

4. konferenca z mednarodno udeležbo
Konferenca VIVUS – s področja kmetijstva, naravovarstva, hortikulture in floristike ter živilstva in prehrane
»Z znanjem in izkušnjami v nove podjetniške priložnosti«
20. in 21. april 2016, Biotehniški center Naklo, Strahinj 99, Naklo, Slovenija

4th Conference with International Participation

Conference VIVUS – on Agriculture, Environmentalism, Horticulture and Floristics, Food Production and Processing and Nutrition

»With Knowledge and Experience to New Entrepreneurial Opportunities«

20th and 21st April 2016, Biotechnical Centre Naklo, Strahinj 99, Naklo, Slovenia

Raznolikost in uporabnost *in vitro* metod določanja živosti peloda v biotehnoloških postopkih žlahtnjenja rastlin

dr. Liliana Vižintin

Biotehniški center Naklo, Slovenija, liliana.vizintin@bc-naklo.si

Izvleček

Novejše biotehnološke metode omogočajo manipulacijo peloda v *in vitro* razmerah za namene klasičnega žlahtnjenja ali ustvarjanja transgenih rastlin. Z razvojem tehnik tkivnih kultur so raziskovalci razvili in optimizirali tudi številne metode določanja živosti, ki so prilagojene uporabljenemu rastlinskemu materialu (vrsti, razvojni fazi peloda,..) in namenu eksperimentiranja. Ločimo jih na teste obarvanja peloda, ki slonijo na permeabilnosti membrane in encimskim reakcijam, ter metode *in vitro* kalitve zrelega peloda.

V članku smo opisali najbolj uporabljene metode določanja živosti peloda preko testov obarvanja, analizirali smo prednosti in slabosti nekaterih preizkušenih metod. Poudarili smo uporabnost teh metod v povezavi s poskusi oprašitve, vnosa tujih genov, izbire parentalnih genotipov in shranjevanjem peloda.

Ključne besede: pelod, živost, biotehnologija

Diversity and applicability of *in vitro* methods for pollen viability determination in biotechnical methods of plant breeding

Abstract

New biotechnological techniques allow *in vitro* manipulation of pollen for classical plant breeding or transgenic plants production. With the development of tissue cultures, a wide number of methods for determination of pollen viability has been proposed for a particular plant material (species, developmental stage of pollen,...) or specific purposes of experimentation. Mainly, these methods could be divided in staining tests, which are based on membrane permeability and enzyme reactions, and methods of *in vitro* germination of mature pollen.

In this paper, the most used staining methods of pollen viability determination were described. In particular we analysed strengths and weaknesses of tested methods. We stressed the usefulness of these methods for attempts of pollination, introduction of foreign genes, selection of parental genotypes and pollen conservation.

Key words: pollen viability, biotechnology

1 Uvod

Razvoj zrelega peloda semenk je veliko bolj zapleten kot pri ostalih rastlinskih vrstah, saj so semenke evolucijsko tudi najbolj razvita skupina rastlin. Zrela pelodna zrna semenk nastajajo v prašnicah in se nazadnje strukturno spremenijo pri klitju na pestični brazdi (kritosemenke) ali po prenosu na mikropilo semenske zasnove (golosemenke). Na razvoj peloda vplivajo številni dejavniki, med drugim tudi polutanti v zraku (Majd in Mohamadi, 1992; Emberlin, 1998, Rezanejad 2007). Študije so dokazale, da lahko polutanti vplivajo na strukturo peloda, živost, kaljivost in dolžino pelodnega mešička. Ker je razvoj zrelega peloda občutljiv in energetsko potraten postopek v življenju rastlin, so tudi postopki *in vitro* gojenja peloda dokaj zapleteni. Kljub temu, s pomočjo novejših biotehnoloških metod, lahko pri nekaterih rastlinskih vrstah razvoj peloda že uspešno induciramo in spremljamo v *in vitro* razmerah; pri tem vsaki posamezni vrsti prilagajamo pogoje gojenja v *in vitro* razmerah (Tupy in sod., 1991; Stauffer in sod. 1991; Touraev in Heberle-Bors, 1999).

Podobno lahko induciramo v laboratoriju poleg normalnega razvoja tudi embriogenetski razvoj peloda. Preklopa iz gametofitnega v sporofitni razvoj se zgodi le v zgodnji razvojni stopnji mikrospor (v enojedrni ali začetni dvojedrni fazi) in ga običajno induciramo z različnimi stresnimi dejavniki (temperaturni, gladovni stres,...). Označujejo ga številne celične delitve, ki vodijo do nastanka globularnega embrioida. Ta se direktno ali indirektno (preko kalusa) regenerira v odraslo haploidno rastlino (Goralski in sod., 1999; Bohanec, 1992).

