013
petunija	Raquin, 1985
pomelo	Yahata in sod., 2010
sliva	Peixe in sod., 2000
sončnica	Todorova in sod., 1997
<i>Nicotiana</i>	Pandey, 1980; Pandey in Phung, 1982
vrtnica	Meynet in sod., 1994

Metoda temelji na lastnosti peloda obsevanega z UV,  $\gamma$  ali X žarki, ki po opráševanju na brazdi normalno kali in pelodni mešiček napreduje skozi vrat pestiča do embrionalne vrečke, kjer se tvori embrij. Ali jedri peloda oplodita jajčno celico in polarni jedri in se kromosomi opráševalca izločijo šele v kasnejši embriogenezi ali pa nastanek haploidnega embrija sproži že sama kalitev peloda, je za enkrat še nedorečeno. Novejše raziskave nakazujejo na možnost, da do oploditve dejansko pride, vendar se kromosomi iz močno obsevanega peloda čez čas izločijo iz jedra (Murovec in Bohanec, 2013). Uspeh metode je, poleg dejavnikov naštetih v drugem poglavju tega prispevka, odvisen od doze obsevanja in razvojne faze embrijev ob reševanju.

Vpliv doze sevanja na preživetje haploidnih embrijev in križancev je prvi preučil Hertwig leta 1911 v svojih poskusih oplojevanja jajčnih celic žab. Po njem so kasneje pojav poimenovali 'Hertwigov efekt'. V svojih poskusih je opazil, da po opráševanju s spermalnimi celicami predhodno obsevanimi z nizkimi dozami, velik odstotek embrijev propade zgodaj v razvoju. Tisti, ki preživijo, pa kažejo različne morfološke spremembe. Opráševanje s spermalnimi celicami obsevanimi z visokimi dozami, povzroči višji odstotek živih embrijev, ki so normalnega fenotipa (Hertwig, 1912 cit. po Pandey in Phung, 1982). Kasneje so pojav temeljito preučili in ugotovili, da so močno obsevane spermalne celice zmožne prodreti v jajčno celico, vendar je niso zmožne oploditi. Kljub temu pa stimulirajo delitev jajčne celice in ginogenetski razvoj embrija. Pri nižjih dozah obsevanja, spermalne celice obdržijo sposobnost oploditve jajčne celice, vendar zaradi obsevanja na hibrida prenesejo mutacije, ki povzročajo nenormalen fenotip ali prezgodnjo smrt (različni avtorji, cit. po Pandey in Phung, 1982). Pandey in Phung (1982) sta 'Hertwigov efekt' prva opazila pri rastlinah med opráševanjem štirih vrst rodu *Nicotiana*. Pri nižjih dozah obsevanja (100-200 Gy) je z višanjem doze padal odstotek pridobljenih sejancev, od katerih jih je veliko kmalu po kalitvi propadlo. Sejanci, ki so preživeli do cvetenja, so bili morfološko različni, niso bili podobni materinim rastlinam in so bili večinoma sterilni. Citološke analize so pokazale, da so bile rastline aneuploidni križanci, ki so vsebovali vse kromosome materine rastline in različno število kromosomov od opráševalne rastline. Z višanjem

doze obsevanja peloda nad 500 Gy, se je število aneuploidov manjšalo, večalo pa se je število dihaploidov in podvojenih dihaploidov. Kasneje so vpliv doze sevanja na izid opráševanja preučevali še pri drugih kmetijsko pomembnih rastlinskih vrstah. Tako so tudi pri kumarah (Claveria in sod., 2005), kiviju (Chalak in Legave, 1997; Musial in Przywara, 1998) in orehu (Grouh in sod., 2011), z višanjem doze obsevanja, uspeli regenerirati večje število haploidov v primerjavi z nižjimi dozami. Po drugi strani pa višanje doze močno vpliva na manjšanje števila nastalih plodov (Przyborowski in Niemirowicz-Szczytt, 1994; Kurtar in sod., 2002; Froelicher in sod., 2007; Košmrlj in sod., 2013), manjšanje števila normalno razvitih semen (Cuny in sod., 1993; Przyborowski in Niemirowicz-Szczytt, 1994; Chalak in Legave, 1997; Musial in Przywara, 1998; Sugiyama in Morishita, 2000; Lotfi in sod., 2003; Froelicher in sod., 2007), manjšo kalivost semen (Chalak in Legave, 1997) in na manjše število nastalih embrijev (Grouh in sod., 2011; Košmrlj in sod., 2013).

Opráševanje z obsevanim pelodom je najbolj raziskano pri bučevkah (družina Cucurbitaceae) pri katerih se metoda uporablja že vrsto let v žlahtniteljskih programih (Sugiyama in Morishita, 2000; Sari in Yetisir, 2002; Kuzuya in sod., 2003; Claveria in sod., 2005). Od prvih poskusov leta 1987 (Sauton in Dumas de Valux, 1987) pa do danes, so s pomočjo opráševanja z obsevanim pelodom, pridobili haploide pri melonah, lubenicah, kumarah in različnih bučah. Metoda temelji na opráševanju z obsevanim pelodom in kasnejšim reševanjem embrijev na E20A gojišču, ki sta ga uporabila že Sauton in Dumas de Valux leta 1987 pri melonah. Reševanje embrijev poteka 3-5 tednov po opráševanju, ko se iz polnih semen izolira embrije. Ob izolaciji so embriji v različnih razvojnih fazah: pri bučah so od točkaste do kotiledonske faze (Kurtar in sod., 2002), pri kumarah so od zgodnje srčaste do kotiledonske faze (Faris in sod., 1999) in pri melonah so od globularne do kotiledonske faze (Cuny in sod., 1993). Kurtar in sodelovci (2002) so dokazali, da je uspešnost regeneracije rastlin odvisna od razvojne stopnje embrijev ob reševanju. Najvišji odstotek regeneracije so dosegli iz embrijev inokuliranih v kotiledonski fazi. Kasneje so opazili, da je z razvojno fazo ob reševanju povezana tudi ploidnost embrijev. Embriji v zgodnejših fazah razvoja so bili haploidni, medtem

