

Prof. dr. sc. Jure Beljo
Sveučilište u Zadru
Odjel za ekologiju, agronomiju i akvakulturu

TEHNIKE OPLEMENJIVANJA BILJA
Skripta

Zadar, 2012.

Kazalo

1. Mjesto i uloga oplemenjivanja u poljoprivredi i društvu	1
2. Porijeklo kultiviranog bilja	4
Domestikacija	4
Centri podrijetla	7
Introdukcija	9
3. Genetički mehanizmi reguliranja fertilnosti	11
Samoinkompatibilnost	11
Muška sterilnost	12
4. Heterozis	18
5. Izvori genetičkog variranja	21
Variranje kao temelj oplemenjivanja	21
Hibridizacija	22
Tehnika izvođenja hibridizacije	23
Formiranje populacije	24
Međuvrsna hibridizacija	28
6. Ciljevi oplemenjivanja	31
Oplemenjivanje na prinos	31
Oplemenjivanje na kvalitetu	33
Oplemenjivanje za otpornost na činitelje rizika	34
Oplemenjivanje za otpornost na bolesti i štetnike	35
Oplemenjivanje na visoke temperature i sušu	37
Oplemenjivanje na niske temperature	38
7. Metode oplemenjivanja bilja	40
Početni materijal u oplemenjivanju	40
Oplemenjivanje samooplodnog bilja	42
Masovna selekcija	42
Individualna selekcija	45
Pedigre metoda	47
Selekcija u smjesi (Bulk metoda)	50
Potomstvo jedne sjemenke	53
Metoda povratnog križanja	56
Oplemenjivanje stranooplodnog bilja	59
Metoda masovne selekcije	59
Individualna selekcija	63
Razvoj hibridnih kultivara	64
Razvoj inbed linija	64
Ispitivanje kombinacijskih sposobnosti	65
Tipovi hibridnih kultivara	67
Proizvodnja hibridnog sjemena	68
Razvoj sintetičkih kultivara	71
Razvoj klonskih kultivara	73
Rekurentna selekcija	76
Metoda dihaploida	81

Oplemenjivanje za ekološku proizvodnju	84
8. Načela oplemenjivanja voćaka i vinove loze	87
Ciljevi oplemenjivanja	87
Metode oplemenjivanja	89
Masovna selekcija	90
Individualna selekcija	90
Metode oplemenjivanja nakon hibridizacije	91
Povratno križanje	92
Klonska selekcija	92
Mutacije u voćarstvu	93
Selekcija podloga	94
9. Biljni kultivari i njihova zaštita	97
Obilježja kultivara	97
Tipovi kultivara	98
Tehnika poljskih pokusa	100
Priznavanje i zaštita kultivara	102
10. Biljni genetski izvori	104
Osnovna obilježja biljnih genetskih izvora	104
Gubitak biljnih genetskih izvora	105
Skupljanje i održavanje biljnih genetskih izvora	107
11. Biotehnologija u oplemenjivanju bilja	111
Kultura biljnog tkiva	111
Kultura meristema	112
Somatska embriogeneza	113
Kultura mikrospora (androgeneza)	114
Kultura makrospora (ginogeneza)	114
Kultura embrija i megagametofita	115
Fuzija protoplasta	115
Oplodnja i selekcija <i>in vitro</i>	116
Genetičko inženjerstvo	118
Odnos biotehnologije i konvencionalnog oplemenjivanja	119
12. Osnove sjemenarstva	121
Kategorije poljoprivrednog sortnog sjemena	122
Kategorije poljoprivrednog sortnog materijala	123
Norme kvalitete sjemena	123

1. Mjesto i uloga oplemenjivanja u poljoprivredi i društvu

Oplemenjivanje je znanstvena disciplina koja se bavi razvojem i uvođenjem u proizvodnju novih poboljšanih biljnih formi ili kultivara u cilju povećanja produktivnosti u poljoprivredi. Poznati ruski genetičar Vavilov definirao je oplemenjivanje kao proces usmjerene evolucije kojom čovjek svjesno, uz primjenu odgovarajućih oplemenjivačkih postupaka, razvija nove individue s novim kombinacijama gena i s novim svojstvima koja su unaprijed predviđena. Prirodnom evolucijskom procesu za takvo što trebala bi desetljeća, stoljeća ili se čak nikad ne bi ostvarilo, a čovjeku svega pet do deset godina.

Uvođenje novih produktivnijih kultivara i napredak tehnologije uzgoja doveli poljoprivrednu proizvodnju na visoku razinu. Prije stotinjak godina prosječan prinos pšenice iznosio je 10 - 12 dt; danas iznosi 40 - 50 dt. U to vrijeme šećerna repa u prosjeku je sadržavala do 9% šećera. Danas već postoje kultivari koji sadrže više od 20% šećera. Prinosi svih kultiviranih vrsta su povećani, poboljšana su i ostala svojstva radi kojih se one uzgajaju. Poljoprivredna površina potrebna za proizvodnju hrane iznosila je 1961. 0,44 ha per capita, danas je 0,26 ha. Procjenjuje se da će do 2050. pasti na 0,15 ha po stanovniku (Altman, 1999.). Kao što se svijet danas ne bi mogao prehraniti s agrotehničkim metodama iz 1940., tako farmeri ne mogu očekivati da zadovolje globalne zahtjeve za hranom za 30 – 40 godina koristeći današnje kultivare i poljoprivrednu tehnologiju.

Procjenjuje se da ukupnom povećanju biljne proizvodnje oplemenjivanje doprinosi 30-50% (Fehr, 1984.; Lande i Thompson, 1990.). Ostali dio rezultat je unapređenja tehnologije uzgoja. Za svaku kultiviranu vrstu postoji stanoviti teorijski mogući prinos suhe tvari. Postojeći kultivari, čak i u idealnim uvjetima uzgoja, dostižu samo dio tog teorijskog prinosa, dok su prosječni prinosi koji se danas postižu, znatno ispod te razine. Između rekordnog i teorijski mogućeg prinosa je prostor za selekciju, a između prosječnog i rekordnog prinosa je prostor za agrotehniku, što je prikazano na primjeru pšenice (slika 1).

Teorijski mogući prinos zrna 250-300 dt		
Rekordni prinos 140-150 dt	← (prostor za selekciju) →	
Prosječni prinos 40-50 dt.	← (agrotehnika) →	

Slika 1. Odnos oplemenjivanja i agrotehnike u povećanju prinosa pšenice

Cilj oplemenjivanja je promijeniti nasljedna svojstva biljke da bi se povećala njena produktivnost. Biljke su osnovni izvor hrane za ljude. Od oko 350.000 katalogiziranih biljnih vrsta na zemlji postoji, prema nekim autorima, oko 7.000 onih koje sada mogu služiti čovjeku za neku korisnu namjenu (Ehrlich i Wilson, 1991.). Ako pod kultiviranim vrstama podrazumijevamo takve koje čovjek uzgaja radi određene koristi, onda je izvjesno da broj kultiviranih vrsta dostiže jedva 600 - 650, što znači da postoji još golem neispitan potencijal vrsta koje je moguće korisno upotrijebiti ili kultivirati. Uostalom, mnoge današnje kultivirane vrste, ne tako davno, bile su divlje ili poludivlje. Spomenimo primjer moderne jagode s velikim plodovima koja je rezultat slučajnog križanja dvije divlje vrste iz SAD i Čilea u Francuskoj što se dogodilo sredinom 18. stoljeća.

Razlika između ciljeva oplemenjivanja i tehnologije uzgoja je u tome što selekcioner svojim metodama nastoji poboljšati nasljednu sposobnost organizma za povećanje njegovog potencijala, dok se tehnologijom uzgoja taj nasljedni potencijal nastoji realizirati. Drugim

riječima, cilj poljoprivrede u cjelini je proizvesti dovoljno proizvoda dobre kvalitete, a cilj oplemenjivanja je razvoj biljnih formi sa zadovoljavajućom nasljednom osnovom za dobar prinos i kvalitetu.

Oplemenjivanje je uvijek i ekonomska djelatnost. Novi kultivari uvode se u proizvodnju samo ako daju dodatnu dobit u odnosu na postojeće stanje, a naročito onda kada se mijenja tehnologija proizvodnje i kad stari kultivari postaju limitirajući činitelji daljeg razvoja. Ulaganje u razvoj novih kultivara je najprofitabilnije ulaganje; to su potvrdila brojna istraživanja u različitim biljnim vrstama. Najnovije istraživanje u selekciji krumpira u SAD pokazalo je da je dobit od ulaganja u razvoj i uvođenje novih kultivara iznosila 35% na uložena sredstva (Araji i Love, 2002.).

Što je zapravo oplemenjivanje: vještina, tehnologija ili znanost? Dok neki drže da je oplemenjivanje još uvijek suviše empirijsko da bi se univerzalno prihvatilo kao znanost, drugi su ga definirali kao tehnologiju (Riley, 1978.). Možda bi najbolje bilo reći da je to znanstveno temeljena tehnologija usmjerena prema ekonomskim ciljevima. Dok se oplemenjivanje temeljilo samo na sposobnosti promatranja i vizualnom odabiranju boljih fenotipova ono je bilo vještina. Čim su se u oplemenjivanju počela primjenjivati načela mendelske genetike, a oplemenjivači se u izboru oslonili na znanstvene spoznaje, oplemenjivanje je postalo znanost.

Za uspješno bavljenje oplemenjivanjem potrebno je poznavanje brojnih znanstvenih i stručnih disciplina među kojima su genetika, botanika, biljna fiziologija, biljna patologija, entomologija, biokemija, statistika i agronomija, odnosno tehnologija uzgoja biljne vrste kojom se oplemenjivač bavi (slika 2).

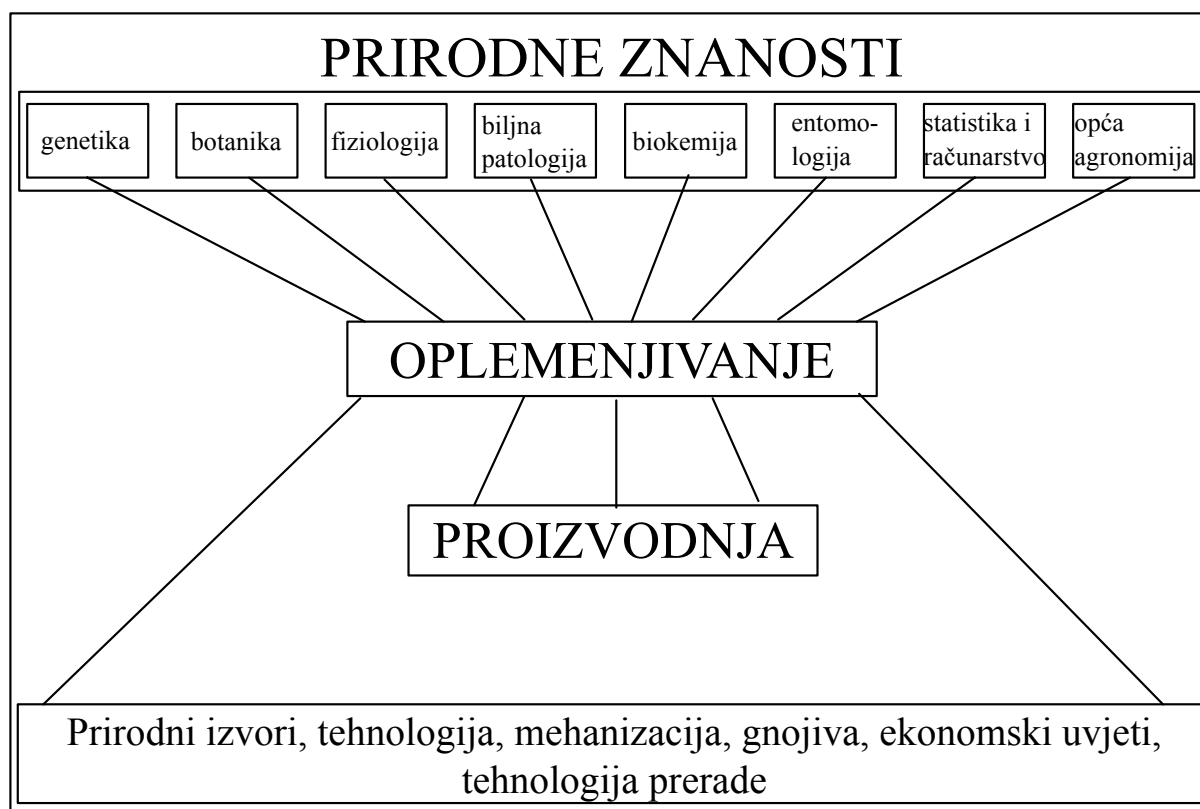
Genetika je temelj racionalnog oplemenjivanja. Stoga neki označavaju oplemenjivanje kao primijenjenu genetiku. Poznavanje mehanizama nasljeđivanja pojedinih svojstava je preduvjet uspješnog razvoja novih kultivara. Nasljeđivanje kvalitativnih i kvantitativnih svojstava određuje ponašanje biljke u sustavima oplemenjivanja. Uvođenje biotehnologije i genetičkog inženjerstva u oplemenjivanje nalaže potrebu poznavanja načela molekularne genetike.

Za normalno provođenje oplemenjivačkih postupaka nužno je poznavanje botanike, odnosno sistematike, anatomije, morfologije i sustava reprodukcije. U razvoju kultivara otpornih na bolesti i štetnike valja upoznati način nasljeđivanja otpornosti i odnos biljke prema patogenima. Selekcioner i biljni patolog, odnosno entomolog, često rade zajedno na projektu razvoja novih kultivara.

Za ocjenu prinosa i za interpretaciju rezultata sortnih pokusa treba primijeniti statističke metode da bi se dobili pouzdani rezultati. To svakako podrazumijeva i poznavanje rada na računalu. Na koncu, za uspješno uvođenje novog kultivara u komercijalnu proizvodnju, selekcioner mora biti upućen u tehnologiju uzgoja vrste kojom se bavi, potrebe proizvođača i potrošača za njom.

Oplemenjivač ne može biti stručnjak u svim ovim oblastima. On prije svega primjenjuje cjelinu svog znanja i iskustva o određenoj vrsti u cilju razvoja novih poboljšanih kultivara. Najbolji se rezultati u oplemenjivanju postižu timskim radom, kada stručnjaci različitih profila sudjeluju u oplemenjivačkom programu.

Razvoj novih sorti prilagođenih uvjetima određenog područja stalan je proces potican izazovima pojave novih bolesti i štetnika, promjena tržišnih zahtjeva i izmjena tehnologije proizvodnje. Stoga će oplemenjivanje uvijek imati važnu ulogu u razvoju i unapređenju poljoprivrede.



Slika 2. Povezanost oplemenjivanja s drugim znanstvenim disciplinama i proizvodnjom
(Lewontin i Berlan, 1990.)

Literatura

- Altman, A. 1999. Plant biotechnology in the 21st century: the challenges ahead. *Electronic Journal of Biotechnology* 2(2):1-6.
- Araji, A.A., Love, S. 2002. The economic impact of investment in the Pacific Northwest potato development program. *Am. J. Potato Res.* 79(6):411-420.
- Ehrlich, P.R., Wilson, E.O. 1991. Biodiversity studies: science and policy. *Science* 253:758-761.
- Fehr, W.H. 1984. Genetic contributions to yield gains of five major crop plants. *CSSA Spec. Publ. 7*, CSSA, Madison WI.
- Lande, R., Thompson, R. 1990. Efficiency of marker-associated selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124:743-756.
- Lewontin, R.C., Berlan, J-P. 1990. The political economy of agricultural research: the case of hybrid corn. U: Cannoll, C.R., Vandermeer, J.H., Rosset, P.M. (ur.) *Agroecology*, str. 613-628. McGraw Hill, New York.
- Riley, R. 1978. Plant breeding – an integrating technology. U: Holmes, J.C., Tahir, W.M. (ur.) *Technology for increasing food production*, str 267 – 272, FAO, Roma.

2. Porijeklo kultiviranog bilja

Prema procjenama biologa u prirodi postoji oko milijun biljnih vrsta; oko 350.000 ih je katalogizirano, a oko 80.000 je jestivo. U svojoj povijesti ljudi su koristili oko 7.000 različitih vrsta, no samo ih je oko 650 na neki način kultivirano. Danas se komercijalno uzgaja oko 150 vrsta (Menini, 1998.).

Sa stajališta poljoprivrede i odnosa čovjeka prema bilju, sve biljne vrste dijele se na divlje i kultivirano bilje. Postoji i korovsko bilje kao zasebna skupina. Nju Harlan (1992.) definira kao posebne divlje biljke prilagođene staništima koje je čovjek poremetio. Međutim, neko korovsko bilje može u određenim uvjetima također služiti kao kultivirano bilje (krmne leguminoze, trave).

Divlje bilje je svako koje raste, razvija se i razmnožava u slobodnoj prirodi, bez utjecaja čovjeka. To bilje nije značajno promijenjeno promišljenim radom čovjeka, niti je prilagođeno za posebna staništa koja je čovjek stvorio. To, međutim, ne znači da divlje biljke nisu korisne niti da neka posebna divlja biljka ne može biti i kultivirana vrsta.

U sklopu divljeg bilja nalaze se brojni srodnici naših kultiviranih vrsta, a korisni su stoga što sadrže mnoga svojstva koja je moguće upotrijebiti u oplemenjivačkim programima u cilju poboljšanja postojećih kultivara. Kako raste intenzitet poljoprivredne proizvodnje i šire se kultivirana područja, tako se smanjuje prostor za divlje bilje pa mnoge vrste zbog toga polako nestaju.

Kultivirano bilje, nasuprot tome, raste, razvija se, razmnožava i širi isključivo pod nadzorom čovjeka. Ono je nesposobno opstati bez čovjekove brige ili, kako se slikovito izrazio jedan znanstvenik «*moderne kultivirane vrste ne bi se održale u divljini duže nego bi jedna Chihuahua izdržala u društvu vukova*» (Trewavas, 2000.). Kultivirano bilje nastalo je od divljeg bilja genetičkim promjenama u toku evolucije i domestikacije. Preteče mnogih naših kultiviranih vrsta još postoje u divljini.

Domestikacija

Domestikacija, ili udomaćivanje, označava evolucijsku fazu biljne populacije kada je ona bitno izmijenjena od divljeg stanja tako da je bez čovjekove brige nesposobna preživjeti u divljini. Mnoge razlike između udomaćenih biljaka i njihovih divljih predaka nastale su kao posljedica skupljanja i odabiranja divljih biljaka (Rindos, 1984.). Najstariji podaci o domestikaciji pojavljuju se na Bliskom istoku (današnja Turska, Sirija, Iran, Irak) 6.000 – 7.000 godina prije Krista. Domestikacija je proces, a ne evolucijski događaj. Taj proces traje već 8.000 – 9.000 godina i još uvijek nije završen.

Domestikacija biljaka i životinja jedan je od najvažnijih razvojnih procesa u prošlih 10.000 – 12.000 godina ljudske povijesti. Bila je preduvjet rasta civilizacije i transformacije globalne demografije. Simmonds i Smartt (1999.) su povijest domestikacije podijelili u četiri perioda: drevni, rani, kasni i suvremeni. Period domestikacije nekih važnijih kultiviranih vrsta prikazan je u tablici 1.

Među 127 kultiviranih vrsta koje se danas u svijetu uzgajaju na značajnijoj komercijalnoj razini, prema Simmondsu (1979.), 14 ih je uvedeno u kulturu u periodu 7.000 – 5.000 godina prije Krista, 83 kulture su udomaćene od u vremenu 5.000 godina prije Krista do početka naše ere, dok je u zadnjih 2000 godina privedeno kulturi 30 vrsta. Za ljudske potrebe razvoj novih kultiviranih vrsta veoma je ograničen i spor proces. Prema izvješću Prescott-

Alena (1986.) samo je šest značajnih biljnih vrsta privedeno kulturi i u stanovitoj mjeri rašireno u dvadesetom stoljeću.

Tablica 1. Domestikacija važnijih vrsta kultiviranih biljaka
(Prilagođeno prema Simmonds i Smartt, 1999.)

Period i trajanje	Vrste udomaćene u tom periodu
Drevni: 7000.-5000. godina prije Krista	pšenica, ječam, raž, riža, grah, grašak, paprika, bob, lan, leća
Rani: 5000. - 0	kukuruz, soja, zob, krumpir, sirak, paradajz, suncokret, kupus, krastavac, luk, duhan, patlidžan, šeć. trska, salata, lucerna, pamuk, jabuka, trešnja, maslina, kruška, šljiva, smokva, breskva, badem, marelica, citrusi, banana, vinova loza, čaj
Kasni: 0-1750.	uljana repica, mrkva, heljda, hmelj, malina, ribiz, kava
Suvremeni: 1750. do danas	šećerna repa, krmne trave, jagoda, borovnica, buhač, kaučukovac, kivi

Među novim kultiviranim vrstama je kivi, podrijetlom od kineskog ogrozda. Opisan je kao najblistavija voćna vrsta dvadesetog stoljeća koja je danas raširena po cijelom svijetu (Beutel, 1990.). Kineski ogrozd raste u Kini kao divlji te nije jestiv. Brižljiva selekcija učinila ga je jestivim i preimenovan je u «kiwi» na Novom Zelandu nakon njegova uvođenja u ovu državu početkom 20. stoljeća.

Od oko 3.000 rodova, koliko ih ima u skriveno-sjemenjačama (*Angiospermae*), iz manje od 200 njih su proizašle naše današnje kultivirane vrste, što je relativno malo i što pokazuje da postoji još golem rezervoar za iskorištavanje, premda neki smatraju da je većina prehrambenih biljnih vrsta već otkrivena (Wilkes, 1984.). S druge strane, od ukupno oko 300 familija pojedine vrste su kultivirane iz njih 64, što odražava širok opseg raznolikosti ekoloških uvjeta i ljudskih potreba.

Iz nekih familija su udomaćene brojne vrste kao što je slučaj s familijama *Gramineae*, *Leguminosae*, *Cruciferae* i *Solanaceae*. U većini je familija ipak kultivirana samo jedna ili manji broj vrsta. No tisuće biljnih vrsta procijenjene su kao potencijalne komercijalne kulture. Postoje desetine tisuća neprocijenjenih vrsta s mogućnošću proizvodnje novih lijekova, hrane, stočne hrane, industrijskih sirovina, goriva ili nekog drugog proizvoda (Jolliff i Snapp, 1988.).

Različiti narodi, ili, bolje rečeno, različita društva u pojedinim povijesnim periodima i geografskim područjima, udomaćili su taksonomski različite vrste iz različitih familija sa sličnim namjenama: gomoljaste vrste (krumpir, slatki krumpir, jam, kasava), vrste za proizvodnju šećera (šećerna trska i šećerna repa), uljarice (suncokret, soja, uljana repica, maslina).

Odabiranje biljaka za drugačije namjene tijekom domestikacije i selekcije rezultiralo je razvojem varijeteta različitog izgleda u okviru iste ishodne vrste. Najbolji primjer za to je kupus, *Brassica oleracea* (tablica 2). Odabirom lisnatijih formi selekcionirana je raštika, odnosno kelj. Kupus glavica nastao je odabirom na pup, selekcijom na cvjetne izbojke izvedeni su cvjetača i brokula, a odabirom pazušnih pupova kelj pupčar. Sličan je slučaj u vrsti *Beta vulgaris*. Takav se proces naziva specijacija tj. razdvajanje jedne razvojne linije na dvije ili više novih formi.

Tablica 2. Specijacija u vrsti *Brassica oleracea* tijekom evolucije i domestikacije

Varietas	Subvarietas	Narodno ime	Posebno razvijen biljni organ
<i>Acephala</i>		Raštika	List
<i>Capitata</i>		Kupus (glavati)	Pup (glavica)
<i>Botrytis</i>	<i>Cauliflora</i>	Cvjetača	Cvijet
	<i>Aimosa</i>	Brokula	Cvijet
<i>Gemmifera</i>		Kelj pupčar	Pazušni pupovi
<i>Gongiloides</i>		Koraba	Korijen

U divljem bilju provodi se isključivo prirodna selekcija, a nasljedne se promjene u kultiviranom bilju događaju usmjerenim djelovanjem čovjeka. Divlje biljke imaju skladan i ujednačen razvoj svih biljnih dijelova – korijena, stabljike, lista i cvijeta, odnosno ploda. U kultiviranim je biljkama taj sklad narušen. Oni dijelovi biljke koji su u određenoj kultiviranoj vrsti komercijalni proizvod obično su uvećani u odnosu na divlje srodnike. Tako je npr. u mrkvi i repi korijen postao skladište rezervnih tvari. Podzemne su stabljike krumpira i šparoge također promijenile svoj oblik i funkciju pa su ispunjene prekomjernom količinom rezervne tvari. U drugim je biljkama u nadzemnim izdancima i dijelovima stabljike došlo do prekomjernog zadebljanja (lukovice, koraba), što je s biološkog stajališta sasvim nepotrebno. Listovi nekih biljaka su u odnosu na divlje srodnike veoma povećani, a na plodovima su nastupile promjene prema određenoj svrsi: prema željama čovjeka promijenjen je odnos hranidbenih sastojaka u biljkama.

Pravci širenja divljih vrsta su u kultiviranim vrstama najvećim dijelom napušteni, budući da je njihovo održavanje i širenje pod potpunim nadzorom čovjeka. Tijekom procesa evolucije i domestikacije mnoge današnje kultivirane vrste stekle su svojstva koja su ih učinila pogodnim za određene namjene. Te promjene mogu biti morfološke naravi ili su pak kemijskih i citogenetičkih karakteristika. Na taj način došlo je do skraćivanja stabljike (pšenica, ječam, riža, soja), nestanka ili smanjenja bodlji (malina, patlidžan, ananas) ili smanjenja toksičnih sastojaka (krumpir, pamuk, neke kupusnjače). Evolucija je u nekim biljnim vrstama potakla posebne učinke major gena za određena svojstva, što je poboljšalo komercijalnu vrijednost te vrste. Takvi su učinci npr. neosipanje sjemena iz klasa pšenice i ječma, hermafroditizam u vinovoj lozi, patuljast rast u ananasu, vegetativna partenogeneza u banani.

Prema tome, današnje kultivirane vrste, njihov izgled i svojstva, rezultat su prirodne i umjetne selekcije. U određenom vremenu i prostoru prva dovodi do spontanog kultiviranja i poboljšanja prilagodbe i reproduktivne sposobnosti, dok druga predstavlja usmjereno poticanje točno određenih promjena i održavanje istih u potomstvu. Umjetna selekcija usmjeravana je prema povećanju ploda, olakšanju berbe, formiranju atraktivne boje ili oblika, ili razvoju biljaka bez bodlji. Neka od ovih svojstava utječu na prinos ili kvalitetu proizvoda, dok druga daju sigurnost i praktičnost u proizvodnji ili potrošnji

Glavni činitelji nastanka kultiviranih vrsta tijekom evolucijskog procesa su hibridizacija, selekcija, mutacije i izoliranost. Mnoge kultivirane vrste su hibridi. Nastale su spontanom križanjem različitih vrsta, kao što su npr. naše vulgare pšenice, uljana repica i

duhan. Divlje forme vulgare pšenica (*Triticum aestivum*, $2n = 42$) koje bi mogle doći u obzir kao preci kultivirane pšenice, nisu nikada pronađene, što je očit dokaz da je ona nastala isključivo hibridizacijom drugih vrsta. Danas je poznato da je krušna pšenica nastala križanjem tri različite vrste roda *Triticum*.

Prirodna selekcija kao proces odbacivanja onih genotipova koji u novim uvjetima nisu više konkurentni, razvila je odgovarajuće forme. Spontane mutacije, formiranjem novih biljnih oblika bile su također važan činitelj u razvoju konkurentnijih genotipova. Smatra se da je sprječavanje osipanja sjemena iz klasa pšenice spontana mutacija (Hillman i Davies, 1990.). Da je izoliranost u nastanku mnogih biljnih vrsta igrala važnu ulogu, zaključuje se na temelju centara raznolikosti jedne vrste.

Centri podrijetla

Nastanak pojedinih kultiviranih vrsta veže se uglavnom za točno određena geografska područja. Istražujući podrijetlo kultiviranih vrsta, poznati ruski genetičar N.I. Vavilov i njegovi suradnici skupili su više od 300.000 uzoraka kultiviranog bilja i njihovih srodnika iz cijelog svijeta. Nakon svestrane analize tog biljnog materijala Vavilov je došao do zaključka da postoji osam užih područja, odnosno centara u kojima su nastale naše današnje kultivirane biljne vrste. To su kineski, indijski, centralnoazijski, bliskoistočni, mediteranski, etiopijski, južno-meksički i centralno-američki, te južnoamerički. Uz to je predložio i tri podcentra: indomalezijski, čileanski i brazilsko-paragvajski (tablica 3; slika 3).

Pojedina su područja posebno bila bogata kultiviranim vrstama. Od 650 značajnijih biljnih vrsta, više od 500 njih vodi podrijetlo iz starog svijeta, a oko 400 iz Azije. Široku genetičku varijabilnost Vavilov je našao u ograničenim geografskim područjima, dok je u širokim prostorima relativno malo genetičke varijabilnosti, što je on pokazao na primjeru pšenice. Vavilov je našao brojne forme diploidnih, tetraploidnih i heksaploidnih vrsta pšenice na Bliskom istoku, dok su širom Europe i Azije nađeni uglavnom heksaploidni tipovi pšenice.

Vavilov je smatrao da je centar podrijetla ujedno i centar raznolikosti te vrste. Međutim, na temelju tog koncepta nije bilo moguće objasniti zašto neke vrste imaju više od jednog centra raznolikosti, a jedan od centara raznolikosti neke vrste bio je odvojen od njihovih divljih srodnika. Te pojave objašnjene su prenošenjem kultiviranog bilja u ranom evolucijskom periodu u drugo područje gdje se stvorio novi centar raznolikosti. Stoga je Vavilov kasnije područja gdje je počela domestikacija, nazvao primarni centri, a područja u kojima se raznolikost nastavila širiti i nakon domestikacije, nazvao sekundarni centri.

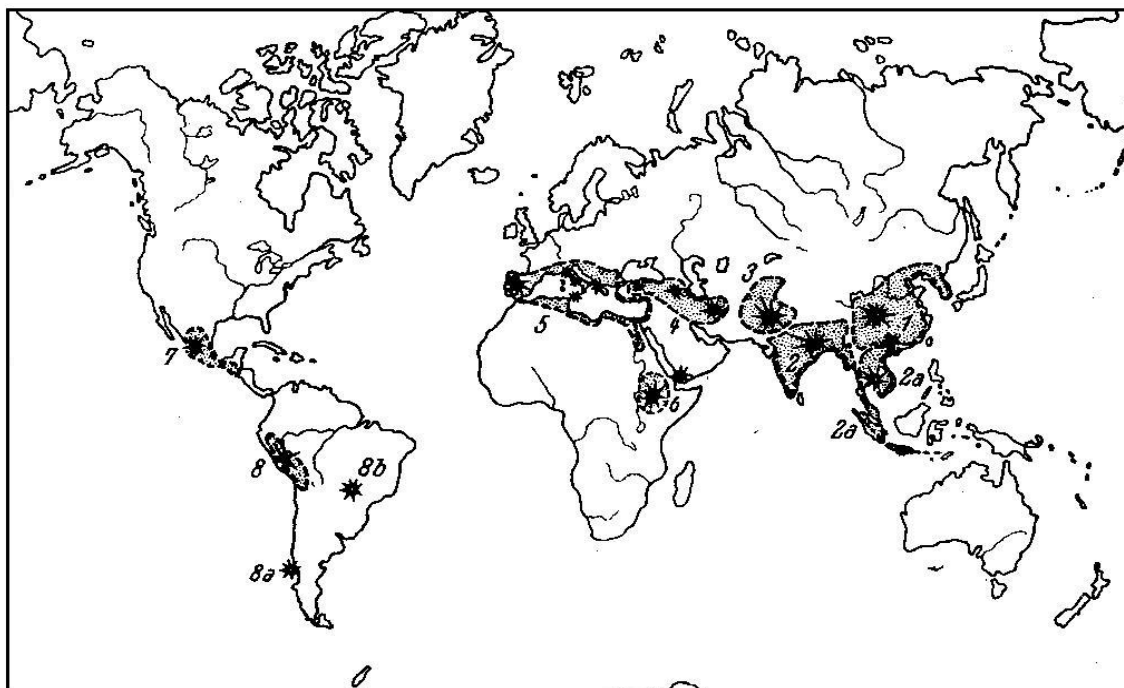
Kasnija istraživanja pokazala su da se centri podrijetla teško mogu odrediti samo po genetičkoj raznolikosti vrste u određenom području pa je ovaj prvobitni koncept od osam centara naknadno ispravljan i dopunjavan. Harlan je (1971.) zaključio da je pravilnije govoriti o mjestima gdje je počela domestikacija kultiviranog bilja kao i o centrima raznolikosti prije nego o centrima podrijetla. Centrom podrijetla označava se geografsko područje iz kojeg jedna vrsta potječe. Centar raznolikosti je mjesto gdje se javlja široka genetička varijabilnost među genotipovima kultiviranog bilja i njihovim divljim srodnicima.

Kultivirano bilje se širilo u vremenu i prostoru. Ponekad je veoma teško odrediti pravi centar podrijetla. Harlan smatra da su za točnu ocjenu podrijetla i širenja kultiviranog bilja potrebne informacije i istraživanja iz različitih znanstvenih područja, kao što su genetika, sistematika, evolucija, geografija, paleobotanika, povijest i geologija. Dokazano je da su neke vrste udomaćene neovisno u dva ili tri centra, kao što je slučaj s paprikom (*Capsicum annuum*), grahom (*Phaseolus vulgaris*), tikvom (*Cucurbita pepo*), i duhanom (*Nicotiana tabacum*) (Sanjur i sur. 2002.).

Tablica 3. Centri podrijetla kultiviranog bilja, (Vavilov 1926.)

Centri podrijetla	Primjeri kultiviranih biljnih vrsta
1 Kineski	Salata, soja, repa
2 Indijski	Krastavac, riža, orijentalni pamuk
2a Indo-Malezijski	Banana, kokos
3 Centralnoazijski	Badem, lan, leća, breskva
4 Bliskoistočni	Lucerna, jabuka, kupus,
5 Mediteranski	Celer, tvrda pšenica, metvica
6 Etiopijski	Kava, ricinus, ječam, proso
7 Južnomeksički i Centralnoamerički	Kukuruz, planinski pamuk, grašak,
8 Južnoamerički	Pamuk, krumpir, tikva, rajčica, duhan
8a Čileanski	Krumpir
8b Brazilsko-Paragvajski	Manioka, kikiriki, ananas,

Domestikacija kultiviranog bilja može nastati u centrima ili ne-centrima. U ovom slučaju centri su ograničena područja gdje je počela domestikacija biljne vrste i od kojeg je proširena u druga područja u svijetu. S druge strane ne-centri su široka geografska područja u kojima je vrsta mogla biti udomaćena istodobno na nekoliko različitih lokacija. Harlan je predložio tri centra: Bliski istok, Kina i Srednja Amerika, te tri ne-centra: Afrika, Azija i Pacifičko otočje.



Slika 3. Centri podrijetla kultiviranog bilja (po Vavilovu)

Centri podrijetla uopće se ne poklapaju s najproduktivnijim poljoprivrednim područjima modernog svijeta, osim Kine. Štoviše, gotovo sve od 30 glavnih kultiviranih vrsta u najvećoj mjeri uzgajaju se izvan svojih centara podrijetla, a većina njih postigla je mnogo bolje rezultate u područjima izvan originalnog nastanka. Pretpostavlja se da su u izvornom centru te vrste izvrgnute dugo vremena posebnim bolestima, štetnicima i biljojedima. Prenosjenjem u drugo područje izbjegavaju, barem privremeno, ova ograničenja. S genetičkog stajališta migriranje kultura od njihovog centra podrijetla smanjuje efektivnu veličinu populacije i na taj način brže reagiranje na umjetnu selekciju (Smart i Simmonds, 1995.).

Svaka današnja kultivirana vrsta ima srodnike u divljim vrstama koje prirodno nastaju u centrima podrijetla. U centrima podrijetla najveća je raznolikost i tu treba tražiti i različita korisna svojstva za oplemenjivačke programe. Međutim, centri podrijetla primitivnih oblika kultiviranih biljaka i njihovih divljih srodnika sve više nestaju. Lokalni biotipovi i izvorne sorte mnogih kultiviranih vrsta zamjenjuju se manjim brojem novih kultivara. Veliki rezervoar genetičke varijabilnosti, čija je potencijalna vrijednost u budućem oplemenjivanju nemjerljiva, u opasnosti je da bude izgubljen. Stoga je neobično važno prikupljanje raznolike germplazme i njeno održavanje u kolekcijama i bankama gena prije nego bude izgubljena.

Introdukcija

Prvi i ponekad najvažniji način uvođenja i širenja novog biljnog materijala je introdukcija. Naziv introdukcija dolazi od latinske riječi *introducire*, što znači uvoditi, pa introdukcija predstavlja uvođenje ili prenošenje bilja, ili biljnog materijala iz jednog područja u drugo. Uz domestikaciju, geografsko širenje kultiviranog bilja jedan je od najvažnijih procesa u povijesti poljoprivrede. Introdukcija i danas ima veliko značenje u oplemenjivanju bilja i razvoju poljoprivrede.