Če želimo opravljati poskuse *in vitro* zorenja peloda ali embriogenetskega razvoja, je pomembno, da lahko spremljamo živost peloda v vsaki fazi razvoja in še posebej pri izolaciji mikrospor v zgodnji razvojni stopnji, saj lahko mehanični ali kemični dejavniki pelod poškodujejo do te mere, da onemogočajo njegov nadaljnji razvoj v *in vitro* pogojih (Vižintin in Bohanec, 2004). Zaradi tega so se hkrati z omenjenimi metodami tkivnih kultur razvile tudi metode spremljanja živosti mikrospor in zrelega peloda.

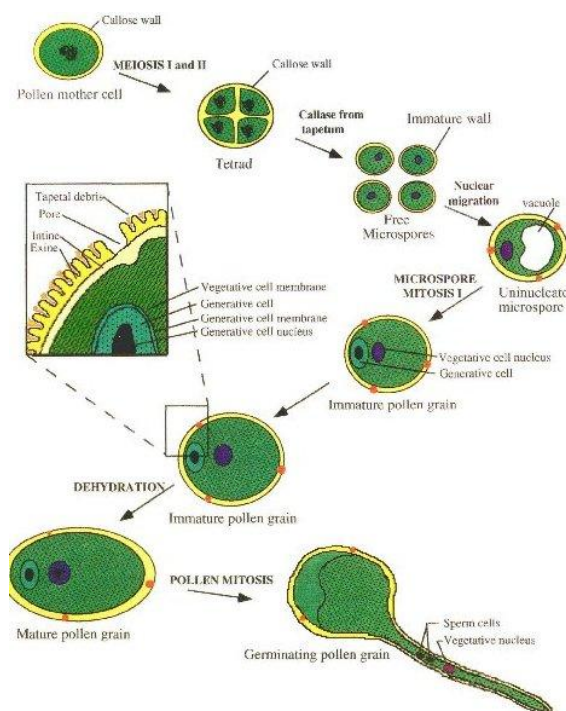
V naravi je obstojnost peloda (»živost« ali zmožnosti zrelega peloda, da kali) lahko različno dolga, kar je lahko posledica prilagoditve rastline na abiotske razmere in na način opravevanja. Sposobnost kalitve zrelega peloda po sprostitvi iz prašnic je tako odvisna od načina opravevanja rastline (preko žuželk ali vetra), trajanja in načina odprtja cvetov (kontinuirano ali ciklično), od abiotskih faktorjev v okolju (letni čas, vlaga, temperatura), morfologije cvetov in peloda in od same začetne hidracije peloda (Lisci in sod., 1994; Nepi in Pacini, 1993; Pacini in sod., 1997; Nepi in sod. 2001). Na primer pri bučah, ki so žužkocvetke z enospolnimi cvetovi, stopnja živosti peloda pade v obdobju odprtega cveta od začetne vrednosti 92% (ob prvem odprtju cveta) do 75% (ob zaprtju cveta) in je ob ponovnem odprtju cveta komaj 10%. Ključni dejavnik, ki vpliva na živost je v tem primeru dehidracija peloda v času, ko je bil pelod že sproščen iz anter in se nahaja na površini le-teh. Podobno so opazili tudi pri drugih vrstah žužkocvetk in vetrocvetk. Na splošno velja, da pri vseh rastlinah pride s časom do več ali manj strmega padca stopnje živosti peloda, ki se sprosti iz anter. To je bistvena informacija pri načrtovanju poskusa kalitve *in vitro* ali *in situ*.

Namen članka je analizirati in predstaviti najbolj uporabljene tehnike določanja živosti peloda kritosemenk na osnovi metod obarvanja peloda. V diskusiji bomo poudarili predhodne raziskave in uporabnost predstavljenih metod pri številnih raziskavah, kjer se pelod uporablja v namen zlahtnjenja novih sort ali drugih aplikacij v kmetijstvu.