ko so bili embriji v kotiledonski fazi izključno diploidni. Rezultati so skladni z rezultati Faris in Niemirowicz-Szczytt (1999), ki sta spremljala razvoj embrijev in endospermov kumare po opráševanju s svežim pelodom in pelodom obsevanim pri 100 ali 300 Gy. Ugotovila sta, da se v primerjavi s kontrolnim opráševanjem, embriji in endospermi nastali po opráševanju z obsevanim pelodom, razvijajo počasneje in kažejo odstopanja od normalne morfologije. Poleg tega so, po opráševanju z obsevanim pelodom, embriji v kasnejših razvojnih fazah (mutanti) začeli propadati že 9 (100 Gy) oz. 3 dan (300 Gy) po opráševanju, tako da sta 15 dni po opráševanju v semenskih zasnovah zasledila samo še embrije v globularni razvojni fazi.

Velika prednost indukcije haploidov s pomočjo opráševanja z obsevanim pelodom je, da pri nekaterih vrstah kot so kivi (Pandey in sod., 1990; Chalak in Legave, 1997), čebula (Dore in Marie, 1993), mandarina (Froelicher in sod., 2007) in vrste rodu *Nicotiana* (Pandey in Phung, 1982) ni potrebe po reševanju embrijev. Tako pri kiviju puščajo oprášene cvetove na trsih do fiziološke zrelosti plodov, jih nato vernalizirajo in izločijo semena. Pandey in sodelavci (1990) so slabšo *in vivo* kalivost zrelih partenogenetskih semen izbojšali z *in vitro* kalitvijo semen na štirih različnih hranilnih gojiščih, Chalak in Legave (1997) pa sta kasneje kalitev semen poenostavila in dobila zadovoljiv odstotek trihaploidnih regenerantov tudi po neposredni setvi v vermikulit.

Spontana diploidizacija haploidnega jedra po opráševanju z obsevanim pelodom je bila na podlagi morfološkega opazovanja regenerantov opažena pri vrstah rodu *Nicotiana* (Pandey in Phung, 1982), čebuli (Dore in Marie, 1993), sončnici (Todorova in sod., 1997), nageljnu (Sato in sod., 2000) in meloni (Lotfi in sod., 2003). Pri sončnicah so opazili zanimiv pojav spontane diploidizacije haploidov med gojenjem v rastlinjaku. Od 296 regenerantov, katerim so s pretočno citometrijo opravljeno v fazi 2-3 listov dokazali haploidnost, so po 20 dneh rasti v rastlinjaku dobili 239 (81 %) diploidov, 32 (11 %) miksploidov in le preostalih 25 (8 %) je ostalo haploidnih (Todorova in sod., 1997). Spontano podvojene haploide so samooprašili, linije odbrali glede na lastnosti zanimive za žlahtnjenje in 17 odbranih DH linij analizirali s 4 izoencimskimi

markerji. Rastline znotraj vseh linij so bile uniformne, linije pa so bile homozigotne in so vsebovale izoencime materinih ali očetovskih rastlin.

### 2.3 Androgeneza

S pojmom androgeneza (ali embriogeneza mikrospor) označujemo pridobivanje haploidnih embrijev iz moških gamet. Poznani sta dve metodi in sicer *in vitro* kultura prašnic, s katero so pred 50 leti pridobili prve haploide (vrsta *Datura innoxia*; Guha in Maheshwari, 1964, 1966) in kultura izoliranih mikrospor, ki je sledila 10 let kasneje (tobak; Nitsch, 1974). Zaradi velike uspešnosti in uporabnosti pri številnih rastlinskih vrstah, je androgeneza najbolj pogosto uporabljena metoda indukcije haploidov pri žlahtnjenju rastlin in genetskih raziskavah. V komercialne namene se redno uporablja pri ječmenu, pšenici, koruzi, rižu, tritikali, rži, tobaku, oljni ogrščici in drugih vrstah rodu *Brassica* (podrobni protokoli so zbrani v Maluszynski in sod., 2003). Glavne slabosti androgeneze so močna odvisnost uspeha od genotipa rastline, neodzivnost določenih kmetijsko pomembnih vrst (drevesne vrste, stročnice) in modelne rastline *Arabidopsis thaliana* ter relativno velik delež regeneriranih albino rastlin. Metoda temelji na sposobnosti nezrelega peloda – mikrospor, da ob primernih dražljajih, spremeni razvojno pot iz gametofitne (dozorevanja peloda) v sporofitno (nastanek embrija). Ob ugodnih pogojih v *in vitro* razmerah, nastane haploidni embrij neposredno ali pa posredno preko kulture haploidnega kalusa.