Neke kultivirane vrste prenesene u drugo uzgojno područje toliko su se prilagodile da je njihova proizvodnja u tim područjima puno veća nego u izvornim centrima. Tipičan primjer je soja. U SAD se proizvodi više od polovine svjetske proizvodnje ove vrste, a u SAD je koncem 19. stoljeće doneseno iz Kine šest biljaka soje. Slično je s proizvodnjom kave u Južnoj Americi. Znano je da je samo jedno stablo kave preneseno u J. Ameriku 1706. iz Botaničkog vrta u Amsterdamu. Introdukcija je posebno bila važna u počecima razvoja poljoprivrede, ali i sve dotle dok oplemenjivanje nije razvijeno kao znanstvena disciplina.

Introdukcija bilja i sjemena započela je u vrijeme nomadskog života ljudi. Posebno je bila izražena u vrijeme velikih seoba naroda. Seleći se iz jednog područja u drugo ljudi su sa sobom nosili sjeme i bilje koje su prije toga uspješno uzgajali. S razvojem civilizacije počinju se organizirati ekspedicije u neistražena područja odakle se donosi novi biljni materijal. Pisana povijest međunarodnih misija prikupljanja bilja postoji barem 3500 godina, otkako su Egipćani počeli donositi bilje nakon vojnih pohoda.

Najveća razmjena biljnog materijala vjerojatno je uslijedila nakon otkrića Amerike. Tada su iz novog u stari svijet unesene mnoge vrste koje do tada nisu bile poznate: kukuruz, krumpir, rajčica, paprika, grah, duhan, pamuk. Iz Europe i Azije su u Ameriku prenijete pšenica, ječam, kasnije soja, različite vrste povrća i voća. To je uveliko promijenilo prehrambene navike stanovništva u oba područja i doprinjelo općem razvoju poljoprivrede u svijetu.

Dva su temeljna razloga introdukcije:

- ✧ primjena novog biljnog materijala ili sjemena u proizvodnji
- ✧ introducirani materijal služi kao izvor nove genetičke varijabilnosti

U prvom slučaju introdukcija se koristi za unapređenje poljoprivredne proizvodnje u novom uzgojnom području. Primjer za to je uvođenje visokoprinosnih talijanskih kultivara pšenice ili američkih hibrida kukuruza u naša područja nakon II. svjetskog rata. Ti kultivari zamijenili su zastarjele nisko produktivne domaće kultivare i uveliko povećali proizvodnju žita, a ostali su u proizvodnji sve dok nisu razvijeni domaći produktivniji kultivari.

Introducirani biljni materijal koristi se također za proširenje genetičke varijabilnosti i razvoj novih poboljšanih domaćih kultivara. Već spomenute talijanske sorte pšenice poslužile su kao početni materijal za razvoj domaćih kultivara pšenice. Rijetki su današnji kultivari pšenice, razvijeni u nas, koji ne sadrže u sebi dio nasljedne osnove tih talijanskih kultivara. Sličan je slučaj i u drugim domaćim ratarskim vrstama: soji, duhanu, ječmu. Danas je sa selekcijskog i uzgojnog stajališta mnogo važniji ovaj vid introdukcije.

Introdukcija novih biljnih vrsta uglavnom je završena, ali razmjena nove germplazme postojećih vrsta omogućuje razvoj novih poboljšanih biljnih formi u drugim područjima. To sve doprinosi općem unapređenju poljoprivredne proizvodnje u svijetu.

Jedna od potencijalnih opasnosti introdukcije bilja i sjemena je unošenje uzročnika bolesti i štetnika s introduciranim materijalom. To je posebno istaknuto u introdukciji klonova. Mnoge opasne bolesti i štetnici tako su iz neznanja, ili nepažnje preneseni u nova područja. U Europu je na taj način unesena filoksera iz Amerike, a u Ameriku neke bolesti pšenice i soje. S današnjom pokretljivošću i povećanim međunarodnim transportom širenje patogena je veoma teško kontrolirati. Stoga se u introdukciji mora voditi stroga karantinska politika. Sve biljne i sjemenske introdukcije valjalo bi uzgajati izolirano jednu generaciju prije nego se puste u komercijalni promet.

Introducirani biljni materijal, jednako kao i novo selekcionirani, čuva se u posebnim kolekcijama oplemenjivačkih institucija ili u tzv. "genskim bankama", koje su opremljene za dulje čuvanje. Iz tih kolekcija biljni materijali i sjeme razmjenjuju se s drugim oplemenjivačima i institucijama u zemlji i svijetu.

Literatura

- Beutel, J.A. 1990. Kiwifruit. U: Janick, J i Simon, E. (ur.) *Advances in new crops*, str. 309-316, Timber Press, Portland, OR, USA.
- Harlan, J.R. 1971. Agricultural origins: centers and non-centers. *Science*, 174:468-474
- Harlan, J.R. 1992. *Crops and Man*. American Soc. for Agronomy and Crop Sci., Madison, WI, USA.
- Hillman, G.C., Davies, M.S. 1990. Measured domestication rates in wild wheats and barley under primitive cultivation and their archaeological implications. *J. World Prehistory* 4:157-222.
- Menini, U.G. 1998. Policy Issues for the Conservation and Utilization of Horticultural Genetic Resources for Food and Agriculture. World Conference on Horticultural Research, Rome, 17-20 June.
- Jolliff, G.D., Snapp, S.S. 1988. New crop development. *J. Prod. Agric.* 2:6-13.
- Prescot-Alen, R., Prescott-Alen, C. 1986. *The first resource*. Yale University Press, New Haven, CT, USA.
- Rindos, D. 1984. *The Origins of Agriculture : An Evolutionary Perspective*. Academic Press, San Diego.
- Sanjur, O.I., Piperno, D.R., Andres, T.C., Wessel-Beaver, L. 2002. Phylogenetic relationships among domesticated and wild species of cucurbita (Cucurbitaceae) inferred from a mitochondrial gene: implications for crop plant evolution and areas of origin. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA* 99:35-45.
- Simmonds, N.W., Smartt, J. 1999. *Principles of Crop Improvement*. Blackwell Science, London.
- Smartt J., Simmonds, N.W. 1995. *Evolution of crop plants*. 2nd ed. Longman, Harlow.
- Trewavas, A. 2000. GM is the best option we have. *Agbioview*
- Wilkes, G. 1984. Germplasm conservation toward the year 2000: potential for new crops and enhancement of present crops. U: Yeatman, C.W., Kafton, D., Wilkes, G. (ur.) *Plant Genetic Resources*, str. 131-164. Westview Press, Boulder CO, USA.

3. Genetički mehanizmi reguliranja fertilnosti

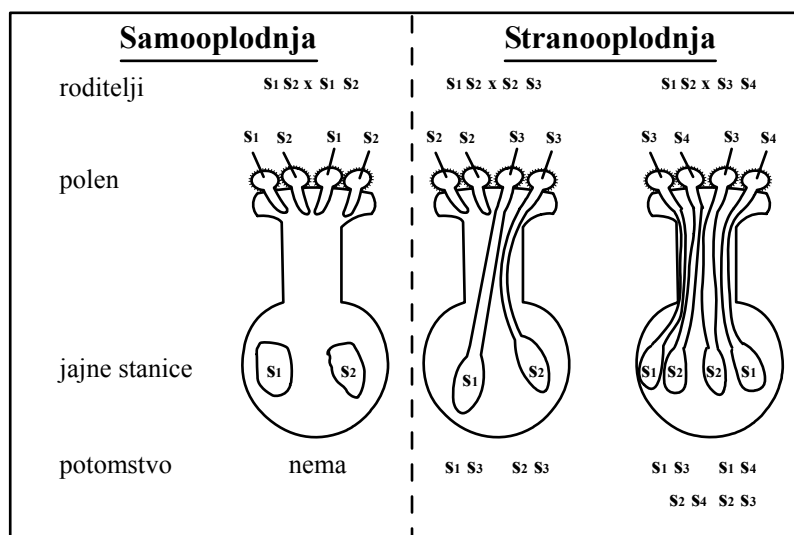
Samoinkompatibilnost

Prilikom oplodnje nekih biljnih vrsta često se događa da normalan i funkcionalno razvijen polen ne može oploditi jajnu stanicu istog ili nekog drugog cvijeta zbog određenih fizioloških prepreka. Nesposobnost fertilne hermafroditne biljke da stvori zigotu nakon samooplodnje naziva se samoinkompatibilnost ili samosterilnost (de Netancourt, 2001.). Samoinkompatibilnost je jedan od najraširenijih mehanizama u biljkama cvjetnicama u sprječavanju samooplodnje, a nađena je u brojnim kultiviranim vrstama u familijama *Leguminosae*, *Solanaceae*, *Cruciferae*, *Compositae*, *Gramineae* i *Rosaceae*.

Članovi iste skupine inkompatibilnosti su striktno samosterilni, a fertilni su s drugim skupinama. Ti sustavi potiču stranooplodnju. Postoji više uzroka zbog kojih izostaje oplodnja i formiranje zigote (Lersten, 1980.): polen uopće ne klija na njušci tučka, polenova cijev (mješnica) raste sporo tako da ne može doseći sjemeni zametak, polenova cijev ne može prodrijeti u embrijsku vrećicu, muška gameta može čak i ući u embrijsku vrećicu, ali se ne spaja s jajnom stanicom.

Samoinkompatibilnost je obično genetički uvjetovana djelovanjem brojnih alela na pojedinačnom S lokusu, označenih kao S aleli (Bateman, 1955.). Ti aleli imaju funkciju regulatornih gena od kojih su dva u diploidnom tkivu vrata tučka, a jedan u svakom polenovu zrnu. S lokus može biti veoma polimorfan, a u jednoj populaciji utvrđen je 41 S alel (Lawrence, 2000.).

Prema fenotipskom odnosu muških i ženskih reproduktivnih organa razlikuju se homomorfni i heteromorfni sustavi inkompatibilnosti. U homomorfnom sustavu nema morfoloških razlika između tučka i prašnika, odnosno tučak i prašnici su iste dužine. Ovisno o načinu djelovanja S alela inkompatibilnost u homomorfnim biljkama može biti gametofitska i sporofitska.



Slika 4. Gametofitska inkompatibilnost

Gametofitska inkompatibilnost uvjetovana je alelima u polenu. Rast polenove cijevi kroz vrat tučka genetički je uvjetovan većim brojem multiplih alela označenih kao S₁, S₂, S₃, S₄... Budući je polenovo zrno haploidno, sadržavat će samo jedan alel. Tkivo vrata tučka je

diploidno i normalno sadrži dva alela. U slučaju gametofitske inkompatibilnosti polen će oploditi jajnu stanicu samo ako se alel koji on nosi na S lokusu, razlikuje od oba alela u tkivu vrata tučka. Drugim riječima, biljka čiji tučak ima genotip S1S2, ne može biti oplođena polenom biljke s genotipom S1S2, budući da će polen s te biljke imati alele S1 ili S2. Ako biljka oprašivač ima genotip S1S3, samo polen s alelom S3 moći će oploditi biljku s genotipom S1S2. Ako neka biljka ima genotip S3S4, sav polen te biljke normalno će oploditi biljku s genotipom S1S2 (slika 4). Homozigotan genotip za S alele, npr. S1S1, nije moguć, budući da S1 polen ne može oploditi tučak koji nosi alel S1.

Sporofitska inkompatibilnost također je posljedica niza multiplih alela na jednom lokusu, ali je uvjetovana genetičkom konstitucijom biljke davatelja polena. Na taj način sve muške gamete jedne biljke imaju istu mogućnost oplodnje ženskog roditelja, bez obzira na individualni genotip polenova zrna. U sporofitskoj inkompatibilnosti S aleli mogu izraziti dominantnost ili pojedinačno djelovanje u ženskim i muškim organima. Tako npr. ako biljka donor polena ima genotip S1S2, a S1 alel je dominantan, sav polen te biljke ponašat će se kao da ima alel S1, bez obzira koji alel nosi. Taj polen bit će inkompatibilan s tučkom koji sadrži alel S1, ali kompatibilan s tučkom koji nosi alel S2.

Inkompatibilnost je vezana i s morfološkom građom cvijeta. Takav sustav naziva se heteromorfna inkompatibilnost. Postoje biljne vrste s različitom dužinom tučka i prašnika. Ta se pojava označava kao heterostilija, a takvi cvjetovi nazivaju se heteromorfni. S obzirom na odnos dužine tučka i prašnika, postoji distilija i tristilija, a veće razlike tučka i prašnika su veoma rijetke. Moguća je oplodnja samo između različitih tipova cvijeta.

Pojava inkompatibilnosti može imati odraz u oplemenjivanju i razvoju novih kultivara. Visok stupanj inkompatibilnosti omogućava jednostavnu rekombinaciju gena pa se ta okolnost koristi u oplemenjivanju. S druge strane, kao posljedica samoinkompatibilnosti ne mogu se razviti inbred linije za hibridne kultivare. Ova pojava koristi se za kontrolu oplodnje i proizvodnju hibridnog sjemena, ako nije moguće dobiti muško sterilne linije. To pokazuje pokus proveden u nekim vegetativno razmnoženim samoinkompatibilnim klonovima. Sustav gametofitske samoinkompatibilnosti u bijeloj i crvenoj djetelini veoma je dobar kontrolni mehanizam za proizvodnju hibridnog sjemena.

Inkompatibilnost ima odraza u komercijalnoj proizvodnji u voćarstvu. Postoje brojne vrste i sorte voćaka koje su samoinkompatibilne pa se u nasad moraju uključiti oprašivači.

Da bi se mogao provesti oplemenjivački program, nekad je potrebno prevladati pojavu inkompatibilnosti, posebno kad treba razviti inbred linije. Postoji nekoliko načina prevladavanja inkompatibilnosti: oprašivanje cvijeta u veoma ranom stadiju razvoja, oprašivanje pri kraju cvatnje ili pri kraju vegetacijske sezone, upotreba starijeg polena, upotreba hormona ili mutagenih sredstava, tretiranje cvjetova višim temperaturama, cijepljenje inkompatibilnih roditelja na kompatibilnu podlogu. U nekim slučajevima su induciranim mutacijama u samoinkompatibilnim individuama dobiveni aleli autofertilnosti, kao što se uspjelo u trešnji.

Muška sterilnost

U svom životnom ciklusu više biljke prolaze kroz vegetativnu (sporofitsku) i spolnu (gametofitsku) fazu. Spolna faza podrazumijeva sposobnost biljke da formira funkcionalno aktivne muške i ženske spolne organe u kojima se razvijaju polenova zrna (mikrogamete) i jajne stanice (makrogamete). Normalnim razvojem ovih organa osigurava se samo- ili stranooplodnja, razvitak embrija i produženje vrste.

Sve ove procese uglavnom kontroliraju geni u jezgri. Međutim, određeni činitelji kao što su prirodne i inducirane mutacije, okolina, međuvrsna hibridizacija i genetičko inženjerstvo, ove gene mogu mijenjati. Posljedica toga je sterilnost ili nefunkcionalnost spolnih organa. Ako biljka zbog različitih funkcionalnih poremećaja ne može razviti polen sposoban za oplodnju, ta se pojava naziva muška sterilnost. Postoji također ženska sterilnost u slučaju kad se ne razvije funkcionalna jajna stanica ili embrijska vrećica. Međutim, sustav ženske sterilnosti je manje postojan te nema značenja u oplemenjivanju bilja.

Muška sterilnost je opća pojava u biljnom carstvu (tablica 10), a po nekim pokazateljima većina biljnih vrsta imaju barem jedan jezgreni gen za mušku sterilnost (Duvick, 1966.). Pojava muške sterilnosti je genetički uvjetovana. Tri su tipa genetički uvjetovane muške sterilnosti:

- ✧ genska ili karioplazmatska
- ✧ citoplazmatska
- ✧ gensko-citoplazmatska

Genska muška sterilnost uvjetovana je jednim ili više gena u jezgri. Nasljeđuje se mendelski. Ovaj tip sterilnosti prvenstveno je uvjetovan recesivnim alelom *ms*. Dominantni alel *Ms* rezultat je normalnog razvoja prašnika i polena. U diploidnom organizmu genotip *msms* bit će sterilan, dok će genotipovi *MsMs* i *Msms* biti fertilni.

Citoplazmatska muška sterilnost (*cms*) uvjetovana je genima u citoplazmatskim organelama (mitohondrije i plastidi). Nasljeđuje se dominantno preko majčinske biljke. Karakterizira je nemendelski način nasljeđivanja. Citoplazmatska muška sterilnost nastaje kao rezultat unošenja kromosoma u stranu citoplazmu (sirak, pšenica) i križanja različitih vrsta jednog roda (duhan, suncokret).

Neke biljke imaju *cms* sustave koji sadrže jezgrene gene koji mogu prevladati stanje sterilnosti i povratiti fertilnost. Takvi geni nazivaju se restorer geni. Biljka s restorer genima po svim svojstvima ista je kao i muško sterilna biljka, no u svom genomu ima barem jedan gen za obnavljanje fertilnosti koji je u stanju obnoviti fertilnost u muško sterilnoj liniji.

Činitelji koji u genskoj strukturi biljke uvjetuju sterilnost, označavaju se slovom *S*, oni koji uvjetuju fertilnost slovom *F*, a geni koji uvjetuju obnavljanje fertilnosti, označavaju se slovom *R*.

Geni obnavljanja fertilnosti (*Rf*) smješteni su u kromosomima. Ako su restorer aleli dominantni (*RfRf* ili *Rfrf*), biljka će biti normalno fertilna, a ako su ti aleli recesivni (*rfrf*), biljka će biti sterilna. Ovisno o genotipu biljke oprašivača, *cms* biljke mogu imati tri vrste potomstva:

- $CMS\ rfrf \times RfRf \rightarrow$ sve biljke fertilne s genotipom *Rfrf*
- $CMS\ rfrf \times Rfrf \rightarrow$ 50% fertilnih biljaka s genotipom *RfRf* i
50% sterilnih biljaka s genotipom *rfrf*
- $CMS\ rfrf \times rfrf \rightarrow$ sve biljke sterilne s genotipom *rfrf*

Gensko (karioplazmatsko)-citoplazmatska muška sterilnost je kombinacija dvaju prethodnih tipova sterilnosti. Uvjetovana je genima u kromosomima uz gene modifikatore u citoplazmi.

Tablica 4. Muška sterilnost u nekim kultiviranim vrstama

Vrsta	Izvor
Duhan (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Clayton, 1950.
Ječam (<i>Hordeum vulgare</i>)	Suneson, 1940., Ahokos, 1978.
Kukuruz (<i>Zea Mays</i>)	Rhoades, 1931.
Luk (<i>Allium cepa</i>)	Jones i Clarke, 1943.
Paprika (<i>Capsicum annuum</i>)	Peterson, 1958.
Pšenica (<i>Triticum aestivum</i>)	Kihara, 1951.
Raž (<i>Secale cereale</i>)	Geiger i Schnell, 1970.
Soja (<i>Glycine max</i>)	Brim i Young, 1971.
Suncokret (<i>Helianthus annuus</i>)	Leclercq, 1969.
Šećerna repa (<i>Beta vulgaris</i>)	Owen, 1945.
Uljana repica (<i>Brassica napus</i>)	Thompson, 1972.

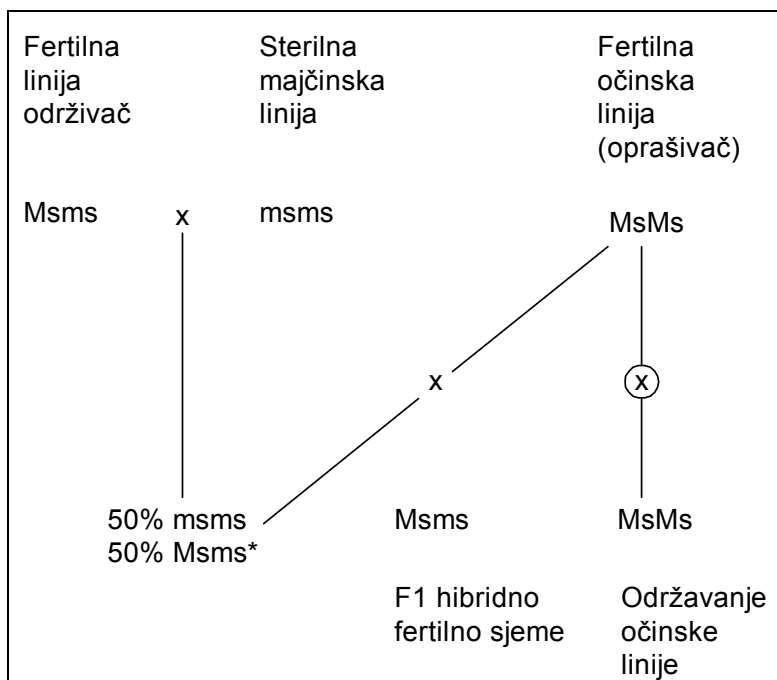
Muška sterilnost, i recesivna i dominantna, koristi se u oplemenjivačkim programima, odnosno u programima rekurentne selekcije u cilju povećanja genetičke varijabilnosti. Međutim, uporaba muške sterilnosti u programima rekurentne selekcije nije se pokazala uspješnom, posebno u samooplodnim vrstama. U takvom postupku javljaju se poteškoće zbog slučajne oplodnje. U samooplodnim vrstama poteškoće stvara ručno oprašivanje i manja proizvodnja sjemena. No i pored toga u nekim vrstama preporuča se i provodi uporaba muške sterilnosti u rekurentnim selekcijskim programima. Npr. genska muška sterilnost soje uvjetovana je jednim recesivnim genom te se koristi u oplemenjivačkim programima rekurentne selekcije (Palmer i sur., 1992.).

Puno se češće muška sterilnost primjenjuje u proizvodnji hibridnog sjemena. Proizvodnja hibridnog sjemena relativno je skupa, no pomoću muške sterilnosti u velikoj se mjeri olakšava i pojeftinjuje. Troškovi proizvodnje hibridnog sjemena kukuruza u SAD iznose oko 300 dolara po hektaru ženskog roditelja, što samo za sebe govori o potrebi iznalaženja novih rješenja u proizvodnji sjemena.

U proizvodnji hibridnog sjemena pomoću genske muške sterilnosti javljaju se poteškoće zbog toga što se normalnim postupkom križanja ne može dobiti čista populacija muško sterilnih biljaka. Za stvaranje fertilnog F_1 hibrida potrebno je križati majčinske msms biljke s očinskim MsMs biljkama. Međutim, križanjem muško sterilnih biljaka majčinske linije s fertilnom linijom održivačem u potomstvu će biti 50% sterilnih (msms) i 50% fertilnih biljaka (Msms) (slika 6). Te fertilne biljke prije križanja muško sterilne majčinske linije s fertilnom očinskom linijom trebalo bi odstraniti iz nasada, što je veoma teško, ili pak nemoguće, jer nema genetičkog odnosno morfološkog markera koji bi te biljke razlikovao prije cvatnje. Stoga je primjena genske muške sterilnosti u proizvodnji hibridnog sjemena ograničena, pa se u tu svrhu više koristi citoplazmatska muška sterilnost.

Citoplazmatska se muška sterilnost uspješno koristi u proizvodnji hibridnog sjemena mnogih kultura: suncokreta, ječma, duhana, kukuruza, šećerne repe, uljane repice, luka. (Frankel i Galum, 1977.). No i u primjeni citoplazmatske muške sterilnosti treba biti oprezan jer su ponekad moguće negativne popratne pojave. Citoplazmatska muška sterilnost u kukuruzu bila je tzv. Texas tipa i nosila je sa sobom osjetljivost na sivu pjegavost lista (*Helminthosporium maydis*) pa je nakon katastrofalne epifitocije ovaj tip sterilnosti napušten.

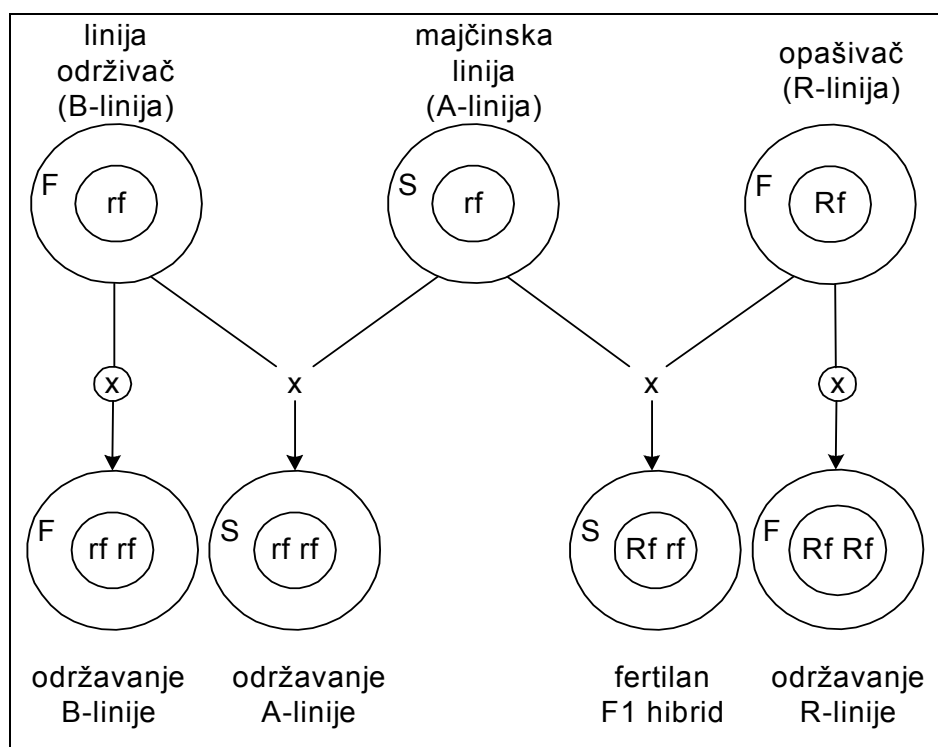
U lucerni se cms pokazala neuspješnom jer pčele nerado posjećuju muško sterilne cvjetove, a poznato je da lucernu najviše oprašuju pčele (Viands, i sur. 1988.). S druge strane citoplazmatska se muška sterilnost veoma uspješnom pokazala u duhanu, suncokretu i uljanoj repici.



Slika 5. Proizvodnja hibridnog sjemena pomoću genske muške sterilnosti (Borojević, 1981.)

Pri uporabi muške sterilnosti u proizvodnji sjemena poteškoću pričinjava obnavljanje fertilnosti u vrstama u kojima je sjeme komercijalni proizvod (suncokret, uljana repica). U vrstama u kojima sjeme nije komercijalni proizvod, obnavljanje fertilnosti nije potrebno (duhan). Ako se citoplazmatska muška sterilnost koristi u proizvodnji sjemena, onda je to trolinijski sustav jer mora postojati muško sterilna linija A, linija održivač B i restorer linija R (slika 7). U takvom sustavu za proizvodnju hibridnog sjemena trebaju dva kruga.

Poseban tip sterilnosti je funkcionalna muška sterilnost. To je pojava u biljkama koje imaju normalan polen, ali se zbog nekih fizioloških poremećaja prašnici ne otvaraju te ne dolazi do oslobađanja polena. Takva pojava češće se pojavljuje u rajčici i patlidžanu. Može biti korisno upotrijebljena u proizvodnji hibridnog sjemena. Za majčinsku liniju upotrebljavaju se biljke s funkcionalnom muškom sterilnošću bez odstranjivanja prašnika, a za oca se koristi druga normalna linija tako da nema potrebe za restorer genima.



Slika 6. Proizvodnja hibridnog sjemena na osnovi citoplazmatske muške sterilnosti (Borojević, 1981.)

Literatura

- Ahokos, H. 1978. Cytoplasmic male sterility in barley. I. Anther and pollen characteristics of msms restored and partially restored msms genotypes. *Z. Pflanzenzuechtung* 81:327-332.
- Bateman, A.J. 1955. Self-incompatibility system in angiosperms. *Cruciferae. Heredity* 6:285-310.
- Borojević, S. 1981. Principi i metodi oplemenjivanja bilja. Ćirpanov, Novi SAD.
- Brim, C.A., Young, M.F. 1971. Inheritance of male-sterile character in soybeans. *Crop Sci.* 11:564-566.
- Clayton, E.E. 1950. Male sterile tobacco. *J. Heredity* 41:171-175.
- de Netancourt, D. 2001. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.
- Duvick, D.N. 1966. Influence of morphology and sterility on breeding methodology. U: Frey, K.J (ur.), *Plant breeding str.* 85 – 138. Ames, Iowa, Iowa State Univ. Press.
- Frankel, R., Galun, E. 1997. Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Geiger, H.H., Schnell, F.W. 1970. Cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.). *Crop Sci.* 10:590-593.
- Hanson, A.A., Barne S., D.K., Hill, R.R.Jr. (ur.) *Alfalfa and alfalfa improvement. Agronomy monograph* 29:931-960.
- Jones, H.A., Clarke, A.E. 1943. Inheritance of male sterility in the onion and the production of hybrid seed. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 43:189-194.
- Kihara, H. 1951. Substitution of nucleus and its effects on genome manifestations. *Cytologia* 16:177-193.
- Lawrence, M.J. 2000. Population genetics of the homomorphic self-incompatibility polymorphism in flowering plants. *Ann. Bot.* 85:221-226.
- Leclercq, P. 1969. Une sterilité male cytoplasmique chez tournesol. *Ann. Amélior. Plantes* 19(2):99-106.

- Lersten, N.R. 1980. Reproduction and seed development. U: Fehr W.R. Hadley H.H. (ur.), Hybridization of crop plants. American Society of Agronomy; Madison, Wis.
- Lewis, D. 1954. Comparative incompatibility in angiosperms and fungi. *Adv. Genetics* 6:235-285.
- Owen, F.V. 1945. Cytoplasmatically inherited male-sterility in sugar beets. *J. Agr. Res.* 71:423-440.
- Palmer, R.G., Albertsen, M.C., Horner, H.T., Skorupska, H. 1992. Male sterility soybean and maize: Developmental comparisons. *Nucleus* 35:1-18.
- Peterson, P.A. 1958. Cytoplasmically inherited male-sterility in Capsicum. *Am. Nat.* 92:111-119.
- Poehlman, J.M., Sleper, D.A. 1995. Breeding field crops. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.
- Rhoades, M.M. 1931. Cytoplasmic inheritance of male sterility in Zea mays. *Science* 73:340-341.
- Schlichting, C.D. 1986. The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 17:667-693.
- Suneson, C.A. 1940. A male sterile character in barley. *J. Hered.* 31:213-214.
- Thompson, K.F. 1972. Cytoplasmic male sterility in oilseed rape. *Heredity* 29:253-257.
- Viands, D.R., Sun, P., Barnes, D.K. 1988. Pollination control: mechanical and sterility. U: Virmani, S.S. 1994. Heterosis and hybrid rice breeding. *Monogr. Theor. Appl. Genet.* 22. Springer-Verlag.

4. Heterozis

Križajući međusobno biljke različitih vrsta i sorata austrijski botaničar Koelreuter zapazio je još 1763. godine da je potomstvo F_1 generacije superiornije po prinosu ili nekom drugom svojstvu od svojih roditelja. Nakon toga brojni drugi istraživači, među kojima i Darwin, istraživali su ili pisali o ovoj pojavi. No tek početkom dvadesetog stoljeća američki genetičar Shull počeo se sustavno baviti istraživanjem povećane bujnosti potomstva F_1 generacije i njenom praktičnom primjenom u selekciji kukuruza. Shull je 1909. predložio postupak za proizvodnju hibridnih kultivara kukuruza razvojem inbred linija i njihovim međusobnim križanjem.

Pojavu povećane bujnosti F_1 generacije u odnosu na roditelje Shull je nazvao heterozis. Hibridni vigor i heterozis, prema tome, smatraju se sinonimima jer označavaju izražavanje povećane bujnosti. Izraz "heterozis" kratica je od riječi heterozigotni stimulans (stimulus heterozygosis) ali Shull nije opisao genetički mehanizam njegova izražavanja. Heterozis se izražava u obliku postotka, a mjeri se u odnosu na prosjek roditelja ili u odnosu na boljeg roditelja. tj.

$$h (\%) = \frac{F1 - MP}{MP} \cdot 100, (MP = \text{prosjeck roditelja})$$

$$h (\%) = \frac{F1 - HP}{HP} \cdot 100 (HP = \text{bolji roditelj})$$

I pored brojnih istraživanja genetička osnova heterozisa još uvijek je prijemna tema. Za objašnjenje fenomena heterozisa do sada je predloženo nekoliko teorija. Neke od njih imaju genetičku osnovu, neke nemaju. No, većina tih teorija svrstana je u dvije skupine:

- ✧ teorija superdominantnosti
- ✧ teorija dominantnosti

Teoriju superdominantnosti koja u osnovi predstavlja fiziološku stimulaciju ili alelnu interakciju postavio je prvi Shull i označio je kao hipotezu heterozigotnosti. Temelji se na pretpostavci da je heterozigotnost sama po sebi uzrok heterozisa, odnosno da su heterozigotni lokusi superiorniji od homozigotnih, tj. $Aa > AA > aa$. To je nemendelsko objašnjenje. Po toj teoriji najvigoroznije su one biljke koje imaju najveći broj heterozigotnih lokusa (Savolainen i Hedrick, 1995.). Superdominantnost po tome proistječe iz interakcije alela na samom lokusu.

Glavni je prigovor hipotezi superdominantnosti da nema dokaza o heterotičnom doprinosu heterozigotnosti kad se razmatraju poligenska svojstva biljke. Utvrđeno je također da heterozigotnost sama ne daje heterotični učinak ako nisu prisutni i neki drugi činitelji, što je dokazano na primjeru duhana jer su homozigotne linije imale viši prinos od heterozigotnih F_1 hibrida (Chaplin, 1966.). Pokusi izvedeni na riži (Xiao i sur., 1995.) pokazali su da nije bilo korelacije između većine svojstava i ukupne heterozigotnosti genoma.

Teorija dominantnosti polazi od pretpostavke da će heterozis nastati ako su na lokusima prisutni dominantni ili djelomično dominantni aleli. To bi bila mendelska genetička hipoteza. Po ovoj teoriji heterozis se izražava akumulacijom dominantnih pozitivnih činitelja na različitim lokusima, tj. $AA > Aa > aa$. Sprague (1983.) je pokazao da je heterozis za prinos u kukuruzu potpuno ili u najvećoj mjeri rezultat akumuliranja dominantnosti.

Ova teorija također ima stanovite nedostatke. Ako heterozis nastaje akumulacijom poželjnih dominantnih alela, bilo bi moguće stvoriti inbred linije s kompletnom dominantnošću i produktivne kao F_1 hibridi, a to se kod stranooplodnih vrsta nikada nije

postiglo. Izražavanje vigora kvantitativnih svojstava za prinos iznimno je složeno jer je broj alela velik. Bilo bi veoma teško dobiti potpuno homozigotnu liniju koja nosi sve povoljne alele, čak i ako bi bilo samo desetak alela. U kukuruzu je, primjerice nađeno od 10 do 100 alela koji utječu na izražavanje prinosa.

Definitivan dokaz za bilo koju od ovih teorija, teško je utvrditi. Mnogi dokazi upućuju na to da je u izražavanju heterozisa značenje djelomične ili potpune dominantnosti veće od značenja superdominantnosti (Hallauer i Miranda, 1981.).

Epistaza također može doprinijeti izražavanju heterozisa (Mitchell i Olds, 1995.). Epistaza nije glavna komponenta genetičke varijabilnosti, ali epistatični učinci mogu nastati u nekim kombinacijama inbred linija kukuruza, pa epistaza može imati utjecaja u izražavanju vigora jednostrukih hibrida nastalih križanjem dvije inbred linije. No, po svemu sudeći, epistaza je mnogo manje važna u izražavanju heterozisa od dominantnosti (Hallauer i Miranda 1981.).

Zbog složenosti nasljeđivanja kvantitativnih svojstava u izražavanju heterozisa najvjerojatnije su prisutni svi tipovi djelovanja gena. S genetičkog stajališta heterozis je rezultat intraalelne interakcije (dominantnost i superdominantnost) i jednim dijelom interalelne interakcije (epistaze). To je stanje maksimalne heterozigotnosti koja nastaje križanjem različitih homozigotnih inbred linija.

Za izražavanje heterozisa, prema Falconeru (1989.) trebaju biti ispunjena dva bitna uvjeta: prisutnost određene razine dominantnosti i relativna razlika u frekvenciji gena dva roditelja. Ukoliko bilo koji od ova dva uvjeta nije ispunjen, heterozis se neće izraziti, a što su roditelji međusobno genetički i geografski više udaljeni, heterozis će biti izraženiji.

Heterozis se također modificira interakcijom genotipa i okoline. Zapaženo je da su neki hibridi izrazili heterozis za prinos u jednim uvjetima uzgoja, ali kad su se promijenili uvjeti, nije zabilježen heterotični učinak (Chapman i sur., 2000.). Stoga bi bilo pravilnije označiti posebne hibridne linije za točno određena staništa i određene uvjete uzgoja.

Heterozis se različito izražava u diploidnim i tetraploidnim vrstama. U diploidnim vrstama najizraženiji je heterozis u jednostrukim hibridima, budući da je najveća mogućnost nastajanja lokusa s heterozigotnim alelima. Npr. križanjem dvije inbred linije AABBBccdd x aabbCCDD nastat će F₁ hibrid AaBbCcDd. U tetraploidu, međutim, raspored alela na lokusima je drukčiji i heterozigotnost je manja nego u diploidu.