1.1 Razvoj zrelega peloda pri kritosemenkah

Mikrogametofit (ali moški gametofit) je pri kritosemenkah zelo majhen in enostaven, sestavljen iz največ treh celic znotraj izvorne stene pelodnega zrna (poenostavljeno to imenujemo kar pelod), dokončni razvoj le-tega pa poteka vedno na ženskem cvetu oziroma na ženskem delu dvospolnega cveta. Razvoj peloda pri kritosemenkah (McCormick, 1993; Goldberg in sod., 1993; Bedinger, 1992) se začne v prašnicah (anterah) z delitvijo diploidnih sporofitnih celic in nastankom pelodnih maternih celic, ki se delijo mejotično – nastanejo tetrade haploidnih celic, ki jih ovija kalozna stena. Le-te se nato ločijo v mikrospore s pomočjo encima kalaze, ki ga izloča *tapetum* (notranja plast celic pelodne

vrečke), ki je hranilno in sekrecijsko tkivo (Polowick in Sawhney, 1993). Enojedrne mikrospore hitro rastejo, razvija se jim tudi celična stena in sicer zunanji sloj eksine, ki ga sestavlja zelo obstojni polimer sporopolenin, in notranji sloj intine (celuloze). Mikrospore se razvijajo v mikrogametofit in sicer se mitotično delijo, tako da tvorijo vegetativno in generativno jedro (ali celico). To označuje prehod v dvojedrno fazo razvoja. V 70% rastlinskih družin (na primer Solanaceae, Liliaceae) se zrel pelod sprosti iz prašnic, ko je še v dvojedrni fazi in se generativno jedro ponovno deli v dve spermalni jedri (ali celici) šele ob klitju peloda na pestični brazdi. V drugih rastlinskih družinah (na primer Cruciferae, Gramineae) pa pride do ponovne mitotične delitve, ko je pelod še znotraj anter in tako se že iz prašnic sprosti trojedrni pelod. Po opraitvi z zrelim pelodov iste vrste pride nato še do oploditve, ko vegetativna celica oblikuje pelodni mešiček ali cevko, ki prodre skozi tkivo vrata pestiča preko mikropile do embrionalne vrečke plodnice. Tukaj se ena spermalna celica združi z jajčno celico v diploidno zigoto (spojek), druga pa z jedroma sekundarnega endosperma tvori triploidno hranilno tkivo, imenovano sekundarni endosperm. Temu pravimo dvojna oploditev pri kritosemenkah. Zgradba pelodnih zrn, prašnikov, pestiča in ostalih delov cveta je vrstno specifična in se je tekom evolucije vrste izoblikovala kot posledica prilagoditve semenk na okolje in način opraitve ali opraitvalca. Pri žužkocvetkah je to odraz dolge vzporedne evolucije rastlin in živali (koevolucije opraitvalca in rastline) v spreminjajočem se okolju (Kiester in sod., 1984; Edlund in sod., 2004).



Slika 1: Razvoj peloda.

Vir: McCormick, 1993.

2 Metode in material pri določanju živosti peloda

Tehnike določanja stopnje živosti peloda smo analizirali na osnovi pregleda predhodnih raziskav ter ocenili izvedljivost in uporabnost predstavljenih metod. Določene metode smo tudi že preizkušali (Vižintin, 2003) na pelodu kumar (*Cucumis sativus* L.), buč (*Cucurbita pepo* L.), čebule (*Allium cepa* L.) in sicer na izoliranem in neizoliranem zrelem pelodu in mikrosporah. Na splošno se tehnike določanja živosti peloda delijo na metode, ki slonijo na encimski aktivnosti ali prepustnosti membrane peloda, in metode določanja kalivosti peloda v *in vitro* razmerah (kot potrdilo živosti le-tega). V našem primeru smo se osredotočili le na prve, v kolikor tehnike *in vitro* kalitve peloda so uporabne le

v primeru zrelega peloda in zahtevajo optimizacijo metode (postopka in gojišča) za vsako posamezno rastlinsko vrsto.

Tudi pri določanju encimske aktivnosti ali prepustnosti membrane kot dokazilo živosti peloda, moramo upoštevati različne specifičnosti te analize, ki se navezujejo na uporabljen rastlinski material. Večkrat metode obarvanja ne delujejo enako na pelodu različnih rastlinskih vrst. Poleg tega, na rastlini dozorel pelod ali nezrel izoliran pelod se običajno različno odziva na metode obarvanja.