Androgeneza iz prašnic je najbolj preprosta metoda pri kateri se po površinski sterilizaciji predtretiranih cvetnih brstov, prašnice aseptično izločijo in gojijo na hranilnih gojiščih. Kultura izoliranih mikrospor se začne podobno, le da se izolirane prašnice potopi v tekoče gojišče, kjer se ob stalnem tresenju izločijo mikrospre. Druga možnost izolacije mikrospor je trenje steriliziranih cvetnih brstov v tekočem gojišču in kasnejše ločevanje mikrospor od somatskega tkiva s filtriranjem in centrifugiranjem. Čeprav je izolacija mikrospor bolj zahtevna metoda, je njena velika prednost ločevanje mikrospor od sporofitnega tkiva. Tako je onemogočen vpliv sporofitnega tkiva na embriogenezo mikrospor in hkrati se prepreči nevarnost regeneracije heterozigotov iz somatskih celic.



Za uspešno spremembo razvojne poti iz gametofitnega v sporofitni razvoj, je najpomembnejši dejavnik razvojna faza mikrospor. Za večino rastlinskih vrst je najbolj primeren čas prve haploidne mitoze, ko so mikrospore v pozni enojedrni in zgodnji dvojedrni fazi (Touraev in sod., 1997; Maraschin in sod., 2005). Stresni dejavniki, ki se uporabljajo v ta namen (temperaturno pred-tretiranje, stradanje mikrospor in osmotski stres), se razlikujejo glede na rastlinsko vrsto. Tako se pri ječmenu, pšenici, koruzi, rižu, tritikali in rži uporablja pred-tretiranje

na nizkih temperaturah, pri vrstah rodu *Brassica* in tobaku pa na visokih temperaturah, oboje več ur ali dni. Pri oljni ogrščici in tobaku so dokazali, da lahko embriogenezo sprožijo različni stresni dejavniki, odvisno od razvojne faze mikrospor. Tako za enojedrne mikrospore oljne ogrščice zadostuje temperatura 32 °C, za dvojedrne pa je potrebna že temperatura 41 °C (Maraschin in sod., 2005). Pri tobaku, temperaturni šok uspešno vodi v embriogenezo enocelične mikrospore, medtem ko dvojedrnih mikrospor ne in jih je potrebno izpostaviti stradanju (Touraev in sod., 1997).

### 3 DOLOČANJE PLOIDNOSTI IN PREVERJANJE HOMOZIGOTNOSTI REGENERANTOV

Med *in vitro* kulturo cvetov in njihovih delov (prašnice, plodnice, itd.) se lahko na hranilnih gojiščih regenerirajo poleg haploidnih tudi diploidne rastline in celo rastline višjih stopenj ploidnosti (Sunderland, 1974; Germanà 2005, 2006, 2009; Košmrlj in sod., 2013; Murovec in Bohanec, 2013). V preteklosti so za določanje ploidnosti uporabljali posredne metode kot so spremljanje morfoloških lastnosti rastlin (velikost rastlin in listov, oblika cvetov), fertiliteti rastlin, bujnost rastlin, število kloroplastov v celicah zapiralkah in velikost listnih rež. Metode so bile zamudne, nenatančne in pod vplivom nepredvidljivih okoljskih dejavnikov. Dandanes se uporabljajo predvsem citološke tehnike štetja metafaznih kromosomov (primer protokola je predstavljen v Maluszynska, 2003) in merjenje količine DNA v jedrih s pomočjo pretočne citometrije (primer protokola je predstavljen v Bohanec, 2003). Slednja metoda predstavlja najhitrejšo in najbolj zanesljivo tehniko določanja ploidnosti regenerantov. Omogoča zelo zgodnje določanje, saj za analizo zadostujejo že majhne količine rastlinskega materiala, tako da se analiza lahko opravi še v fazi tkivne kulture. Poleg tega je s pomočjo pretočne citometrije mogoče odkrivanje mikšoploidnih regenerantov, kar z ostalimi tehnikami ni mogoče.

Diploidni regeneranti so lahko posledica spontane diploidizacije gamet (so spontani podvojeni haploidi), somatski regeneranti iz diploidnih starševskih celic ali križanci po samoopraševanju oz. tujeopraševanju. Zato je za dokončno potrditev DH potrebna analiza homozigotnosti. V ta namen se uporabljajo številne metode, odvisno od

rastlinske vrste in dostopnih markerskih sistemov. V preteklosti je analiza diploidnih regenerantov temeljila predvsem na fenotipskih markerjih (Raquin, 1985; Dore in Marie, 1993; De Witte in Keulemans, 1994; Maine, 2003) ter na samoopraševanju pridobljenih regenerantov in morfološkem testiranju potomstva (Sato in sod., 2000). Potomci DH naj bi bili izenačeni za vse lastnosti in pri njih naj ne bi bilo opaziti segregacije lastnosti. Kasneje so se uveljavili številni molekularni markerji, med njimi sprva izoencimi (Campion s sod., 1995; Bohanec in Jakše, 1999; Germanà in Chiancone, 2001; Höfer in Grafe, 2003), kasneje pa še DNA molekularni markerji kot npr. AFLP (Eeckhaut s sod., 2001) in RAPD (Bohanec in sod., 1995; Eimert in sod., 2003; Yahata in sod., 2005 a, b).

