

Avtorji prispevka:

Katarina Rudolf Piliš, Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova 17, 1000 Ljubljana, Slovenija,
katarina.rudolf@kis.si

Borut Bohanec, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija,
borut.bohanec@bf.uni-lj.si

Vladimir Meglič Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova 17, 1000 Ljubljana,
vladimir.meglic@kis.si

Žlahtnjenje hibridnih sort zelja (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)

Izvleček

Zelje je ena izmed najpomembnejših vrtnin tako v svetu kot pri nas. Je dvoletnica in tujeprašnica, kar močno vpliva na žlahtniteljski postopek. Žlahtnjenje lahko poteka na klasičen način, ki je dolgotrajen in delovno zahteven, ali pa z uporabo novejših biotehnoloških pristopov, ki skrajšajo število let, potrebnih za nastanek novih sort. V prispevku so podani problemi, ki se pojavljajo v postopkih žlahtnjenja, ter to, kako jih je z biotehnološkimi metodami možno premostiti, in trenutno stanje na področju žlahtnjenja zelja v Sloveniji. V biotehnoloških postopkih žlahtnjenja zelja smo preučevali metode pridobivanja dihaploidnih linij s kulturo mikrospor. V poskus odzivnosti smo vključili 27 rastlin 8 različnih genotipov, ki vključujejo dednino udomačenega kultivarja »Varaždinsko«. Na indukcijo haploidov s pomočjo kulture mikrospor (Lichter, 1982) je bilo odzivnih 20 rastlin. Skupno se je v različnih poskusih razvilo 4.554 embrijev. Regeneracija embrijev v rastline je bila 7,7 %. Iz embrijev se je razvilo 350 rastlin, od teh se jih je 130 (37 %) spontano podvojilo. Na ta način smo dobili 62 dihaploidnih linij, ki smo jih samooprašili. Čiste linije smo v letu 2011 ocenili v poljskem poskusu. Najbolje ocenjene linije bomo v rastni sezoni 2012 križali in v letu 2013 križance testirali ter se tako približali požlahtnitvi prvega slovenskega hibrida zelja.

Ključne besede: zelje, žlahtnjenje, kultura mikrospor, dihaploidi

Breeding of cabbage hybrids (*Brassica oleracea* var. *capitata*)

Summary

Cabbage is one the most important vegetables in the world and also in Slovenia. It is a biannual and open-pollinated crop; therefore the classical breeding procedure is time consuming and labour intensive. On the other hand, biotechnological methods speed up the development of new varieties. The aim of the present paper is to present the problems arising during breeding procedure and possible solutions to overcome these difficulties. The present situation of cabbage breeding in Slovenia is also discussed. The biotechnological procedures of breeding cabbage via microspore culture were investigated. Twenty plants were responsive to haploid induction by microspore culture (Lichter, 1982). In different experiments 4554 embryos were developed. Regeneration of embryos into plants was 7.7 %. From total of 350 regenerants 130 (37%) were doubled spontaneously and 62 lines were acclimatized and then self-pollinated. Inbred lines were evaluated in the field trial in 2011. The most promising lines will be crossed in the year 2012 and in 2013 the evaluation of hybrids will be done. So, we will come near to the production of the first Slovene cabbage hybrid.