Pri izvajanju teh poskusov je potrebno optimizirati še posebej postopke izolacije peloda, ker lahko le-ti vplivajo na rezultate živosti ali povzročajo drugačno obarvanost peloda zaradi interakcije barvila in gojišča. Najbolj optimalen postopek dela z *in situ* dozorelim pelodom zahteva, da antere direktno namočimo v kapljico barvila na objektnem stekelcu; v tem primeru imamo veliko možnosti, da se iz anter sprosti nepoškodovan pelod, ki ga nato uporabimo v postopkih obarvanja. Pri izolaciji nezrelega peloda pa je postopek bolj zapleten, saj so enojedrne mikrospore zelo občutljive na mehanski in kemični stres. V primeru enojedrnih mikrospor je zato primerno, da cvetove zelene velikosti (glede na že preverjeno razvojno fazo mikrospor) razrežemo z britvico in jih rahlo (s konico britvice, skalpela ali igle) iztisnemo v kapljico barvila na objektnem stekelcu (Vižintin in Bohanec, 2004). V primeru, da pelod ali mikrospore že *in vitro* gojimo v tekočem gojišču za dozorevanje ali kalitev, moramo vzorec centrifugirati pri nižjih vrtljajih in odpipetirati na objektno stekelce le nekaj kapljic koncentriranega vzorca peloda. Pri tem upoštevamo, da se zaradi prisotnosti gojišča barvilo nekoliko razkreeči.

Selektivnost barvila (obarvanje le živih pelodnih zrn) je potrebno vedno preveriti z obdelavo peloda ali mikrospor z etanolom (95% etanol, 1 - 2 minuti inkubacije in nato spiranje z bidestilirano vodo). Pri tem močno poškodujemo pelod, kar bi moralo biti očitno v ne-obarvanosti takega peloda, če test določanja živosti deluje pravilno oz. selektivno (Rodriguez – Riano in Dafni 2000).

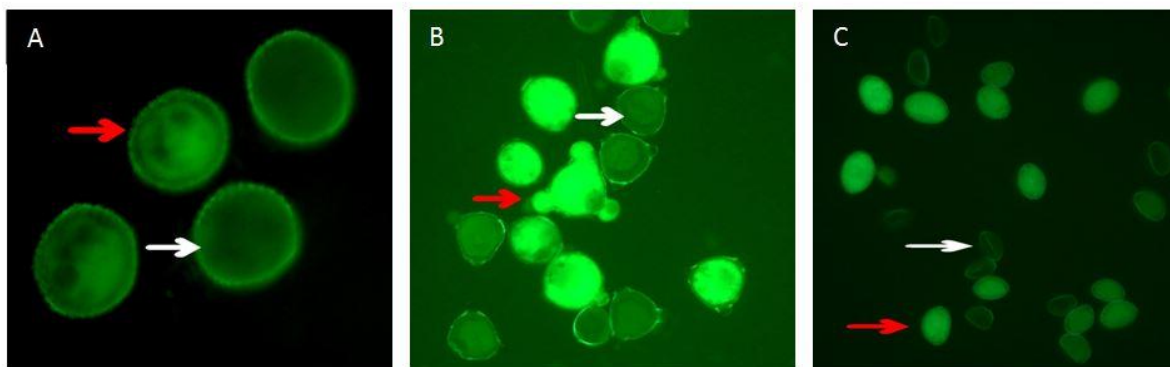
3 Rezultati in diskusija

Iz analize raziskovalnih člankov ugotavljamo, da se uporabljajo različne metode določanja živosti s pomočjo testov obarvanja. Raziskave sežejo že v sedemdeseta leta prejšnjega stoletja (King 1960; Walden in Everett, 1961; Heslop-Harrison in Heslop-Harrison, 1970), kar sovпада z razvojem raziskav o tkivnih kulturah ter *in vitro* gojenju peloda. Heslop-Harrison in sod. (1984) so prvič uporabili fluorescein diacetat barvilo (FDA) in sicer v metodi, katero so poimenovali FCR (fluorokromatičen) test. FCR test so primerjali z metodami določanja živosti iz predhodnih raziskav, na primer preko obarvanja z aceto-orceinom, fuksin lakto-fenolom in tetrazolidnim kloridom, ter ugotovili, da je določanje živosti v primeru FCR testa bolj uspešno. Dokazali so višjo stopnjo zanesljivosti FCR testa v primerjavi z ostalimi, predvsem kar zadeva povezavo s stopnjo kalivosti, kar so kasneje potrdili tudi drugi raziskovalci (Grigg in sod., 1988; Shivanna in sod. 1991; Lisci in sod., 1994; Nepi in Pacini, 1993; Pacini in sod., 1997; Nepi in sod., 2001). Jones in Senft (1985) sta prvič k fluorescein diacetatu (FDA) dodala še propidijev jodid (PI) ter s tem uporabljala dvojno obarvanje. To tehniko, ki so jo prvotno razvili na živalskih celicah, so nato prevzeli tudi Joersbo in sod. (1990) za določanje živosti ječmenovih mikrospor ter dosegli dobre rezultate. Propidijev jodid se še danes uporablja tudi za določanje razvojne stopnje peloda (Vižintin, 2003). Novejše postopke obarvanja peloda za določanje živosti na osnovi encimske dejavnosti peloda sta primerjala in opisala tudi Rodriguez – Riano in Dafni (2000). Poskuse sta izvedla na pelodu različnih rastlinskih vrst. Ugotovila sta različno sposobnost obarvanja peloda. Teste obarvanja sta preverila tudi s poskusi *in vitro* kalitve peloda. Najboljše rezultate sta dosegla z dvema postopkoma obarvanja; prvi temelji na odkrivanju encimatske aktivnosti peroksidaze, drugi pa dehidrogenaze.