Zaradi kodominantnega načina dedovanja, relativne pogostosti v genomu evkariontov, visoke stopnje polimorfizma, preprostega in nedvoumnega vrednotenja (PCR namnoževanje, določanje dolžine z avtomatskimi sekvenčnimi aparati), mikrosateliti v zadnjih letih nadomeščajo ostale metode preverjanja homozigotnosti regenerantov. V primerih indukcije haploidov z inokulacijo prašnic ali drugih delov ne-oprašenih cvetov, je za potrditev DH dovolj analiza enega mikrosatelitnega lokusa, ki je pri izvorni rastlini heterozigoten. Pri indukciji haploidov s pomočjo opraševanja, kjer obstaja možnost nenamerne samooploditve ali oploditve s strani opraševalca, pa je potrebno analizirati več lokusov. Tako so Košmrlj in sodelavci (2013) odkrili, da je za nedvoumno potrditev izvora diploidnih

regenerantov buč v večini primerov zadostna analiza na treh lokusih.

Mikrosatelite so uporabili za določanje genetskega izvora diploidov pri številnih rastlinskih vrstah kot so *Citrus clementina* (Germanà in Chiancone, 2003; Germanà in sod., 2005), jablana (Höfer in sod., 2002; Vanwynsberghe in sod., 2005), hruška (Bouvier in sod., 2002), pšenica (Muranty in sod., 2002), koruza (Aulinger in sod., 2003; Tang in sod., 2006), mandarina (Froelicher in sod., 2007), oranžni krinkar (Murovec in Bohanec, 2013) in oljne buče (Košmrlj in sod., 2013).

Za hitro in poceni ločevanje med haploidi in nezaželenimi heterozigotnimi diploidi po indukciji z oprашevanjem, so najbolj primerni morfološki znaki, ki se izrazijo zgodaj v razvoju. Tako pri koruzi poznajo gen *RI-nj*, ki ob prisotnosti dominantnih genov *A1* ali *A2* in *C2* povzroči rdeče obarvanje alevronske plasti endosperma in v predelu skuteluma – ščitka (Geiger in Gordillo, 2009). Gen *RI-nj* mora biti v materini rastlini homozigotno recesiven, v oprашevalni liniji pa homozigotno dominanten. Po oprашevanju, se selekcija opravi že med zrnjem, saj se pri zrnju z nezaželenimi hibridnimi embriji opazi rdeče

obarvano krono v predelu alevronske plasti endosperma in skuteluma, zrnje s haploidnim embrijem pa vsebuje rdečo krono samo v alevronski plasti zaradi normalne oploditve polarnih jeder. Nedavno so predstavili nov morfološki znak, ki naj bi v prihodnje služil za ločevanje haploidov od križancev koruze. S križanjem so ustvarili dve novi oprășevalni liniji z izredno visoko vsebnostjo olja, hibridne potomce pa so določili s pomočjo jedrne magnetne resonance (nuclear magnetic resonance, NMR), saj so vsebovali večjo vsebnost olja od haploidnih (Melchinger in sod., 2013). Glavna prednost predstavljene novitete je v veliki zanesljivosti in možnosti avtomatizacije, hitrost pa je trenutno 20 semen na minuto.

Podoben princip z barvnim morfološkim znakom uporabljajo tudi pri krompirju, po oprășevanju s *S. phurea*. Dominantni gen povzroča vijoličaste pike na semenih in vijoličen obroč v predelu nodija stebela, tako da lahko selekcija poteka v dveh razvojnih fazah. Tako pri koruzi kakor pri krompirju pa opisana barvna morfološka znaka ne moreta ločiti haploidnih embrijev od hibridov po nenamernem samooprășevanju, zato so potrebni še dodatni morfološki ali molekularski markerji.

#### 4 PODVAJANJE ŠTEVILA KROMOSOMOV

Haploidi zaradi enojnega števila kromosomov ne tvorijo funkcionalnih gamet (so sterilni) in je za pridobivanje fertlnih linij potrebno število njihovih kromosomov podvojiti. Za pridobivanje t.i. podvojenih haploidov (doubled haploids, DH), homozigotnih na vseh lokusih, se uporabljajo različne tehnike, ki večinoma vključujejo tretiranje z antimitotičnimi sredstvi kot so kolhicin (v začetku izoliran iz jesenskega podleska *Colchicum autumnale* L.), orizalin, trifluralin, amiprofos-metil (AMP) in drugi. Ta sredstva se lahko uporabijo v različnih fazah indukcije haploidov od najzgodnejše faze mikrospor, ko jih dodajajo v indukcijsko gojišče, pa vse do faze aklimatiziranih haploidnih rastlin, pri katerih se sredstva nanašajo na meristeme. Novejše raziskave nakazujejo možnost podvajanja kromosomov preko adventivne regeneracije (Maine, 2003; Škof in sod., 2007) brez uporabe antimitotičnih sredstev. Tako so pri šalotki na gojišču za indukcijo

ginogeneze opazili spontano podvajanje kromosomov somatskih regenerantov, v tem primeru iz diploidnega v tetraploidno število (Sulistyanskih in sod., 2006). Metodo so uspešno uporabili za podvajanje kromosomov haploidnih rastlin čebule Alan in sodelavci (2007), ki so s somatsko regeneracijo na gojiščih za indukcijo ginogeneze pridobili 61 % diploidnih regenerantov. Odstotek regeneriranih diploidov se je ob dodajanju 12,5, 25 ali 50  $\mu$ M kolhicina v gojišče celo zmanjšal, ob hkratnem povečanju odstotka regeneriranih tetraploidov in miksploidov. S somatsko regeneracijo so iz miksploidnega matičnega materiala uspeli regenerirati same diploide. Še boljše rezultate so dosegli Jakše in sodelavci (2010) s somatsko regeneracijo iz kulture cvetnih brstov, kjer so dobili do 83 % uspešnost podvajanja kromosomov haploidnih in do 100 % uspešnost podvajanja kromosomov miksploidnih čebul.