U autopoliploidnim vrstama razina heterozisa će ovisiti o broju različitih alela na jednom lokusu. U autotetraploidu broj različitih alela na jednom lokusu varira od jedan do četiri. Utvrđeno je da se najveći heterozis izražava u tetragenskom lokusu (abcd), manji je u trigenskom (abcc), zatim u digenskom (aaab, aabb, abbb), a najmanji u monogenskom (aaaa). Stoga je poželjan svaki sustav oplodnje autotetraploida kojim se povećava učestalost lokusa s multiplim alelima, jer se na taj način povećava prosječan heterozis.

Heterosis je zaslužan za veliko povećanje prinosa po jedinici površine i jedan je od najvećih praktičnih doprinosa biljne genetike povećanju poljoprivredne proizvodnje. Fenomen heterozisa u oplemenjivanju se koristi u hibridnim kultivarima, sintetičkim kultivarima, klonskom oplemenjivanju i populacijskom oplemenjivanju.

Literatura

Chaplin, J.F. 1966. Comparative performance of F₁ flue-cured tobacco hybrids and their parents. I. Agronomic and quality characteristics. Tob. Sci. 10:126-130.

- Falconer, D.S. 1989. Introduction to Quantitative Genetics. Longman, Harlow, 3rd edn.
- Hallauer, A.R., Miranda, J.B. 1981. Quantitative genetics in maize breeding. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa.
- Savolainen, O., Hedrick, P. 1995. Heterozygosity and fitness: no association in Scots pine. *Genetics* 140:755-766.
- Sprague, G.F. 1983. Heterosis in maize: theory and practice. *Monogr. Theor. Appl. Genet.* 6:47-70.
- Xiao, J., Li J., Yuan, L., Tanksley, S.D. 1995. Dominance is the major genetic basis of heterosis in rice revealed by QTL analysis using molecular markers. *Genetics* 140:745-754.

5. Izvori genetičkog variranja

Variranje kao temelj oplemenjivanja

Individue jedne skupine unutar kultivirane vrste karakterizira raznolikost njihovih svojstava. Biljke se u jednoj populaciji, makar bila čista linija, međusobno razlikuju u izražavanju svojstava, tim više što je veća genetička raznolikost među individuama. Čak i ako su individue genetički identične, među njima mogu postojati stanovite fenotipske razlike. Razlike mogu biti morfološke (veličina i oblik ploda, lista ili stabljike), zatim fiziološke, fenološke, razlike u sadržaju kemijskih tvari, otpornosti na bolesti i mnogim drugim svojstvima. Prema tome, variranje je pojava razlika u izražavanju svojstava između individua jedne populacije ili između populacija. Opseg variranja veoma je širok. S obzirom na način nastanka, razlikuje se nenasljedno ili okolinsko i nasljedno uvjetovano variranje.

Nenasljedno variranje je variranje fenotipskih svojstava biljke kao posljedica reagiranja na uvjete okoline u kojoj se individue razvijaju. Razlike se očituju u bilo kojem vanjskom svojstvu. Okolinska variranja najlakše se uočavaju usporedbom biljaka u genetički ujednačenoj populaciji. Jedna sorta duhana vinove loze prilagođena na uvjete Dalmacije dat će potpuno drugačiju sirovinu i drugačije vino u kontinentalnim uvjetima. Cvijet hortenzije u kiseloj sredini ima plavu, a u alkalnoj sredini crvenu boju cvijeta. Dvije biljke jedne iste linije u jednoj okolini oboljet će od neke bolesti na koju je ta linija osjetljiva ako je prisutan patogen i ako su povoljni vanjski uvjeti, dok će u drugom slučaju biljke ostati zdrave.

Ako usporedimo biljke na parceli, zapaziti ćemo da su one na rubnim dijelovima robusnije, i imaju viši prinos. To je rezultat povoljnijih uvjeta uzgoja i većeg vegetacijskog prostora. Posijemo li sljedeće godine sjeme tih biljaka i onih iz sredine parcele, vidjet ćemo da u potomstvu nema razlike. Stoga u selekciji za prinos treba izbjegavati odabiranje biljaka iz rubnih redova budući da veća robusnost tih biljaka može zavarati. Naime, izborom u genetički ujednačenoj populaciji ne mogu se dobiti linije koje se razlikuju u reagiranju na uvjete okoline.

Sve te promjene na biljnom fenotipu koje su nastale kao posljedica djelovanja vanjskih činitelja, prolazne su modifikacije te se ne prenose na potomstvo.

Nasljedno variranje, s druge strane, obuhvaća promjene morfoloških, fenoloških, kemijskih ili bilo kojih drugih svojstava kao rezultat djelovanja genetičkih činitelja, a prenose se na potomstvo. Te promjene mogu biti jednostavne i lako prepoznatljive: npr. u boji i obliku ploda, boji cvijeta, otpornosti na patogene, ili mogu biti složene kao što je variranje u prinosu, vigoru biljnog razvoja ili kvaliteti proizvoda. Nasljedne promjene u biljkama u prirodnim uvjetima nastaju kao rezultat genskih rekombinacija, variranja u broju kromosoma i mutacija. Te promjene lako se otkrivaju nakon razmnožavanja.

Ponekad se dogodi da učinci okoline maskiraju genetičke razlike. U kukuruzu se npr. povremeno pojave mutantne biljčice s nedostatkom klorofila, ali će se razlike između normalnih i mutantnih biljčica pojaviti samo ako se uzgajaju na suncu (Poehlman i Sleper, 1996.).

Genetičko variranje u agronomskim svojstvima nužan je preduvjet u oplemenjivanju. Bez toga nema napretka u oplemenjivačkom radu. Stoga je veoma važno održavati dovoljnu razinu variranja u oplemenjivačkom materijalu. To se odnosi na razvoj kultivara bilo kojom metodom, a posebno u razvoju hibridnih kultivara, budući da je heterozis obično izraženiji u hibridima između linija koje su genetički različite.

Hibridizacija

Hibridizacija predstavlja cjelokupnu aktivnost oplemenjivača na križanju roditelja različite genetičke konstitucije rezultat čega će biti potomstvo s novim genskim kombinacijama. Cilj je hibridizacije formiranje genetički varijabilnih populacija iz kojih će se odabirati genotipovi za razvoj novih poboljšanih kultivara. Hibridizacijom se i naknadnom selekcijom u pojedinačnim genotipovima kombiniraju pogodni geni iz jednog ili više roditeljskih genotipova.

Za uspješno provođenje oplemenjivačkog programa od posebnog je značenja precizno i djelotvorno izvođenje umjetne hibridizacije; tek se križanjem pogodnih roditelja mogu razviti populacije iz kojih se izdvajaju nove vrijedne kombinacije ili transgresivni segreganti. Za djelotvornu hibridizaciju nužno je poznavanje reproduktivnih struktura, odnosno biologije cvijeta, razvoj vrste i kultivara s kojima se radi, te vanjskih uvjeta potrebnih za cvatnju, oplodnju i razvoj sjemena.

Za sve aspekte umjetne hibridizacije postoji veliko variranje između vrsta kao i između kultivara unutar vrste. Prvi korak umjetne hibridizacije je odabir odgovarajućih cvjetova ženskog roditelja u vrijeme dostupnosti pogodnog polena očinske biljke. Prirodno slaganje vremena cvatnje partnera u križanju olakšava provođenje križanja. Iz iskustva je poznato da se najbolji rezultati postižu oplodnjom u normalnom vremenu cvatnje glavnog izdanka, a polen je funkcionalno najsposobniji u vrijeme glavne cvatnje.

Ako roditelji ne cvjetaju u isto vrijeme, moraju se primijeniti odgovarajući postupci za usklađivanje vremena cvatnje. To se provodi različitim vremenom sjetve, manipuliranjem dužine dana, manipuliranjem temperaturama, podsijecanjem ranijeg roditelja, odstranjivanjem vršnih cvjetova ili mijenjanjem činitelja rasta. Moguće je također polen ranije cvjetajućih roditelja održati funkcionalnim do cvjetanja drugog roditelja.

Važnu ulogu u hibridizaciji imaju klimatski činitelji. Najkritičniji klimatski činitelj koji utječe na uspjeh hibridizacije jest temperatura. Temperatura regulira brojne procese rasta i razvoja odlučujuće za oprašivanje, oplodnju i razvoj sjemena i ploda. Veoma se malo cvjetnih pupova razvije ispod 5°C, a na 10°C kod nekih je vrsta mikrosporogeneza pet puta sporija nego na 25°C. Ispod 10°C antere slabo pucaju, klijanje polena je nisko, a polenove cijevi rastu sporo. Problem niskih temperatura i njihovog utjecaja na cvatnju i oplodnju posebno je istaknut u voćnim vrstama, budući da mnoge od njih cvjetaju u rano proljeće pa mogu nastati oštećenja zbog proljetnih mrazova. Stoga je za križanje bolje sačekati porast temperatura, ili na neki način zaštititi cvjetove koji će se oprašivati odnosno, ako je to moguće, umjetno povećati temperaturu.

Visoke temperature (iznad 30°C) imaju također štetan učinak na hibridizaciju. Pri višim temperaturama cvjetovi se brže otvaraju što povećava mogućnost neželjene oplodnje i gubitak prijemčivosti njuške tučka. Temperature između 15 i 25°C u pravilu su optimalne za kontroliranu hibridizaciju većine kultiviranih vrsta.

Drugi klimatski činitelji, kao što su relativna vlaga, vjetar ili oborine, također utječu na uspjeh hibridizacije. Visoka vlaga ima prednost jer produžava period prijemčivosti tučka, a niska ga isušuje što može prouzročiti gubitak prijemčivosti žiga tučka i gubitak vijabilnosti polena ili tučka. Hladni, kao i vrući, vjetrovi mogu biti pogubni za uspjeh hibridizacije, dok lagani ili mirni vjetrovi djeluju pozitivno u kontroliranoj hibridizaciji. Vjetar može utjecati na neželjenu kontaminaciju polenom ukoliko izolacija nije bila dobra.

Kad se obavi izbor roditelja koji će se međusobno križati, jedan od njih, onaj na kojem će se provesti križanje označi se kao ženski. U najvećem broju slučajeva nije bitno koji se roditelj koristi kao majka, a koji kao otac. Međutim, ponekad je to važno. Izbor roditelja mora se brižljivo planirati. To je posebno važno u međuvrsnim križanjima, jer je među njima često potrebno provesti recipročno križanje. U međuvrsnim križanjima obično divlja vrsta služi kao ženski roditelj.

Ako se pak želi ocijeniti u F_1 generaciji jesu li križanja uspjela, onda se za oca odabira sorta s jednim ili više lako prepoznatljivih svojstava. Ako je križanje uspjelo, ta svojstva će se izraziti u potomstvu, a ako je slučajno došlo do samooplodnje, tih svojstava neće biti u potomstvu.

Općenito se roditelj s većim vigorom i najpogodnijim svojstvima bira kao majčinski partner. Ako je od jednog roditelja prisutno malo biljaka on služi kao izvor polena. Na majčinskoj biljci biraju se za križanje cvjetovi koji će najsigurnije dati sjeme (glavna stabljika u žitarica, donji cvijet u grašku i grahu). Odstranjuju se oni cvjetovi ili cvatovi koji u prirodnim uvjetima lako ostaju prazni ili postoji mogućnost odbacivanja ploda.

Tehnika izvođenja hibridizacije

Pripremanje majčinskog cvijeta za križanje podrazumijeva sprječavanje samooplodnje ili pak neželjene stranooplodnje. U dvospolnim cvjetovima potrebno je uklanjanje prašnika ako se koriste kao ženski roditelj. Prašnici se odstranjuju ručno ili se polen inaktivira odgovarajućim tretmanom. Odstranjivanje prašnika mora se provesti pravodobno da se spriječi samooplodnja. Kastrirani se cvjetovi do oprašivanja izoliraju na odgovarajući način (prekrivač, vrećica) da se zaštiti tučak od neželjene stranooplodnje. Ponekad je potrebno prije uzimanja polena za oprašivanje, izolirati i očinske cvjetove da vjetar ili insekti ne bi na njega prenijeli strani polen.

Kastriranje ne predstavlja poteškoću kod biljaka s većim cvijetom kao što su krumpir, repica, duhan, leguminoze i mnoge voćne vrste. Teže je odstranjivanje prašnika u biljkama malog cvijeta poput trava, nekih leguminoza ili vinove loze. Kastriranje bi trebalo provesti u potpuno razvijenom cvijetu, pošto su tada svi organi veći i bolje formirani. Kastriranje se obavlja podesnim instrumentima, primjerice rezanjem škarama. Mora se uvijek paziti da ne ostane još koji neodstranjen prašnik. Ako cvijet sadrži samo ženski organ, kao u muško sterilnim biljkama, kastriranje je nepotrebno. U tom slučaju cvijet se samo zaštiti od neželjene oplodnje. Kastrirani i izolirani majčinski cvijet kod nekih vrsta oprašuje se odmah, a kod drugih nakon jedan do dva dana, ovisno o vrsti. U pšenici se npr. polen nanosi obično dva dana nakon kastriranja, u vinovoj lozi 2 – 4 dana, a u većini voćnih vrsta 1 – 2 dana nakon emaskulacije.

Ako oplodnjom nastaje velika količina sjemena, kao u duhanu, rajčici ili krumpiru, dovoljan je manji broj križanja, tim prije što F_1 biljke također imaju puno sjemena. Na taj se način lako održava brojna F_2 generacija. Ako iz jednog oprašivanja nastaje samo jedna ili manji broj zigota (žita, leguminoze), mora se provesti veći broj križanja. U takvim se vrstama čak može provesti kloniranje F_1 biljaka. Na taj način moguće je uzgojiti opsežnu F_2 generaciju za uspješnu selekciju.

Oprašivanje se obavlja nanošenjem polena na žig tučka majčinske biljke. Način oprašivanja ovisi o vrsti s kojom se radi. Provodi se cijelim cvijetom ili se prethodno skupljeni polen nanese na tučak četkicom ili nekim drugim pogodnim sredstvom. U strnim žitaricama najčešće se primjenjuje tzv. CYMMIT metoda oprašivanja spajanjem klasova.

Nazvana je tako po međunarodnom institutu u Meksiku gdje je najprije i primijenjena. Ako se skupljeni polen neće upotrijebiti odmah moguće ga je čuvati kraće vrijeme u eksikatoru ili hladnjaku. Nakon oplodnje cvijet se mora zaštititi da ne bi došlo do slučajnog nanošenja stranog polena te da ne dođe do isušivanja oprašenog tučka. Kod nekih vrsta nije potrebna zaštita.

Nakon provedenog križanja na cvijet se stavlja oznaka da se zna što se upotrijebilo u križanju. Na tu se oznaku upisuje ime majke zatim ime oca, datum oprašivanja, eventualno ime osobe koja je obavila križanje. Selekcioner ponekad dodaje i neke svoje opaske. Obilježavanje mora biti jasno i precizno da se može pratiti pedigree sa svim bitnim podacima o precima kultivara. Inače, samo križanje oduzima oplemenjivaču manje vremena od bilo koje druge pojedinačne operacije u provođenju oplemenjivačkog programa.

Kad god je moguće za križanje će se upotrijebiti roditelji koji su homozigotni, barem za svojstva koja se žele kombinirati. U samooplodnim vrstama stoga se upotrebljavaju uglavnom čiste linije, a u stranooplodnim što je moguće više inbred linije. Ako se kao roditelji u križanju upotrijebe heterozigoti, tada će odabiranje poželjnih genotipova početi već u F₁ generaciji.

Formiranje populacije hibridizacijom

Prvi korak u razvoju novog kultivara, bez obzira koja se oplemenjivačka metoda primjenjuje, jest formiranje genetički varijabilne oplemenjivačke populacije. Takve populacije najčešće se formiraju križanjem genetički različitih roditelja, odnosno hibridizacijom. Na taj se način postižu različite genske kombinacije, što je osnovni preduvjet nastanka superiornih genotipova u potomstvu. Postoje različite metode križanja, a o tome u značajnoj mjeri ovisi provođenje selekcijskog postupka i uspjeh u oplemenjivanju.

Najjednostavnija je i najčešće primjenjivana metoda križanja **dvojno** (dvolinijsko) **križanje**. U takvom se križanju za formiranje populacije koriste dva roditelja: P1 x P2. Takav način križanja naziva se jednostavno ili jednostruko križanje (single cross). Potomstvo ovakvog križanja upotrebljava se izravno kao novi kultivar (F₁ hibrid), kao početni materijal za križanje s drugim kultivarima ili populacijama, ili kao populacija za izbor novih genotipova. Svaki roditelj u ovakvom križanju prenosi potomstvu po 50% gena. Ako su kombinirani roditelji s dobrim svojstvima, koji nemaju mnogo nepovoljnih svojstava, izborom u generacijama razdvajanja relativno se lako i brzo razvije novi kultivar. Velikim dijelom to također ovisi i o načinu nasljeđivanja traženog svojstva. Međutim, ukoliko je jedan roditelj intenzivan a drugi ekstenzivan, ne mogu se u potomstvu očekivati genotipovi superiorniji od intenzivnog roditelja.

Sljedeći način križanja je **trojno križanje**, u kojem se za formiranje populacije koriste tri roditelja: (P1 x P2) x P3. Ova metoda hibridizacije primjenjuje se ako se u dva roditelja ne može naći dovoljno varijabilnosti za određeno svojstvo. U ovom slučaju roditelji P2 i P3 obično su kvalitetni kultivari, ali im nedostaje neko korisno svojstvo koje treba prenijeti iz roditelja P1.

Ako je P1 ekstenzivni kultivar, onda se u križanju on kao roditelj upotrebljava prvi, a intenzivni kultivar, tj. onaj koji ima najveći broj pozitivnih svojstava, treba biti zadnji. Ekstenzivni roditelj tada unosi u potomstvo svega 25% svoje nasljedne osnove, dok intenzivni kultivari sudjeluju ukupno sa 75%:

$$\begin{array}{ccc} (P1 & \times & P2) & \times & P3 \\ 25\% & 25\% & 50\% \end{array}$$

Zbog toga je u metodi trojnog križanja najvažniji izbor zadnjeg roditelja, onog koji u potomstvo unosi najviše svoje nasljedne tvari.

Potomstvo trojnog križanja može se upotrijebiti izravno kao novi komercijalni kultivar. To se ponekad prakticira u proizvodnji kukuruza i šećerne repe. Međutim, kako ovi hibridi nisu potpuno ujednačeni, a razina heterozisa manja je nego u dvojnim hibridima, oni se rjeđe koriste u komercijalnoj proizvodnji.

Da bi se u populaciji postigla dovoljna varijabilnost nekad je potrebno kombinirati četiri roditelja. Ta metoda križanja naziva se **četverolinijsko ili dvostruko križanje** (double cross). Četverolinijsko križanje provodi se na dva načina. U prvom se međusobno križaju dva dvolinijska hibrida: $[(P1 \times P2) \times (P3 \times P4)]$. U tom slučaju svaki roditelj unosi u potomstvo po 25% svoje nasljedne osnove. Drugi način križanja četiri roditelja je postupno križanje, $[(P1 \times P2) \times P3] \times P4$ kad se za formiranje populacije u križanje postupno uvode novi roditelji. To križanje provodi se u tri generacije, a predstavlja se i na sljedeći način: $P1 \times P2$; $F_1 \times P3$; $F_1 \times P4$. Doprinos je pojedinog roditelja u ovoj populaciji sasvim drugačiji od prvog postupka. $P1$ i $P2$ unose u populaciju po 12,5% svoje germplazme, $P3$ sudjeluje s 25%, a zadnji roditelj $P4$ s 50%. U ovakvom načinu križanja također je veoma važno da se u križanju kao zadnji roditelj upotrijebi kultivar sa što više pozitivnih svojstava.

Četverolinijski hibridi koji nastaju križanjem dva F_1 hibrida, također se upotrebljavaju kao komercijalni kultivari. Takvi se hibridi ponekad primjenjuju u proizvodnji kukuruza.

U formiranju početne populacije u oplemenjivačkim programima moguće je kombinirati više od četiri roditelja. Takva križanja nazivaju se **složena križanja**. Ona se izvode najčešće u cilju poboljšanja populacije rekurentnom selekcijom, u razvoju sintetičkih kultivara, te u ispitivanju kombinacijskih svojstava novih linija. U složenim križanjima broj mogućih alela u populaciji za svaki lokus povećava se s brojem upotrijebljenih roditelja. Uz to, veća je vjerojatnost za heterozigotnost na multiplim lokusima. Način kombiniranja roditelja u složenim križanjima ovisi o broju roditelja, raspoloživom vremenu za formiranje populacije i doprinosu koji bi svaki roditelj trebao dati populaciji. Sa svakim dodatnim roditeljem u križanju povećava se broj različitih alela u populaciji, ali se istodobno produžava vrijeme za razvoj oplemenjivačke populacije.

Formiranje populacije križanjem osam roditelja prikazuje se na sljedeći način:

$$[(P1 \times P2) \times (P3 \times P4)] \times [(P5 \times P6) \times (P7 \times P8)]$$

Svaki roditelj upotrijebljen u ovakvom križanju unosi u novu populaciju po 12,5% svoje nasljedne osnove.

Jedan od postupaka složenog križanja je i lančano križanje:

$$P1 \times P2, P2 \times P3, P3 \times P4, P4 \times P5, \dots, P_n \times P1$$

Tablica 5. Broj međukrižanja prema broju roditelja

Broj roditelja	Broj generacija međukrižanja
3-4	2
5-8	3
9-16	4
17-32	5

Prije nego započne izbor odgovarajućih individua iz populacije nastale složenim križanjem, potrebno je provesti određen broj međukrižanja kako bi se stvorila mogućnost da se u pojedinim individuama nađe što više gena iz svih roditelja, te da se razbiju eventualni vezani blokovi. Broj međukrižanja ovisi o broju roditelja koji sudjeluju u formiranju populacije (tablica 5).

Jedna od metoda složenog križanja je **dialelno križanje** (tablica 6) koje se primjenjuje kada se žele ispitati kombinacijske sposobnosti i vrijednost novih linija ili kultivara. U dialelnom križanju upotrebljava se različit broj roditelja. Izvodi se tako da se svaki roditelj križa sa svakim drugim u populaciji. Dialelno križanje može biti djelomično ili potpuno koje se dobije ako se roditelji međusobno križaju i recipročno (npr. P2P1).

Tablica 6. Djelomična dialelna metoda križanja s pet roditelja

	P1	P2	P3	P4	P5
P1		P1P2	P1P3	P1P4	P1P5
P2			P2P3	P2P4	P2P5
P3				P3P4	P3P5
P4					P4P5
P5					

Broj mogućih kombinacija u dialelnom križanju izračunava se po formuli

$$\frac{n(n-1)}{2}$$

u čemu je n broj genotipova koji se križaju. Dialelnim se križanjem ispituje oplemenjivački materijal ranim testiranjem da bi se predvidjelo ostvarenje potomstva prije nego se završi postupak razvoja linija.

Formiranje populacije moguće je provesti nakon jedne ili više generacija međukrižanja što se provodi pomoću **polycross** metode. To je postupak međukrižanja roditelja a primjenjuje se često u vegetativno razmnožavanim vrstama. Cilj je ove metode ujednačenje međukrižanje roditelja čime se postiže sličan genetički doprinos od svakog roditelja u formiranju populacije.

Raspored roditelja u polycross metodi može biti po shemi latinskog kvadrata i randomiziranog blokno sustava. U polycross postupku svaki roditelj ima istu mogućnost križanja sa svakim drugim roditeljem pa se prakticira za stranooplodne vrste. Broj roditelja u polycross križanju je različit, a shema jednog latinskog kvadrata polycross postupka s pet roditelja predstavlja se na sljedeći način:

P1	P2	P3	P4	P5
P3	P4	P1	P5	P2
P4	P1	P2	P3	P5
P5	P3	P4	P2	P1
P2	P5	P3	P1	P4

Svi opisani postupci križanja pripadaju metodama divergentnog križanja, što podrazumijeva križanje genetički različitih roditelja u cilju dobijanja novih rekombinacija. Za razliku od tih postupaka konvergentno križanje predstavlja unošenje nekog posebnog gena u drugi kultivar. To se postiže uglavnom povratnim križanjem.

Povratno križanje je križanje potomstva F_1 generacije s jednim od roditelja: (**P1 x P2**) x **P1**. Ono je oblik rekurentne hibridizacije, a najviše se koristi kad se u neki, inače dobar, kultivar treba unijeti jedno svojstvo, te zadržati sva ostala svojstva tog istog kultivara. Genotip koji daje nedostajući gen za traženo svojstvo, naziva se donor, davatelj ili nerekurentni roditelj. On se u cijelom postupku križanja upotrebljava samo jednom. Genotip u koji se traženi gen prenosi, zove se primatelj, recipijent ili rekurentni roditelj. On se u toku križanja koristi više puta.

Sa svakim se povratnim križanjem povećava udio germplazme rekurentnog roditelja (tablica 6), tako da će potomstvo nakon šest povratnih križanja, sadržavati 98.4% germplazme rekurentnog roditelja, i uz gene za traženo svojstvo. Ako pak donor ima suviše negativnih svojstava uz pozitivne koje treba unijeti u rekurentni roditelj, ili se od njega razlikuje u većem broju svojstava, primjenjuje se više od šest povratnih križanja da bi se obavila potpuna restitucija rekurentnog roditelja.

Način izvođenja povratnog križanja dijelom je određen genetikom svojstva koje se dodaje. Ako je svojstvo dominantno, potomstvo se odabira na pojedinačnoj bazi, a ako je recesivno, nužno je testiranje potomstva. Pravilno izveden program povratnog križanja omogućit će obnavljanje svih povoljnih svojstava rekurentnog roditelja.

Tablica 7. Postotak homozigotnih biljaka iz povratnog križanja

Broj gena s različitim alelima	Broj generacija povratnih križanja					
	1	2	3	4	5	6
1	50	75	88	94	97	98
2	25	56	77	88	94	97
5	3	24	51	72	85	92
10	0.1	6	26	52	73	85

Homozigotnost se za rekurentne alele u povratnom križanju povećava u istom obujmu kao u samooplodnji. Udio homozigotnih biljaka u bilo kojoj generaciji povratnog križanja izračunava se po formuli:

$$\left(\frac{2^m - 1}{2^m} \right)^n$$

u čemu je m broj generacija povratnih križanja s rekurentnim roditeljem, a n broj gena za koje rekurentni i nerekurentni roditelj imaju različite alele. Kako se povećanje razlika između roditelja odražava na postotak homozigotnosti prikazano je u tablici 22.

Povratno križanje se koristi za unošenje gena citoplazmatske muške sterilnosti u neku liniju. Moguće je povratiti fertilnost citoplazmatski muško sterilne linije ako se obavi križanje s vrstom iz koje je unijeta sterilnost. Prijenos se gena iz divlje u adaptiranu germplazmu provodi postupkom povratnog križanja.

Hibridizacija je postala nezaobilazan postupak u različitim oplemenjivačkim programima. Procjenjuje se da je oko 75% svih kultivara rezultat hibridizacije na razini vrste, roda ili familije (Simmonds, 1979.). Koji će se postupak hibridizacije primijeniti, ovisi o oplemenjivačkoj metodi koja će se upotrijebiti, cilju koji se oplemenjivanjem želi postići, vrsti germplazme s kojom se radi, kao i tehničkim mogućnostima u izvođenju hibridizacije.

Međuvrsna hibridizacija

Unutar kultivirane vrste često se za određeno svojstvo ne može naći gen ili dovoljno genske varijabilnosti. Stoga se taj gen nastoji pronaći i unijeti iz drugih srodnih ili čak nesrodnih vrsta. Križanje između različitih vrsta naziva se međuvrsna (interspecies) hibridizacija. Divlji srodnici koristan su izvor agronomskih svojstava u oplemenjivanju kultiviranih vrsta. Za pšenicu se npr. rod *Agropyron* koristi kao izvor gena za otpornost na bolesti, sušu ili hladnoću.

Već dugo je poznato da se jedan broj vrsta unutar istog roda (interspecies) međusobno uspješno križa, dok je križanje između rodova (intergenus) znatno teže. Takvi hibridi su iznimno rijetki. U oplemenjivanju kultiviranih vrsta divlja se germplazma najčešće koristi za povećanje otpornosti na bolesti i štetnike, zatim u poboljšanju tolerantnosti na okolinske stresove, poboljšanju kemijskog sastava (izmjena sadržaja nekih kemijskih komponenata) u kvantitativnom i kvalitativnom pogledu, ali i za druge ciljeve.

Prije započinjanja postupka križanja treba provjeriti ima li nekih drugih blisko srodnih izvora za tražene gene pa ih pokušati iskoristiti. Korisno je također znati hoće li i kako novi geni biti izraženi u adaptiranoj germplazmi. Valja predvidjeti eventualne posebne postupke za prijenos gena kao što je kultura tkiva, premoštenje ili genska transformacija.

Nakon toga pravi se plan hibridizacije i izbor roditelja. Dobro je imati što veći broj roditelja iz klimatskih različitih područja koji su ispitani na svojstva koja nas zanimaju. Potrebno je usto prikupiti što više informacija o genetičkim, fiziološkim, agronomskim i fitopatološkim karakteristikama potencijalnih roditelja, te eventualnim posljedicama donora na genetičku bazu recipijenta. Na taj se način odabiru pogodni partneri za hibridizaciju.

Svojstvo koje se želi unijeti, najprije se traži u blisko srodnim vrstama koje pripadaju tzv. primarnom genskom skupu (primary gene pool). U toj su skupini biljaka obično srodne sistematske jedinice među kojima je moguće križanje i dobivanje vijabilnog sjemena kao i fertilnog potomstva bez posebne tehnike. Ako se takvi roditelji ne nađu u primarnom genskom skupu onda se traže u sekundarnom, ili, eventualno, tercijarnom, u kojem je vjerojatnost oplodnje mnogo manja.

Da bi prijenos gena iz jedne vrste u drugu bio uspješan, potrebno je najprije ostvariti fertilno F_1 potomstvo ili njegovo potomstvo s drugim roditeljem, te iz tog potomstva daljim selekcijskim radom razviti odgovarajući genotip. Naime, međuvrsnim se križanjima u kultiviranu vrstu iz divlje vrste unose obično i neka neželjena svojstva koja selekcijskim postupkom treba postupno eliminirati. To se najčešće radi serijom povratnih križanja.

Zbog različitih prepreka koje treba prevladati križanje između različitih vrsta teže je provesti nego križanje unutar iste vrste. Te prepreke mogu biti morfološke, fenološke, fiziološke ili genetičke naravi. Prva je moguća prepreka vrijeme cvatnje. U vrijeme križanja roditelji moraju biti u istoj fazi cvatnje i što je period cvatnje ujednačeniji očekuje se veći uspjeh u križanju. Vrijeme cvatnje usklađuje se različitim postupcima koji su već navedeni u hibridizaciji unutar vrste.

Genetičke prepreke koje treba prevladati za stvaranje fertilnog potomstva u međuvrsnom križanju, mogu biti predzigotne i postzigotne, tj. one koje se javljaju prije oplodnje i nakon oplodnje. U prvom slučaju nema oplodnje. To može biti posljedica slabog ili nikakvog klijanja polena na njušci tučka, sporog rasta polenove cijevi ili nekog drugog uzroka koji onemogućuje mušku gametu da se spoji s jajnom stanicom. Ove barijere prevladavaju se recipročnim križanjem, promjenom razine ploidijske roditelja s manjim brojem kromosoma ili miješanjem polena jedne kompatibilne vrste s inkompatibilnim roditeljem. Da bi se postpjelo

klijanje polena i rast polenove cijevi, upotrebljavaju se regulatori rasta, a korisno bi bilo povećati i broj križanja da bi se povećala vjerojatnost oplodnje.

Ako oplodnja i uspije, moguće je da se nakon toga pojave različite poteškoće, među kojima su nemogućnost razvoja hibridnog sjemena, slab vigor i razvoj hibridne biljke, djelomična ili potpuna sterilnost F_1 hibrida ili, pak, poremećaji u razvoju kao i fertilitnosti kasnijeg potomstva. Za prevladavanje tih poteškoća primjenjuje se recipročno križanje, poseban izbor roditelja, razvoj embrija na aseptičnom mediju i kasnija regeneracija, ili cijepljenje.

U mnogim je slučajevima bolja ili slabija uspješnost određene individue u međuvrsnim križanjima nasljedno uvjetovana. Isto tako u križanju manje bliskih formi uspjeh često ovisi o tome koji se roditelj upotrijebio kao otac, a koji kao majka. Recipročne razlike rezultat su morfoloških, fizioloških ili genetičkih činitelja. Uvijek se za ženskog roditelja bira linija s kraćim tučkom, jer je tada polenovu zrnu lakše doprijeti do embrijske vrećice.

Različit broj kromosoma je najčešći uzrok različitog uspjeha u recipročnom križanju. Tkivo vrata tučka ima somatski broj kromosoma ($2n$), a polenovo zrno je haploidno (n) pa je prilikom samooplodnje ili križanja biljaka s istim brojem kromosoma taj odnos 2:1. U križanju roditelja s različitim brojem kromosoma takav odnos se mijenja što stvara poteškoće u oplodnji. U tom slučaju prije poduzimanja križanja korisno je znati kako se koja vrsta ponaša. U većini se slučajeva bolji rezultati postižu ako je vrsta s većim brojem kromosoma upotrijebljena kao majka, ali je u nekim križanjima bolji rast polenove cijevi ako otac ima veći broj kromosoma. Ima vrsta (kupusnjače) u kojima nema razlika u recipročnim križanjima.

Uzroci besplodnosti ili potpune sterilnosti međuvrsnih F_1 hibrida u većini su slučajeva poremećaji tijekom redukcijske diobe, a to je posljedica nepravilnog sparivanja kromosoma ili prisutnosti nehomolognih kromosoma u hibridu. Veliki dio interspecies i intergenus hibrida su sterilni, no jedan mali dio ovih biljaka ima embrijsku vrećicu sposobnu za razvoj. Tako je npr. u hibridnom potomstvu dobivenom križanjem *Aegilops* x *Triticum* nađeno 0,33%, a u hibridima rodova *Triticum* x *Secale* 0,06% embrijskih vrećica sposobnih za razvoj. Stoga je dobro imati što veći broj međuvrsnih križanja i što veće potomstvo.

Da bi se dobili hibridi između vrsta s različitim brojem kromosoma, nekad je potrebno u vrsti s manjim brojem kromosoma taj broj udvostručiti. Takvi autotetraploidi mogu stvoriti hibride s drugim vrstama koje inače kao diploidi ne mogu postići.

Interspecies i intergenus F_1 hibridi su uglavnom kao i oni međulinijski, potpuno ujednačeni. Ako roditelji nisu u svim svojstvima homozigotni, u tom slučaju se u F_1 generaciji pojavljuje dva ili više različitih genotipova. U F_1 hibridima između različitih vrsta česta je pojava luksuriranja, tj. pojačanog vegetativnog vigora, kada su biljke, u cjelini ili pojedinim organima, bujnije i bolje razvijene od roditelja. Takvi hibridi često imaju ubrzaniji rast, raniju cvatnju i zriobu. Rjeđi su slučajevi da su međuvršni F_1 hibridi slabiji od oba roditelja.

Potomstvo potpuno fertilnih međuvrsnih F_1 hibrida čiji roditelji imaju homologne genome, ne razlikuje se po svojim genetičkim svojstvima i po načinu razdvajanja od običnih međulinijskih hibrida. Kako se roditelji u pravilu razlikuju u mnogim svojstvima, u F_2 generaciji najčešće nastaje veliko razdvajanje, tako da je u potomstvu teško naći dvije identične biljke. Česta je i pojava transgresije u međuvrsnim križanjima.

Do sada je stvoreno malo međuvrskih hibrida koji su komercijalno upotrebljivi; iznimka je *Triticale* (pšenoraž). Međutim, brojni interspecies ili intergenus hibridi poslužili su kao oplemenjivački materijal za unošenje korisnih svojstava u komercijalne kultivare ili su križanjem dobijeni novi kultivari.. U vinovoj lozi su križanjem divljih vrsta s kultiviranom vrstom dobijeni kultivari stolnog grožđa. U razvoju novih kultivara rajčice i paprike često se koriste divlje vrste kao izvor korisnih gena, a slično je i u nekim voćnim vrstama.

U vrstama koje se razmnožavaju vegetativno, poremećaji u formiranju embrija i sterilnost hibridnog sjemena s komercijalnog stajališta nisu bitni. Hibridi takvih vrsta bez teškoća se komercijalno koriste, a negdje je to i prednost jer se formiraju plodovi bez sjemenki. Ako se, pak, samo jednim križanjem ostvari selekcijski cilj, takvi hibridi mogu se izravno razmnožavati dalje kao nove linije.