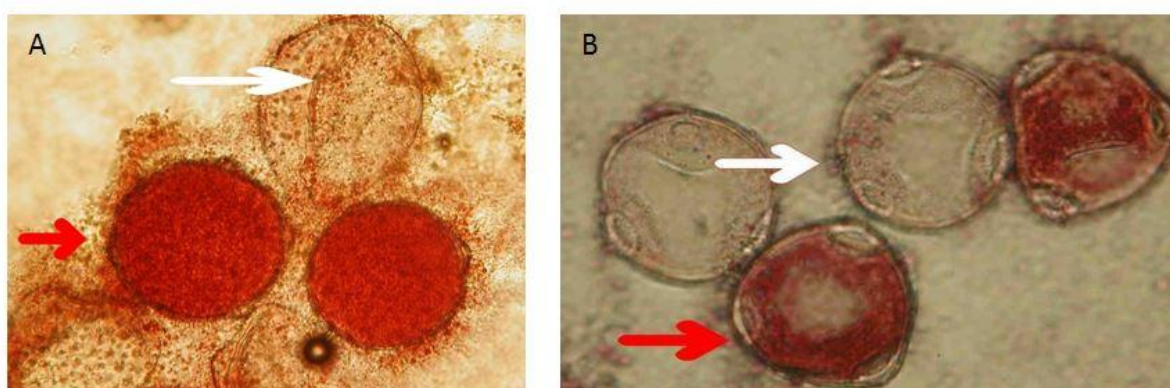
Pri izbiri najbolj primerne metode obarvanja za določanje živosti peloda, je potrebno preizkušati različne metode ter jih primerjati na osnovi kriterijev, ki so relevantni za naše raziskave. Na primer relevantna je lahko hitrost reakcije, zanesljivost rezultatov, enostavnost metode, finančni strošek in podobno.

V predhodnih raziskavah (Vižintin, 2003; Vižintin in Bohanec, 2004) smo na osnovi navedenih kriterijev izbrali in preizkušali nekatere metode določanja živosti in sicer metodo LPCB, DAB, FCR, barvilo anilin modro in MTT. Metoda LPCB (lakto fenol - cotton blue), ki so jo predlagali Acosta-