## 5 ZAKLJUČEK

Petdeset let od prvega sproženega nastanka haploidnih rastlin so tehnike indukcije in regeneracije haploidov še vedno oz. vedno bolj aktualne. Od prvotne uporabe v žlahtnjenju najpomembnejših poljščin, se njihovo pridobivanje širi na druge vrste kot so zelenjadnice, okrasne, zdravilne, aromatične in krmne rastline. Poleg tega

dobivajo (podvojeni) haploidi z novimi tehnologijami (npr. določanje zaporedij celotnih genomov) nov pomen in vlogo v sodobnih genetskih študijah. Zato menim, da bodo haploidi in podvojeni haploidi tudi v prihodnje igrali pomembno vlogo v kmetijstvu in bazičnih raziskavah.

## 6 VIRI

- Alan A.R., Brants A., Cobb E., Goldschmied P.A., Mutschler M.A., Earle E.D. 2004. Fecund gynogenic lines from onion (*Allium cepa* L.) breeding materials. *Plant Science*, 167, 5: 1055-1066
- Alan A.R., Lim W., Mutschler M.A., Earle E.D. 2007. Complementary strategies for ploidy manipulations in gynogenic onion (*Allium cepa* L.). *Plant Science*, 173: 25-31
- Aleza P., Juarez J., Hernandez M., Pina J.A., Ollitrault P., Navarro L. 2009. Recovery and characterization of a *Citrus clementina* Hort. ex Tan. 'Clemenules' haploid plant selected to establish the reference whole Citrus genome sequence. *BMC Plant Biology*, 9, št. članka 110
- Aulinger I.E., Peter S.O., Schmid J.E., Stamp P. 2003. Rapid attainment of a doubled haploid line from transgenic maize (*Zea mays* L.) plants by means of anther culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant*, 39: 165-170
- Bal U., Touraev A. 2009. Microspore embryogenesis in selected medicinal and ornamental species of the *Asteraceae*. V: *Advances in haploid production in higher plants*. Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. (ur.). Springer: 219-229
- Barret P., Brinkmann M., Beckert M. 2008. A major locus expressed in the male gametophyte with incomplete penetrance is responsible for *in situ* gynogenesis in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 117: 581-594
- Bohanec B. 1994. Induction of gynogenesis in agricultural crops: a review. V: *Proceedings of the international colloquium on impact of plant biotechnology on agriculture*, December 5th - 7th 1994, Rogla, Slovenia. Javornik B., Bohanec B., Kreft I. (ur.). Ljubljana, Biotechnical Faculty, Agronomy Department, Centre for Plant Biotechnology and Breeding: 43-55
- Bohanec B. 2003. Ploidy determination using flow cytometry. V: *Doubled haploid production in crop plants, a manual*. Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (ur.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 397-403
- Bohanec B. 2009. Doubled haploids via gynogenesis. V: *Advances in haploid production in higher plants*. Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. (ur.). Springer: 35-46
- Bohanec B., Jakše M., Ihan A., Javornik B., 1995. Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): induction procedures and genetic analysis of regenerants. *Plant Science*, 104: 215-224
- Bohanec B., Jakše M. 1999. Variations in gynogenic response among long-day onion (*Allium cepa* L.) accessions. *Plant Cell Reports*, 18: 737-742
- Bouvier L., Guérif P., Djulbic M., Durel C.E., Chevreau E., Lespinasse Y. 2002. Chromosome doubling of pear haploid plants and homozygosity assessment using isozyme and microsatellite markers. *Euphytica*, 123: 255-262
- Bouvier L., Zhang Y.X., Lespinasse Y. 1993. Two methods of haploidization in pear, *Pyrus communis* L.: greenhouse seedling selection and *in situ* parthenogenesis induced by irradiated pollen. *Theoretical and Applied Genetics*, 87: 229-232
- Campion B., Bohanec B., Javornik B. 1995. Gynogenic lines of onion (*Allium cepa* L.): evidence of their homozygosity. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 598-602
- Chalak L., Legave J.M. 1997. Effects of pollination by irradiated pollen in Hayward kiwifruit and spontaneous doubling of induced parthenogenetic trihaploids. *Scientia Horticulturae*, 68: 83-93
- Claveria E., Garcia-Mas J., Dolcet-Sanjuan R. 2005. Optimization of cucumber doubled haploid line production using *in vitro* rescue of *in vivo* induced