6. Ciljevi oplemenjivanja

Oplemenjivanje na prinos

Prinos je u većini slučajeva, najvažnije svojstvo jedne kultivirane vrste i prvi cilj oplemenjivanja. Prinos se fenotipski izražava u obliku morfoloških osobina i fizioloških funkcija, a s genetičkog stajališta prinos je složeno kvantitativno svojstvo čija realizacija u velikoj mjeri ovisi o uvjetima okoline u kojoj se određeni genotip uzgaja. Izražava se masom ili težinom proizvoda ostvarenog po jedinici površine. Prinos nekog genotipa povećava se poboljšanjem njegovog genetičkog potencijala ili stvaranjem povoljnijih vanjskih uvjeta za optimalnu realizaciju postojećeg potencijala

Potencijal prinosa obično se definira kao prinos komercijalnog proizvoda neke kulture kada voda i hranjiva nisu ograničavajući činitelji, a da pritom nema šteta od bolesti, štetnika ili abiotičkih stresova. Povećava se izborom za prinos *per se*, poboljšanjem komponenata prinosa, poboljšanjem morfoloških i fizioloških karakteristika biljke, te činitelja koji smanjuju gubitke prinosa.

Povećanje prinosa oplemenjivanjem moguće je postići se izborom u potomstvu križanja genotipova s komplementarnim genima. Iz toga mogu proizaći segreganti s transgresivnim svojstvima za prinos. Pojedinačne biljke se izabiru u ranim generacijama razdvajanja. Selekcija pojedinačnih biljaka za prinos na temelju vizualne ocjene nije pouzdano mjerilo, a izbor biljaka na temelju vaganja težine također ne pomaže puno zbog heterogenosti tla. U F₂ generaciji nije moguće provesti pouzdan izbor biljaka za kvantitativna svojstva poput prinosa. Stoga se biljke odabrane za viši prinos u ranim generacijama razdvajanja ocjenjuju za potencijal prinosa na temelju ostvarenja potomstva.

Potencijal prinosa povećava se poboljšanjem komponenata prinosa. Prinos svake kultivirane vrste zbirni je rezultat djelovanja više komponenata. Svaka komponenta je posebno svojstvo i obično ih je moguće poboljšati oplemenjivanjem. U žitaricama su komponente prinosa broj klasova po jedinici površine (X), broj zrna po klasu (Y) i prosječna težina zrna (Z) (Grafius, 1964.). Povećanjem jedne komponente povećava se ukupni prinos, uz uvjet da su druge dvije komponente stabilne. Utvrđene su značajne razlike između sorti za broj zrna po klasu i prosječnu težinu zrna (Major i sur., 1992.) što je dobar pokazatelj za poboljšanje tih svojstava oplemenjivanjem. Međutim, veoma se često događa da druge dvije komponente opadaju ako se jedna poveća.

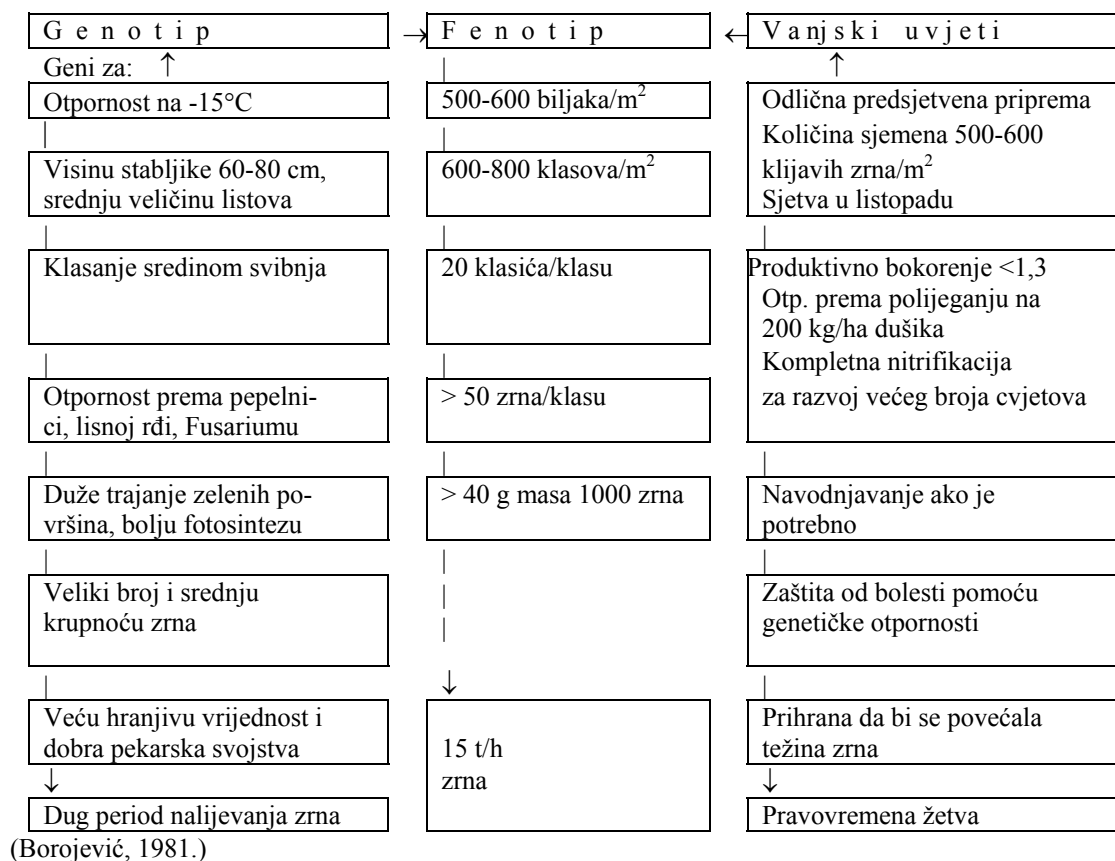
Tablica 8. Odnos prinosa i žetvenog indeksa među sortama pšenice u V. Britaniji (Cooke, 1981.)

Sorta	Godina uvođenja	Prinos zrna (t/ha)	Visina u cm	Žetveni indeks
Little Joss	1908	5,2	142	36
Holdfest	1935	5,9	126	36
Maris Hantsman	1972	7,8	106	46
Norman	1980	9,0	84	51

Oplemenjivači se u povećanju prinosa služe također metodom indirektne selekcije, kada se promjenom jednog svojstva potiče odgovarajuća promjena drugog. Ponekad se, naime, bolji uspjeh u oplemenjivanju postiže ako se provodi izbor za svojstvo koje je u

korelaciji sa svojstvom koje nas zanima nego izbor za samo svojstvo. Reagiranje na indirektnu selekciju ovisi o metodi selekcije, heritabilnosti indirektnog svojstva i korelaciji između direktnog i indirektnog svojstva.

Slika 7. Model razvoja visokoprinosnih sorti pšenice



Jedna od metoda povećanja prinosa zrna u žitaricama je promjena žetvenog indeksa (tablica 8). Žetveni indeks definira se kao odnos težine zrna prema težini ukupne biljne mase. Promjena se žetvenog indeksa postiže izmjenom arhitekture biljke, tj. skraćanjem stabljike. Skraćenje stabljike u pšenici postignuto je uvođenjem gena za polupatuljasti rast iz japanske lokalne sorte Norin 10. Za pšenicu se smatra optimalna visina stabljike 70 – 100 cm jer se količina biomase ispod te visine smanjuje brže nego što se povećava žetveni indeks. Viši žetveni indeks pokazatelj je biljne učinkovitosti, budući da više asimilata odlazi u zrno nego u ostale biljne dijelove, a povećanjem težine zrna u odnosu na slamu povećava se prinos pšenice. U praktičnoj selekciji, međutim, pojavljuje se poteškoća jer se taj odnos utvrđuje samo mjerenjem, i nije ga moguće ocijeniti vizualno.

Selekcija na povećani prinos provodi se i na bazi modela. U tom cilju najprije se napravi model ili ideotip biljke kakav bi trebao imati novi kultivar. Model predstavlja cjelovit fenotipski izgled kao i genetičku konstituciju novog genotipa. Uz to, također valja odrediti i uvjete okoline u kojoj će taj genotip optimalno realizirati svoje genetičke potencijale (slika 7). Novim saznanjima u biologiji, selekciji i agrotehnici mijenja se i model biljke. Oplemenjivački postupak ovisi o biljnoj vrsti i tipu kultivara. U razvoju linijskih kultivara u samooplodnim vrstama provodi se tako da se u F₂ generaciji obavlja izbor biljaka prema pretpostavljenom modelu i nastavlja dalja selekcija, najčešće pedigree metodom.

Selekcija na prinos prema tome ovisi o kultiviranoj vrsti, načinu upotrebe proizvoda od te vrste i uvjetima okoline u kojoj će se ona uzgajati. U ranim generacijama ispituje se veliki broj biljaka čije potomstvo valja testirati u širokoj mreži poljskih pokusa na različitim lokacijama. Posebno je važno da se pokusi provode u uvjetima u kojima će se budući kultivar uzgajati. Pri tom se provodi detaljna analiza svih elemenata koji utječu na povećanje genetičkog potencijala za prinos ili na djelotvornost proizvodnje.

Oplemenjivanje na kvalitetu

Kvaliteta proizvoda je bitno svojstvo kod većine kultiviranih vrsta. Često je i glavni cilj oplemenjivanja naročito kod voćaka i vinove loze. Kvaliteta ploda, sjemena, lista ili nekog drugog biljnog organa koji služi kao komercijalni proizvod, uglavnom je nasljedno uvjetovana. No ona je također pod jakim utjecajem uvjeta okoline. U oplemenjivanju na poboljšanu kvalitetu pažnja se usmjerava na fizička i kemijska svojstva proizvoda koja utječu na hranidbenu vrijednost, na prerađivačku vrijednost, te na iskorištavanje, odnosno upotrebu proizvoda.

Kvaliteta je, po načinu nasljeđivanja, složeno svojstvo. Oplemenjivanje u cilju poboljšanja kvalitete složenije je nego za druga jednostavna svojstva. Za većinu biljnih svojstava oplemenjivač uglavnom sam odabire odgovarajuće biljke iz cijepajućeg potomstva, dok se za oplemenjivanje na kvalitetu traži timski rad koji često uključuje prehrambene stručnjake i degustatore.

Nema univerzalne definicije kvalitete. Ona se obično definira kao pogodnost za uporabu pod pravilno određenim proizvodnim režimima. Zadatak je oplemenjivača prilagoditi potencijalnu kvalitetu proizvoda zahtjevima potrošača ili prerađivača.

Četiri su glavne skupine svojstava kvalitete prema načinu finalne uporabe:

- ✧ organoleptička svojstva (sa ili bez prerade), u koja spadaju okus, miris, boja, tekstura
- ✧ kemijska svojstva određuju se sadržajem važnijih kemijskih sastojaka u biljkama
primjerice ulje, šećer, bjelančevine, alkaloidi
- ✧ mehanička svojstva najčešće se ocjenjuju u nekim industrijskim vrstama (vlakna)
- ✧ biološka vrijednost proistječe iz sadržaja i odnosa pojedinih sastojaka biljke i biljnog proizvoda

Elementi kvalitete poljoprivrednih proizvoda dijele se na vanjske i unutarnje; kvaliteta se promatra i kroz biološku vrijednost. Vanjska svojstva su ona koja ocjenjujemo vizualno. To su boja, oblik, veličina ili opći izgled ploda, čistoća ili druga organoleptička svojstva. Unutarnja svojstva kvalitete određuje sadržaj pojedinih tvari bitnih za određeni proizvod kao npr. ugljikohidrati, bjelančevine, ulja, minerali, alkaloidi.

Struktura pojedinih sastojaka određuje biološku vrijednost proizvoda. U žitaricama je primjerice bitan aminokiselinski sastav bjelančevina. Preporučena minimalna razina lizina, kao najvrjednije aminokiseline za ljudsku ishranu, je 5 mg na 100 g bjelančevina (FAO 1991.). Većina žitarica ima sadržaj lizina znatno ispod te granice, pa je njihova hranidbena vrijednost za ljude i preživače niska, pogotovo što je nizak sadržaj i drugih visoko vrijednih aminokiselina (triptofan i treonin). Biološka vrijednost raži npr. veća je nego u pšenice, jer raž ima bolji aminokiselinski sastav bjelančevina.

Svojstva kvalitete proizvoda variraju s vrstom i njenom namjeravanom upotrebom. Uzmimo za primjer pšenicu, prehrambenu vrstu koja se prerađuje u mnoge proizvode. Osnovna uporaba pšenice je za mljevenje u brašno za kruh ili za kolače, kekse i tjestenine. Pojedine vrste proizvoda iziskuju genetički različite tipove i kultivare pšenice uzgajane u

različitim uzgojnim područjima i obrađene različitim postupcima. Prema genotipu kultivara pšenice obično se određuju i postupci mljevenja i način upotrebe brašna. Slično tome, druge kultivirane vrste imaju određene zahtjeve u pogledu kvalitete pa je razvoj kultivara sa boljom kvalitetom važan cilj svakog oplemenjivača. Kod voća su npr. glavna svojstva kvalitete ploda boja, čvrstina, okus, suha tvar, sadržaj pigmenata, sadržaj šećera ili nekog drugog sastojka.

Tablica 9. Poboljšanje kvalitete kod nekih kultiviranih vrsta

Kultivirana vrsta	Ciljano svojstvo
Kukuruz, soja	Bjelančevine, ulje (sadržaj, sastav)
Pšenica	Sadržaj bjelančevina
Ječam	Kvaliteta slada
Krumpir	Sadržaj suhe tvari
Vinova loza	Sadržaj šećera, kiselina, okus
Voćne vrste	Osobine ploda, okus

Svaka kultivirana vrsta ima svoje specifičnosti u pogledu izražavanja kvalitete o čemu valja voditi računa u provođenju oplemenjivačkog programa (tablica 8). Dobra ilustracija za to su neke leguminoze koje sadrže tzv. antihranidbene činitelje u relativno maloj količini. Ti činitelji imaju važnu ulogu u otpornosti na bolesti i štetnike i prilagođavanju na nepovoljne vanjske uvjete, ali smanjuju probavljivost i pogoršavaju okus u potrošnji. Genetička analiza pokazala je da su mnogi od njih pod kontrolom pojedinačnih gena, što znači da ih je oplemenjivanjem moguće smanjiti i tako poboljšati hranidbenu vrijednost proizvoda (McPhee i Muehlbauer, 1991.).

Oplemenjivački postupak koji se primjenjuje u selekciji na svojstva kvalitete ovisi o vrsti i karakteru kvalitete. Ako je kvaliteta uvjetovana samo jednim jednostavnim svojstvom, kao boja cvijeta, tada se to svojstvo lako postiže izborom u ranijim generacijama razdvajanja, primjerice pedigre metodom ili nekim drugim sličnim postupkom. Ako je kvaliteta uvjetovana s više različitih činitelja koji se nasljeđuju po kvantitativnom genetičkom modelu, selekcijski se postupak vodi kao i za druga kvantitativna svojstva.

Selekcija na kvalitetu u ranim generacijama razdvajanja odvija se uglavnom na temelju individualnih pokazatelja, a u kasnijim generacijama se radi na većim uzorcima kad se provode kemijske, fizikalne ili neke druge analize. Međutim, na temelju preliminarnih testova kvalitete, mnogi se selekcijski materijali odbacuju već nakon prve godine. Molekularne tehnike za identifikaciju i manipulaciju gena otvaraju nove mogućnosti u promjeni svojstava kvalitete.

Oplemenjivanje za otpornost na činitelje rizika

Svako djelovanje na biljku koje je izvan optimalnih granica, bez obzira je li biotičkog ili abiotičkog karaktera, smatra se činiteljem rizika ili stresom. Takvi su činitelji niske i visoke temperature, manjak i suvišak vode, zračenja, vjetar, kemijski činitelji (soli, ioni, pesticidi), bolesti i štetnici. Procjenjuje se da je samo oko 10% površina na kojima se uzgaja kultivirano bilje u svijetu moguće svrstati u područja koja nisu izložena nekoj vrsti rizika (Christiansen 1982.). Prema tome, biljna proizvodnja veoma je rijetka bez stresnih utjecaja, a stres se najizravnije odražava na smanjenje prinosa i na produktivnost u biljnoj proizvodnji. Stoga je selekcija biljaka na otpornost, odnosno tolerantnost na različite činitelje rizika, važan dio

svakog oplemenjivačkog programa. Od svih činitelja rizika najveći negativan učinak na biljnu proizvodnju imaju biljni patogeni i štetnici.

Otpornost na bolesti i štetnike

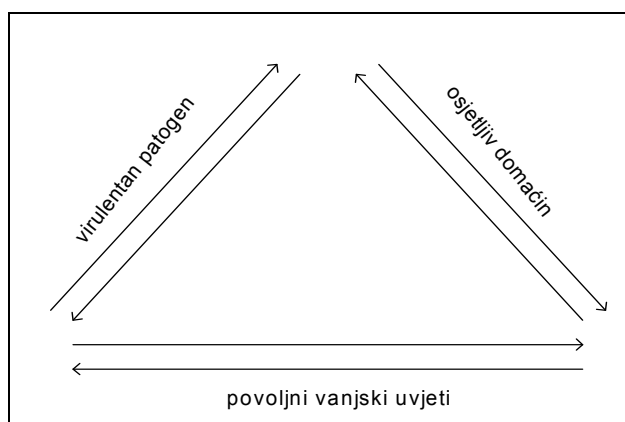
Štete izazvane napadom štetnih insekata i patogena negativno se odražavaju na prinosu, kvaliteti proizvoda ili na nekom drugom svojstvu. Zaštita od bolesti i štetnika provodi se preventivno različitim agrotehničkim mjerama, kemijskim sredstvima, a jedan od najdjelotvornijih postupaka je razvoj i uzgoj kultivara s nasljedno uvjetovanom otpornošću na patogene. U svijetu se troši dvadesetak milijardi dolara na sredstva za zaštitu bilja godišnje, no usprkos tome predžetveni gubici zbog bolesti i štetnika procjenjuju se na 24% ukupnog prinosa. Samo u prehrambenim vrstama ovi gubici su dovoljni da prehrane milijardu ljudi (Robinson, 1997.).

Uzajamni odnos između biljke domaćina i patogena iskazuje se na tri načina:

- ✧ osjetljivost prema patogenu kad se patogen u biljci normalno razvija i uzrokuje oštećenja
- ✧ tolerantnost prema patogenu, što se pokazuje na taj način da se patogen razvija u biljci, ali pritom ne dovodi do oštećenja ili su oštećenja slabijeg intenziteta pa se biljka normalno razvija
- ✧ otpornost na patogene, kad je patogenu zbog određenih obrambenih mehanizama biljke domaćina razvoj ograničen ili onemogućen

Tijekom evolucije biljke su razvile različite zaštitne mehanizme kojima se štite od patogena. Nasuprot tome patogeni razvijaju svoje mehanizme kojima nastoje prevladati mehanizme biljne zaštite, tako da je to svojevrsno evolucijsko nadmetanje. Orambeni zaštitni mehanizam domaćina može biti morfološke, histološke ili fiziološke prirode. Reakcija biljke na patogene pritom varira od potpunog imuniteta, odnosno bez ikakvih vidljivih znakova infekcije, do hipersenzitivnosti. Hipersenzitivnost je takav sustav obrane biljke od patogena u kojem stanice oko inficiranog mjesta ugibaju i na taj način sprječavaju dalje širenje patogena.

Da bi se bolest izrazila u biljci domaćinu, moraju biti ispunjena tri uvjeta odnosno mora se stvoriti tzv. trokut bolesti. Stranice trokuta predstavljaju agresivnog i virulentnog patogena, osjetljiva domaćina i povoljne vanjske uvjete (Agrios, 1988.). U slučaju odsutnosti bilo kojeg od ova tri parametra, bolest se neće pojaviti. Predviđanje napada bolesti ovisi o poznavanju prirode svakog činitelja i njihovog uzajamnog djelovanja (slika 8).



Slika 8. Trokut bolesti

Pojava bolesti u biljci domaćinu određena je genetičkim odnosom između nje i patogena. Uzajamni odnos biljke domaćina i patogena Flor (1958.) je predstavio kao hipotezu

gen-za-gen. Po toj hipotezi postoji aktivna interakcija između genetičkih mehanizama domaćina i patogena. Za svaki **R** gen u biljci domaćinu koji uvjetuje otpornost, postoji odgovarajući **P** gen u patogenu koji uvjetuje virulentnost. S dva alela na jednom lokusu u genomu domaćina (**R** ili **r**) i dva na odgovarajućem lokusu patogena (**P** ili **p**), postoje četiri moguće kombinacije. Browning (1963.) je hipotezu gen-za-gen usporedio s kompletom brava i ključeva. Svaki alel u domaćinu koji uvjetuje otpornost prema patogenu je potencijalna brava, a ključeve predstavljaju aleli za virulentnost. Hipersenzitivnost je također rezultat sustava gen-za-gen.

Van der Plank (1968.) je postavio teoriju o nužnosti razlikovanja između otpornosti na fiziološke rase patogena i otpornosti na ukupni spektar patogenosti pojedinog patogena. Prvi tip otpornosti on naziva **vertikalna**, a drugi **horizontalna** otpornost. Dopunjujući Van der Planka, Hooker (1983.) je vertikalnu otpornost označio kao **specifičnu**, a horizontalnu kao **opću**, što je vjerojatno ispravnije. Specifična otpornost, prema tome, predstavlja otpornost protiv samo jedne rase patogena, dok se opća otpornost odlikuje djelotvornošću prema svim rasama jednog patogena.

U postupku razvoja otpornih kultivara najprije treba napraviti oplemenjivački program, odabrati metodu selekcije, te provesti epidemiološko proučavanje, da bi se upoznao odnos između patogena, njegova domaćina i okoline. Potom se utvrđuju dostupni genetički izvori koji će biti nositelji gena za otpornost. Izvori otpornosti ovise o obujmu genetičke raznolikosti u vrsti. Najčešće ih je moguće naći u komercijalnim kultivarima, oplemenjivačkim linijama ili lokalnim sortama i populacijama same vrste. No nekad ih treba tražiti u drugim srodnim ili nesrodnim kultiviranim i divljim vrstama.

Nakon identificiranja izvora otpornosti pristupa se selekcijskom postupku kojim će se provesti transfer gena, te razvoj novog otpornog genotipa. Razvoj novih otpornih kultivara provodi se različitim oplemenjivačkim metodama, a ovisi o karakteru otpornosti, odnosno broju gena koji kontroliraju to svojstvo.

Otpornost na specifične rase je kvalitativno svojstvo, uvjetovano je najčešće jednim dominantnim genom, ali je također često pod kontrolom dvaju ili više gena (poligena) ili recesivnih gena s jakim učinkom. Razvoj kultivara otpornih na specifične rase patogena postiže se sljedećim postupcima: a. razvoj kultivara s pojedinačnim major genima koji kontroliraju jednu fiziološku rasu, b. sistem piramide i c. korištenje multilinija.

U praksi se najčešće koriste kultivari s genima koji kontroliraju jednu rasu. Takvi kultivari dobiju se selekcijom u potomstvu cijepajuće populacije nakon križanja odabranih roditelja, najčešće pedigre metodom ili povratnim križanjem. Razvoj linija koje sadrže major gene za otpornost je najuspješniji postupak u kontroli biljnih bolesti.

Nažalost ta vrsta otpornosti nije dugotrajna jer većina patogena ima sposobnost da se mijenja i napadne prethodno otporne biljke. Kultivar otporan na jednu rasu patogena može oboljeti ako se pojavi nova fiziološka rasa. Nova rasa može doći iz nekog drugog područja u kojem je prevalentna, pojavljuje se kao nova mutacija, a moguće je da je ta rasa postojala ranije u tom području, ali nije iskazivala agresivnost.

Strategija piramide, ili gomilanje gena, je postupak uvođenja više gena u jedan kultivar. Svaki gen kontrolira određeni soj patogena. Na taj način kultivar postaje otporan na više rasa jednog patogena. U ovom postupku odabrani roditelj križa se s više donora i svaki od njih daje po jedan gen rekurentnom roditelju. Gomilanje gena pored određenih prednosti ima i nedostataka: puno rada i vremena za razvoj kultivara, mogućnost unošenja neželjenih gena iz roditelja donora, a kako postupak dugo traje, moguć je u međuvremenu razvoj novih virulentnih rasa patogena.

U žitaricama, travama i krmnim leguminozama u zaštiti od različitih fizioloških rasa koriste se multilinijski kultivari. Ti kultivari obično su izogene linije i međusobno se razlikuju samo po otpornosti na određeni soj patogena.

Nasljeđivanje gena za horizontalnu ili opću otpornost je složenije. Obavlja se po istom načelu kao i za druga kvantitativna svojstva. Opća otpornost se lako određuje u populaciji, ali teško na bazi jedne biljke. U nekim klonskim vrstama (krumpir, voćke) selekcija je na opću otpornost uspješna, jer se klonovi uzgajaju kao populacije. Dobri rezultati u oplemenjivanju na opću otpornost postižu se transgresivnim cijepanjem. Transgresivno razdvajanje unutar populacije osjetljivih biljaka obično će akumulirati svu potrebnu horizontalnu otpornost.

Opća je otpornost povoljnija sa stajališta oplemenjivanja, jer su otporni kultivari manje ranjivi na genetičke promjene pojavom nove rase patogena. Ovaj tip otpornosti neki nazivaju trajna, potpuna ili nespecifična jer djeluje na sve ili bar na većinu rasa jednog patogena. Međutim, razvoj je kultivara za opću otpornost teži, jer se radi s minor genima s aditivnim učinkom.

Osnovna načela selekcije za otpornost na štetne insekte ista su kao u selekciji na uzročnike bolesti. Najprije se odrede geni za otpornost na insekte, bilo da su u kultivaru kultivirane vrste ili u divljoj srodnoj vrsti, te se nakon toga ti geni prenesu u osjetljivi kultivar. Biotipovi i rase određuju se u pojedinim vrstama insekata, što je usporedivo s biotipovima i rasama patogena.

U otpornim kultivarima koji su dugo u proizvodnji, nerijetko se događa gubitak otpornosti zbog razvoja nove virulentnosti parazita što je posljedica selekcijskog pritiska. Stoga je razvoj otpornih kultivara kontinuiran proces. Poseban je problem u razvoju otpornih kultivara ponovni povratak genetičke vjernosti originalnog kultivara zajedno sa činiteljima otpornosti na bolesti. Naime, s transferom gena otpornosti u osjetljivi kvalitetni kultivar obično se prekida genetička ujednačenost tog kultivara; pritom je moguće unijeti i neka neželjena svojstva, a to produžava selekcijski postupak.

Nakon razvoja otpornog kultivara provodi se ispitivanje njegovih svojstava u uvjetima izloženosti infekciji, prirodnoj ili umjetnoj, da bi se odvojili otporni od osjetljivih genotipova. Ispitivanje u prirodnim uvjetima u polju provodi se radi određivanja načina reagiranja genotipova na prevalentne rase patogena. Ispitivanjem u stakleniku utvrđuju se optimalni uvjeti temperature i vlage za razvoj određenog patogena. Ako se ispituju kultivari otporni na insekte, oni se također izlažu u polju populaciji štetnika ili umjetno odgojenoj populaciji u kontroliranim uvjetima. U pokus se uvijek uključuje kontrolni kultivar za kojeg se unaprijed zna način reagiranja na ispitivane rase patogena. U razvoju novih linija otpornih na bolesti i štetnike i njihovom testiranju veoma je bitna suradnja oplemenjivača i fitopatologa, odnosno entomologa.

Oplemenjivanje za otpornost na abiotičke rizike

Najvažniji abiotički činitelji koji nepovoljno utječu na rast i razvoj te na prinos i kvalitetu poljoprivrednih proizvoda su suša, te visoke i niske temperatura.

Otpornost na visoke temperature i sušu

Suša je jedan od najčešćih ograničavajućih činitelja u poljoprivrednoj proizvodnji, a ako je još udružena s visokim temperaturama, šteta se višestruko povećava. Negativan učinak visoke temperature na rast i razvoj biljke ovisi o vrsti, sorti, stadiju biljnog uzgoja i dužini trajanja visokih temperatura. Pod utjecajem visokih temperatura povećava se transpiracija, a

smanjuje fotosintetska aktivnost, što nepovoljno utječe na opći vigor biljke. Toplotni je udar posebno opasan u vrijeme cvjetanja, jer onemogućuje oplodnju i razvoj sjemena.

Otpornost je na sušu sposobnost biljke da lakše podnese i preživi sušni stres. Smanjenje štete od suše postiže se izbjegavanjem suše, te različitim fiziološkim mehanizmima koji povećavaju tolerantnost na sušu. Visoke temperature u vrijeme cvjetanja moguće je izbjeći razvojem kultivara s ranijom cvatnjom. Odgovarajuće vrijeme cvjetanja pojedinačno je najvažniji parametar za povećanje prinosa žitarica u sušnim uvjetima.

Postoje kultivari koji su po svojim genetičkim karakteristikama tolerantniji na sušu budući da biljka posjeduje genetički uvjetovane morfološke i fiziološke mehanizme koji smanjuju gubitak vode. Među tim mehanizmima su posebna građa kutikule, zatvaranje stoma, voštana navlaka na lisnoj površini ili uvrtnje listova u vrijeme visokih temperatura. Relativni sadržaj vode u listu jedan je od kriterija otpornosti na sušu; on pokazuje značajnu heritabilnost. Sadržaj voska na epidermu lista nasljedno je uvjetovan pa ga je oplemenjivanjem moguće poboljšati (Mahiul i sur., 1992.).

Negativan učinak suše prevladava se boljim razvojem korjenova sistema. Dubok korjenov sistem sinonim je za otpornost na sušu, budući da biljka crpi vlagu iz dubljih slojeva. Biljna svojstva koja su povezana s dubljim ukorjenjivanjem upotrebljavaju se kao selekcijski kriterij.

Otpornost na toplotu i sušni stres obično je kvantitativnog karaktera te se nasljeđuje po složenom modelu. Razvoj kultivara tolerantnih na ove stresove obavlja se kao i u selekciji ostalih kvantitativnih svojstava. Pojedina morfološka ili fiziološka svojstva koja doprinose povećanju otpornosti, obično su pod kontrolom jednog ili manjeg broja gena, pa se nasljeđuju kao kvalitativna svojstva. U tom slučaju oplemenjivanje se provodi pedigre metodom, tj. izborom u F₂ generaciji uz dodatne cikluse selekcije familija da bi se svojstvo fiksiralo i prevladale poteškoće zbog okolinskog variranja (Hall, 1990.).

Izbor tolerantnih genotipova otežava interakcija genotipa i okoline. Genotipovi odabrani kao tolerantni u jednoj okolini ponekad pokazuju slabu prilagođenost u drugoj. S druge strane, genotipovi odabrani samo za tolerantnost na sušu često pokazuju nizak potencijal prinosa u optimalnim uvjetima. Stoga se u oplemenjivanje za tolerantnost na sušu uključuje i visok potencijal prinosa, uz stabilnost ostvarenja agronomskih svojstava u okolinama sklonim suši.

Otpornost na niske temperature

Većina je kultiviranih biljnih vrsta osjetljiva na niske temperature, što se očituje oštećenjem biljnog tkiva ili, u krajnjem slučaju, ugibanjem biljke. Tome su posebno izvrnute ozime vrste, te drvenaste vrste koje su trajnice. Neke vrste i kultivari u okviru pojedinih vrsta manje su osjetljivi na niske temperature. Npr. raž je najotpornija među strnim žitaricama, potom slijede pšenica, ječam, i zob. Među kultivarima pšenice postoji značajno variranje u reagiranju na zimu što je važna pomoć u oplemenjivanju na ovo svojstvo.

Istraživanja su pokazala da je tolerantnost na niske temperature složeno svojstvo i da je uvjetovano biljnim genotipom i uvjetima okoline u kojima se biljka uzgaja. U nekim žitaricama poput pšenice (Sutka, 1984.), ječma (Eunus i sur. 1962.) i zobi (Muehlbauer i sur. 1970.) nađena je visoka ocjena heritabilnosti za otpornost na zimu, što znači da je to svojstvo nasljedno. Ako je prisutna dovoljna razina genetičke varijabilnosti, moguća je selekcija kultivara koji posjeduju odgovarajuću razinu otpornosti. Zapaženo je da su biljke otporne na niske temperature obično tolerantnije na sušu.

Prvi korak u razvoju kultivara tolerantnih na niske temperature je odabir odgovarajućih genotipova koji se međusobno križaju ili ih se posebno ispituje u poljskim uvjetima. Nakon toga se provodi izbor biljaka i linija manje osjetljivih na niske temperature. Genotipovi unutar vrste koji su otporniji na niske temperature od drugih, općenito potječu od germplazme koja je selekcionirana i prilagođena u hladnim klimatskim uvjetima. Isto tako linije selekcionirane za otpornost na niske temperature testiraju se u pokusima u područjima u kojima postoji visoka vjerojatnost oštećenja od niskih temperatura. Dobri rezultati u selekciji kultivara tolerantnih na niske temperature postižu se selekcijom u smjesi budući da se prirodnom selekcijom favoriziraju otporniji genotipovi. Cilj oplemenjivanja nije maksimalno povećati otpornost na zimu već razviti kultivare s nužnim minimumom otpornosti za ciljano područje.

U ispitivanju reagiranja na niske temperature novi genotipovi uspoređuju se s kultivarima koji se dugo uzgajaju na određenom području i koji posjeduju različitu razinu otpornosti na niske temperature. Razina otpornosti i način oštećenja ocjenjuju se najčešće po skali UPOVa od 1 do 9. Neki selekcioneri upotrebljavaju vizualnu ocjenu po skali od 1 do 100.

Literatura

- Agrios, G.N. 1988. Plant Pathology. 3rd ed. Academic Press, San Diego.
- Browning, J.A. 1963. Teaching and applying the gene-for-gene hypothesis for interactions in host:parasite system. J. Ia. Acad. Sci. 70:120-125
- Eunus, A.M., Johnson, L.P.V., Aksel, R. 1962. Inheritance of winterhardiness in an eighteen-parent diallel cross of barley. Can. J. Genet. Cytol. 4:356-376.
- Flor, H.H. 1956. The complementary genic system in flax and flax rust. Adv. Gen. 8:29-54.
- Grafius, J.E. 1964. A geometry for plant breeding. Crop Sci. 4:241-246.
- Hall, A.E. 1990. Breeding for heat tolerance: An approach based on whole-plant physiology. HortScience 25(1):17-19.
- Hooker, A.L. 1983. Breeding to control pests. U Wood D.R. Crop breeding, str. 199-230. Am. Soc. of. Agron., Madison Wis.
- Mahiul, H.M., Mackill, D.J., Ingram, K.T. 1992. Inheritance of leaf epicuticular wax content in rice. Crop Sci. 32:865-868.
- Muehlbauer, F.J., Marshall, H.G., Hill, R.R. Jr. 1970. Winterhardiness in oat populations derived from reciprocal crosses. Crop Sci. 10:646-649.
- Robinson, R.A. 1997. The acceptance of horizontal resistance in crops. Biotechnol. and Development Monitor 33:24-25.
- Sutka, J. 1984. A ten-parental diallel analysis of frost resistance in winter wheat. Zeitsch. fuer Pflanzenz. 93:147-157.
- Tuinstra, M.R., Grote, E.M., Goldsbrough, P.B., Ejeta, G. 1996. Identification of quantitative trait loci associated with pre-flowering drought tolerance in sorghum. Crop Sci. 36:1337-1344.
- Van der Plank, J.E. 1968. Disease resistance in plants. Academic Press, New York.

7. Metode oplemenjivanja bilja

Početni materijal u oplemenjivanju

Oplemenjivači se u razvoju novih kultivara služe metodama izbora iz populacije, kombinacijskim metodama i izborom nakon hibridizacije, metodama konvergentnog oplemenjivanja, metodama klonske selekcije, a u novije vrijeme koriste se i biotehnoške metode. Bez obzira koja se metoda primjenjuje, oplemenjivanje u osnovi predstavlja genetičku rekombinaciju, selekciju i fiksiranje vrijednih agronomskih svojstava u novim linijama.

Osnovni je preduvjet uspješnosti oplemenjivačkog postupka prikupljanje odgovarajućeg početnog materijala. Izbor roditelja prvi je korak u svakom oplemenjivačkom programu. Pravilan izbor roditelja koji će se upotrijebiti za dalji selekcijski rad, ovisit će o ciljevima oplemenjivanja. Temelji se na fenotipskom i genotipskom izražavanju njihovih svojstava. Osnovni kriteriji u izboru su agronomska, morfološka i fenološka svojstva, otpornost na bolesti i eventualno neka druga svojstva, što se utvrđuje u pokusima.

Roditelji koji se upotrebljavaju kao oplemenjivački materijal, općenito se svrstavaju u dvije skupine: 1. lokalne sorte prilagođene uvjetima okoline u kojima se novi kultivar razvija i 2. germplazma odabrana zbog odgovarajućih svojstava, bez obzira na prilagođenost uvjetima okoline.

Lokalna adaptirana germplazma posebno selekcionirana ili introducirana, najčešće je osnovni roditeljski materijal u oplemenjivačkim programima. Pritom se pretpostavlja da takvi materijali imaju dobru fenotipsku i oplemenjivačku vrijednost. Iz iskustva se zna da su najbolji roditelji obično najbolji kultivari. Kao elitni izvor germplazme za najvažnija svojstva u oplemenjivanju najčešće se koriste postojeći komercijalni kultivari, inbred linije hibridnih kultivara ili roditelji sintetika. Upotrebljavaju se također i oplemenjivačke linije koje imaju neki nedostatak pa se ne upotrebljavaju kao komercijalni kultivari, ali imaju neko drugo korisno svojstvo.