Key words: cabbage, breeding, microspore culture, dihaploids

1 Uvod

Pridelovanje zelja ima v Sloveniji stoletno tradicijo. Gojimo domače sorte požlahtnjene iz avtohtonih populacij, ki izvirajo iz okolice Ljubljane, to so Kašeljško in Ljubljansko zelje. Z Bloške planote izhaja Bloško zelje, iz Škofjeloškega pogorja Zaloško zelje ter iz južnega predela Slovenije razni tipi Varaždinskega zelja. Vse večji pomen v pridelavi pa imajo tuji hibridni kultivarji. S stališča slovenskega zelenjadarstva je zato pomembno žlahtnjenje novih sort in hibridnih kultivarjev zelja, ki bodo vključevali lastnosti domačih sort. Žlahtnjenje lahko poteka na klasičen način, ki je dolgotrajen in delovno zahteven ali pa z uporabo biotehnoloških postopkov, s pomočjo katerih se je število let potrebnih za nastanek novih sort občutno skrajšalo. Žlahtnjenje hibridov vključuje pridobivanje čistih linij, selekcijo linij, določanje kombinacijskih sposobnosti izbranih linij in križanje. Zelje je dvoletna tujeprašna rastlina. Postopek pridobivanja linij na klasičen način traja 10 let, saj potrebujemo najmanj pet generacij samoopraševanja. Precej hitreje lahko čiste linije pridobimo s postopkom indukcije haploidov oziroma dihaploidov. Dihaploidne rastline nastanejo s spontanim ali induciranim podvojevanjem kromosomov v haploidnih celicah in so teoretično popolnoma homozigotne. S samooprašitvijo dihaploidnih rastlin dobimo potomstvo, ki ga imenujemo čista linija. V preteklih letih smo v naš laboratorij uspešno vpeljali tehniko pridobivanja čistih linij s pomočjo kulture mikrospor. Cilj, ki smo si ga zastavili je vzgoja visoko produktivnega in na črno žilavko odpornega hibrida zelja s kvalitativnimi lastnostmi v slovenskem prostoru uveljavljenega kultivarja Varaždinsko.

2 Material in metode dela

2.1 Rastlinski material uporabljen pri biotehnoloških postopkih žlahtnjenja zelja (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)

Žlahtnjenje hibridne sorte zelja z vključevanjem novih izhodiščnih križancev za pridobivanje dihaploidnih rastlin, se je pričelo jeseni 2008. Od oktobra 2008 do februarja 2009 smo pri 5°C vernalizirali 27 rastlin naslednjih križancev: 667 x Matsumo F1, 712 x Varaždinsko, 712 x Atria F1, Matsumo F1xVaraždinsko, Atria F1xVaraždinsko, Atria F1xMatsumo, 667x885, 712x885. Čiste linije (667, 712, 885) izhajajo iz križancev med kultivarjem Varaždinsko in Hawke F1 iz predhodnega cikla žlahtnjenja. Liniji 667 in 712 sta tolerantni na črno žilavko kapusnic (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*), na rasi 1 in 4, prav tako tudi hibrid Matsumo F1. V nadaljevanju poskusa smo proučevali čiste linije zgoraj navedenih genotipov, ki smo jih pridobili s postopkom indukcije haploidov. V poljski poskus smo vključili 62 čistih linij in križancev. Kot kontrolo smo uporabili kultivar Varaždinsko ter štiri komercialne, v Sloveniji uveljavljene hibride: Krautami F1, Atria F1, Bravo F1 in Rinda F1.

2.2 Kultura mikrospor

Izolirane mikropore smo kultivirali na saharozno (NLN) gojišče brez rastnih regulatorjev ter z dodatkom oglja. Za induciranje sporofitnega razvoja mikrospor smo uporabili 48 urno tretiranje pri temperaturi 30° C (Duijs, 1992; Hansen, 1994). Po preteku 21 do 30 dni od kultiviranja mikrospor v gojišče, smo prešteli inducirane embrije.

2.3 Izsuševanje embrijev in dodajanje abscizinske kisline

V petrijevke smo dodali abscizinsko kislino, tako da je bila koncentracija v gojišču 5 mg/l. Po enodnevnem tretiranju z abscizinsko kislino smo embrije prestavili na sterini filter papir. Izsuševanje je trajalo 30 dni pri temperature 20°C.

2.4 Regeneracija rastlin iz embrijev in aklimatizacija

Po 30 dneh izsuševanja smo embrije prestavili na trdno B5 gojišče (Gamborg in sod., 1968) z 2% saharozo in 0,7% agarja. Po 40-50 dneh od prvega kultiviranja embrijev na gojišče za regeneracijo, smo dihaploidne regenerante presadili v zemljo v mini rastlinjak, od tam pa v lončke premera 10 cm.

2.5 Merjenje ploidnosti

Ploidnost smo izmerili pred prenosom regenerantov iz *in vitro* v *in vivo* pogoje. V rastlinjak smo posadili le dihaploidne rastline. Stopnjo ploidnosti regenerantov smo določili s tehniko pretočne citometrije. Uporabili smo modificirano metodo Otta in sod. (1981), ki temelji na izolaciji jeder s citrsko kislino in barvanju jeder s fluorokromom DAPI v fosfatnem pufru. Ploidnost smo določili na osnovi C1 pikov, pri čemer smo imeli za kontrolo diploidno zelje.