- parthenogenic embryos. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130, 4: 555-560
- Cuny F., Grotte M., Dumas de Vault R., Rieu A. 1993. Effects of gamma irradiation of pollen on parthenogenetic haploid production in muskmelon (*Cucumis melo* L.). *Environmental and Experimental Botany*, 33, 2: 301-312
- De Witte K., Keulemans J. 1994. Restrictions of the efficiency of haploid plant production in apple cultivar Idared, through parthenogenesis *in situ*. *Euphytica*, 77: 141-146
- Deimling S., Fleihinghaus-Roux T. 1996. Haploids in rye. V: In vitro haploid production in higher plants. Jain S.M., Spory S.K., Veilleux R.E. (ur.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 181-204
- Devaux P., Kasha K.J. 2009. Overview of barley doubled haploid production. V: Advances in haploid production in higher plants. Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. (ur.). Springer: 47-63
- Dore C., Marie F. 1993. Production of gynogenetic plants of onion (*Allium cepa* L.) after crossing with irradiated pollen. *Plant Breeding*, 111: 142-147
- Eeckhaut T., Werbrouck S., Dendauw J., Bockstaele E.V., Dobergh P. 2001. Induction of homozygous *Spathiphyllum wallisii* genotypes through gynogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67:181-189
- Eimert K., Reutter G., Strolka B. 2003. Fast and reliable detection of doubled-haploids in *Asparagus officinalis* by stringent RAPD-PCR. *Journal of Agricultural Science*, 141: 73-78
- Faris N.M., Niemirowicz-Szczytt K. 1999. Cucumber (*Cucumis sativus* L.) embryo development *in situ* after pollination with irradiated pollen. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 41: 111-118
- Faris N.M., Nikolova V., Niemirowicz-Szczytt K. 1999. The effect of gamma irradiation dose on cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid embryo production. *Acta Physiologiae Plantarum*, 21, 4: 391-396
- Ferrant V., Bouharmont J. 1994. Origin of gynogenetic embryos of *Beta vulgaris* L. *Sexual Plant Reproduction*, 7: 12-16
- Ferrie A.M.R. 2009. Current status of doubled haploids in medicinal plants. V: Advances in haploid production in higher plants. Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. (ur.). Springer: 209-217
- Ferrie A.M.R., Caswell K.L. 2011. Isolated microspore culture techniques and recent progress for haploid and doubled haploid plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104, 3: 301-309
- Forster B.P., Heberle-Bors E., Kasha K.J., Touraev A. 2007. The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Science*, 368-375
- Froelicher Y., Bassene J.B., Jedidi-Neji E., Dambier D., Morillon R., Bernardini G., Costantino G., Ollitrault P. 2007. Induced parthenogenesis in mandarin for haploid production: induction procedures and genetic analysis of plantlets. *Plant Cell Reports*, 26:937-944
- Geiger H.H., Gordillo G.A. 2009. Doubled haploids in hybrid maize breeding. *Maydica*, 54: 485-499
- Gémes-Juhász A., Baloh P., Ferenczy A., Kristóf Z. 2002. Effect of optimal stage of female gametophyte and heat treatment on in vitro gynogenesis induction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Reports*, 21: 105-111
- Germanà M.A. 2006. Doubled haploid production in fruit crops. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 86: 131-146
- Germanà M.A. 2009. Haploid and doubled haploids in fruit trees. V: Advances in haploid production in higher plants. Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. (ur.). Springer: 241-263
- Germanà M.A., Chiancone B, Lain O., Testolin R. 2005. Anther culture in *Citrus clementina*: a way to regenerate tri-haploids. *Australian Journal of Agricultural Research*, 56: 839-845
- Germanà M.A., Chiancone B. 2001. Gynogenetic haploids of Citrus after in vitro pollination with triploid pollen grains. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66: 59-66
- Germanà M.A., Chiancone B. 2003. Improvement of *Citrus clementina* Hort. Ex Tan. microspore-derived embryoid induction and regeneration. *Plant Cell Reports*, 22: 181-187
- Godbole M., Murthy H.N. 2012. Parthenogenetic haploid plants using gamma irradiated pollen in snapmelon (*Cucumis melo* var. momordica). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109: 167-170
- Gonzalo M.J., Claveria E., Monforte A.J., Dolcet-Sanjuan R. 2011. Parthenogenetic haploids in melon: Generation and molecular characterization of a doubled haploid line population. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 136: 145-154
- Grouh M. S.H., Vahdati K., Lotfi M., Hassani D., Biranvand N. P. 2011. Production of haploids in persian walnut through parthenogenesis induced by gamma-irradiated pollen. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 136, 3: 198-204