Izvor roditeljske germplazme su introdukcije s nekim posebnim svojstvom, kao npr. otpornost na bolesti. Veoma se često kao izvor različitih vrijednih svojstava koriste lokalne sorte ili populacije. FAO procjenjuje da se čak 30 – 40% dobiti u produktivnosti oslanja na doprinose iz lokalnih populacija.

Ponekad se željeno svojstvo traži u drugim srodnim kultiviranim ili divljim vrstama. Ako se koriste divlje vrste, valja razviti tehniku međuvrsne hibridizacije da bi se olakšao prijenos gena između vrsta. No postoji mogućnost da se iz divlje germplazme prenesu i nepovoljna svojstva pa većina selekcionera ne upotrebljava takve materijale za kratkoročne već samo za dugoročne ciljeve

Praksa uporabe elitne germplazme kao roditeljskog materijala za križanje poznata je kao dobar x dobar roditelj. Osnovna je pretpostavka u tom pristupu da je dobar kultivar, na neki način, ekvivalent dobroj genetičkoj konstituciji, što znači da će automatski biti dobar roditelj. To međutim ne mora uvijek biti pravilo; nisu svi komercijalno uzgajani kultivari ujedno i dobri roditelji. Teško je dobre kombinacije predvidjeti samo na temelju roditeljskog fenotipa. Dobri će roditelji ponekad dati i loše potomstvo pa valja utvrditi kombinacijske sposobnosti pojedinih roditelja. Nakon analize rezultata, s nekim roditeljima će se nastaviti raditi, a neki će biti odbačeni ili ostavljeni u kolekciji. Uporaba najboljih kultivara kao roditelja ponekad među razvijenim komercijalnim kultivarima dovodi do sužavanja genetičke raznolikosti. Takav je slučaj u jabuci jer 2/3 kultivara jabuke razvijenih u zadnjih tridesetak

godina potječe od samo pet roditelja. Stoga je dobro u početnom materijalu koristiti što raznolikiju germplazmu.

Izbor roditelja teži je za svojstvo koje treba poboljšati izvan razine prisutne u roditeljskoj germplazmi. Jedan od primjera takvog poboljšanja je prinos kao najvažnije kvantitativno svojstvo. Oplemenjivači ga nastoje poboljšati iznad razine postojećih kultivara. U tom cilju biraju se elitni roditelji s visokom genetičkom raznolikošću, s pretpostavkom da će kombinacija takvih roditelja dati potomstvo s prinosom višim od oba roditelja.

Izbor oplemenjivačke metode ovisi o biljnoj vrsti, načinu reprodukcije, oplemenjivačkom cilju, prirodi svojstva koje se oplemenjuje kao i tehničkim mogućnostima. Tijek roditeljskog genetičkog materijala različit je za različite vrste. Ovisi o životnom ciklusu i intenzitetu oplemenjivačke aktivnosti. Zbog brze smjene i intenzivne selekcije u žitaricama je najčešći vijek nove sorte desetak godina, dok se u voćnim vrstama jedna sorta održava desetljećima, a u komercijalnom uzgoju ima voćnih kultivara starih više stotina godina.

Oplemenjivanje samooplodnog bilja

U oplemenjivanju samooplodnih kultiviranih vrsta oplemenjivači imaju dva široka pristupa u razvoju novih kultivara: razvoj linijskih kultivara, što je češći pristup, ili razvoj drugih tipova kultivara (hibridi, sintetici). U većini samooplodnih vrsta oplemenjivači se orijentiraju na razvoj kultivara čistih linija, koji su prilagođeni specifičnim uvjetima okoline uz optimalno izražavanje prinosa i drugih korisnih svojstava.

Kultivare čiste linije moguće je dobiti na dva načina. Jedan je izbor najboljih linija iz heterogene populacije, a drugi je razvoj takvih linija nakon križanja roditelja različite genetičke konstitucije. Koncept izbora linija iz heterogene populacije primjenjuje se u metodi masovne i individualne selekcije. Razvoj čistih linija nakon hibridizacije koristi se u pedigree metodi, metodi smjese i metodi potomstva jedne sjemenke.

Masovna selekcija

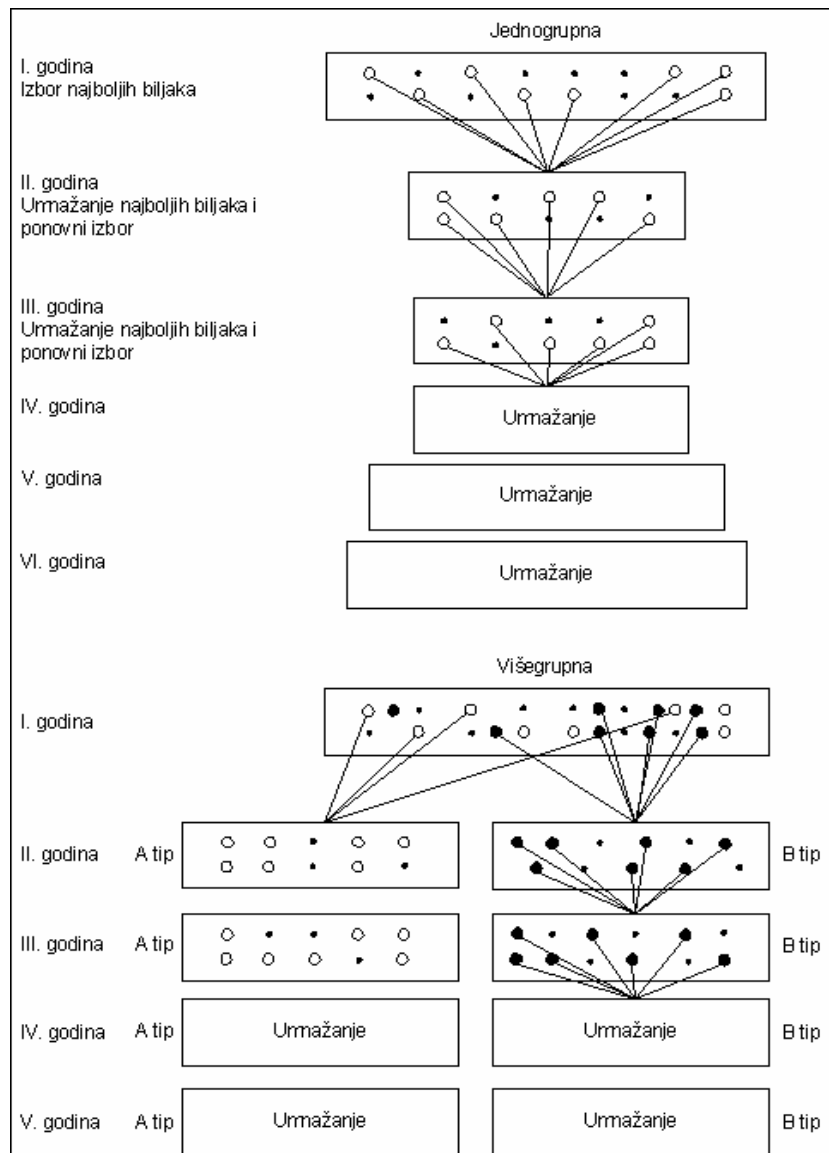
Izbor odgovarajućih biljaka u heterogenoj populaciji i njihov kasniji uzgoj najstariji je postupak poboljšanja svojstava samooplodnih biljnih vrsta. Tom su se metodom služili proizvođači koji su u lokalnim populacijama odabirali sjeme ili biljke s korisnim svojstvima i upotrebljavali ih u sljedećoj godini kao materijal za uzgoj. Kasnije, s počecima razvoja oplemenjivanja kao znanstvene discipline, masovna selekcija je usvojena kao relativno brz, jednostavan i ne skup postupak razvoja novih kultivara. Ovom metodom povećava se učestalost željenih genotipova u populaciji tijekom provođenja postupka.

Selekcijski postupak započinje izborom većeg broja biljaka koje se po određenim svojstvima razlikuju od ostalih biljaka u populaciji. Sjeme tih biljaka pomiješa se i sije sljedeće godine. Takav se postupak ponavlja dok se ne postigne zadovoljavajuća ujednačenost biljaka u populaciji za traženo svojstvo, a to je obično u F_3 ili F_4 generaciji (slika 9).

Masovna selekcija je primjenjiva samo u uvjetima u kojima se ciljano svojstvo može iskazati. Najbolje rezultate postiže u razvoju kultivara za jednostavna i lako prepoznatljiva svojstva kakva su boja sjemena ili ploda, osatost, vrijeme zriobe, visina stabljike, veličina zrna ili ploda. Teže se postiže uspjeh u selekciji na kvantitativna svojstva poput prinosa i kvalitete, u kojima su fenotipske razlike suviše male da bi ih se lako prepoznalo. Učinkovitost masovne selekcije ovisi prvenstveno o tome koliko dobro fenotip odražava genotip.

Kao primjer razvoja novog kultivara masovnom selekcijom navest ćemo oplemenjivanje za visinu biljke u populaciji zobi (Romero i Frey, 1966.). U populaciji biljaka uzgojenih u polju nakon cvjetanja podrezani su klasovi svih biljaka iznad određene visine. Na taj način iz budućeg potomstva eliminirane su sve visoke biljke. Da bi se iz budućeg kultivara isključile i iznimno niske biljke, obrano je samo 10 gornjih cm nepodrezanih biljaka. Sjeme je ovršeno zajedno i od njega je uzet uzorak koji je poslužio kao potomstvo u sljedećem krugu selekcije. Postupak je ponavljan dok nije dobiven kultivar određene visine. Sličan postupak moguće je provesti za raniju zriobu izborom biljaka određenog vremena zriobe (Fehr i Weber, 1968.).

Izbor biljaka iz populacije može biti jednokratni i višekratni. Jednokratni izbor provodi se kad se u populaciji odvajaju homozigotni genotipovi koje daljim izborom nije moguće poboljšati. Ako je, pak, polazni materijal suviše heterogen, potreban je ponovljeni izbor. Ukoliko se iz populacije izdvaja samo jedna grupa biljaka, onda je to jednogrupna metoda, a ako se izdvaja dvije ili više grupa sličnih biljaka, riječ je o višegrupnoj masovnoj selekciji.



Slika 9. Masovna selekcija u samooplodnom bilju

Masovnom selekcijom u početku su stvoreni brojni novi kultivari samooplodnih vrsta. To su uglavnom bili linijski kultivari, izvedeni iz lokalnih heterogenih populacija. Izborom biljaka u takvim populacijama i njihovom samooplodnjom sa svakim ciklusom selekcije smanjuje se postotak heterozigotnih, a povećava udjel homozigotnih individua, sve dok nova populacija ne postane relativno homogena. Sustav samooplodnje kombiniran s usmjerenom selekcijom vodi brzom iscrpljivanju varijabilnosti populacije tako da produžen izbor više nema učinka.

U masovnoj selekciji nije moguće vidjeti razliku između genotipova koji su homozigotni ili heterozigotni za kvalitativna svojstva koja kontrolira dominantni gen. Isto tako nije moguće utvrditi jesu li superiorna svojstva biljke rezultat nasljednih činitelja ili povoljnih uvjeta okoline, budući da se ne testira potomstvo pojedinačnih biljaka.

Zbog svih tih ograničenja danas se više koriste druge metode oplemenjivanja u razvoju novih kultivara. Masovna selekcija obično se primjenjuje kad se sorta uvodi u novo područje, ili kad se neki popularni kultivar uzgaja na rubu područja svoje zone prilagođavanja. Izborom odgovarajućih biljaka razvija se kultivar prilagođen za to područje.

Metoda masovne selekcije upotrebljava se često u sjemenarstvu u održavanju čistoće sjemenske linije ili kultivara. Sjemenski se kultivar posije u polje, a tijekom razvoja i zriobe odstrane se netipične biljke. Nakon toga se obere veliki broj odgovarajućih biljaka koje se zajedno ovršu. Još jednom se u laboratoriju obavi reselekcija, a preostalo se sjeme koristi kao osnovno sjeme za umnožavanje.

Literatura

Fehr, W.R., Weber, C.R. 1968. Mass selection by seed size and specific gravity in soybean populations. Crop Sci. 8:551-554.

Romero, G.E., Frey, K.J. 1966. Mass selection for plant height in oat populations. Crop Sci: 6:283-287.

Individualna selekcija

Metoda individualne selekcije je djelotvorniji postupak od masovne selekcije u razvoju novih kultivara jer se temelji na ocjeni genotipa a ne samo fenotipa. Testiranje genotipa obavlja se na potomstvu. Za razliku od masovne selekcije u individualnoj selekciji biraju se iz populacije pojedinačne biljke, s kojima se potom nastavlja selekcijski postupak.

Znano je da se heterogene populacije samooplodnog bilja sastoje uglavnom od velikog broja homozigotnih linija. Raznolikost postoji između linija, ali ne i unutar linije. Ako se u takvoj populaciji zapaze biljke s nekim korisnim svojstvom takve biljke poslužiti će kao pogodan početni materijal za selekciju. Na taj se način individualna selekcija primjenjuje radi iskorištavanja lokalnih sorti ili populacija ako u njima postoje pogodni genotipovi.

Individualna selekcija započinje izborom fenotipski zanimljivih pojedinačnih biljaka iz heterogene populacije i njihovom samooplodnjom. U sljedećoj se generaciji potomstvo odabranih biljaka sije u zasebne redove ili parcelice. U toku vegetacije prati se razvoj tih potomstava i ocjenjuju svojstva za koja se provodi selekcija. Na temelju ocjene u vegetaciji biraju se najbolja potomstva. Ako je potrebno, postupak se ponavlja dok se ne dobije potpuno ujednačeno potomstvo. Sjeme cijelog odabranog potomstva obere se u masi i sljedeće godine u preliminarnim pokusima ispituje se prinos i ostala zanimljiva svojstva. Sjeme se linije odabrane u preliminarnim pokusima umnožava, a linija daje u postupak za priznavanje (slika 10).

U individualnoj selekciji ispituje se potomstvo kako bi se utvrdilo jesu li odabrane linije homozigotne (AA ili aa), ili heterozigotne (Aa), što nije moguće utvrditi u masovnoj selekciji. Ovisno o genetičkoj varijabilnosti početne populacije, individualnom selekcijom će nastati više novih vrijednih linija. U početku dok još selekcija nije bila dovoljno razvijena, ovom metodom stvoren je veliki broj kultivara i linija samooplodnog bilja. Kultivari razvijeni metodom individualne selekcije bit će ujednačeniji od kultivara stvorenih masovnom selekcijom, budući da sve biljke imaju isti genotip.

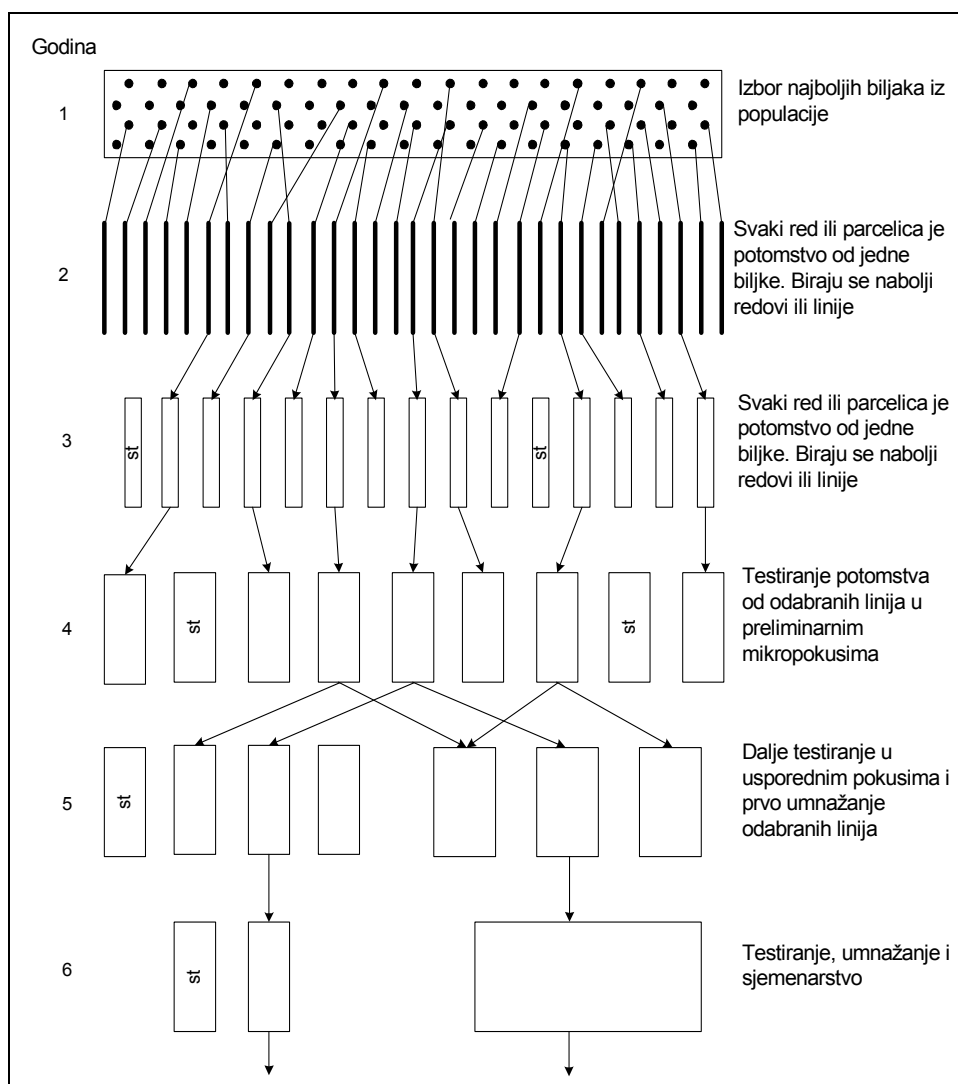
Svaka odabrana individua iz početne populacije ne mora uvijek biti i nova linija; stoga je odlučujuća ocjena potomstva te individue. Ako se potomstvo puno ne razlikuje od roditeljske biljke, to je svojstvo genetički uvjetovano, što znači da je fenotip izraz genetičke konstitucije. Ako se, pak, potomstvo u većoj mjeri razlikuje od roditeljske biljke, tada je očito da je fenotip te biljke više rezultat okolinskih nego genetičkih činitelja, ili je variranje nastalo zbog slučajne stranooplodnje u početnoj populaciji. Ukoliko je variranje rezultat stranooplodnje, to se jednostavno provjerava na temelju razdvajanja unutar potomstva.

Prednost je individualne selekcije što omogućuje relativno brzi razvoj linija ujednačenih po izgledu i ostvarenju. Nedostatak je ove metode što nema povećanja u variranju populacije, a proistekle linije nisu nanovo razvijene već samo izdvojene iz populacije. Ovakve linije, uz to mogu biti ograničene u prilagodljivosti.

Individualna selekcija se danas uglavnom primjenjuje u kulturama u kojima nisu još dovoljno razvijene druge oplemenjivačke metode, kao što su neke trave i krmne leguminoze, koje je još moguće naći u obliku heterogenih populacija. Ova metoda koristi se također kao logičan prvi korak u razvoju ujednačene sorte u novoj kulturi ili novom području. Ponekad su i moderni kultivari heterogeni za neka svojstva pa se individualna selekcija koristi za pročišćavanje takvih kultivara.

Metoda se individualne selekcije češće primjenjuje u sjemenskoj proizvodnji u cilju održavanja čistoće postojećih kultivara samooplodnih vrsta. Obično se provodi u znanstvenim institucijama ili ovlaštenim sjemenskim organizacijama. Postupak započinje izborom nekoliko stotina ili tisuća pojedinačnih biljaka iz jednog dobrog usjeva određenog kultivara.

Svaka se biljka posebno ovrše. Prije sjetve još se jednom obavi reselekcija u laboratoriju. Sljedeće se godine sjeme od svake biljke sije odvojeno u zasebne redove ili parcelice. U toku vegetacije svako se potomstvo ocjenjuje, a najbolja potomstva odabiru se za žetvu. Kako nam je u ovakvom postupku cilj održavanje genetičke čistoće određenog kultivara a ne razvoj nove linije, žetva svih odabranih potomstava obavlja se zajedno. Takvo sjeme predstavlja osnovno sjeme koje se dalje umnožava u komercijalne sjemenske kategorije.



Slika 10. Individualna selekcija iz prirodnih ili lokalnih populacija samooplodnog bilja (Borojević, 1981.)

Literatura

Borojević, S. 1981. Principi i metodi oplemenjivanja bilja. Ćirpanov, Novi Sad

Pedigre metoda

Najčešća metoda razvoja novih linija samooplodnog bilja je pedigree metoda. Pedigree metoda se također u cilju razvoja inbred linija upotrebljava u stranooplodnom bilju. Razlika u primjeni ove metode u samooplodnom i stranooplodnom bilju samo je u načinu oplodnje. U samooplodnom bilju inbriding se obavlja prirodno, a u stranooplodnom bilju to se mora obaviti umjetno. Pedigree metoda temelji se na odabiranju među biljkama i linijama u toku ranih generacija selekcije dok se još održava dovoljno genetičkog variranja. Naziv metode izveden je iz riječi koja znači rodovnik, odnosno podrijetlo.

Osnovno je obilježje selekcijskog postupka da se izabrano potomstvo vodi pod određenom oznakom, da ima identifikaciju podrijetla, te da se točno zna numerički slijed i generacija razvoja potomstva. Postupak omogućuje selekcioneru da prati odabrani materijal od početka izbora u F_2 generaciji do trenutka umnožavanja sjemena za sortne pokuse. Linije razvijene metodom pedigreea su homozigotne i homogene, ali s novim genskim kombinacijama.

Postupak počinje izborom dva ili više roditelja koji posjeduju svojstva koja oplemenjivač želi kombinirati u novom kultivaru. Pojedinačne biljke roditeljske germplazme križaju se da se dobije F_1 generacija. F_1 generacija je genotipski i fenotipski ujednačena i u njoj nema izbora, pa nije potrebna velika populacija, obično 50 - 100 biljaka. U ovoj generaciji, međutim, ocjenjuje se način nasljeđivanja pojedinih kvalitativnih svojstava, odnosno moguće je vidjeti koja se svojstva nasljeđuju dominantno, koja recesivno, a koja intermedijarno.

Nakon samooplodnje biljaka F_1 generacije obrano sjeme sije se i uzgaja u F_2 generaciji. U F_1 generaciji treba proizvesti dovoljno sjemena za veliku F_2 populaciju. Zbog mogućnosti stradanja sjemena ili usjeva iz bilo kojih razloga valja računati na stanovitu rezervu. Veličina F_2 populacije ovisi o vrsti s kojom se radi, dostupnosti sjemena, genetičkim razlikama između roditelja, heritabilnosti svojstva i oplemenjivačkim ciljevima. Dobro je da F_2 generacija, kao prva generacija razdvajanja svojstava, bude što veća kako bi se dobio što veći broj biljaka s različitim svojstvima. To olakšava mogućnost izbora pogodnih genotipova. Primjerice u strnim žitaricama uzgaja se 2.000 – 3.000 biljaka, u soji 1.000 – 1.500, a u duhanu 500 - 600. Sklop treba biti dovoljno širok da biljke imaju normalan razvoj.

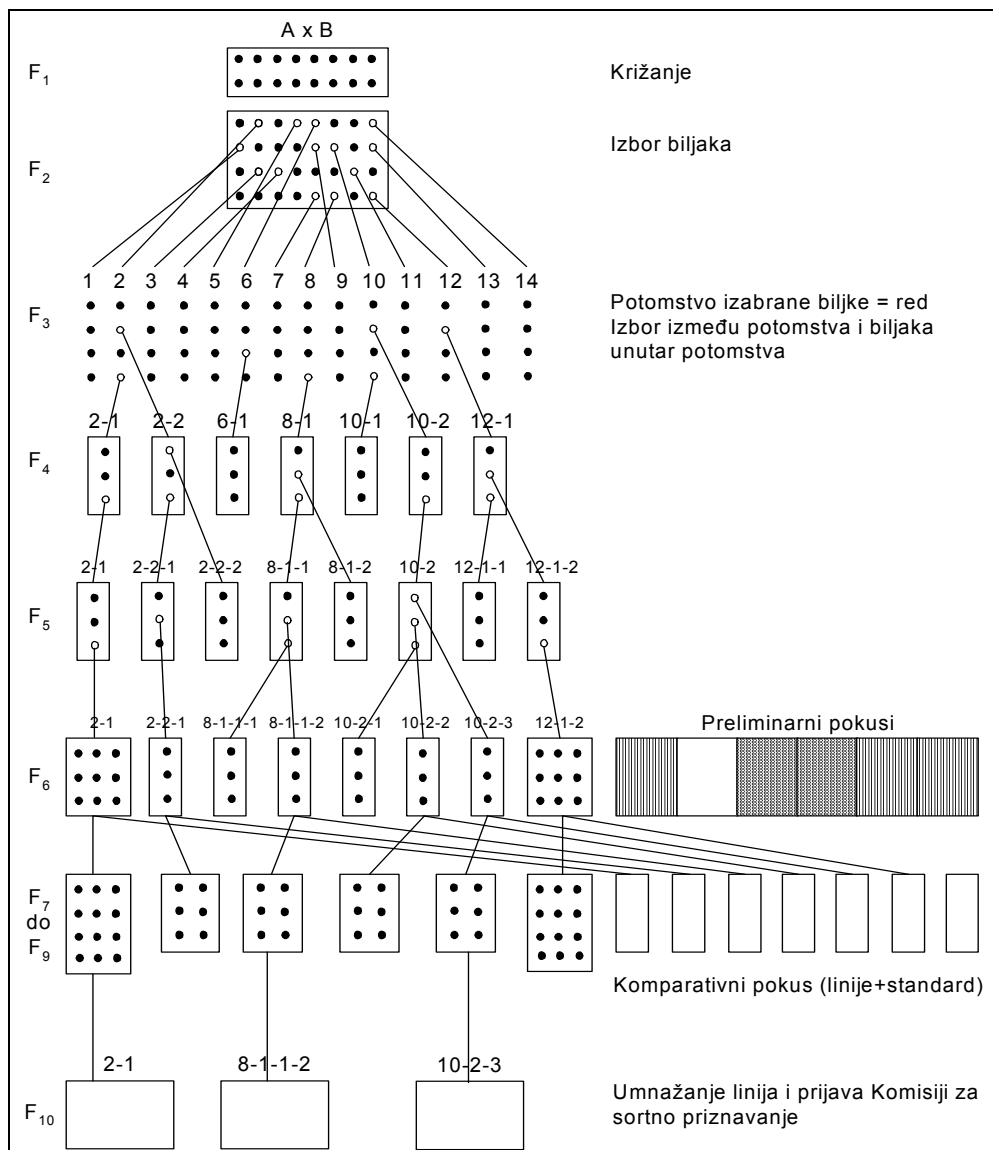
U F_2 populaciji bira se veliki broj biljaka koje vizualno odgovaraju pretpostavljenom modelu budućeg kultivar. Osnovni je kriterij izbora procjena koje će biljke imati najbolje potomstvo. U ovoj generaciji je 50% heterozigotnih genotipova za jedan alelni par pa valja odabrati veći broj sličnih genotipova kako se ne bi eventualno odbacili genotipovi u kojima su korisni geni maskirani zbog heterozigotnosti. Zbog utjecaja heterozigotnosti odabrano potomstvo neće uvijek odražavati ostvarenje roditelja. U F_2 generaciji može također doći do izražaja transgresija.

Potomstvo svake odabrane F_2 biljke sije se u F_3 generaciji u pojedinačne redove. Broj biljaka u redu ovisi o biljnoj vrsti. U oplemenjivanju žitarica to je obično klas na red. Razmak biljaka u redu je takav da je moguće proučavati pojedinačne biljke. Budući da je u F_3 generaciji broj homozigotnih biljaka 75%, pokazuje se stanovita ujednačenost svojstava, no i dalje dolazi do cijepanja.

Sjeme biljaka odabranih u F_3 generaciji sije se sljedeće sezone u F_4 generaciji, također u zaseban red. Potomstva biljaka odabranih u prethodnoj generaciji u istom redu uzgajaju se u F_4 generaciji kao familije u susjednim redovima. U F_4 generaciji homozigotnost iznosi 87.5%,

ali se još uvijek pojavljuje razdvajanje, mada su linije tada već prilično ujednačene. U ovoj generaciji započinje sužavanje izbora; samo najbolje i najujednačenije linije prevode se u sljedeću generaciju.

Izbor se u F_4 generaciji obavlja između familija tako da se odaberu najbolje familije, unutar familija najbolji redovi i unutar redova najbolje biljke. Sjeme tih biljaka uzgaja se sljedeće sezone kao F_5 generacija na isti način kao što se to činilo u F_4 generaciji. Postupak se ponavlja dok se u jednom redu ne postigne ujednačenost biljaka; to je obično u $F_5 - F_7$. Tada se sve biljke u jednom redu obru, sjeme pomiješa, te provede eventualna reselekcija u laboratoriju. To sjeme služi kao izvorni materijal za preliminarne pokuse.



Slika 11. Pedigree metoda (Kontinuirana individualna selekcija) (Milohnić, 1972.)

Laboratorijska ispitivanja sjemena, odnosno biljnog materijala koji kod određene vrste služi kao komercijalni proizvod, počinju već u F_5 generaciji, dakle prije nego počnu preliminarne pokuse za ispitivanje prinosa. Testiranje prinosa ponekad se provodi u ranim generacijama inbridinga, no najčešće se provodi tek kad odabrano potomstvo postigne ujednačenost. Broj generacija samooplodnje ovisi o postizanju stupnja ujednačenosti linije. Negdje će linija biti dovoljno ujednačena već u F_4 generaciji, a negdje tek u F_7 ili F_8 .

Tijekom selekcijskog postupka u generacijama razdvajanja vode se detaljni podaci o svakom odabranom potomstvu. Broj odabranih i ocijenjenih genotipova ovisi o kultiviranoj vrsti i mogućnostima rada. Svaka populacija u kojoj će se provoditi selekcija, dobija posebnu oznaku, a odabranim biljkama i linijama pripaja se odgovarajući broj do kraja selekcijskog ciklusa. Svaki odabrani genotip imat će svoju oznaku; označavanje počinje već u F₂ generaciji. Pretpostavimo da je populacija nastala križanjem kultivara A i B, tada se genotipovi odabrani u F₂ označavaju kao AxB-1, AxB-2, AxB-3, ovisno o tome koliko je genotipova odabrano.

Oplemenjivač može umjesto oznake kultivara također uvesti neku šifru pod kojom će tu kombinaciju voditi do kraja selekcijskog ciklusa. Potomstvo odabrano u sljedećim generacijama dobiva dodatne brojčane oznake. Ako je npr. iz reda AxB-2 odabrana jedna biljka, iz reda AxB-4 tri biljke, a iz reda AxB-8 dvije biljke, one će dobiti sljedeće oznake: AxB-2-1; AxB-4-1, AxB-4-2, AxB-4-3; AxB-8-1, AxB-8-2. Takav postupak nastavlja se i u sljedećim generacijama (slika 14). Za svako odabrano potomstvo u knjizi se vodi evidencija o tijeku selekcijskog postupka i o svim obilježjima genotipa.

Nakon formiranja ujednačenih linija radi ispitivanja njihovih svojstava u poljskim uvjetima počinju preliminarni, a potom sortni pokusi. Razvoj kultivara ovom metodom za komercijalnu uporabu traje obično 10 - 12 godina, osim ako se u povoljnim uvjetima postignu dvije generacije u jednoj godini, kao u slučaju nekih vrsta kraćeg vegetacijskog perioda (slika 11).

Uspjeh selekcije pedigree metodom veći je za svojstva s višom heritabilnošću, odnosno onih koje je moguće vizualno identificirati i u ranim generacijama lako odabrati. Svojstva koja nije moguće vizualno ocijeniti poput sadržaja ulja ili proteina, moraju se ocjenjivati laboratorijski; tek nakon tih analiza odabira se potomstvo za uzgoj u sljedećoj generaciji. Poteškoće pri izboru individua u generacijama razdvajanja ponekad nastaju zbog hibridnog vigora i dominantnosti. Naime, između dominantnih homozigota i heterozigota nema vizualnih razlika, pa izbor poboljšanih heterozigotnih biljaka usporava tijekom dobivanja homozigotnih linija.

Prednost je pedigree metode što se samo superiorno potomstvo, za jedno ili više svojstava, prenosi u sljedeću generaciju. Odstranjivanje slabijeg materijala valja obaviti prije izvođenja skupih pokusa. Ako se generacije razdvajanja uzgajaju na više od jednog mjesta, domet se selekcije povećava. U ovom postupku moguće je skupljanje i analiza genetičkih podataka o potomstvu i upoznavanje genetičke strukture populacije; u drugim postupcima to nije moguće.

U pedigree metodi manja je mogućnost odbacivanja povoljnih genotipova u ranim generacijama. Međutim, ako je heritabilnost svojstva niska ili je svojstvo kontrolirano recesivnim genima, moguće je i u ovom postupku u ranim generacijama odbaciti korisne genotipove. U svakoj generaciji genotipovi se odabiru u posebnim uvjetima godine što omogućuje izražavanje značajne varijabilnosti.

Nedostatak je ove metode što u vrijeme ranih generacija valja uložiti puno rada i voditi puno podataka. Postupak nije dovoljno djelotvoran u uvjetima u kojima se za traženo svojstvo ne može izraziti genetička varijabilnost. Stoga se ocjenjivanje svojstava koja se oplemenjivanjem žele poboljšati, mora obavljati u polju, pa je korištenje staklenika za ovu metodu ograničeno, osim za uzgoj F₁ generacije. Najčešće se izvodi samo jedna generacija u jednoj godini, što u odnosu na druge metode produžava selekcijski postupak.

Selekcija u smjesi (Bulk metoda)

Metoda smjese jednostavna je, praktična i relativno jeftina metoda selekcije nakon hibridizacije. Ona iziskuje manje rada i manje pojedinačne brige, posebno u toku ranih generacija razdvajanja. Osnovni je cilj ove metode omogućiti prirodnoj i, eventualno umjetnoj, selekciji odstranjivanje neželjenih genotipova iz populacije tijekom razvoja linija. Metodu je prvi uveo švedski genetičar Nilsson-Ehle (1912.), a u cilju razvoja kultivara pšenice otpornih na zimu. Selekcija u smjesi danas se primjenjuje u razvoju kultivara tolerantnih na različite abiotičke činitelje rizika, te onih koji su otporni na bolesti i štetnike.

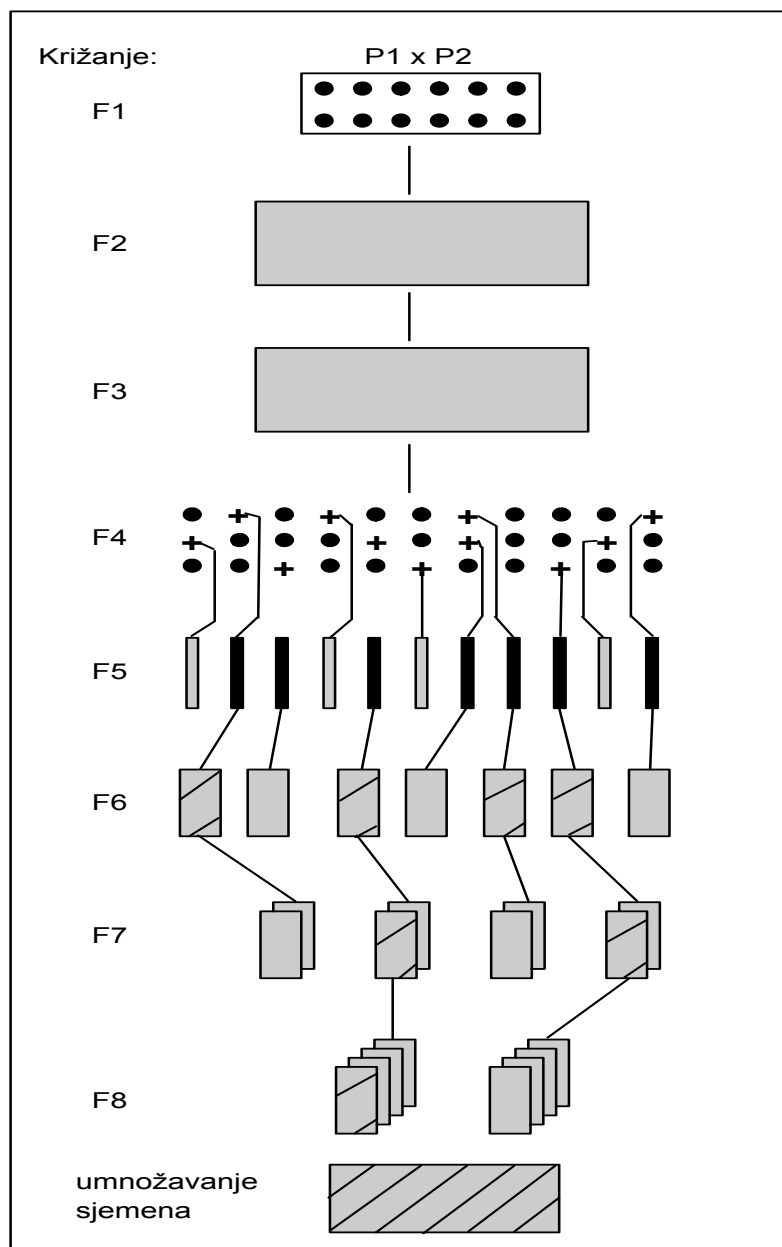
Postupak započinje križanjem odabranih roditelja, slijedi uzgoj i samooplodnja F_1 generacije i sjetva F_2 generacije. U F_2 generaciji sije se 2.000 – 3.000 biljaka. Ne obavlja se izbor već se svi genotipovi prepuštaju prirodnoj selekciji. Podvrgavanje cijepajućih populacija prirodnoj selekciji djeluje na održavanje najprilagodljivijih individua u uvjetima u kojima se s populacijama provodi postupak. Sjeme se biljaka F_2 generacije obere u masi, te miješa i sije sljedeće godine u F_3 generaciji. Postupak se ponavlja sve dok se za ciljano svojstvo ne postigne ujednačenost biljaka na parcelici. Na taj način prirodnom selekcijom odstranjeni su nepoželjni genotipovi, a nova populacija sadrži uglavnom željene genotipove.