Mercado in sod. (2002) zahteva pripravo reagentov v laboratoriju ali pa nakup komercialnih različic le-teh (kar je dražje a bolj hitro in zanesljivo). Za pripravo reagentov v laboratoriju je postopek sledeč: 200 mg/l anilin modrega se doda v raztopino, ki vsebuje mlečno kislino, fenol, bidestilirano vodo in glicerol v enakem volumnu. Po obarvanju sledi 2 - 3 minutna inkubacijska doba. Preparat se opazuje pod navadno svetlobo. Živ pelod prepoznamo po modrem obarvanju, do katerega pride zaradi encimske reakcije ob vstopu barvila v notranjost peloda. V poškodovanem pelodu ne pride do te reakcije in posledično naj bi pelod ostal nebarvan. Kljub temu smo ugotovili, da je selektivnost obarvanja variabilna (večkrat se obarva tudi pelod, ki je bil tretiran z etanolom) in so težave predvsem pri vstopu barvila v zrel pelod (zaradi odebeljene pelodne stene). Prednost te metode pa je zagotovo enostavnost in hitrost reakcije. Adhikari in Campbell (1998) predlagata metodo obarvanja na osnovi barvila anilin modrega (0,05% anilin modro v K_2PO_4 pufru, pH 7,2). Barvilo naj bi prehajalo preko membrane nepoškodovanega peloda in fluoresciralo modro, kadar ga osvetlimo z UV svetlobo. Tudi v tem primeru smo ugotovili nezanesljivost in neselektivnost metode (obarvajo se tako neobdelane kot tudi z etanolom obdelane mikrospore) in težave v primeru zrelega peloda. Podobno tudi v primeru metode barvanje z DAB (3,3 diaminobenzidin) testom po Rodriguez-Riano in Dafni (2000). V tem primeru rjavordeča barva peloda nakazuje prisotnost peroksidaze, kar je znak živosti peloda, medtem ko poškodovani pelodi pa ostanejo ne-obarvani. Vsi omenjeni testi so sicer hitre in enostavne izpeljave, ampak v našem primeru so se izkazali kot malo zanesljivi. Nasprotno, kot zelo uspešna se je v našem preizkušanju izkazala metoda FCR (fluorokromatična reakcija) po Heslop-Harrisonu in sod. (1984). V tem primeru pripravimo založno raztopino 20 mg FDA v 10 ml acetona, katero lahko hranimo tudi več mesecev v hladilniku in jo po potrebi uporabljamo. Kljub temu moramo vsakič na novo in samo tik pred poskusom pripraviti še 15% raztopino saharoze. V 10 ml raztopine saharoze damo nekaj kapljic raztopine FDA, in sicer kapljico za kapljico (1 - 3 kapljice), dokler se raztopina saharoze ne obarva svetlorumenozeleno. S tem preparatom obarvamo pelod na objektnem stekelcu in inkubiramo na vlažnem 10 minut. Preparat opazujemo pod UV svetlobo. FDA je nepolaren ester, ki lahko prehaja preko pelodne membrane v notranjost peloda. Tukaj ga encimi (esteraze) hidrolizirajo v fluorescein, ki zaradi svoje polarne narave težje prehaja skozi membrano. Živ pelod fluorescira zelenorumenno zaradi kopičenja fluoresceina v njegovi notranjosti. Pri poškodovanem pelodu pa ne pride do encimske reakcije. Metoda je visoko selektivna in zelo zanesljiva, kljub temu pa nekoliko bolj dolgotrajna in komplicirana od ostalih, saj potrebujemo UV svetlobo. Dobri rezultati te metode obarvanja in določanja živosti so predstavljeni tudi na sliki 2. Preizkusili smo tudi metodo določanja živosti peloda z MTT barvilom (3 - 4,5 dimetiltiazol-2-yl-2,5 difenil - tetrazolijevim bromidom) in sicer smo metodo po Rodriguez-Riano in Dafni (2000) tudi optimizirali v primeru zrelega peloda in mikrospor kumar (Vižintin in Bohanec, 2004). Metoda temelji na določanju prisotnosti encima dehidrogenaza. Barvilo smo pripravili tako, da smo raztopili 100 mg MTT v 5 ml 5% saharoze. Po obarvanju, smo preparat osušili z uporabo alkoholnega gorilnika in mu nato dodali kapljico glicerola. Kritična točka samega postopka je prav segrevanje preparata, ki ne sme zavreti. Če se to zgodi, je preparat neuporaben. Preparat opazujemo pod mikroskopom z navadno svetlobo. Rdeča barva peloda nakazuje prisotnost dehidrogenaze in s tem živost peloda. Poškodovani pelodi pa ostanejo nebarvani. Največja prednost te metode je enostavnost in hitrost reakcije. Pozitivni rezultati metode so vidni na sliki 3.



Slika 2: Pelod buč (a), kumar (b) in čebule (c) obarvan s FCR testom. Rdeča puščica označuje obarvane žive pelode, bela pa ne-obarvane nežive pelode. vir: Vižintin, 2013.



Slika 3: Pelod buč (a) in kumar (b) obarvane z MTT metodo. Rdeča puščica označuje obarvane žive pelode, bela pa ne-obarvane nežive pelode. vir: Vižintin, 2013.

Upravljanje s pelodom ima pomembne aplikacije v kmetijstvu, predvsem pri žlahtnjenju rastlin in vnosu novih genov v rastline (Touraev in sod. 1995; Touraev in sod. 1996). Glede transgenih rastlin je informacija o živosti peloda ali obstojnosti le-tega v okolju lahko pomembna za omejevanje pretoka transgenega peloda (Luna in sod., 2001). Pri klasičnem žlahtnjenju ali s pomočjo biotehnoloških metod pa je informacija o živosti peloda relevantna pri načrtovanju poskusov oprašitve (Tupy in sod., 1991; Lyra in sod., 2011; Gaaliche 2013). Živost peloda v določenih okoljskih razmerah je lahko tudi odločilna pri izbiri parentalnih genotipov ali za določanje fertlnosti staršev (Abdul-Baki in Stommel, 1995). Obstojnost peloda je potrebno ugotavljati tudi v primeru shranjevanja peloda (Tupy in sod. 1991; Youmbi, 2005).