- Guha S., Maheshwari S.C. 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 204, 4957: 497
- Guha S., Maheshwari, S.C. 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature*, 212: 97-98
- Höfer M., Gomez A., Aguiriano E., Manzanera J.A., Bueno M.A. 2002. Analysis of simple sequence repeat markers in homozygous lines of apple. *Plant Breeding*, 121: 159-16
- Höfer M., Grafe Ch. 2003. Induction of doubled haploids in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Euphytica*, 130: 191-197
- Höfer M., Lespinasse Y. 1996. Haploidy in apple. V: *In vitro* haploid production in higher plants, Vol. 3: Important selected plants. Jain S.M., Sopory S.K., Veilleux R.E. (ur). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 261-276
- Hosp J., Maraschin S.F., Touraev A., Boutilier K. 2007. Functional genomics of microspore embryogenesis. *Euphytica*, 158: 275-285
- Jakše M., Hirschegger P., Bohanec B., Havey M.J. 2010. Evaluation of gynogenic responsiveness and pollen viability of selfed doubled haploid onion lines and chromosome doubling via somatic regeneration. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 135, 1: 67-73
- Kasha K.J., Hu T.C., Oro R., Simion E., Shim Y.S. 2001. Nuclear fusion leads to chromosome doubling during mannitol pretreatment of barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores. *Journal of Experimental Botany*, 52, 359: 1227-1238
- Kasha K.J., Kao K.N. 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature*, 225: 874-876
- Katoh N., Hagimori M., Iwai S. 1993. Production of haploid plants of melon by pseudofertilized ovule culture. *Plant Tissue Culture Letters*, 10: 60-66
- Košmrlj K., Murovec, J., Bohanec B. 2013. Haploid induction in hull-less seed pumpkin through parthenogenesis induced by X-ray-irradiated pollen. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 138: 310-316
- Kurtar E.S., Balkaya A. 2010. Production of *in vitro* haploid plants from *in situ* induced haploid embryos in winter squash (*Cucurbita maxima* Duchesne ex Lam.) via irradiated pollen. *Plant, Cell, Tissue and Organ Culture*, 102: 267-277
- Kurtar E.S., Balkaya A., Ozbakir M., Ofluoglu T. 2009. Induction of haploid embryo and plant regeneration via irradiated pollen technique in pumpkin (*Cucurbita moschata* Duchesne ex Poir). *African Journal of Biotechnology*, 8: 5944-5951
- Kurtar E.S., Sari N., Abak K. 2002. Obtention of haploid embryos and plants through irradiated pollen technique in squash (*Cucurbita pepo* L.). *Euphytica*, 127: 335-344
- Kuzuya M., Hosoya K., Yashiro K., Tomita K., Ezura H. 2003. Powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) resistance in melon is selectable at the haploid level. *Journal of Experimental Botany*, 54, 384: 1069-1074
- Laurie D.A., Bennett M.D. 1988. The production of haploid wheat plants from wheat x maize crosses. *Theoretical and Applied Genetics*, 76: 393-397
- Lotfi M., Alan A.R., Henning M.J., Jahn M.M., Earle E.D. 2003. Production of haploid and doubled haploid plants of melon (*Cucumis melo* L.) for use in breeding for multiple virus resistance. *Plant Cell Reports*, 21: 1121-1128
- Maine M.J. 2003. Potato haploid technologies. V: Doubled haploid production in crop plants, a manual. Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (ur.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 241-247
- Maluszynska J. 2003. Cytogenetic tests for ploidy level analyses – chromosome counting. V: Doubled haploid production in crop plants: A manual. Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (ur). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 391-395
- Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. 2003. Doubled haploid production in crop plants, a manual. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 428 str.
- Maraschin S.F., de Priester W., Spaink H.P., Wang M. 2005. Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective. *Journal of Experimental Botany*, 56, 417: 1711-1726
- Melchinger A.E., Schipprack W., Würschum T., Chen S., Technow F. 2013. Rapid and accurate identification of *in vivo*-induced haploid seeds based on oil content in maize. *Scientific Reports*, 3, št. članka 2129
- Meynet J., Barrade R., Duclos A., Siadous R. 1994. Dihaploid plants of roses (*Rosa x hybrida*, cv 'Sonia') obtained by parthenogenesis induced using irradiated pollen and *in vitro* culture of immature seeds. *Agronomie*, 2: 169-175
- Muranty H., Sourdille P., Bernard S., Bernard M. 2002. Genetic characterization of spontaneous diploid