Selekcioner bira onu okolinu koja će pogodovati željenim genotipovima u populaciji. To znači: ako želimo sortu otpornu na niske temperature, populacije će se u generacijama razdvajanja uzgajati u područjima s niskim temperaturama tako da će nakon određenog broja generacija u populaciji ostati uglavnom genotipovi otporni na niske temperature. U toku izbora sjemena u ranim generacijama cijepanja pod utjecajem prirodnih uvjeta smanjuje se broj nepogodnih genotipova koji slabije podnose uvjete okoline.

Kad se postigne ujednačenost, a to je obično u F_4 ili F_5 generaciji, započinje pojedinačni izbor (slika 12). U žitaricama se sije 3.000 – 5.000 biljaka iz čega se odabere 300 - 500 pogodnih biljaka. Od svake biljke sjeme valja držati odvojeno. Sljedeće se godine uzgaja u zasebnoj parcelici te nastavlja dalja selekcija. Iz tih parcelica odabiru se odgovarajuće biljke, odnosno linije, u nekoliko daljih generacija sve dok se ne postigne ujednačenost linija zadovoljavajućih svojstava. Linije izvedene iz pojedinačnih biljaka ocjenjuju se isto kao i linije razvijene drugim metodama inbridinga.

Preživljavanje konkurentnih alela u prirodnoj selekciji nije slučajno. Superiorniji aleli u selekciji obično su s agronomskog stajališta superiorniji. Utvrđeno je da prirodna selekcija može doprinijeti održavanju visokoprinosnih individua (Allard, 1988.; Corte i sur., 2002.). Pokusi s grahom pokazali su da prirodna selekcija čak povećava prinos zrna (Hamblin, 1977.). No dvojbeno je djeluje li prirodna selekcija uvijek u pravcu koji oplemenjivači žele. Štoviše, prirodna selekcija ponekad djeluje protiv nekih korisnih svojstava. Ako, pak, okolina u kojoj je provedena selekcija, nije identična onoj u kojoj će se budući kultivar uzgajati, prirodna selekcija može proizvesti populaciju nepogodnu za namjeravani cilj.

Budući da metoda selekcije u smjesi traje dugo, barem 10 godina od početnog križanja do priznavanja sorte, prave se kombinacije s drugim metodama da se ubrza i poboljša postupak. Jedna od modifikacija je kombinacija s metodom potomstvom jedne sjemenke. U F_3 ili F_4 generaciji nakon uzgoja u smjesi nastavi se postupak s potomstvom jedne sjemenke. Ovakav postupak uspješno se primjenjuje u žitaricama u oplemenjivanju za otpornost na bolesti, ali i za poboljšanje nekih drugih svojstava. F_2 i eventualno F_3 generacija uzgajaju se u smjesi uz umjetno povećanu prisutnost odgovarajućih patogena nakon čega se od preživjelih biljaka odabira jedna sjemenka te provodi dalji postupak. Time se postiže usmjeravanje selekcije u željenom pravcu i ubrzanje postupka.



Slika 12. Metoda selekcije u smjesi (Bulk metoda)

Druga mogućnost modificiranja je kombiniranje s pedigree metodom. U takvoj modifikaciji metoda smjese primjenjuje se u F_2 , F_3 i eventualno u F_4 generaciji. Nakon toga započinje izbor pojedinačnih genotipova pedigree metodom. Postupak je moguće provoditi i tako da selekciju obavljamo u F_3 ili F_4 generaciji nakon čega slijede poljski pokusi, čak i ako se linije još cijepaju. Superiorne linije se reselekcioniraju dok se nastavlja ispitivanje prinosa u preliminarnim pokusima.

Nedostatak je selekcije u smjesi što se, za razliku od pedigree metode, ne mogu dobiti podaci u tijeku ranih generacija o nasljeđivanju posebnih svojstava ili ostvarenju pojedinih linija. Uz to, neki korisni genotipovi koji su u populacijskoj smjesi slabije konkurentni, mogu biti eliminirani prirodnom selekcijom. Prirodna selekcija ne favorizira uvijek željene genotipove; ponekad može favorizirati i neželjene. Npr. genotipovi kratke stabljike, ranije epohe dozrijevanja i otporni na polijeganje, mogu biti potpuno eliminirani prirodnom

selekcijom, dok će visoke biljke s kasnijim dozrijevanjem i osjetljive na polijeganje biti favorizirane.

Literatura

Allard, R.W. 1988. Genetic change associated with the evolution of adaptadness in cultivated plants and their wild progenitors. *J. of Heredity* 79:225-238.

Corte, H.R., Ramalho, M.A.P., Gonçalves, F.M.A., Abreu, A. de F.B. 2002. Natural selection for grain yield in dry bean populations bred by bulk method. *Euphytica* 123:387-393.

Hamblin, J. 1977. Plant breeding interpretations of the effect of bulk breeding on four populations of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica* 26:157-168.

Potomstvo jedne sjemenke

Izbor individua u ranim generacijama razdvajanja može oplemenjivača odvesti u pogrešnom pravcu što je ozbiljan nedostatak nekih metoda oplemenjivanja samooplodnog bilja. Taj nedostatak moguće je prevladati prevođenjem linija u homozigotno stanje i brzim fiksiranjem gena u odsutnosti selekcije. To je najlakše provesti razmnožavanjem pojedinačnih sjemenki od svake samooplođene biljke, počevši od F_2 generacije. Takva metoda razvoja novih linija naziva se potomstvo jedne sjemenke.

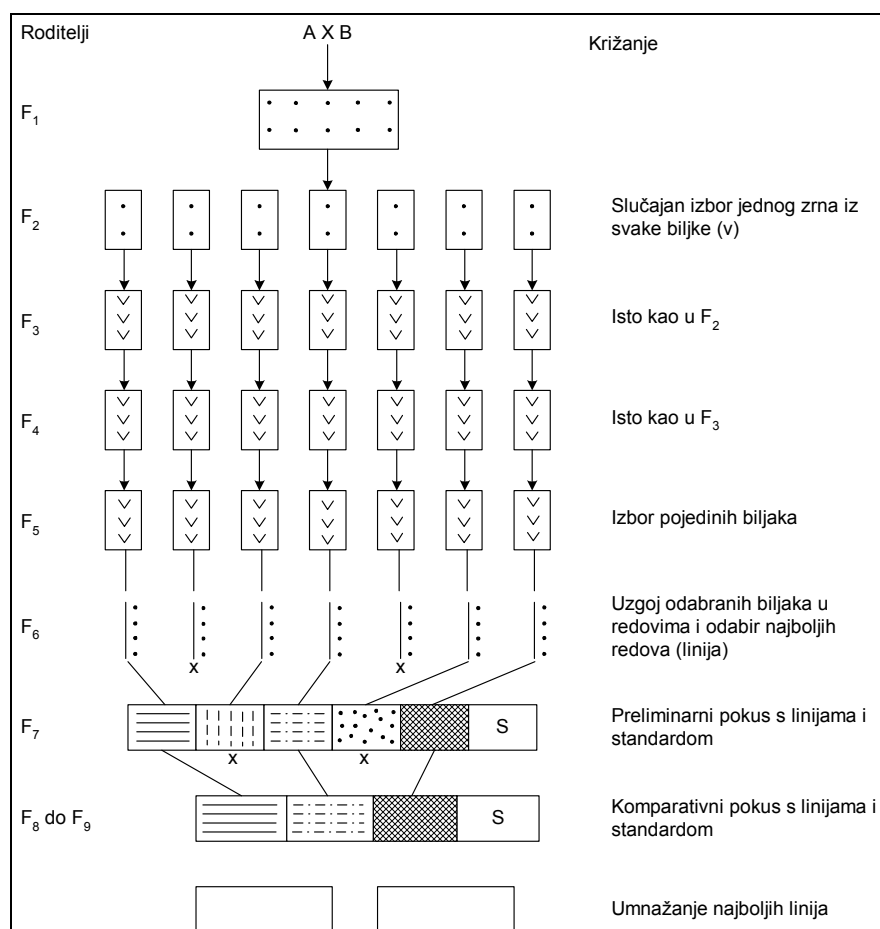
Ova metoda oplemenjivanja nastoji održati visoku razinu heterogenosti unutar velikog broja biljaka u populaciji, dok se one prevode u homozigotno stanje. Za to se koristi široka varijabilnost u F_2 generaciji. Druge oplemenjivačke metode uglavnom gube dio ove varijabilnosti prirodnom ili umjetnom selekcijom. Osnovni postupak sastoji se u uzimanju jedne sjemenke s biljke u F_2 generaciji za dalju selekciju.

Kao i u ostalim metodama kombinacijskog oplemenjivanja, postupak započinje križanjem odabranih roditelja i samooplođnom F_1 generacije. U F_2 generaciji uzgaja se veći broj biljaka. Sa svake biljke uzme se slučajnim izborom po jedna sjemenka i uzgaja u F_3 generaciji. U sljedećim generacijama ovaj postupak se ponavlja, obično do F_5 ili F_6 , sve dok se ne postigne ujednačenost biljaka u potomstvu. Nakon toga se uzgajaju biljke u redovima. Svaki red sad predstavlja posebnu liniju, a biljke u toj liniji potječu od jedne F_2 biljke. Između velikog broja ispitivanih linija odabiru se one sa zadovoljavajućim svojstvima. Nakon toga se s izdvojenim linijama izvođe preliminarni i usporedni pokusi na standardan način do priznavanja novih linija (slika 13).

Budući da u generacijama razdvajanja od F_3 do F_6 nema ocjene potomstva, i da je cilj postupka što prije postići homozigotnost odabranih biljaka, ovaj postupak je pogodan za rad u staklenicama i zatvorenim prostorima s umjetnim uvjetima uzgoja. Stoga je ovom metodom moguće u jednoj godini postići dvije generacije, pa se selekcijski postupak znatno ubrzava. Ovakav sustav iziskuje uzgoj velikog broja biljaka, pošto se potomstvo uzima od svake biljke. Međutim, kako za uzgoj generacija F_2 do F_4 , ili F_5 , ovisno o tome kad počinjemo uzgoj u redove u polju, nisu potrebni optimalni uvjeti, te se biljke uzgajaju u gušćem sklopu nego je to uobičajeno u komercijalnom uzgoju pa se prostor za provođenje postupka smanjuje.

Metoda potomstva jedne sjemenke primjenjuje se u oplemenjivanju brojnih kultiviranih vrsta: soje, žitarica, rajčice i nekih drugih povrtlarskih vrsta. Najviše se upotrebljava u oplemenjivanju soje. Soja ima kratak vegetacijski period; u jednoj godini relativno se lako postignu 2 - 3 generacije. Na taj način se brzo postiže ujednačenost linija i razvoj novog kultivara (tablica 10).

Tri su postupka koji koriste koncept potomstva jedne sjemenke (Fehr, 1987.). Prvi već opisani standardni postupak izdvajanja pojedinačne sjemenke omogućuje da se najveći broj biljaka iz F_2 generacije ostvaruje preko potomstva u naknadnim generacijama. U tom postupku, međutim, potrebno je više rada i teže ga je provesti ako se želi proizvesti više generacija u jednoj godini. Drugi je postupak jedne kućice (humke), a treći je postupak višestrukog sjemenka, tj. potomstvo jedne mahune umjesto pojedinačne sjemenke.



Slika 13. Metoda potomstva jedne sjemenke (Kozumplik, Martinčić, 1996.)

Potomstvo jedne kućice najviše se primjenjuje u žitaricama, a umjesto jedne sjemenke prakticira se potomstvo jednog klasa. Sa svake biljke F_2 generacije obere se jedan klas što se kroz kasnije generacije održava kao posebna linija. Oko 10 - 30 sjemenki od svake te biljke sije se u posude u stakleniku ili u parcelice u polju (odnosno kućice), a od svake linije ponovo se slučajnim izborom uzima jedan klas za uzgoj u sljedećoj generaciji. Izbor klasova je brz i jednostavan. Takav postupak omogućuje selekcioneru da održava rezervu sjemena u slučaju nedovoljne jarovizacije, slabijeg nicanja, izmrzavanja ili tuče. Postupak iziskuje više prostora nego potomstvo jedne sjemenke, ali oplemenjivaču u selekcijskom postupku pruža više mogućnosti i sigurnosti.

Tablica 10. Razvoj kultivara soje Preston metodom potomstva jedne sjemenke (Fehr, 1987.)

Godina	A k t i v n o s t
1	Križanje linija Schechinger S48 x Land O'Lakes "Max" u stakleniku u Portoriku u ožujku. Križanac označen kao AX2357.
1	F_1 sjeme AX2357 posijano u polju u Iowi (SAD), da se dobije sjeme F_2 .
2	F_2 sjeme AX2357 u toku studenog posijano u Portoriku i biljke uzgajane u prirodnim uvjetima. Od svake biljke uzete tri sjemenke i pomiješane.
2	F_3 sjeme AX2357 sijano u Portoriku tijekom veljače u prirodnim uvjetima. Od svake biljke uzete po tri sjemenke i pomiješane.
3	F_4 sjeme AX2357 posijano na odgovarajući razmak u Iowi. F_4 biljke klasirane prema vremenu zriobe kao rane, srednje rane i kasne i ovršene pojedinačno.
	$F_{4;5}$ linije AX2357 ocijenjene u dva ponavljanja na dvije lokacije. Oko 50% linija s

	najboljim vizualnim agronomskim svojstvima obrano za procjenu prinosa.
4	<p>Odabrane $F_{4:6}$ linije AX2357 uzgojene u dva ponavljanja u parcelicama po dva reda na tri lokacije u Iowi. Izdvojena linija A81-257031 koja je kasnije postala sorta Preston.</p> <p>a. A81-257031 ocijenjena za prinos sjemena i druga svojstva na 11 lokacija u 9 država SAD.</p>
5	<p>b. pročišćavanje linije. 48 F_7 biljaka s ujednačenim svojstvima biljke i sjemena ovršene pojedinačno.</p> <p>a. A81-257031 ocijenjeno na ukupno 20 lokacija u 12 provincija i država u SAD i Kanadi.</p>
6	<p>b. redovi potomstva za svaku od 48 biljaka odabranih u prethodnoj godini uzgojeni u Iowi. 47 potomstava s ujednačenim svojstvima obrano odvojeno i dobiveno ukupno 120 kg sjemena.</p>
7-9	Ocjena u sortnim pokusima za priznavanje; proizvodnja elitnog i registriranog sjemena za komercijalnu proizvodnju.

Oplemenjivači soje i drugih zrnatih leguminoza primjenjuju postupak potomstva jedne mahune umjesto jedne sjemenke. Sa svake biljke umjesto jedne sjemenke uzima se i dalje kao smjesa umnožava sjeme jedne mahune. Uz pretpostavku da jedna mahuna soje ima tri sjemenke očekivati je da svaka treća F_6 linija bude izvedena od posebne F_2 biljke. To bi trebalo poticati značajnu genetičku varijabilnost za kvantitativna svojstva poput prinosa (Macchiavelli i Beaver, 2001.).

Prednosti metode potomstva jedne sjemenke su, prije svega ubrzanje selekcijskog postupka, zatim veća genetička varijabilnost populacije, laganije održavanje populacije tijekom inbridinga i smanjenje utjecaja prirodne selekcije na populaciju. Metoda potomstva jedne sjemenke postiže veću genetičku dobit od pedigree metode zbog veće genetičke varijabilnosti i poboljšane učinkovitosti selekcije. Iz istih razloga ova je metoda učinkovitija od drugih za svojstva niske heritabilnosti i za svojstva uvjetovana recesivnim genima. Pored toga, metoda potomstva jedne sjemenke omogućuje dobar uspjeh ako se provodi istodobna selekcija za nekoliko svojstava s različitim razinama heritabilnosti (Tigchelaar i Casali, 1976.).

Nedostatak ove metode je što biljke uzgojene u umjetnim uvjetima nisu bile izvrnute stresovima pod kakvim će se razvijati u prirodnim uvjetima. Stoga se selekcijski postupak produžava zbog ispitivanja homozigotnih linija u odgovarajućim uvjetima uzgoja u poljskim pokusima. Ovi će nedostaci biti manje izraženi ukoliko su oba roditelja elitne linije s minimalnim agronomskim nedostacima. Budući da u metodi potomstva jedne sjemenke u generacijama razdvajanja nema ocjene odabranih genotipova već je izbor slučajna, moguć je gubitak vrijednih genotipova.

Literatura

Brim, C.A. 1966. A modified pedigree method of selection in soybeans. *Crop Sci.* 6:220.

Fehr, W.R. 1987. Principles of cultivar development. Volume 1, Theory and technique. Macmillan Publishing Co., New York.

Kozumplik, V. Martinčić, J. 1996. Oplemenjivanje bilja. Zagreb.

Macchiavelli, R., Beaver, J.S. 2001. Effect of number of seed bulked and population size on genetic variability when using the multiple-seed procedure of single seed descent. *Crop Sci.* 41:1513-1516.

Tigchelaar, E.C., Casali, V.W.D. 1976. Single seed descent applications and merits in breeding self-pollinated crops. *Acta Hort.* 63:85-90.

Metoda povratnog križanja

Metoda povratnog križanja je selekcijski postupak kojim se iz jednog genotipa u drugi prenosi jedan ili nekoliko gena. To se čini da bi se poboljšalo neko svojstvo postojećeg, inače dobrog kultivara. Postupak se provodi ponovljenim križanjem potomstva s jednim od roditelja. Većina oplemenjivačkih programa koristi povratno križanje, uglavnom na ograničenoj bazi, ali se ovakvo križanje koristi i kao jedina oplemenjivačka metoda. U ovoj metodi oplemenjivač ima značajnu kontrolu nad genetičkim variranjem u cijepajućoj populaciji u kojoj se provodi izbor.

Metodom se povratnog križanja ne razvija novi kultivar, već se samo postojećem kultivaru poboljšava određeno svojstvo. To je konzervativna metoda. Ona omogućuje oplemenjivačima da održavaju genotipove koji su stabilni po prinosu. Primjenjuje se najviše u prijenosu kvalitativnih svojstava kao npr. otpornosti na bolesti.

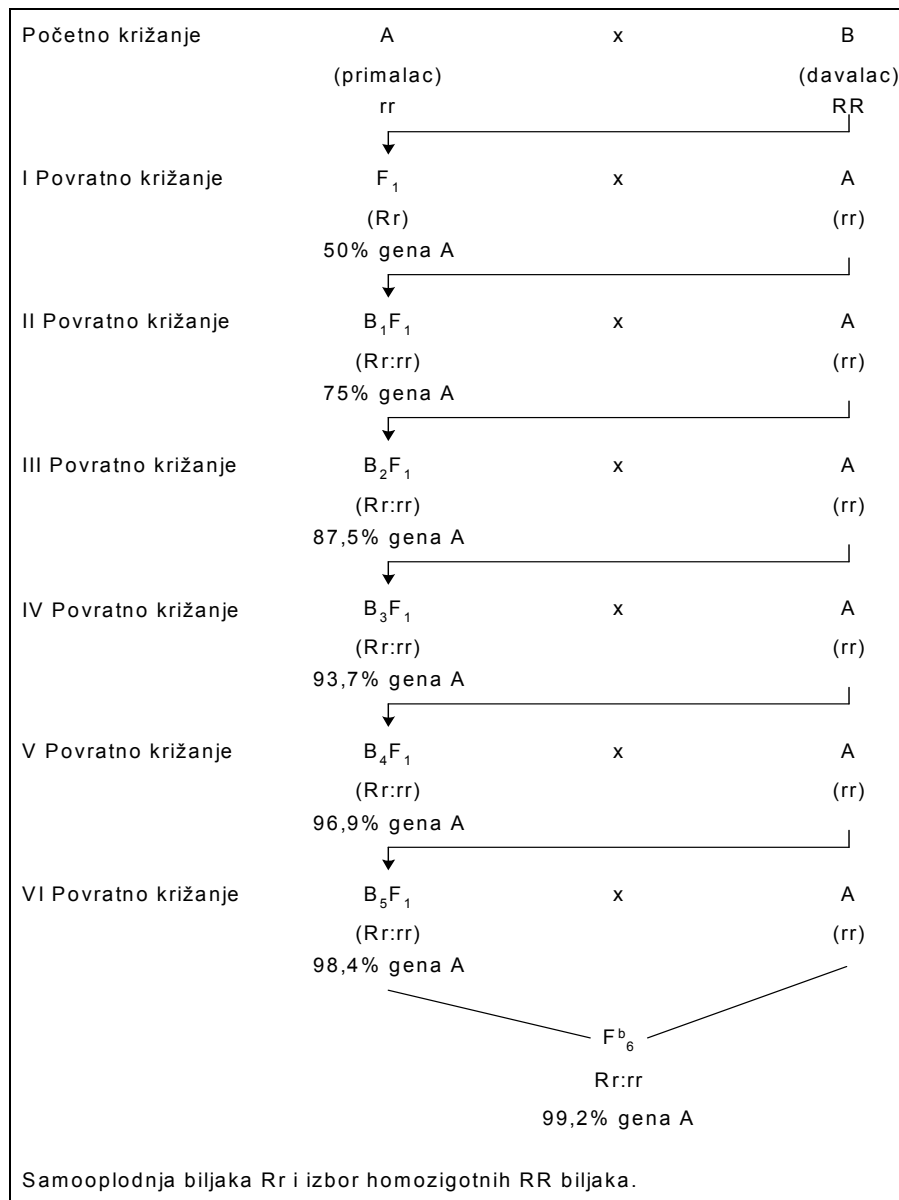
Povratno se križanje za unošenje nekog svojstva u inbred linije koristi kao korektivna metoda, a često i za kombiniranje svojstava iz divlje germplazme (Shade i Kitch, 1986.; McCaslin, 1998.). Pojavom uspješnih tehnika biljne transformacije i razvoja transgenskih biljaka, omogućeno je stvaranje poboljšanih kultivara transferom gena iz transformiranih biljaka u poznate kultivare povratnim križanjem.

Prvi je korak u provođenju ovog selekcijskog postupka izbor donora i rekurentnog roditelja. Za rekurentnog roditelja bira se genotip koji je stabilan i prihvatljiv za sva svojstva, osim za ono koje se povratnim križanjem treba unijeti. Obično se bira sorta koja je održala komercijalno značenje za duži period što joj jamči da će i nakon završetka postupka biti atraktivna za proizvodnju. Za donora se bira genotip koji ima gene za traženo svojstvo i što manje drugih neželjenih svojstava.

Tijek selekcijskog postupka ovisi o načinu djelovanja gena za traženo svojstvo. Ako se geni prenose dominantno, potomstvo koje nosi željeni gen, prepoznatljivo je po fenotipu u heterozigotnom stanju, pa ga je lako izdvojiti. Bitna je i heritabilnost svojstva. Prijenos je lakši ako je svojstvo moguće identificirati vizualno ili jednostavnim testovima.

Nakon križanja rekurentnog roditelja (rr) i donora (RR), F_1 koji je heterozigotan, ali izražava dominantno svojstvo, križa se s rekurentnim roditeljem. U prvoj povratnoj generaciji 50% je heterozigotnog s dominantnim izražavanjem i 50% homozigotno recesivnog potomstva, tj. osjetljivog na patogene, ako se prenosi otpornost na bolesti. Osjetljive biljke se odbacuju, a otporne se ponovo križaju s rekurentnim roditeljem (slika 14).

Postupak se povratnog križanja obično provodi od BC_4 do BC_6 generacije. Ako davatelj gena nema mnogo nepovoljnih svojstava i ako je sličan rekurentnom roditelju, s povratnim križanjem prestaje se već nakon BC_4 . Ako je sličnost manja, križanje završava u BC_6 kad je obnovljeno već 96,9% rekurentnog roditelja. Ukoliko još ima osjetljivih genotipova oni se odbacuju, a otporni se samooplode i odvojeno beru. Sljedeće se godine potomstvo svake biljke ocjenjuje za sva važnija svojstva u usporedbi s rekurentnim roditeljem. Ako u potomstvu još uvijek ima osjetljivih genotipova, oni se odbacuju, a otporni genotipovi koji su po ostalim svojstvima jednaki rekurentnom roditelju, beru se u smjesi i uzgajaju kao nove linije umjesto rekurentnog roditelja.



Slika 14. Metoda povratnog križanja (Martinčić, Kozumplik, 1996.)

U prijenosu recesivnih alela tijekom selekcijskog postupka je drugačiji jer se recesivni gen koji treba unijeti u rekurentnog roditelja može identificirati samo u homozigotnom stanju. Stoga je između dva povratna križanja potrebno izvesti jednu samooplodnju. Križanje za prijenos recesivnih gena odvija se u ciklusima. Jedan ciklus sastoji se od tri faze: 1. križanje rekurentnog roditelja s homozigotnim nositeljem recesivnog alela, 2. povratno križanje heterozigota s rekurentnim roditeljem, (daje veliki broj BC₁ potomstva nepoznatog genotipa), i 3. testiranje samooplodnjom (S₁) potomstva BC₁ individua sve u cilju da bi se otkrile biljke sa željenim recesivnim fenotipom.

Ako je npr. nakon prvog povratnog križanja nastao genotip Ss, samooplodnjom će se u potomstvu dobiti genotipovi SS, Ss i ss. Za dalje povratno križanje koristit će se genotip ss. S takvim biljkama koje imaju željeno fenotipsko izražavanje nastavlja se dalji postupak sve dok se ne postigne potomstvo s traženim recesivnim svojstvom uz sva druga svojstva rekurentnog roditelja.

Prednost je ove metode u laganom načinu poboljšanja inače dobrih genotipova sa samo jednim nedostatkom. Pod uvjetom da je izražavanje svojstva koje se prenosi u potomstvu dovoljno prepoznatljivo, povratno križanje moguće je izvesti u bilo kojoj okolini, a u stakleniku i u više generacija u jednoj godini. Budući da je rekurentni roditelj već dokazana sorta ili linija, kad se postigne zadovoljavajuće uvođenje željenog svojstva nije nužno provoditi široke pokuse. Tijekom istog programa povratnog križanja moguće je uvesti nekoliko svojstava, primjerice otpornost na dvije ili više bolesti. Metoda povratnog križanja uspješno se primjenjuje u oplemenjivanju tetraploidnih vrsta poput lucerne (Micallef i sur., 1995.).

Nedostatak metode povratnog križanja je u tome što je ograničena uglavnom na prijenos pojedinačnih kvalitativnih svojstava, osim ako se metoda ne modificira. Pored toga, u vrijeme kad se rekurentni roditelj poboljša, može zbog brzog razvoja novih linija drugim metodama zastarjeti kao koristan kultivar.

Literatura

Martinčić, J., Kozumplik, V. 1996. Oplemenjivanje bilja. Zagreb.

McCaslin, M. 1998. New developments in breeding for resistance potato leaf hopper in alfalfa. Proc. 36th North American Alfalfa Improvement Conference.

Micallef, M.C., Austin, S., Bingham, E.T. 1995. Improvement of transgenic alfalfa by backcrossing. *In vitro Cell Devel. Biol.* 31:187-192.

Shade, R.E., Kitch, L.W. 1986. Registration of 81IND-2 glandular haired alfalfa germplasm. *Crop Sci.* 26:205.

Oplemenjivanje stranooplodnog bilja

Oplemenjivanje stranooplodnih vrsta razlikuje se od postupka u samooplodnim vrstama. Razlike su uvjetovane sustavom oplodnje (tablica 11). Kao posljedica međusobnog oprašivanja i visokog stupnja heterozigotnosti u stranooplodnim vrstama oplemenjivanje se provodi više s populacijama nego s pojedinačnim biljkama. Tijekom postupka oplemenjivanja samooplodnog bilja povećava se udjel točno određenih homozigotnih genotipova; svi drugi nestaju. Nasuprot tome kod stranooplodnog bilja ne biraju se homozigotni genotipovi već se u izvornoj populaciji ili potomstvu pronalaze odgovarajući genotipovi s kojima se provodi dalji oplemenjivački postupak.

Tablica 11. Neki parametri samooplodnih i stranooplodnih vrsta značajni za oplemenjivanje

Parametar	Samooplodne vrste	Stranooplodne vrste
Prirodna populacija	homogena	heterogena
Biljka iz prirodne populacije	homozigotna	heterozigotna
Genotip gameta	homogen	heterogen
Genotipovi haploidne gamete	svi isti	svi različiti
Potomstvo pojedinačne biljke	homogeno	heterogeno
Samo-inkompatibilnost	ne	uobičajena
Muška sterilnost	moguća	moguća
Hibridni vigor	moguć	izražen
Depresija inbridinga	ne	očekivana
Čista linija (kultivar)	moguća	ne
Stranooplodni kultivari	ne	mogući
Hibridni kultivari	povremeno	često
Klonski kultivari	da	da

Metoda masovne selekcije

Masovna selekcija je i u stranooplodnom bilju najstarija oplemenjivačka metoda i prvi tip genetičkog poboljšanja. Kao u samooplodnom bilju farmeri su u populacijama stranooplodnih vrsta odabirali najbolje individue te ih dalje razmnožavali. U slobodnoj oplodnji kukuruza proizvođač je svake godine za narednu sjetvu birao najbolje biljke i klipove i na taj način provodio selekciju. Još 1827. američki je selekcioner Leaming započeo sustavni izbor najboljih klipova u polju stranooplodnih populacija kukuruza. Takvim je postupkom dobio sortu Leaming.

Budući da je temeljena na fenotipskoj ocjeni pojedinačnih biljaka bez ponavljanja te traje uglavnom samo jednu sezonu po ciklusu, ova je metoda jednostavna i relativno brza. Masovna je selekcija stranooplodnog bilja jedna vrsta rekurentne fenotipske selekcije. U oplemenjivačkom kontekstu dva su oblika masovne selekcije. Prvi je selekcija biljaka odgovarajućih svojstava prije cvjetanja i slobodna oplodnja odabranih biljaka u istoj sezoni. Drugi oblik je izbor najbolje ocijenjenih majčinskih biljaka nakon oplodnje. U prvom slučaju križaju se međusobno samo odabrane biljke dok u drugom slučaju nema kontrole polena.

Rezultat masovne selekcije u svakom slučaju bit će poboljšanje prosjeka svojstva koje se oplemenjuje.

Početna populacija u masovnoj selekciji stranooplodnog bilja je stranooplodna sorta nastala u prirodi u slobodnoj oplodnji. Takve populacije su heterogene mješavine heterozigotnih genotipova s visokom razinom genetičkog variranja. To omogućuje selekciju jednostavnim metodama kao i dobro reagiranje na selekciju. Selekcija među genotipovima temelji se na fenotipu, ali reagiranje na selekciju je funkcija genetičke varijabilnosti i heritabilnosti (DeLacy i sur., 1996.).

Postupak masovne selekcije, bez obzira o kojem se obliku radi, u većini biljnih vrsta počinje izborom 50 - 100 ili više biljaka pogodnih svojstava iz izvorne populacije. Prije cvjetanja oplemenjivač može odstraniti biljke neodgovarajućih svojstava tako da one ne sudjeluju u oplodnji sa odabranim genotipovima. Kad se identificiraju zadovoljavajući genotipovi među njima se obavi slobodna oplodnja i na taj se način formira nova populacija ili F₁ generacija. Sjeme se tih biljaka obere i sije kao sljedeća generacija. Seleksijski postupak sada počinje iznova i to na poboljšanoj populaciji (slika 15).

Seleksijski se postupak ponavlja sve dok se ne postigne željena razina ostvarenja svojstva. Ovakva metoda provodi se obično u 2 – 5 ciklusa selekcije i reselekcije da bi se što potpunije iskoristila genetička varijabilnost prisutna u populaciji.

Djelotvornost masovne selekcije ovisi o odabranom biljnom materijalu, svojstvu koje se oplemenjuje, adekvatnoj izolaciji i preciznosti eksperimentalne tehnike koju koristi oplemenjivač. Opseg odabira individua u populaciji ovisi najviše o učestalosti traženog svojstva te dijelom o tehničkim mogućnostima izvođenja. Izbor se često pravi za jedno svojstvo pa treba paziti da se odabere dovoljno velik uzorak kako bi se održala varijabilnost za druga svojstva u populaciji.

Tablica 12. Povećanje prinosa masovnom selekcijom

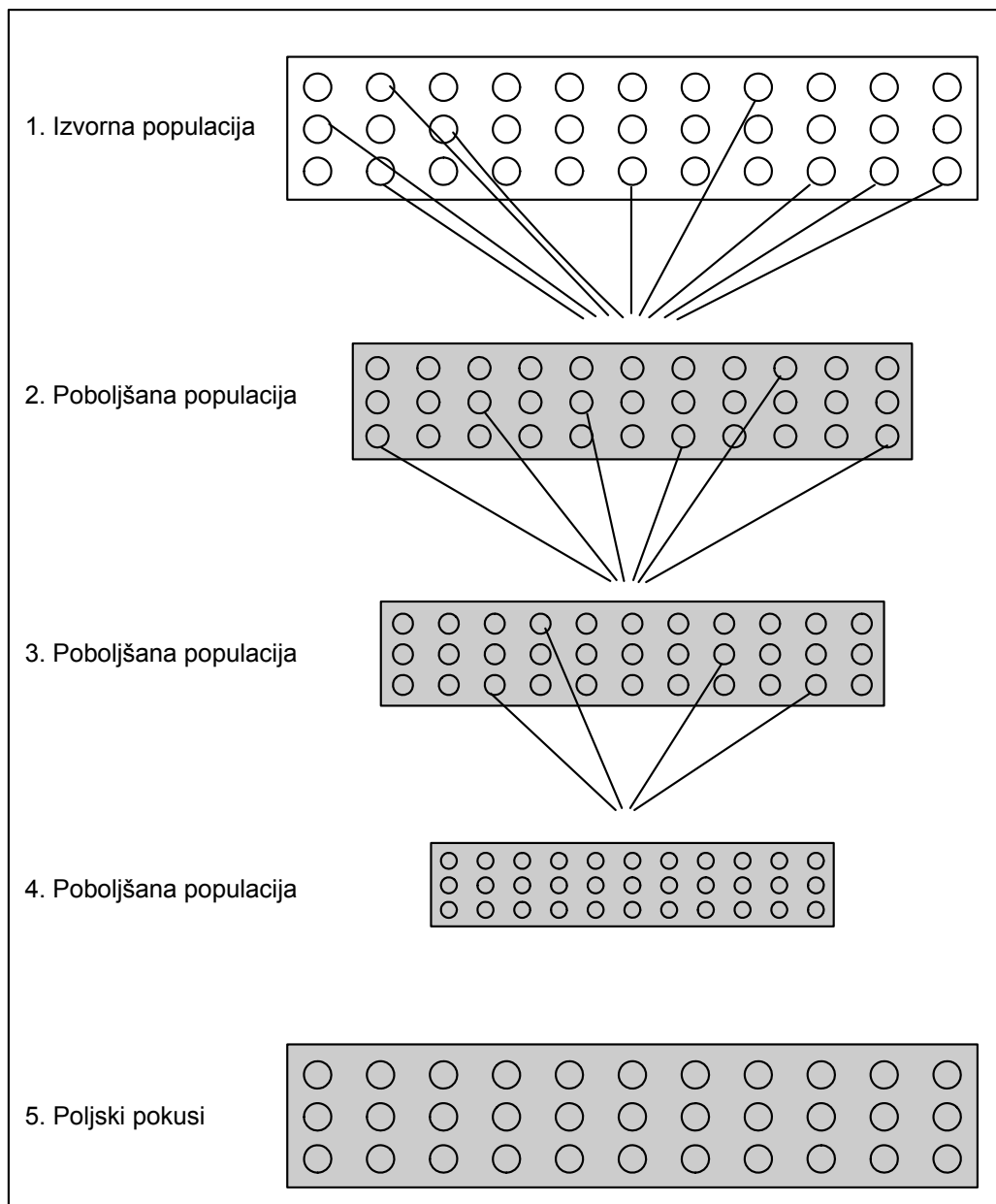
Populacija	kg/ha	% od kontrole
C0*	5040	100,0
C1	5206	103,3
C2	5364	106,4
C3	5708	113,2
C4	6991	127,8

C0 je osnovna ili referentna populacija (standard za usporedbu)

Masovna selekcija je u određenim uvjetima veoma učinkovit postupak. To je pokazao rad Gardnera (1961.) na kukuruzu. On je iz jedne populacije sa svake odabrane biljke kukuruza uzeo po 20 sjemenki i tako dobio sjeme za sljedeći ciklus. U seleksijsku shemu uveo je sistem blokova kako bi eliminirao mikrolokacijsku varijabilnost tla. U svakom bloku zasijao je po 40 biljaka. Između njih je odabrao četiri najbolje biljke. Podjednak broj sjemenki iz svakog bloka pomiješao je za sljedeći ciklus selekcije. Nakon četiri ciklusa selekcije prinos je povećan gotovo 30% u odnosu na početnu populaciju (tablica 30).