4 Sklepi

Živost peloda lahko ocenimo na hiter, zanesljiv in varčen način preko metod obarvanja peloda, ki temeljijo na permeabilnosti membrane ali encimskih reakcij. Zato je uporabnost teh biotehnoloških metod zelo široka. Sicer pa pozitiven test obarvanja ni zagotovilo, da bo pelod v fazi zrelosti tudi kalil. Potrebno je opraviti tudi poskuse *in vitro* kalitve peloda in podatke primerjati oziroma dopolnjevati. Na splošno velja, da so metode določanja živosti peloda lahko bolj ali manj učinkovite pri pelodu različnih rastlinskih vrst in glede na fazo razvoja peloda. Na učinkovitost vpliva predvsem prodornost barvila v notranjost peloda in prisotnost določenega encimskega delovanja. Pri ocenjevanju živosti na

osnovi encimske dejavnosti pa moramo upoštevati tudi dejstvo, da se lahko določena encimska dejavnost pojavi prej ali pozneje v fazi razvoja peloda oziroma je lahko tudi slabše izražena pri določenih vrstah. Predvsem se ta problem pojavlja v primeru peloda v zelo zgodnjih razvojnih stopnjah.

Preverjanje pelodne aktivnosti oziroma živosti ima zelo široko uporabo. Lahko ga na primer uporabimo pri določanju fertiliteti staršev ali hibridov v biotehnoloških in klasičnih poskusih žlahtnjenja, pri shranjevanju peloda, pri raziskavah interakcije med pelodom in pestičem, pri preučevanju sistema inkompatibilnosti itd.

Literatura

- Abdul-Baki A. A., Stommel J. R., 1995. Pollen Viability and Fruit Set of Tomato Genotypes under Optimum and High-temperature Regimes. *HortScience*, vol. 30, 1: 115-117.
- Acosta – Mercado D., Bird – Pico F. J., Kolterman D., 2002. Genetic variability of *Anthurium crenatum* (L.) Kunth (Araceae) in Puerto Rico. *Caribbean Journal of Science*, vol. 38, 1-2: 118 – 124.
- Adhikari K. N., Campbell C. G., 1998. *In vitro* germination and viability of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) pollen. *Euphytica*, 102: 87 – 92.
- Bedinger P., 1992. The remarkable biology of pollen. *Plant Cell*. vol. 4(8): 879 – 887.
- Bohanec B., 1992. Tehnike rastlinskih tkivnih kultur. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo, Center za rastlinsko biotehnologijo in žlahtnjenje, Ljubljana.
- Edlund A. F., Swanson R., Preuss D., 2004. Pollen and Stigma Structure and Function: The Role of Diversity in Pollination *The Plant Cell*, Vol. 16, Supplement,: 84 – 97.
- Emberlin J., 1998. The effects of air pollution on allergenic pollen. *Eur Respir Rev* 8: 164-1672.
- Gaaliche B, Majdoub A, Trad M, Mars M., 2013. Assessment of Pollen Viability, Germination, and Tube Growth in Eight Tunisian *Caprifig* (*Ficus carica* L.) Cultivars. *ISRN Agronomy*, vol. 2013: 1-4.
- Goldberg R. B., Beals T. P., Sanders P. M., 1993. Anther development: Basic principles and practical applications. *The Plant Cell*, vol. 5: 1217 – 1229.
- Goralski G., Matthys – Rochon E., Vergne P., Przywara L., 1999. Androgenic development: A fascinating embryo formation process. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, vol. 41: 51 – 65.
- Grigg F. D. W., Smith P. R., Stenerson M. A., Murray B. G., 1988. Variable pollen fertility and abnormal chromosome behaviour in the pepino (*Solanum muricatum* Ait., Solanaceae). *Scientia Horticulturae*, vol. 35: 259– 268.
- Heslop-Harrison J. S., Heslop-Harrison Y., Shivanna K. R., 1984. The evaluation of pollen quality and a further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. *Theoretical and Applied Genetics*, 67: 367 – 375.
- Heslop-Harrison J., Heslop-Harrison Y., 1970. Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence: intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. *Stain Technol*, vol. 45:115–120
- Joersbo M., Jorgensen R. B., Olesen P., 1990. Transient electroporation of barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores to propidium iodide. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 23: 125 - 129.
- Jones K. H., Senft J. A., 1985. An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, vol. 33, 1: 77 - 79.
- Kiester A. R., Lande R., Schemske D. W., 1984. Models of Coevolution and Speciation in Plants and Their Pollinators. *The American Naturalist*, vol. 124, No. 2: 220-243.
- King J.R., 1960. The peroxidase reaction as an indicator of pollen viability. *Stain Technol*, vol. 35: 225–227.