- androgenetic wheat and triticale plants. *Plant Breeding*, 121: 470-474
- Murovec J., Bohanec B. 2013. Haploid induction in *Mimulus aurantiacus* Curtis obtained by pollination with gamma irradiated pollen. *Scientia Horticulturae*, 162: 218-225
- Musial K., Bohanec B., Jakše M., Przywara L. 2005. The development of onion (*Allium cepa* L.) embryo sacs *in vitro* and gynogenesis induction in relation to flower size. *In vitro Cellular and Developmental Biology- Plant*, 41: 446-452
- Musial K., Bohanec B., Przywara L. 2001. Embryological study on gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.). *Sexual Plant Reproduction*, 13: 335-341
- Musial K., Przywara L. 1998. Influence of irradiated pollen on embryo and endosperm development in kiwifruit. *Annals of Botany*, 82: 747-756
- Musial K., Przywara L. 1999. Pollination with heavily irradiated pollen in *Nicotiana*: induced parthenogenesis and embryological study. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 41: 127-137
- Naess S.K., Swartz H.J., Bauchan G.R. 1998. Ploidy reduction in blackberry. *Euphytica*, 99: 57-73
- Nitsch C, 1974. Pollen culture - a new technique for mass production of haploid and homozygous plants. V: Haploids in higher plants: advances and potential : proceedings of the first international symposium, Guelph, Ontario, Canada. Kasha K.J. (ur). University of Guelph: 123-135
- Pandey K.K. 1980. Parthenogenetic diploidy and egg transformation induced by irradiated pollen in *Nicotiana*. *New Zeland Journal of Botany*, 18, 2: 203-207
- Pandey K.K., Phung M. 1982. 'Hertwig effect in plants: induced parthenogenesis through the use of irradiated pollen. *Theoretical and Applied Genetics*, 62: 295-300
- Pandey K.K., Przywara L., Sanders P.M. 1990. Induced parthenogenesis in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) through the use of lethally irradiated pollen. *Euphytica*, 51: 1-9
- Peixe A., Campos M.D., Cavaleiro C., Barroso J., Pais M.S. 2000. Gamma-irradiated pollen induces the formation of 2n endosperm and abnormal embryo development in Euroean plum (*Prunus domestica* L., cv. 'Rainha Claudia Verde'. *Scientia Horticulturae*, 86, 4: 267-278
- Przyborowski J., Niemirowicz-Szczytt K. 1994. Main factors affecting cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid embryo development and haploid plant characteristics. *Plant Breeding*, 112: 70-75
- Raquin C. 1985. Induction of haploid plants by *in vitro* culture of *Petunia* ovaries pollinated with irradiated pollen. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 94: 166-169
- Rines H.W. 2003. Oat haploid from wide hybridization. V: Doubled haploid production in crop plants, a manual. Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (ur.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 155-159
- Sari N., Abak K., Pitrat M., Rode J.C., Dumas de Vaulx R. 1994. Induction of parthenogenetic haploid embryos after pollination by irradiated pollen in watermelon. *HortScience*, 29, 10: 1189-1190
- Sari N., Yetisir H. 2002. Some agronomical characteristics of doubled haploid lines produced by irradiated pollen technique and parental diploid genotypes in melons. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 26: 311-317
- Sato S., Katoh N., Yoshida H., Iwai S., Hagimori M. 2000. Production of doubled haploid plants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by pseudofertilized ovule culture. *Scientia Horticulturae*, 83: 301-310
- Sauton A., Dumas De Vaulx R. 1987. Obtention de plantes haploides chez le melon (*Cucumis melo* L.) par gynogenese induite par pollen irradie. *Agronomie*, 7, 2: 141-148
- Segui-Simarro J., Nuez F. 2008. How microspores transform into haploid embryos: changes associated with embryogenesis induction and microspore-derived embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 134: 1-12
- Sugiyama K., Morishita M. 2000. Production of seedless watermelon using soft-X-irradiated pollen. *Scientia Horticulturae*, 84: 255-264
- Sulistyaningsih E., Aoyagi Y., Tashiro Y. 2006. Flower bud culture of shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum group) with cytogenetic analysis of resulting gynogenic plants and somaclones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86: 249-255
- Sunderland N. 1974. Anther culture as a means of haploid production. V: Haploids in higher plants: advances and potential : proceedings of the first international symposium, Guelph, Ontario, Canada. Kasha K.J. (ur). University of Guelph: 91-122
- Škof S., Bohanec B., Kastelec D., Luthar Z. 2007. Spontaneous induction of tetraploidy in hop using adventitious shoot regeneration method. *Plant Breeding*, 126, 4: 416-421

- Tang F., Tao Y., Zhao T., Wang G. 2006. *In vitro* production of haploid and doubled haploid plants from pollinated ovaries of maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 84: 233-237
- Testillano P.S., Risueno M.C. 2009. Tracking gene and protein expression during microspore embryogenesis by confocal laser scanning microscopy. V: *Advances in haploid production in higher plants*. Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. (ur.). Springer: 339-347
- Thomas T.D. 2004. Embryological observations on unpollinated ovary culture of mulberry (*Morus alba* L.). *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 46: 87-94
- Thomas W.T.B., Forster B.P., Gertsson B. 2003. Doubled haploids in breeding. V: *Doubled haploid production in crop plants, a manual*. Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (ur.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 337-349
- Todorova M., Ivanov P., Shindrova P., Christov M., Ivanova I. 1997. Doubled haploid production of sunflower (*Helianthus annuus* L.) through irradiated pollen-induced parthenogenesis. *Euphytica*, 97: 249-254
- Touraev A., Stoger E., Voronin V., Heberle-Bors E. 1997. Plant male germ line transformation. *Plant Journal*, 12, 4: 949-956
- Vanwynsberghe L., De Witte K., Coart E., Keulemans J. 2005. Limited application of homozygous genotypes in apple breeding. *Plant Breeding*, 124: 399-403
- Wedzony M. 2003. Protocol for doubled haploid production in hexaploid triticale (*xTriticosecale* Wittm.) by crosses with maize. V: *Doubled haploid production in crop plants, a manual*. Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (ur.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 135-140
- Wedzony M., Forster B.P., Zur I., Golemić E., Szechynske-Hebda M., Dubas E., Gotebiowska G. 2009. Progress in doubled haploid technology in higher plants. V: *Advances in haploid production in higher plants*. Touraev A., Forster B.P., Jain S.M. (ur.). Springer: 1-33
- Yahata M., Harusaki S., Komatsu H., Takami K., Kunitake H., Yabuya T., Yamashita K., Toolapong P. 2005a. Morphological characterization and molecular verification of a fertile haploid pummelo (*Citrus grandis* Osbeck). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130: 34-40
- Yahata M., Kunitake H., Yabuya T., Yamashita K., Kashihara Y., Komatsu H. 2005b. Production of a doubled haploid from a haploid pummelo using colchicine treatment of axillary shoot buds. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 130: 899-903
- Yahata M., Yasuda K., Nagasawa K., Harusaki S., Komatsu H., Kunitake H. 2010. Production of haploid plant of 'Banpeiyu' pummelo (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.) by pollination with soft x-ray-irradiated pollen. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 79: 239-245
- Zhang Y.X., Lespinasse Y. 1991. Pollination with gamma-irradiated pollen and development of fruits, seeds and parthenogenetic plants in apple. *Euphytica*, 54: 101-109
- Zhang Z.L., Qiu F.Z., Liu Y.Z., Ma K.J., Li Z.Y., Xu S.Z. 2008. Chromosome elimination and *in vivo* haploid production induced by Stock 6-derived inducer line in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Reports*, 27, 12: 1851-1860