Danas se masovna selekcija najviše koristi u oplemenjivanju krmnih trava (Larson i sur., 2001.) i leguminoza. U lucerni se i danas, zbog ograničenja vezanih za hibridizaciju, primjenjuje metoda masovne selekcije. Ovom metodom stvorena je sorta lucerne tolerantna na sol koju je moguće uzgajati u zaslanjenim tlima (Dobrenz, 1999.). Ako se iz nekog razloga u proizvodnji suncokreta ne uzgajaju F₁ hibridi primjenjuje se masovna selekcija, najčešće

radi povećanja sadržaja ulja i ranije zrelosti. Ova metoda primjenjuje se u oplemenjivanju kukuruza, šećerne repe kao i nekih drugih stranooplodnih vrsta. U krmnim vrstama lokalne sorte stabilizirane prirodnom selekcijom brane su u masi, a izabrano sjeme je korišteno kao novi kultivar. U kukuruзу je masovna selekcija primijenjena u razvoju kultivara s više klipova (Coors i Mardones, 1989.).



Slika 15. Masovna selekcija stranooplodnog bilja: (Schlegel, 2004.)

Osnovni je cilj masovne selekcije promjena frekvencije gena u željenom pravcu, fiksiranje povoljnih alela i povećanje odnosa superiornih genotipova u stranooplodnoj populaciji. Izbor u početku oplemenjivanja djeluje jače nego u kasnijim generacijama. Većim sužavanjem populacije moguća je depresija inbridinga. Dužina provođenja izbora u populaciji kao i djelotvornost same metode, ovisi o broju gena koji djeluju na odabirano svojstvo. Djelovanje izbora utoliko je uspješnije ukoliko na svojstvo djeluje manje gena. U pokusima s kukuruzom najmanja i najviša visina biljke mnogo brže su postignute nego neka druga svojstva, budući da na ova svojstva djeluje samo nekoliko gena. Stalna masovna selekcija za

neko svojstvo visoke heritabilnosti koje je moguće ocijeniti vizualno, kao npr. ranije cvjetanje mijenjat će frekvenciju toga gena u pravcu koji želimo.

Prednosti masovne selekcije su jednostavnost izvođenja, manje rada i niži troškovi proizvodnje. Metoda masovne selekcije posebno je bila korisna u ranim fazama oplemenjivačkih programa. Time se omogućuje formiranje populacije koja se potom može upotrijebiti kao početni materijal za druge oplemenjivačke postupke.

Metoda masovne selekcije manje je djelotvorna u poboljšanju prinosa i ostalih svojstava s kvantitativnim nasljeđivanjem i niskom heritabilnošću, jer biljke superiorne fenotipski mogu biti rezultat okoline kao i nasljednih činitelja. Činitelji koji doprinose slabijoj djelotvornosti masovne selekcije su slaba izolacija, nepostojanje kontrole okoline, interakcija genotipa i okoline te slaba roditeljska kontrola. Nedostatak kontrole nad izvorom polena povećava vjerojatnost oprašivanja pogodnih biljaka s nepogodnim. Da bi se umanjio učinak okoline na izražavanje svojstava, parcelu s biljkama valja podijeliti u manje blokove. Unutar svakog bloka odabiru se biljke odgovarajućih svojstava i sjeme pomiješa za dalji rad.

Literatura

Coors, J.G., Mardones, M.C. 1989. Twelve cycles of mass selection for prolificacy in maize. I. Direct and correlated responses. *Crop Sci.* 29:262-266.

DeLacy, L.H., Basford, K.E., Cooper, M., Bull, J.K., McLaren, C.G. 1996. Analysis of multi-environmental trials – An historical perspective. U: Cooper, M., Hammer, G.L. (ur.) *Plant Adaptation and Crop Improvement*. Oxford: CAB International/IRRI/ICRISAT.

Dobrenz, A.K. 1999. Salt tolerant alfalfa. US patent 6.005.165.

Gardner, C.O. 1961. An evolution of the effects of mass selection and seed irradiation with thermal neutrons on yield of corn. *Crop Sci.* 1:241-245.

Hallauer, A.R. Miranda, J.B. 1988. *Quantitative genetics in maize breeding*. Second ed. Ames: Iowa State University.

Larson, S.R., Waldron, B.L., Monsen, S.B., John, L. St., Polazzo, A.J., McCracken, C.L., Harrison, R.D. 2001. AFLP variation in agamosperous and dioecious Bluegrasses of Western North America. *Crop Sci.* 41:1300-1305.

Schlegel, R. 2004. PBU, CD, Gatersleben

Taylor, N.L. 1987. Forage legumes. U: Fehr, W.R. (ur.) *Principles of cultivar development*, vol. 2 str. 209-248. Macmillan Publishing Co, New York.

Individualna selekcija

U stranooplodnim vrstama također se provodi individualna selekcija, bilo iz populacija slobodne oplodnje, kao što su prirodne ili lokalne populacije bilo nakon križanja dvije sorte. Križanjem se postiže nova rekombinacija gena, a potomstvo takvog križanja je više heterozigotno od oba roditelja. Ako se selekcija provodi nakon hibridizacije, postupak započinje već u F_1 generaciji. Najčešća metoda individualne selekcije stranooplodnog bilja u žitaricama je **klip** ili **klas na red**. U kukuruzu se primjenjuje klip na red, a u žitaricama, kao npr. u raži, klas na red.

Selekcijski postupak počinje izborom 50 – 100 biljaka koje imaju odgovarajuća fenotipska svojstva. Sjeme svake biljke obere se i ovrše odvojeno. Sljedeće se godine sije u zaseban red. Svaki red predstavlja jednu familiju. Tijekom vegetacije ocjenjuju se potomstva u svim redovima. Neodgovarajuće se biljke prije cvjetanja odstrane ili zalome tako da nema oplodnje između pogodnih i nepogodnih biljaka.

Po završetku vegetacije u svakom redu obere se sjeme biljaka koje zadovoljavaju postavljene kriterije za svojstvo koje se oplemenjuje. Sjeme se pomiješa, ovrše zajedno i koristi kao materijal za dalju selekciju. Sljedeće godine ocjenjuju se najbolja potomstva u redovima te identificiraju superiorni redovi. Za dalju selekciju biraju se potomstva najbolje ocijenjenih redova, a ostali se odbacuju. Time završava jedan ciklus.

Izbor se na sličan način može ponoviti u sljedećim godinama dok se ne postigne zadovoljavajuće ostvarenje traženog svojstva. Nakon toga se pojedine familije ispituju u pokusima kao novi kultivari ili se pak slična potomstva mogu sastaviti i od njih proizvesti novi stranooplodni kultivar.

Metodom klip na red vizualna svojstva zrna ili biljke mijenjaju se slično kao i masovnom selekcijom, ali su promjene brže, budući da je u metodi individualne selekcije izvor polena pod djelomičnom kontrolom. Izvor polena ograničen je samo na odabrane genotipove.

Nedostatak je ove metode što se ocjenjuje samo doprinos majke, pošto je doprinos oca nepoznat. Među biljkama nastaje slobodna oplodnja pa se ne zna točan izvor polena. Pošto ocjenu prije cvatnje nije moguće provesti za sva svojstva, ova metoda učinkovita je samo za svojstva visoke heritabilnosti poput dužine klipa i sadržaja ulja u zrnu kukuruza. Za svojstva niske heritabilnosti poput prinosa ova metoda je manje djelotvorna iz istih razloga kao i masovna selekcija.

Individualna selekcija može se provoditi i kao selekcija u polusrodstvu. Biljke ili familije u polusrodstvu potječu od biljaka s jednim zajedničkim roditeljem ili izvorom polena. U ovakvom postupku uzgajaju se potomstva od 25 do 50 biljaka u parcelicama s ponavljanjem tako da se ocjenjuje prosječno ostvarenje i varijanca. Selekcija u polusrodstvu pogodna je za vrste koje se uzgajaju za vegetativnu masu kakve su krmne trave i leguminoze. Budući da se provodi ocjena vegetativnih svojstava moguće je odstraniti inferiorne biljke ili potomstva prije cvjetanja tako da u genskoj strukturi sljedeće generacije sudjeluju samo odabrane biljke.

Razvoj hibridnih kultivara

Od povijesnog rada Shulla s početka prošlog stoljeća pa do danas, hibridni kultivari spadaju među najvažnije i vjerojatno najviše istraživane tipove biljnih kultivara. Hibridi su unaprijedili poljoprivrednu proizvodnju i poboljšali produktivnost u mnogim kultiviranim vrstama. Današnju poljoprivrednu proizvodnju bilo bi nemoguće zamisliti bez hibridnih kultivara. U početku se činilo da će poteškoće u proizvodnji hibridnog sjemena ograničiti razvoj hibridnih kultivara, budući da su roditeljske inbred linije proizvodile malo sjemena. Jones je 1918. predložio da se u praksi koriste četverolinijski hibridi koji nastaju križanjem dva nesrodna jednostruka hibrida, pošto jednostruki hibridi proizvode dovoljno kvalitetnog sjemena.

Prvi su se komercijalni hibridi kukuruza pojavili početkom dvadesetih godina prošlog stoljeća. Već 40-ih godina u SAD hibridi su dominirali u proizvodnji. U početku su se većinom uzgajali četverolinijski hibridi. Početkom 60-ih godina umjesto četverolinijskih uvode se dvolinijski hibridi. Oni se danas uglavnom primjenjuju u proizvodnji hibridnog kukuruza. Kukuruz je postao model za razvoj hibridnih kultivara i kad su se hibridi pokazali uspješnim u ovoj kulturi, nastavljeno je istraživanje u drugim kultiviranim vrstama.

U oplemenjivačkom smislu hibridni kultivar je potomstvo prve generacije križanja dvije genetički različite individue. Takvo potomstvo nastaje križanjem inbred linija, klonova ili populacija. U najvećem broju slučajeva hibridi su rezultat križanja dvije ili više inbred linija ukoliko su u pitanju stranooplodne vrste, odnosno čistih linija u samooplodnim vrstama. S genetičkog stajališta hibrid je rezultat spajanja dvije gamete koje se razlikuju po svojoj genetičkoj konstituciji.

U razvoju hibridnih kultivara najprije se formira početna populacija, nakon čega slijedi razvoj inbred linija, ispitivanje kombinacijskih sposobnosti inbred linija i na koncu proizvodnja hibridnog sjemena

Kao početni materijal za razvoj inbred linija za hibridne kultivare obično se koriste prirodne populacije stranooplodnih vrsta, populacije iz rekurentne selekcije ili F₂ generacija nastala križanjem homozigotnih roditelja. Što je genetički materijal u početnoj populaciji raznolikiji postiže se veći broj različitih inbred linija. Linije i hibridi bit će onoliko dobri koliko je dobra raspoloživa početna oplemenjivačka populacija.

Razvoj inbred linija

Inbred linije su homozigotne oplemenjivačke linije koje se upotrebljavaju kao roditelji hibridnih kultivara u stranooplodnim vrstama. Takve linije nastaju samooplođnjom, križanjem u srodstvu, povratnim križanjem ili metodom dihaploida. Kako se homozigotnost najlakše postiže samooplođnjom, taj postupak se najčešće koristi u razvoju inbred linija.

U samooplodnim biljnim vrstama nema poteškoća u razvoju inbred linija, budući da su sorte u tim vrstama u najvećem broju slučajeva čiste linije ili pak imaju visok stupanj homozigotnosti, pa se individualnom selekcijom lako i brzo prevode u inbred linije.

Odabrane biljke stranooplodne vrste moraju proći postupak samooplođnje kako bi se u potomstvu smanjila heterozigotnost i stvorio određen broj različitih homozigotnih linija. Iz početnog genetičkog materijala odabiru se biljke odgovarajućih svojstava u kojima se provede samooplođnja, a sljedeće godine sjeme se svake biljke sije u posebnu parcelicu. Za svaku odabranu biljku vodi se evidencija samooplođnje. Početna heterozigotna samooplođena biljka

označava se kao S_0 , njezino potomstvo kao S_1 (prva samoopložena generacija), druga generacija kao S_2 i tako se nastavlja obilježavanjem do kraja postupka. Nakon samooplodnje doći će do razdvajanja svojstava budući da su roditelji za većinu svojstava bili heterozigotni. Stoga se tijekom vegetacije iz te S_1 generacije odabiru najbolje biljke na kojima se dalje po istom principu provodi samooplodnja. Postupak se ponavlja sljedećih nekoliko generacija.



Slika 16. Smanjenje vigora u kukuruzu nakon inbridinga; S_0 predstavlja početnu samooploženu biljku, a S_1 do S_6 generacije inbridinga (Poehlman i Sleper, 1996.)

Kako samooplodnja napreduje povećava se raznolikost između linija, a potomstvo unutar linija ujednačava se dok se ne formiraju homozigotne linije. Ako je postupak inbridinga započet s genetički dovoljno heterogenim materijalom, na kraju postupka ostvari se veći broj različitih inbred linija. Korisno bi bilo u toku inbridinga i izbora, inbred linije podvrgavati nepovoljnim uzgojnim uvjetima, kao što je gušći sklop, visoke ili niske temperature, suša ili povoljni uvjeti za infekciju. Na taj način izdvajaju se linije koje će bolje podnositi nepovoljne vanjske uvjete i biti prilagodljivije u različitim okolinama.

Tijekom inbridinga mnogi neželjeni recesivni aleli na lokusima zamjenjuju se dominantnim alelima, a recesivni se gube iz potomstva. Na drugim, pak lokusima recesivni aleli postat će homozigotni, dovodeći tako do općeg gubitka vigora. Za vrijeme inbridinga zapaženo je da je najveći gubitak vigora u prvim generacijama samooplodnje, a taj gubitak se smanjuje kako inbred linije postupno povećavaju homozigotnost (slika 16). Kad se utvrdi da više nema gubitka vigora, prekida se s inbridingom.

U razvoju inbred linija koriste se selekcijski postupci uobičajeni u oplemenjivanju samooplodnih vrsta: metoda pedigreea, potomstvo jedne sjemenke ili metoda dihaploida. Izbor postupka ovisi o uvjetima okoline u kojoj se inbriding provodi, ali se razvoj inbred linija najčešće provodi pedigree metodom.

Ima vrsta u kojima se zbog samoinkompatibilnosti (raž) ili nekih drugih razloga (voćne vrste) nikako ili teško provodi inbriding. U razvoju inbred linija takvih vrsta pribjegava se drugim tehničkim postupcima poput kultura tkive i razvoja haploida.

Ispitivanje kombinacijskih sposobnosti

Nakon razvoja inbred linija, potrebno je u kombinaciji s drugim linijama utvrditi ostvarenje njihovih svojstava u potomstvu. Na taj će se način odrediti obujam hibridnog vigora i pronaći pogodne linije i kombinacije za hibride superiornih svojstava. Vrijednost jedne inbred linije ocjenjuje se samo prema njezinom doprinosu hibridnom vigoru koji se ostvaruje u kombinaciji s drugom linijom. Sposobnost inbred linije da dađe odgovarajući doprinos u hibridnom potomstvu naziva se kombinacijska sposobnost.

U procjeni vrijednosti inbred linija i njihovom doprinosu hibridnom vigoru, koriste se opća i specifična kombinacijska sposobnost. Opća kombinacijska sposobnost (**OKS**) predstavlja prosječan doprinos koji jedna inbred linija daje ostvarenju hibrida u seriji hibridnih kombinacija u usporedbi s doprinosom druge inbred linije u istoj seriji kombinacija. Doprinos jedne inbred linije u ostvarenju hibrida nastalog križanjem s posebnom inbred linijom u odnosu na prosječno ostvarenje te linije za opću kombinacijsku sposobnost predstavlja specifičnu kombinacijsku sposobnost (**SKS**).

Razliku između OKS i SKS objasniti ćemo na sljedećem primjeru. Ako se linija P1 križa s linijama P2, P3, P4, i P5 prosječno ostvarenje hibrida P1xP2, P1xP3, P1xP4 i P1xP5 predstavlja OKS linije P1. S druge strane, posebno ostvarenje bilo kojeg od četiri navedena hibrida predstavlja SKS linije P1 s jednim od ostalih roditelja. Kombinacija s najboljim prosječnim ostvarenjem imat će najvišu specifičnu kombinacijsku sposobnost.

Najčešće korištena metodologija za ocjenu kombinacijskih sposobnosti inbred linija je dialelno križanje prema Griffingovom postupku (1956.). Dialelna analiza po ovom postupku pokazuje opću i specifičnu kombinacijsku sposobnost, najbolje partnerske parove za križanje i najbolje roditelje kao testere. Funkcija je dialelnog križanja odrediti rang roditelja temeljen na kombinacijskoj sposobnosti s posebnim testerom. Dialelno križanje zahtijeva mnogo posla zbog ručnog oprašivanja i hibridnog testiranja. To ograničava funkcionalnost ove metode, pogotovo ako se poveća broj linija za ispitivanje.

Teško je, ako ne i nemoguće, ispitati sve inbred linije u kombinaciji sa svim drugim linijama, pogotovo ako ispitujemo velik broj linija. Broj mogućih kombinacija svih linija križanih međusobno izračunava se za dvolinijske hibride po formuli $n(n-1)/2$. Za trolinijske hibride formula je $n(n-1)(n-2)/2$, a za četverolinijske hibride $n(n-1)(n-2)(n-3)/2$. Ako ispitujemo 10 linija mogući broj dvolinijskih kombinacija iznosi 45, kod trolinijskih križanja 360, a kod četverolinijskih čak 2520 različitih kombinacija. Da bi se smanjio broj križanja i olakšala ocjena vrijednosti inbred linija, one se križaju s jednim zajedničkim, prethodno ispitanim roditeljem koji služi kao tester. Križanje linija s testerom naziva se testcross ili topcross. Kako je u tim ispitivanjima jedan roditelj isti, razlike u hibridima rezultat su kombinacijskih svojstava ispitivane linije.

Linije koje su pokazale dobru opću kombinacijsku sposobnost, ispituju se s više testera radi eliminiranja linija sa slabijim SKS. Sa svakom godinom ispitivanja smanjuje se broj linija za testiranje, a povećava se broj testera za preostale linije.

Za poboljšanje inbred linija, kada se u jednu, inače dobru inbred liniju, želi unijeti neko posebno svojstvo, koristi se metoda povratnog križanja, poznata kao konvergentno oplemenjivanje. Postupak je isti kao i u drugim slučajevima konvergentnog oplemenjivanja. U takvom križanju preferira se izbor dominantnih alela jer se oni izražavaju u svakoj generaciji povratnog križanja. U selekciji za recesivne alele nužno je testiranje potomstva za identifikaciju pogodnih genotipova, a to usporava postupak.

Tipovi hibridnih kultivara

S obzirom na broj linija koje sudjeluju u formiranju jednog hibrida, F_1 hibridi mogu biti dvolinijski ili jednostruki (single-cross), trolinijski (threeway-cross) i četverolinijski ili dvostruki (double-cross).

Od samih početaka rada s hibridnim kultivarima poznato je da su jednostruki hibridi, izvedeni križanjem dvije inbred linije ($A \times B$), najprinosniji i najujednačeniji. Svi genski lokusi u ovakvim hibridima su heterozigotni ($AaBbCcDd$) i imaju maksimalan izražaj heterozisa. Međutim, jedan od ograničavajućih činitelja u razvoju komercijalnih dvolinijskih hibrida je nizak prinos sjemena roditeljskih inbred linija. Proizvodnja hibridnog sjemena kukuruza po ha ženskog roditelja kreće se od 1,5 do 2 t u suhom ratarenju, odnosno do 3 t u intenzivnoj proizvodnji uz navodnjavanje. To je 3 do 4 puta manje nego u komercijalnoj proizvodnji.



Slika 17. Usporedba dvolinijskog hibrida kukuruza i inbred linija od kojih je razvijen

Trolinijski hibrid je potomstvo F_1 hibrida i neke druge linije ($A \times B$) \times C. Razina heterozisa u trolinijskom hibridu ovisi o stupnju različitosti između hibrida i trećeg roditelja. No učestalost lokusa s jednim dominantnim alelom u trolinijskom hibridu općenito će biti manja nego u križanju dvije inbred linije, pa će i heterotični učinak u trolinijskom hibridu biti manji nego u dvolinijskom. Ako dvolinijski hibrid ima genetičku strukturu $AaBbCcDd$ i križa se s inbred linijom $AAbbCCDD$, u hibridnom potomstvu dobit ćemo genotipove različite konstitucije: $A-BbCcD-$, $A-BbccD-$ i $A-bbccD-$. Kao što se vidi, dio potomstva imat će recesivne homozigotne lokuse, što će kod tih potomaka smanjiti prosječan heterotični učinak.

Ponekad se primjenjuje modificirani dvolinijskih hibrid; to je zapravo trolinijski hibrid u kojem je jednostruki hibrid nastao križanjem dvije srodne linije (A_1 i A_2), koji se potom križa s trećom, nesrodnom linijom. Ovaj tip hibrida ima prednost u odnosu na dvolinijski u većoj proizvodnji sjemena, a u odnosu na trolinijski u jačem izražavanju heterozisa.

Dvostruki ili četverolinijski hibridi nastaju križanjem dva jednostruka hibrida, odnosno u njemu su sjedinjene četiri inbred linije ($A \times B$) \times ($C \times D$). U ovakvoj će kombinaciji prosječna učestalost lokusa s jednim dominantnim alelom biti manja nego u dvolinijskom i trolinijskom hibridu, pa će i prosječan izražaj heterozisa biti manji (tablica 13). Ako križamo dva F_1 hibrida koji su maksimalno heterozigotni ($AaBbCcDd \times AaBbCcDd$), u potomstvu će se na jednom ili više lokusa kod više potomaka pojaviti homozigotni recesivni aleli, što će smanjiti heterotični učinak i prinos. Ostvarenje četverolinijskih hibrida razlikuje se u diploidnim i tetraploidnim vrstama. Istraživanja u autotetraploidnim krmnim kulturama su pokazala da je heterozis zbog multiplih alela na lokusima u četverolinijskim hibridima izraženiji nego u dvolinijskim od inbred roditelja (Bingham i sur., 1994.).

Tablica 13. Prinosi 36 skupina različitih tipova hibrida (Hallauer, 1988.)

Tip hibrida	Prosječan prinos u t.	Standardna devijacija	Najmanji prinos	Najviši prinos
Dvolinijski	6,51	8,8	4,36	8,15
Trolinijski	6,20	6,2	4,77	7,29
Četverolinijski	6,03	3,8	5,40	6,77

Proizvodnja hibridnog sjemena

Jedna od većih poteškoća s kojima se oplemenjivači suočavaju u proizvodnji hibrida je proizvodnja sjemena. Proizvodnja je hibridnog sjemena skuplja i složenija od proizvodnje sjemena drugih tipova kultivara, kod kojih se uglavnom radi samo o umnožavanju sjemena. Da bi proizvodnja hibridnog sjemena bila isplativa, povećani prinos hibrida mora opravdati povećane troškove u proizvodnji sjemena.

Hibridno sjeme proizvodi se primjenom različitih postupaka: ručna emaskulacija i oprašivanje, primjena muške sterilnosti (genska, citoplazmatska, kemijski inducirana), samoinkompatibilnost, te klonsko razmnožavanje F_1 hibrida. Ako postoji odgovarajući sustav sterilnosti, u proizvodnji hibridnog sjemena najviše se koristi citoplazmatska muška sterilnost.

Za uspješnu proizvodnju hibridnog sjemena mora postojati mogućnost odstranjivanja fertilnog polena s majčinske biljke te učinkovit prijenos polena sa očinske na majčinsku biljku. Proizvodnja sjemena, usto mora biti ekonomski opravdana.

Polen se s majčinske biljke odstranjuje umjetno, tj. uklanjanjem prašnika, ili uporabom muške sterilnosti. Umjetno se prašnici odstranjuju ručno ili posebnim tretiranjem kemijskim sredstvima. Muška sterilnost primijenjena u proizvodnji hibridnog sjemena je genska, citoplazmatska ili gensko-citoplazmatska. Ponekad se koristi i funkcionalna muška sterilnost.

Prijenos polena na majčinsku biljku provodi se prirodnim putem i umjetnim oprašivanjem. Prirodno oprašivanje obavlja se vjetrom kao u kukuruzu i insektima kao u suncokretu, djetelini i uljanoj repici. Ručno oprašivanje primjenjuje se u duhanu. Majčinske sjemenske linije moraju biti vigorozne i produktivne, a oprašivač treba davati obilje polena.

Količina proizvedenog hibridnog sjemena ovisi i o biljnoj vrsti. U planiranju proizvodnje valja voditi računa o odnosu između količine proizvedenog hibridnog sjemena po jedinici površine i norme sjetve u komercijalnoj proizvodnji o čemu ovisi ekonomičnost proizvodnje hibridnog sjemena. U proizvodnji soje to je npr. 20:1, suncokreta 240:1, a duhana i do 4000:1. To znači da je na jednom hektaru moguće proizvesti dovoljno sjemena za proizvodnju 4000 ha duhana. U proizvodnji hibridnog sjemena različit je odnos muških i ženskih biljaka. Za soju je taj odnos 1:1, za suncokret 2 - 3:1, kukuruz 4 - 6:1 i za duhan 2 -

4:1. Proizvodnja hibridnog sjemena iziskuje posebnu brigu u održavanju genetičke čistoće inbred linija.

Upotreba F_1 hibrida

Pored povećanja prinosa i poboljšane ujednačenosti u odnosu na druge tipove kultivara, hibridi imaju i druge prednosti radi kojih se sve više uzgajaju. Hibridi olakšavaju kombiniranje multiplih svojstava u jednom kultivaru. U jedan hibrid moguće je unijeti nekoliko dominantnih gena za otpornost na bolesti od kojih jedni dolaze od jednog roditelja a drugi od drugog. Isto tako hibrid može imati tolerantnost na sušu od jednog, a otpornost na polijeganje od drugog roditelja. Oplemenjivači hibridnih kultivara reagiraju brže u selekciji i s više mogućnosti izbora za promijenjene zahtjeve. Novi hibridi proizvode se i uvode u pokuse za jednu do dvije godine, uz uvjet da postoji široka baza inbred linija.

Hibridni kultivari su u proizvodnji mnogih kultiviranih vrsta, posebno kukuruza, šećerne repe, suncokreta, luka i nekih povtlarskih vrsta, dali iznimno dobre rezultate. To je mnoge dovelo do uvjerenja da je razvoj hibrida definitivno najbolji put u selekciji biljnih vrsta koje se razmnožavaju sjemenom. Stoga je u gotovo svim kultiviranim vrstama ispitana mogućnost razvoja hibridnih kultivara. Razlozi za to bili su povećanje produktivnosti i monopol nad sjemenom. Naime, hibridno sjeme se uvijek iznova mora nabavljati od vlasnika hibrida, dok sjeme ostalih kultivara može umnožiti bilo tko samo ako jednom dođe do tog sjemena.

Tablica 14. Procjena globalnih doprinosa hibrida nekih kultiviranih vrsta (Duvick, 1999.)

Vrsta	Zasijane površine(% od ukupnih)	Prednost ¹ hibrida u %	Godišnji dodatni prinos (%)	Dodatni prinos u mil. tona	Ušteda zemljišta u mil. ha
Kukuruz	65	15	10	55	13
Sirak	48	40	19	13	9
Suncokret	60	50	30	7	6
Riža	12	30	4	15	6

¹ procijenjena dobit u prinosu u odnosu na superiornu stranooplodnu sortu u vrijeme uvođenja hibrida

Utvrđeno je da je heterozis češći i mnogo izraženiji u stranooplodnim nego u samooplodnim vrstama. Prosječan izražaj heterozisa u kukuruzu može dostići 200% u odnosu na prosjek roditelja, a kod pšenice svega 10%. Stoga je interes za hibride kod samooplodnih vrsta nešto smanjen, a nastavljen je razvoj hibrida kod stranooplodnih vrsta, te kod onih koje se razmnožavaju klonski.

Pored kukuruza u kojem se hibridi uzgajaju još od dvadesetih godina prošlog stoljeća, hibridi se najviše koriste u proizvodnji suncokreta, šećerne repe, riže i sirka. Hibridni suncokret uzgaja se od konca 60-ih godina prošlog stoljeća. Danas u proizvodnji ove biljne vrste u svijetu hibridni kultivari zauzimaju preko 60% površina (tablica 14). Hibridi suncokreta imaju oko 50% viši prinos od najbolje stranooplodne sorte (Miller, 1987.).

F_1 hibridi se komercijalno uzgajaju i kad ne pokazuju viši prinos. U samooplodnim vrstama hibridi su u odnosu na roditeljske linije po prinosu najčešće intermedijarni, no oni mogu imati neko drugo pozitivno svojstvo, primjerice otpornost na bolesti, ranozrelost ili boja cvijeta u cvječarskim vrstama. Heterozigotne biljke imaju manju interakciju genotipa s okolinom i poboljšanu stabilnost prinosa u odnosu na svoje homozigotne roditelje pa je i to jedan od razloga upotrebe F_1 hibrida u samooplodnim vrstama (Becker i Léon, 1988.). U

proizvodnji duhana hibridi se veoma mnogo upotrebljavaju. Mada su istraživanja pokazala da su hibridi inferiorniji u prinosu u odnosu na čiste linije (Chaplin, 1966.) hibridi duhana imaju neke druge prednosti radi kojih se sve više primjenjuju u komercijalnoj proizvodnji.

Literatura

Becker, H.C., Léon, J. 1988. Stability analysis in plant breeding. *Plant Breeding* 101:1-23.

Bingham, E.T., Groose, R.W., Woodfield, D.R., Kidwell, K.K. 1994. Complementary gene interaction are greater in autotetraploids than diploids. *Crop Sci.* 34:823-828.

Chaplin, J.F. 1966. Comparative performance of F₁ flue-cured tobacco hybrids and their parents. I. Agronomic and quality characteristics. *Tob. Sci.* 10:126-130.

Duvick, D.N. 1999. Heterosis: Feeding People and Protecting Natural Resources. U: Coors, J.G., Pandey, S (ur.) *The Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops* str. 9-29. Amer. Soc. of Agronomy, Inc., Madison, WI.

Eathington, S.R., Dudley, J.W., Rufener, G.K. 1997. Marker effects estimated from testcrosses of early and late generations of inbreeding in maize. *Crop Sci.* 37:1679-1685.

Griffing, J.B. 1956. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel system. *Austral. J. of Biological Sci.* 9:463-493.

Hallauer, A.R., Russell, W.A., Lamkey, K.R. 1988. Corn breeding. U: Sprague, G.F., Dudley, J.W. (ur.) *Corn and Corn Improvement* str. 469-565. Amer. Soc. of Agronomy. Inc., Crop Sci. Soc. of Am. Inc., Soil Sci. of Am. Inc., Madison WI.

Lanza, L.L.B., Souza, Jr. C.L., Ottobani, L.M.M., Vieira, M.L.C., Souza, A.P. 1997. Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers. *Theor. Appl. Genetics*, 94:1023-1030.

Lewontin, R.C., Berlan, J-P. 1990. The political economy of agricultural research: the case of hybrid corn. U: Cannoll, C.R., Vandermeer, J.H., Rosset, P.M. (ur.) *Agroecology*, str. 613-628. McGraw Hill, New York.

Miller, J.F. 1987. Sunflower. U: Fehr, W.R. (ur.) *Principles of Cultivar Development v II* . MacMillan Publishing Company, New York.

Poehlman, J.M., Sleper, D.A. 1996. *Breeding field crops*. Iowa State University Press, Ames.

. Razvoj sintetičkih kultivara

Sintetički kultivar (sintetik) je mješavina sjemena različitih genotipova koji se održavaju stranooplodnjom ograničen broj generacija. Od stranooplodnih kultivara razlikuju se po tome što sadrže više genotipova u okviru jednog kultivara. Ti se genotipovi odabiru na temelju njihove kombinacijske sposobnosti. Ovaj tip kultivara nastaje kao rezultat slučajnog međukrižanja više inbred linija ili klonova pri čemu u periodu iskorištavanja sintetičkog kultivara do izražaja dolazi heterotični učinak.

Sintetici su gotovo isključivo stranooplodne i klonski razmnožavane vrste. Najviše se primjenjuju u oplemenjivanju krmnih trava i leguminoza. Za posebne ciljeve koriste se i u drugim kultiviranim vrstama poput kukuruza i suncokreta. Sintetičke populacije obuhvaćaju 45% germplazme koja se koristi u razvoju inbred linija kukuruza, a oplemenjivači planiraju povećati uporabu takvih populacija (Hallauer, 1990.).

Početna populacija za razvoj sintetičkog kultivara može biti lokalna populacija, populacija nastala planskim križanjem, oplemenjena populacija ili populacija iz rekurentne selekcije. Iz takve populacije izdvaja se materijal koji će služiti u razvoju sintetičkih kultivara. Genetički se materijal početne populacije ispituje u izvornom rasadniku. Veličina izvornog rasadnika ovisi o vrsti i dostupnom materijalu.

Linije odabrane u izvornom rasadniku kao potencijalni roditelji sintetika ispituju se u pokusima radi određivanja opće kombinacijske sposobnosti. Kombinacijska sposobnost roditelja za sintetike utvrđuje se metodom križanja top cross (testcross) ili, što je mnogo češće, metodom polycross. Top cross potomstva izvode se križanjem svake klonske linije s testerom široke genetičke osnove. Individue koje su ocijenjene povoljno, dalje se ispituju u pokusima u križanjima s drugim odabranim individuama.

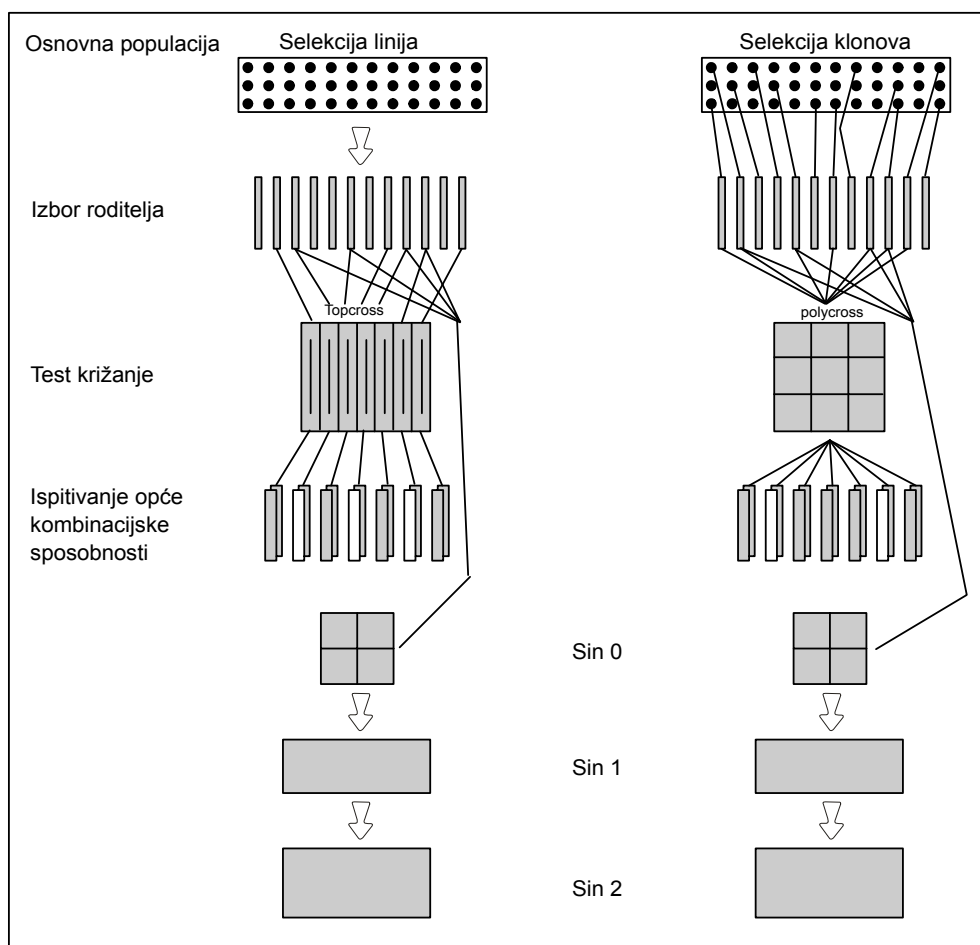
Polycross test tretira se kao zamjena za top cross i provodi se obično nakon prethodne fenotipske selekcije. U polycross rasadniku svaki klon ili individua ima istu mogućnost da bude oprašena polenom bilo koje druge individue. Cilj je polycross metode izolirati klonove sa povoljnim OKS. Takvi klonovi će se potom međusobno križati u cilju formiranja poboljšanih sintetičkih kultivara.

Nakon identifikacije pogodnih klonova oni se međusobno križaju u različitim kombinacijama. Rezultat takvog križanja je pokusni sintetik. Proizvodnja sjemena pokusnog sintetika provodi se u pokusu s ponavljanjima također u polycross rasadniku. Broj ponavljanja ovisi o količini dostupnog klonskog materijala. Budući da je važno imati dovoljne zalihe sjemena kako bi se zadovoljili zahtjevi za novim kultivarima, trebalo bi biti barem 10 ponavljanja

Roditeljski klonovi pokusnog sintetika označavaju se kao Sin_0 . Iz svih ponavljanja uzima se ista količina sjemena i izmiješa. Na taj način dobija se Sin_1 sjeme. To također služi i kao oplemenjivačko sjeme. Sin_1 generacija je u načelu zbroj jednostrukih hibrida roditeljskih klonova. Pokusni sintetik koji se u ispitivanju pokaže superioran, može biti upotrijebljen kao novi kultivar.