- Lisci M., Tanda C., Pacini E., 1994. Pollination ecophysiology of *Mercurialis annua* L. (Euphorbiaceae), an anemophilous species flowering all year round. *Annals of Botany*, vol. 74: 125-135.
- Luna V. S., Figueroa M. J., Baltazar M. B., Gomez L. R., Townsend R., Schoper J. B., 2001. Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. *Crop Science*, vol. 41: 1551-1557.
- Lyra D. H., Sampaio L. S., Pereira D. A., Silva A. P., Amaral C. L. F., 2011. Pollen viability and germination in *Jatropha ribifolia* and *Jatropha mollissima* (Euphorbiaceae): Species with potential for biofuel production. *African Journal of Biotechnology*, vol. 10(3): 368-374.
- Majd A., Mohamadi S., 1992. Effect of certain toxins and air pollution on pollen development of *Glycine max*. *J Islamic Azad University*, vol. 1992: 649-651.
- Marcellan O. N., Camadro E. L.k 1996. The viability of asparagus pollen after storage at low temperature (Short communication). *Scientia Horticulturae*, 67: 101 – 104.
- McCormick S. k1993. Male gametophyte development. *The Plant Cell*, 5: 1265 – 1275.
- Nepi M., Franchi G.G., Pacini E.k 2001. Pollen hydration status at dispersal: Cytophysiological features and strategies. *Protoplasma*, 216: 171 - 180.
- Nepi M., Pacini E.k 1993. Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. *Annals of Botany*, 72: 526 - 536.
- Pacini E., Franchi G. G., Lisci M., Nepi M.k 1997. Pollen viability related to tip of pollination in six angiosperm species. *Annals of Botany*, 80: 83 - 87.
- Polowick P.L., Sawhney V.K.k 1993. Differentiation of the Tapetum During Microsporogenesis in Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), with Special Reference to the Tapetal Cell Wall. *Annals of Botany*, Vol. 72, Issue 6: 595–605.
- Rezanejad F., 2007. The Effect of Air Pollution on Microsporogenesis, Pollen Development and Soluble Pollen Proteins in *Spartium junceum* L. (Fabaceae), *Turk J Bot* 31: 183-191.
- Rodriguez-Riano T., Dafni A., 2000. A new procedure to asses pollen viability. *Sex Plant Reproduction*, 12: 241– 244.
- Shivanna K. R., Linskens H. F., Cresti M., 1991. Pollen viability and pollen vigor. *Theoretical and Applied Genetics*, 81: 38 – 42.
- Stauffer C., Benito Moreno R. M., Heberle-Bors E., 1991. *In situ* pollination with *in vitro* matured pollen of *Triticum aestivum*. *Theor Appl Genet*, vol. 81: 576–580.
- Touraev A., Fink C. S., Stoger E. Heberle-Bors E., 1995. Pollen selection: A transgenic reconstruction approach. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A*, 92: 12165 - 12169.
- Touraev A., Heberle-Bors E., 1999. Microspore Embryogenesis and In Vitro Pollen Maturation in Tobacco. *Plant Cell Culture Protocols*, Vol. 111 of the series *Methods In Molecular Biology*: 281-291.
- Touraev A., Pfosser M., Vicente O., Heberle-Bors E., 1996. Stress as the major signal controlling the developmental fate of tobacco microspores: toward a unified model of induction of microspore/pollen embryogenesis. *Planta*, 200: 144 - 152.
- Tupy J., R'hová L., Zársky V., 1991. Production of fertile tobacco pollen from microspores in suspension cultures and its storage for *in situ* pollination. *Sex Plant Reprod* 4, 284–287.
- Vižintin L., 2003. Metode *in vitro* maturacije in kalitve peloda kumaric (*Cucumis sativus* L.) : magistrsko delo, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana.
- Vižintin L., Bohanec B., 2004. In vitro manipulation of cucumber (*Cucumis sativus* L.) pollen and microspores: isolation procedures, viability, tests, germination, maturation. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*, vol. 46: 177-183.
- Walden D.B., Everett H.L., 1961. A quantitative method for the *in vivo* measurement of the viability of corn pollen. *Crop Sci* 1:21–25.
- Youmbi E., The C., Tedjacno A., 2005. Conservation of the germination capacity of pollen grains in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *Grana* 44: 152–159.