2.6 Vernalizacija dihaploidov

Da bi pridobljeni dihaploidi čimprej in v čim večjem številu zacveteli, smo po obdobju aklimatizacije rastline 12 tednov vernalizirali pri 5°C in 16 urni fotoperiodi. Rastline smo vernalizirali 12 tednov.

2.7 Samoopraševanje in križanje dihaploidov

Pri samoopraševanju dihaploidov zelja prihaja velikokrat do izražanja samoinkompatibilnosti. Z namenom, da bi efekt samoinkompatibilnostnih mehanizmov zmanjšali, smo pri samoopraševanju in križanju uporabili naslednje raztopine:

- 3% raztopina NaCl,
- 100 mg/l giberelinska kislina,
- 20 % raztopina amonijevega sulfata
- 15% raztopina uree.

Rastlinam, ki so imele 5-10 odprtih cvetov, smo le-te porezali. Zaprte cvetove primerne dolžine smo s pinceto odprli. Tako pripravljene cvetove smo oprášili s cvetnim prahom predhodno porezanih cvetov. Oprášene cvetove smo nato tretirali z različnimi sredstvi. Oprášene cvetove smo pokrili s papirnatimi vrečkami in tako onemogočili neželjena križanja. Po oprášitvi so se formirali stroki. Ko so se le-ti posušili, smo jih pobrali in pridobili seme čistih linij in križancev.

2.8 Preizkušanje čistih linij in križancev

V poljskem poskusu smo proučevali dihaploidne linije in križance. Kot kontrolne rastline smo uporabili kultivar Varaždinsko in štiri v Sloveniji uveljavljene hibride. Vse rastline vključene v poskus smo na koncu rastne dobe ocenili in jim določili izbrane parametre. Ohranili smo tiste čiste linije, ki so imele po statističnem izrednotenju najboljše lastnosti. Ponovno smo jih vernalizirali, v letošnjem letu pa bomo izvedli nova križanja in se tako približali požalnitvi hibridne sorte.

2.9 Določanje čistih linij odpornih na črno žilavko kapusnic (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)

V raziskave odpornosti zelja proti črni žilavki smo vključili 6 čistih linij, 3 genotipe F1 generacije, ki izhajajo iz križanj med občutljivimi in tolerantnimi linijami ter za kontrolo tolerantni hibrid Matsumo F1 in občutljiv hibrid Krautman F1. Štiri tedenske sadike smo okužili s suspenzijo bakterij rase 1, 3 in 4 koncentracije 10^8 - 10^9 cfu (Vicente in sod., 2000; Jensen in sod., 2005). Ločeno smo gojili rastline, ki jih nismo okužili in smo jih uporabili kot kontrolo. Rastline smo gojili še tri tedne v lončnih platojih in jih nato presadili na polje. Okuženost smo ocenili ob presajanju rastlin na prosto, drugič v polni rasti in tretjič ob spravilu pridelka.

3 Rezultati

Od skupno 27 rastlin 8 različnih genotipov je bilo na indukcijo haploidov s pomočjo kulture mikrospor odzivno 20 rastlin sledečih genotipov: 667xMatsumo F1 (2 rastlini), 712xVaraždinsko (6 rastlin), 712xMatsumo F1 (2 rastlini), Matsumo F1xVaraždinsko (3 rastline), 667x885 (1 rastlina), 712x885 (1 rastlina), Atria F1xVaraždinsko (1 rastlina), 712xAtria F1 (4 rastline). Skupno se je v različnih poskusih z ali brez uporabe oglja oziroma z ali brez menjave NLN gojišča (Lichter, 1982) po dveh dneh kultiviranja razvilo 4554 embrijev. Regeneracija embrijev v rastline je bila 7,7%. Skupno se je iz embrijev razvilo 350 rastlin, od teh se jih je 130 (37%) spontano podvojilo. Na ta način smo pridobili dihaploidne linije, ki smo jih aklimatizirali v rastlinjaku, kjer so tudi prezimile. V začetku leta 2010 smo tako v predhodni rastni sezoni pridobljene in vernalizirane čiste linije zelja gojili v loncih v rastlinjaku na Biotehniški fakulteti, Oddelka za agronomijo.

Konec meseca aprila so rastline pričele cveteti. Sledilo je samopraševanje z uporabo štirih različnih sredstev za premagovanje inkompatibilnostnih mehanizmov. V mesecu septembru smo pobrali stroke, ki so nastali na samooprašenih rastlinah. V povprečju se je razvilo od 2,3 semena/strok pri tretiranju z ureo do 2,8 semena/strok pri tretiranju z giberelinski kislino. Pri tretiranju z amonijevim sulfatom, se je v povprečju razvilo več semen na strok (3,09) kot pri tretiranju z giberelinsko kislino, vendar je bilo število strokov manjše. Za premagovanje inkompatibilnostnih mehanizmov so na podlagi poskusa primerna vsa štiri sredstva (NaCl, giberelinska kislina, amonijev sulfat in urea), saj med njimi ni bilo statistično značilnih razlik. Seme, ki smo ga pridobili, smo v naslednji rastni sezoni posejali (2011) in sadike vključili v poljski poskus. V bločni poljski poskus smo vključili 62 linij (4 bloki z 62 obravnavanji, s štirimi rastlinami/obravnavanje), skupno 992 rastlin, ki izhajajo iz naslednjih genotipov:

- 20 linij izhaja iz križanca: 712xVaraždinsko
- 16 linij izhaja iz križanca: 667xMatsumo
- 23 linij izhaja iz križanca 667x885
- 3 linije izhajajo iz križanca 712xMatsumo

Med rastno dobo smo ocenili rastni potencial linij (velikost veh, višino in širino rastlin in odpornost rastlin). Linije smo pobrali in ocenili morfološke znake (višina, širina glav, zbitost,...). Najbolje ocenjene linije smo shranili, jih vernalizirali in so trenutno posajene v loncih v rastlinjaku. V letošnjem letu jih bomo v čim večjem številu medsebojno križali. V letu 2012 bomo torej izvajali križanja, v letu 2013 pa bomo križance ovrednotili v poljskem poskusu. Hibride, ki bodo ustrezali zahtevam trga, bomo dali v testiranje.

4 Sklepi

Skladno z vsem navedenim lahko ugotovimo, da nam je s postopkom indukcije haploidov rastlin uspelo inducirati veliko število dihaploidnih rastlin, ki smo jih lahko uporabili v postopkih samoopraševanja. Na ta način pridobimo čiste linije, ki jih medsebojno križamo. Postopek žlahtnjenja se tako nadaljuje in približujemo se požlahnitvi prvega slovenskega hibrida zelja, ki bo imel lastnosti domačih sort, ki so zanimive tako za slovenskega potrošnika, kot tudi širše.

Zahvala

Raziskava je potekala v okviru dveh ciljnih raziskovalnih projektov: 'Uporaba genskega potenciala tradicionalnih slovenskih vrst kmetijskih rastlin za žlahtnjenje novih sort prilagojenih spremenjenim klimatskim razmeram (V4-0482) in 'Genetsko izboljšanje kvalitativnih in kvantitativnih lastnosti ekonomsko pomembnih kmetijskih rastlin za konkurenčno in trajnostno pridelovanje v Sloveniji' (V4-0335). Projekta sta sofinancirala javna agencija za raziskovalno dejavnost RS in Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano.

Viri

- Duijs J.C., Voorrips R.E., Visser D.L., Custers J.B.M. 1992. Microspore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea* L.
- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50:151-158
- Hansen M. 1994. Gametic embryogenesis in *Brassica*: optimisation of production and germination of embryos.V: Proceedings of the international Colloquium on Impact of Plant Biotechnology on Agriculture. Rogla, 5-7 dec. 1994. Javornik B., Bohanec B., Kreft I. (eds). Ljubljana, Biotechnical Faculty, agronomy Department, Centre for Plant Biotechnology and Breeding:15-18
- Jensen D.B., Massomo S.M.S., Swai I.S., Hockenhull J., Bode Andersen S. 2005. Field evaluation for resistance to the black rot pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cabbage (*Brassica oleracea*). *European journal of Plant Pathology*, 113:297-308
- Otto F.J., Oldiges H., Gohde W., Jain W.K. 1981. Flow cytometric measurement of nuclear DNA content variations as a potential *in vivo* mutagenicity test. *Cytometry*, 2:189-191
- Vicente J. G., Conway J., King G.J., Taylor J.D. 2000. Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica* spp. *Acta Horticulturae* 593:61-67