Sin_1 sjeme sije se u redove; u tijeku vegetacije odstranjuju se netipične biljke, a sjeme se preostalih biljaka obere u masi, izmiješa i sije kao i prethodna generacija. Postupak se ponavlja dok se ne dobije dovoljno sjemena za komercijalnu proizvodnju. Sintetici ranih generacija imaju viši stupanj heterozisa. Pokusni sintetici testiraju se u pokusima sa standardom i oni najbolji idu u priznavanje (slika 18).

Komercijalni se sintetici izvođe odmah nakon sjemenske proizvodne parcele, tj. kao Sin₁ sjeme, ili mogu proći jedan do dva ciklusa umnožavanja što ovisi o količini potrebnog sjemena. U proizvodnji trava i djetelina sintetici se općenito umnožavaju, jednom ili dvaput; na taj se način, manje ili više, čini pomak od originalnog sintetika.



Slika 18: Razvoj sintetičkih kultivara (Schlegel, 2004.)

Prednost je sintetika u odnosu na druge tipove kultivara izražavanje heterozisa u vrstama koje imaju značajnu depresiju inbridinga kao i u vrstama u kojima je teško ostvariva proizvodnja komercijalnog hibridnog sjemena; dobra je strana što se lako i brzo koriste u biljnim vrstama koje se razmnožavaju klonski. U odnosu na F₁ hibride imaju veću genetičku raznolikost pa se lakše prilagođavaju izmijenjenim uvjetima okoline. Sintetički kultivari ili populacije ranih generacija služe kao izvor korisne germplazme za druge oplemenjivačke programe. Tako se npr. sjeme iz polycross blokova upotrebljava kao materijal za rekurentnu selekciju. Nedostatak je sintetika što je nužno obaviti testiranje potomstva, a za to je često potrebno mnogo prostora da bi se proveli pokusi.

Literatura

- Falk, K.C., Rakow, G.F.W., Downey, R.K. 1998. The utilization of heterosis for seed yield in hybrid and synthetic cultivars of summer turnip rape. *Can. J. Plant Sci.* 3:383-387.
Hallauer, A.R. 1990. Methods used in developing maize inbreds. *Maydica* 35:1-16.
Gallais, A. 1988. Heterosis: its genetic basis and its utilization in plant breeding. *Euphytica* 39:95-104
Hill, R.R.Jr. 1971. Effect of number of parents on the mean and variance of synthetic varieties. *Crop Sci.* 11:283-286.
Schlegel, R. 2004. PBU, CD, Gatersleben

Razvoj klonskih kultivara

Većina biljnih vrsta u stanju je razmnožavati se vegetativno isto tako dobro kao i generativno (Klimeš i sur. 1997., de Kroon i Bobbink, 1997.). No veliki broj kultiviranih vrsta se zbog nekih genetičkih ili fizioloških razloga u normalnom uzgoju razmnožava uglavnom vegetativno. Najvećim dijelom su to višegodišnje biljke - voćke i vinova loza, ali i mnoge jednogodišnje i dvogodišnje vrste; krumpir, šećerna trska, različito cvijeće, ukrasno bilje, neke krmne trave te neke povrtlarske vrste. U tim vrstama u proizvodnji su uglavnom kultivari razvijeni klonskom selekcijom. U drugim kultiviranim vrstama vegetativno razmnožavanje tj. kloniranje, služi kao pomoćno sredstvo u oplemenjivanju; npr. u travama, djetelini, lucerni, šećernoj repi, kupusnjačama.

Klonski kultivar je vegetativno razmnožena populacija genetički identičnih biljaka koje potječu od jedne biljke. Klonska selekcija razlikuje se u drvenastim i ratarskim kulturama. U ovom poglavlju bit će govora samo o klonskoj selekciji ratarskih kultura.

Izbor roditelja za klonsku selekciju lakši je nego u oplemenjivanju čistih linija, jer je genetička varijabilnost fiksirana od početka. U prirodi postoje genetički miješane populacije nesporno razmnožavanih vrsta, a neki klonovi iz tako prikupljenog genetičkog materijala razmnožavaju se i izravno koriste kao kultivari ili se upotrebljavaju kao roditelji u programu hibridizacije. Klonska germplazma održava se kao kolekcija živih biljaka u polju pa se po tomu razlikuje od održavanja sjemenske kolekcije u vrstama koje se razmnožavaju spolno.

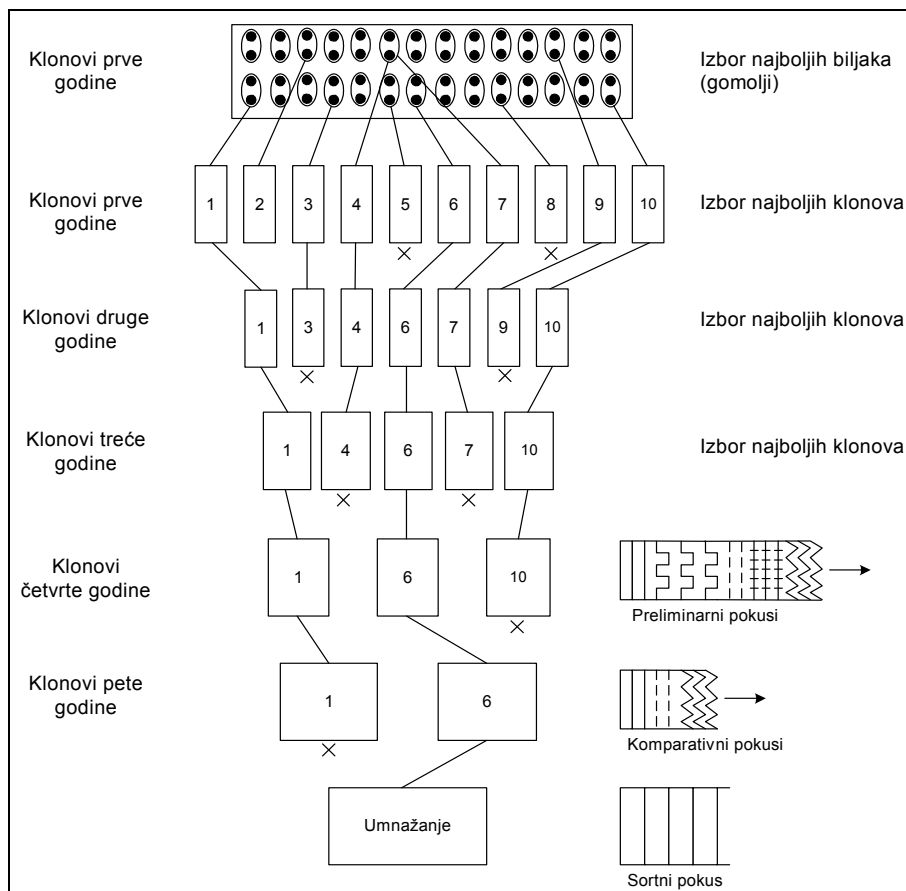
Formiranje oplemenjivačke populacije iz koje će se izdvajati klonski genotipovi obavlja se hibridizacijom heterozigotnih klonova i berbom botaničkog sjemena. Genotipska raznolikost populacija koje se razmnožavaju vegetativno je uska (Ellstrand i Roose, 1987.). Genske rekombinacije nastaju samo spolnom reprodukcijom pa je spolna reprodukcija nužna u vrstama koje se normalno razmnožavaju bespolno, da bi se stvorila potrebna genetička varijabilnost.

Za križanje se uglavnom biraju nesrodni klonovi da bi se povećala heterozigotnost i izbjegla depresija inbridinga. Kao izvor genetičkog variranja koristi se i međuvrsna hibridizacija ili modificirano povratno križanje, ali oplemenjivač mora uvijek voditi računa o održavanje visoke razine heterozigotnosti. Nakon križanja heterozigotnih roditelja dolazi do širokog razdvajanja već u F_1 generaciji. Zbog visoke heterozigotnosti roditeljskih partnera, svaka sjemenka predstavlja jedan klon. Na taj način svaka F_1 biljka je potencijalni izvor novog klonskog kultivara. Klonovi razmnoženih F_1 biljaka također su heterozigotni, a heterozigotnost se održava daljim vegetativnim razmnožavanjem.

Tipičan primjer razvoja kultivara klonskom selekcijom je oplemenjivanje krumpira. Oplemenjivački se postupak odvija kroz trodjelni ciklus koji se sastoji od križanja heterozigotnih roditelja, umnožavanja klonova i ocjene klonova. Iz cijepajućeg F_1 potomstva odabiru se fenotipski zanimljive individue čiji se klonovi, odnosno u krumpiru gomolji, umnažaju dok se ne postigne dovoljno klonova od svake klonske linije. Nakon toga se ti klonovi ocjenjuju u polju u pokusima kako bi se utvrdila gospodarska i ostala svojstva pojedinih klonova (slika 19). Ocjena individua često se radi na bazi pojedinačne biljke.

Klonska selekcija u krmnim travama koje se razmnožavaju vegetativno, počinje skupljanjem široke baze germplazme u izvornim rasadnicima iz čega se potom odabiru pogodni klonovi. Ti se klonovi potom međusobno križaju po metodi policrossa. Potomstvo se iz tih križanja ispituje, eliminiraju se klonovi sa slabom općom kombinacijskom sposobnošću, a preostali klonovi se upotrebljavaju kao novi kultivari ili se, što je češće, koriste za formiranje sintetika. Klonskom selekcijom izvedeni su uspješni kultivari i u drugim

kultiviranim vrstama. U luku (*Allium caepa*) su klonskom selekcijom u kombinaciji s hibridizacijom i razvojem F₁ hibrida razvijene sorte otporne na trips (Theiler i Buser, 1996.).



Slika 19. Klonska selekcija krumpira (prema Milohnić, 1972.)

Klonska selekcija ima izvjesne prednosti u odnosu na selekcijske metode u kojima se normalno primjenjuje spolna reprodukcija. Klonskim biljkama sterilnost nije ograničavajući činitelj, pa je klonove moguće izdvojiti i umnožiti s djelomičnim ili potpunim sterilitetom. Nije potreban selekcijski postupak za formiranje homozigotnih linija. Heterozis se fiksira bez stalne proizvodnje F₁ sjemena. Te prednosti u značajnoj mjeri olakšavaju selekcijski postupak za razvoj klonova. Klonska se selekcija u nekim vrstama kombinira s razvojem sintetika.

Klonsku selekciju prate i neke neželjene pojave. Zbog nepromjenjivosti kultivara (osim u slučaju mutacija) svatko može umnažati i širiti sortni materijal kao i sam oplemenjivač. Veća je opasnost od genetičke ranjivosti. Nedostatak klonskih kultivara vezan je također za problem čuvanja duže vrijeme, jer se održavaju kao žive biljke ili biljni dijelovi. Mnoge bolesti i štetnici lakše preživljavaju na vegetativnim organima što otežava zaštitu, naročito protiv virusa. Stoga u introdukciji klonskih materijala valja biti posebno oprezan. U zadnje se vrijeme kulturom tkiva proizvodi bezvirusni sadni materijal, što pomaže u smanjenju rizika od bolesti.

Literatura

de Kroon, H., Bobbink, R. 1997. Clonal plant dominance under elevated nitrogen deposition, with special reference to *Brachypodium pinnatum*, Chalk Grassland. U: de Kroon, H., van Groenendael, J. (ur.) *The Ecology and Evolution of Clonal Plants*, str. 359-379. Backhuys, Leiden.

Ellstrand, N.C., Roose, M.L. 1987. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *American J. of Botany* 74:123-131.

Klimeš, L., Klimešova, J., Hendriks, R., van Groenendael, J. 1997. Clonal plant architecture: a comparative analysis of form and function. U: de Kroon, H., van Groenendael, J. (ur.) *The Ecology and Evolution of Clonal Plants*, str. 1-29. Backhys, Leiden.

Link, W., Melchinger, A.E. 1995. An approach to the genetic improvement of clonal cultivars via backcrossing. *Crop Sci.* 35:931.

Theiler, R., Buser, H.P. 1996. Resistenzzüchtung beim Lauch klonen – Pflanzen im Vergleich zu Sämlingen. *Der Gemüsebau/ Le Maraicher* 59 (5):4-6.

Rekurentna selekcija

Rekurentna selekcija je oplemenjivački postupak kojim se mijenja prosjek osobina u biljnoj populaciji. Poboljšanje populacije rekurentnom selekcijom usmjerava se na dva osnovna cilja: poboljšanje prosječne vrijednosti populacije povećanjem učestalosti povoljnih alela te održavanje adekvatne genetičke varijabilnosti u poboljšanoj populaciji. Poboljšanjem populacije povećava se vjerojatnost razvoja linija sa boljom kombinacijskom sposobnošću.

Metoda rekurentne selekcije je osobito pogodna za poboljšanje kvantitativnih svojstava, jer se na kraju izvede populacija s visokim postotkom poboljšanih genotipova koji će biti koristan materijal, bilo kao novi kultivar bilo za dalji oplemenjivački rad (slika 25). Ovaj se selekcijski postupak više primjenjuje za poboljšanje kvantitativnih svojstava u stranooplodnim vrstama, osobito u selekciji kukuruza, te u nekim samooplodnim vrstama poput zobi i soje. Djelotvornost rekurentne selekcije ovisi o genetičkoj varijabilnosti populacije, frekvenciji povoljnih alela u osnovnoj populaciji i heritabilnosti svojstva koje se bira.

Postupak rekurentne selekcije odvija se u ciklusima. Svaki ciklus ima tri prepoznatljive faze: razvoj populacije, ocjena i izbor pogodnih individua kao roditelja te na koncu njihovo križanje za formiranje nove populacije. S formiranjem nove populacije završava se jedan ciklus. Početna populacija koja se razvija za rekurentni selekcijski program, zove se osnovna populacija ili ciklus 0. Populacija formirana nakon jednog kruga selekcije zove se ciklus 1, ciklus 2 razvija se iz drugog kruga selekcije. Ciklusi se ponavljaju sve dok se ne postigne željeni cilj.

Veličina populacije za rekurentnu selekciju varira ovisno o vrsti i ispitivanom svojstvu. Određuje se najčešće prema vjerojatnosti pronalaženja pogodnih individua. S teorijskog stajališta za djelotvornu rekombinaciju minimalan je broj 20 – 30 individua, no bolje je imati što veći broj. Međukrižanja se provode radi povećanja frekvencije povoljnih alela, i za razbijanje vezanih blokova. U tom kontekstu kao optimalno predloženo je tri do četiri generacije međukrižanja. S većim brojem međukrižanja povećava se mogućnost rekombinacija, no to istodobno povećava i broj godina po ciklusu.

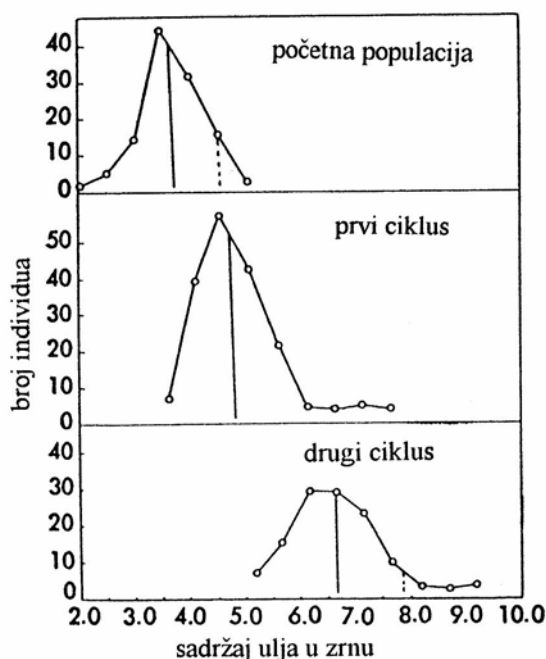
Broj ciklusa za dostizanje željene razine poboljšanja ovisi o početnoj frekvenciji gena i heritabilnosti svojstva koje se oplemenjuje. Tako npr. u selekciji za otpornost na bolesti i štetnike željena razina otpornosti ostvari se u tri do pet ciklusa selekcije.

U rekurentnoj selekciji moguće je poboljšanje svojstava u jednoj populaciji (unutarpopulacijsko poboljšanje), ili njihovim međusobnim križanjem u dvije populacije (međupopulacijsko poboljšanje), ovisno o cilju selekcijskog programa.

Prva metoda unutarpopulacijskog poboljšanja je fenotipska rekurentna selekcija. Ona se temelji na ocjeni pojedinačnih biljaka ili vegetativno razmnoženog potomstva biljke. Ovaj tip selekcije u stranooplodnim populacijama naziva se još masovna selekcija u ciklusima, usmjerena masovna selekcija, fenotipska selekcija ili jednostavna rekurentna selekcija. Dva su oblika fenotipske rekurentne selekcije: prvi je bez međusobnog križanja potomstva, drugi tip uključuje međukrižanje potomstava odabranih biljaka prije sljedeće faze.

Prvi oblik je najjednostavniji postupak rekurentne selekcije; jedan ciklus traje samo jednu godinu. Ovaj oblik naziva se još ponovljena masovna selekcija. U istoj se godini u osnovnoj populaciji odabiru biljke odgovarajućih svojstava koje se međusobno slobodno oprašuju, potom se obere njihovo sjeme što je temelj za novi ciklus. Ponovljena masovna selekcija jednostavna je za izvođenje, no nedostatak je što nema kontrole polena ni ocjene potomstva odabranih biljaka.

Drugi oblik fenotipske rekurentne selekcije uključuje međusobno križanje potomstva odabranih biljaka prije sljedećeg ciklusa. Ovaj oblik traje dvije godine. U prvoj godini (ciklus 0) odabiru se pogodne biljke iz osnovne populacije i obere sjeme tih biljaka. U drugoj godini uzgaja se potomstvo odabranih biljaka i križa međusobno u svim kombinacijama nakon čega se obere sjeme sa svih križanih biljaka, miješa i upotrebljava za sljedeći ciklus selekcije.



Slika 20. Pobljšanje populacije rekurentnom selekcijom (Poehlman i Sleper, 1996.)

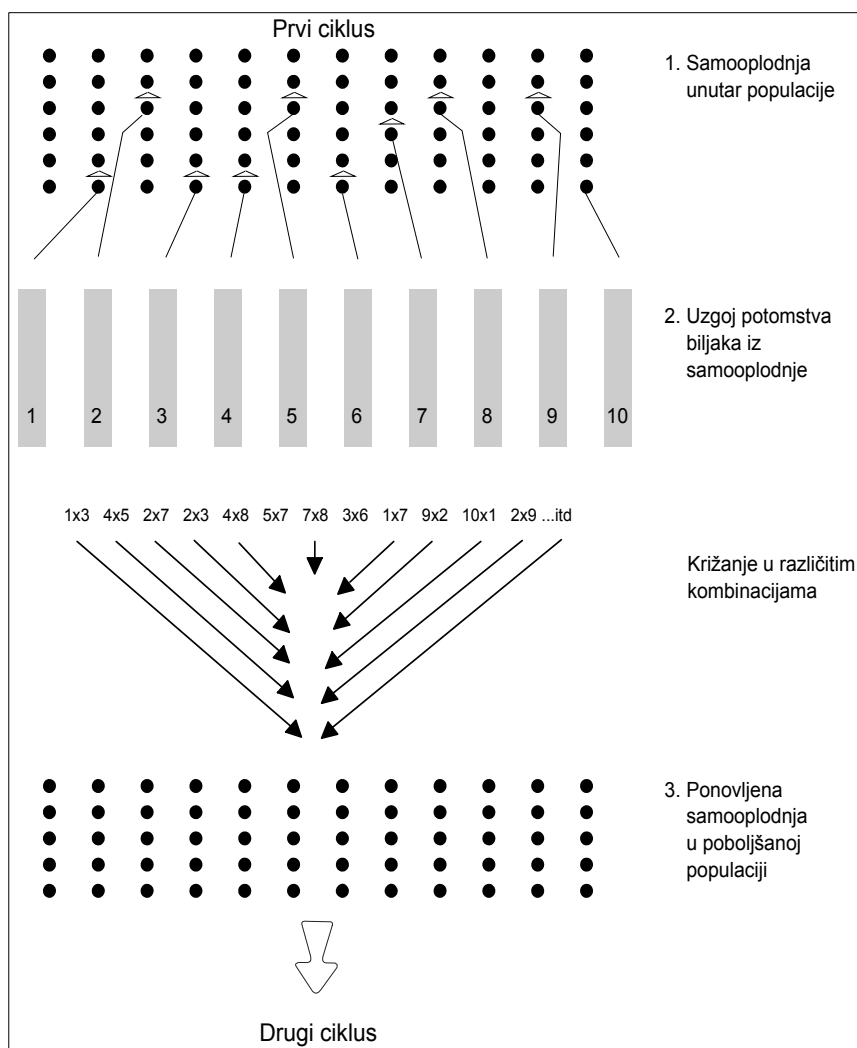
Rekurentna selekcija može biti u polusrodstvu ili punom srodstvu. U prvom slučaju odabiru se biljke nakon slobodne oplodnje u populaciji, a u drugom slučaju nakon križanja parova biljaka. Jedan ciklus traje tri godine. U prvoj godini odaberu se pogodne biljke u osnovnoj populaciji i obere njihovo sjeme ili se križaju parovi biljaka. U drugoj godini uzgaja se potomstvo tih biljaka, među kojima se biraju najbolje familije od čijeg se sjemena formira mješavina. U trećoj godini sjeme iz te mješavine uzgaja se u izolaciji da bi se omogućilo međusobno križanje. Obrano sjeme od svih međusobno križanih biljaka predstavlja bazu za sljedeći ciklus.

U okviru unutarpopulacijskog poboljšanja postoji i rekurentna selekcija iz samooplodnje, a temelji se na ocjeni potomstva nakon jedne ili dvije generacije samooplodnje. U prvoj godini se u osnovnoj populaciji biraju pogodne biljke na kojima se obavlja samooplodnja. U drugoj godini ispituje se potomstvo tih biljaka i odaberu najbolje linije. Sjeme najbolje ocijenjenih linija sije se u trećoj godini i križa međusobno u svim kombinacijama. Obrano sjeme iz tih križanja koristi se za formiranje osnovne populacije za novi ciklus selekcije (slika 20).

Učinak rekurentne selekcije na poboljšanje prosječne vrijednosti populacije prikazat ćemo na primjeru povećanja sadržaja ulja u zrnu kukuruza (Sprague i Brimball 1950.). Postupak je započet u ciklusu 0 odabiranjem pojedinačnih biljaka u osnovnoj populaciji koje su samooplođene, klipovi obrani pojedinačno i sjeme svake biljke analizirano na sadržaj ulja. Sjeme biljaka s višim sadržajem ulja posijano je sljedeće godine i križano u svim mogućim kombinacijama. Od svake kombinacije križanja uzeta je ista količina sjemena od koje je

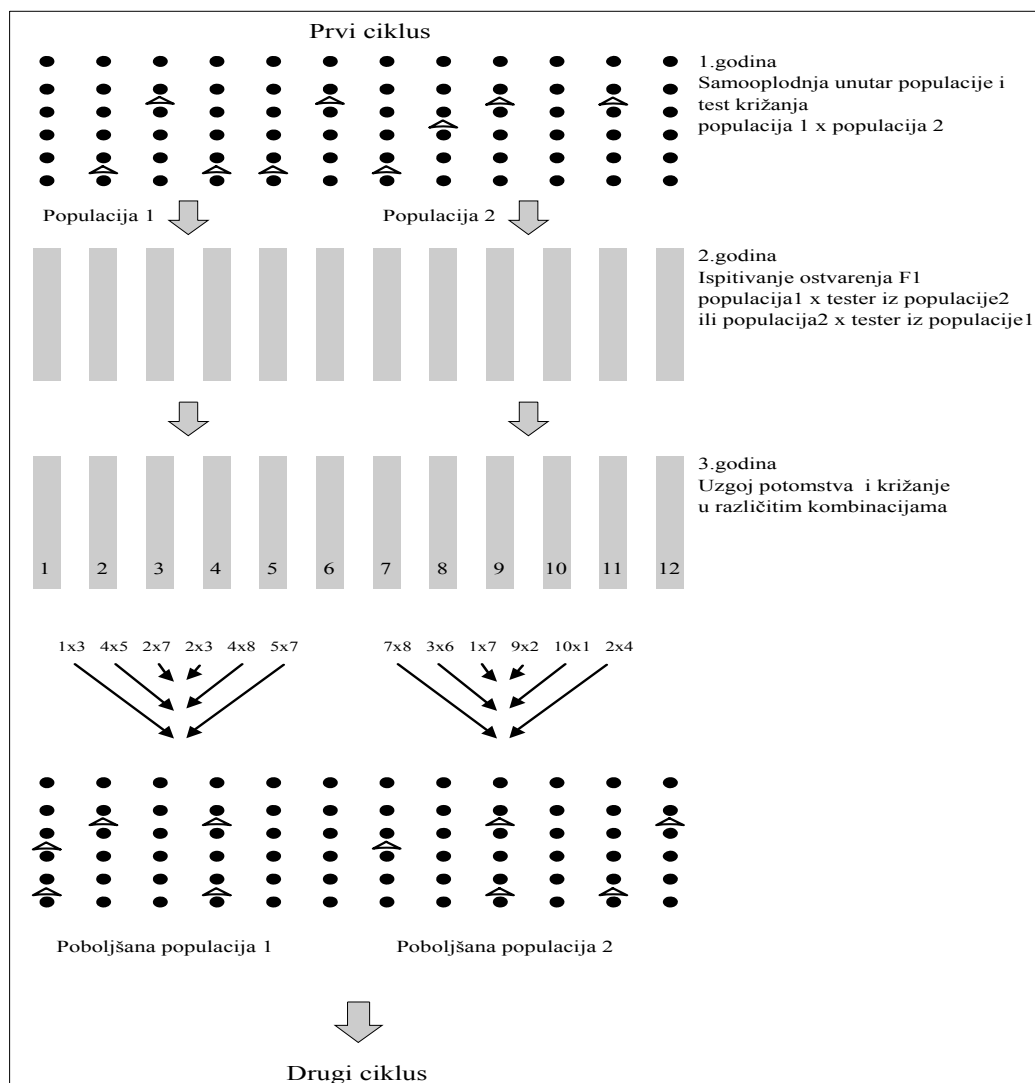
potom formirana nova populacija za ciklus 1 selekcije. Ponovljen je postupak kao u ciklusu 0. Nakon dva ciklusa rekurentne selekcije sadržaj ulja u zrnju povećan je sa 6,5% na 10,5%, izraženo kao prosjek populacije.

Da bi se umanjio utjecaj vanjskih činitelja na izražavanje svojstava, cijelu populaciju valja podijeliti na blokove a potom u svakom bloku birati individue koje će služiti za međusobna križanja. Moguće je da su mikrolokacijski uvjeti na jednom dijelu parcele povoljniji nego na drugom tako da će biljke superiorne po vanjskom izgledu biti odabrane samo na jednom mjestu, premda te biljke nisu i genetički superiorne. Sve biljke odabrane za međukrižanja moraju imati slične uvjete okoline u svom razvoju.



Slika 21. Fenotipska rekurentna selekcija (Schlegel, 2004.)

Recipročna rekurentna selekcija je postupak međupopulacijskog križanja kao metoda istodobnog poboljšanja dvije populacije. Prosjek populacije poboljšava se povećanjem učestalosti odabranih alela na komplementarnim lokusima u svakoj populaciji. Populacije koje se koriste u ovakvom postupku trebaju biti što je moguće raznolikije, a da se istodobno dobro kombiniraju. U ovom postupku međusobno se križaju biljke jedne populacije (populacija A) s biljkama u drugoj populaciji (populacija B). Obje populacije služe jedna drugoj kao testeri da bi se ocijenile individue u suprotnoj populaciji. Međupopulacijska selekcija ima prednost nad unutarpopulacijskim poboljšanjem posebno ako postoje multipli aleli. Jedan ciklus selekcije traje tri godine.



Slika 22. Recipročna rekurentna selekcija (Schlegel, 2004.)

U prvoj godini provode se križanja individua između populacija, a sjeme tih biljaka sljedeće godine sije se u pokusu i ocjenjuje. Na odabranim biljkama obavlja se samooplodnja. U trećoj se godini potomstvo iz te samooplodnje uzgaja u izolaciji i među njima provede križanje u svim mogućim kombinacijama. Sjeme iz takvih međukrižanja predstavlja poboljšanu populaciju A, odnosno B (slika 22).

Poboljšana populacija nakon bilo kojeg oblika rekurentne selekcije služi kao novi kultivar, kao roditelj za razvoj hibrida ili kao populacija za novi ciklus rekurentne selekcije. Ta populacija može također poslužiti kao izvor za odabir individua od kojih se razvijaju nove inbred linije, klonski kultivari ili roditelji sintetika. No, rekurentna selekcija nije zamjena za klasične oplemenjivačke metode; više je dopuna drugim metodama u razvoju poboljšanih kultivara.

Rekurentna selekcija je kratkotrajan ili dugotrajan proces, ovisno o cilju oplemenjivanja. Ciklusi rekurentne selekcije se ponavljaju sve dok se ne dostignu željeni ciljevi. Istraživanje promjena u sadržaju ulja u populaciji kukuruza Illinois High Oil je primjer dugotrajnog postupka rekurentne selekcije. Seleksijski je postupak započet 1898. a završen 1989. nakon 90 generacija rekurentne selekcije, kad se vidjelo da u zadnjih 20 godina nije bilo nikakvih promjena. Sadržaj ulja u međuvremenu je povećan sa oko 4 – 5% koliko obično

iznosi, na 22%, premda ima mišljenja (Dudley i Lambert 1992.) da gornja granica još nije dostignuta.

Literatura

- Bush, R.H., Kofoed, K. 1982. Recurrent selection for kernel weight in spring wheat. *Crop Sci.* 22:568-572.
- Delzer, B.W., Bush, R.H., Horeland, G. 1995. Recurrent selection for grain protein in hard red spring wheat. *Crop Sci.* 35:730-735.
- Dudley, J.W., Lambert, R.J. 1992. Ninety cycles of selection for oil and protein in maize. *Maydica* 37:1-7.
- Ininda, J., Fehr, W.R., Ciazio, S.R., Schnebly, S.R. 1996. Genetic gain in soybean populations with different percentages of plant introduction parentage. *Crop Sci.* 36:1470-1472.
- Parlevliet, J.E., van Omeren, A. 1988. Accumulation of partial resistance in barley to barley leaf rust and powdery mildew through recurrent selection against susceptibility. *Euphytica* 37:261-274.
- Schlegel, R. 2004. PBU CD, Gatersleben
- Sprague, G.F., Brimball, B. 1950. Relative effectiveness of two systems of selection for oil content of the corn kernel. *Agronomy J.* 42:83-88.
- Tapsoba, H., Wilson, J.P., Hana, W.W. 1997. Improvement of resistance to rust through selection in pearl millet. *Crop Sci.* 37:365-369.

Metoda dihaploida

Osnovni je cilj u oplemenjivanju samooplodnih kultura što prije dobiti homozigotne linije. Dostizanje tog cilja ovisi o oplemenjivačkoj metodi i heterogenosti početne populacije. Obično se postiže nakon 5 – 7 generacija samooplodnje. Umjetna proizvodnja haploida, te udvostručavanje broja kromosoma omogućuje razvoj homozigotnih oplemenjivačkih linija od heterozigotnih roditelja u samo jednoj generaciji. Taj se postupak već dugo uspješno koristi u genetici i oplemenjivanju.

Haploidi su biljke s gametnim brojem kromosoma u somatskim stanicama. Mogu nastati spontano u prirodi, ali se za potrebe genetičkih istraživanja i razvoja novih kultivara međuvrskom hibridizacijom, gametnom embriogenezom ili eliminacijom kromosoma induciraju umjetno. U praksi se za razvoj haploida najčešće primjenjuju tehnike kulture antera ili mikrospora i eliminacija kromosoma. Haploidi nastaju iz ženskih kao i muških gameta, ali kako je u svakom cvijetu obično samo jedna jajna stanica a polenovih zrna golem broj, uglavnom se proizvodnja haploida prakticira iz muških gameta. Postupak je poznat kao androgeneza.

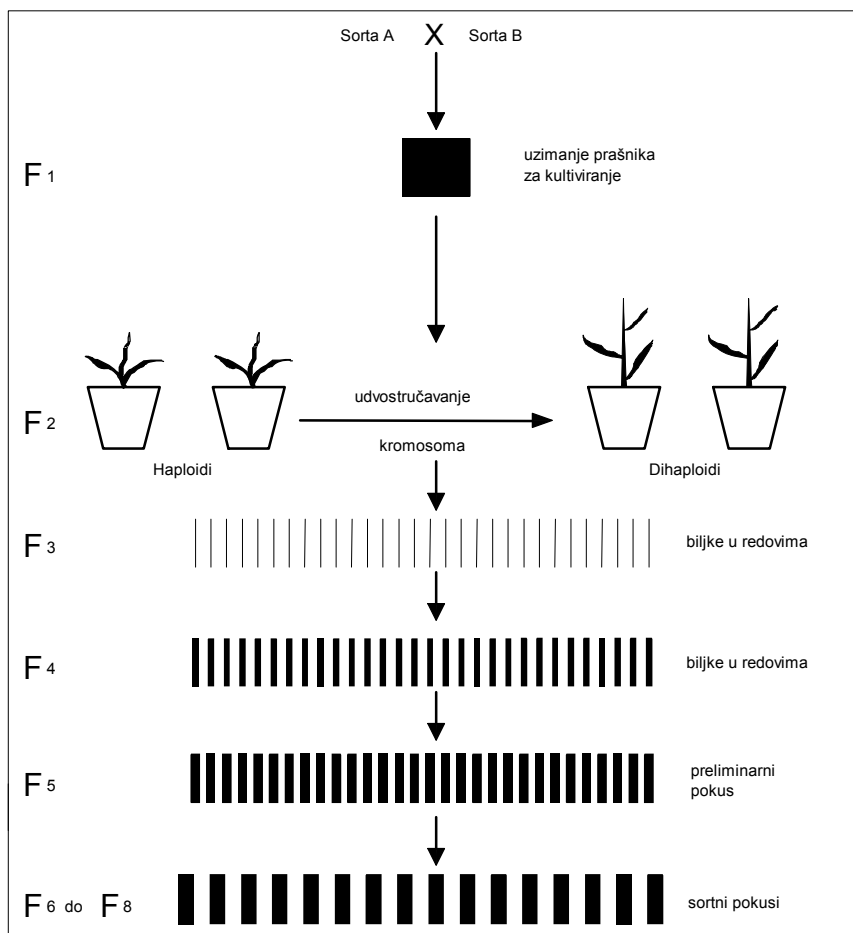
Kao početni materijal za razvoj haploida iz antera i mikrospora koristi se F_1 ili F_2 generacija nastala križanjem homozigotnih genotipova. Budući da je F_1 generacija u tom slučaju genetički maksimalno heterozigotna, svaka gameta predstavlja poseban genotip. Kultiviranjem na hranidbenoj podlozi iz mikrospora ili nezrelih prašnika razvije se veliki broj haploidnih biljčica.

Drugi postupak razvoja haploida za oplemenjivačke svrhe je eliminacija kromosoma. Ovaj postupak primjenjuje se uglavnom u oplemenjivanju ječma. Provodi se tako da se kultivirani ječam (*Hordeum vulgare*) križa s divljim ječmom *Hordeum bulbosum*. Temelji se na selektivnoj eliminaciji kromosoma *H. bulbosum* (Kasha i Kao, 1970.). *H. bulbosum* je višegodišnji divlji ječam podrijetlom iz mediteranskog područja; ima isti broj kromosoma kao kultivirani ječam ($2n = 2x = 14$).

Oplodnja je *H. vulgare* s *H. bulbosum* uspješna, ali tijekom stanične diobe u hibridnom zigotnom embriju spontano se gubi genom *H. bulbosum* tako da ostane samo haploidni embrio *H. vulgare*. Ovaj se embrij izolira i potom regenerira na hranidbenoj podlozi u haploidne biljčice. Biljke ječma koje se križaju s *H. bulbosum* moraju također biti heterozigotne kako bi se na koncu formirali genotipovi s novom kombinacijom gena.

Haploidi su potpuno homozigotni, ali su sterilni i da bi se koristili kao nove linije mora im se udvostručiti broj kromosoma. Na taj način nastaju dihaploidi. Udvostručavanje broja kromosoma provodi se kolhicinom ili nekom drugom pogodnom tehnikom. Dihaploidi se najlakše otkriju nakon uzgoja i cvjetanja jer su fertilni za razliku od haploida koji su sterilni. No dihaploide je moguće otkriti već u juvenilnom stadiju po različitim morfološkim pokazateljima. U novije vrijeme za pronalaženje dihaploida nakon postupka udvostručavanja kromosoma koriste se i genetički markeri.

Postupak razvoja dihaploidne linije pomoću androgeneze započinje križanjem odgovarajućih roditelja. U F_1 generaciji izdvoje se nezrele antere ili polenova zrna, te se kultiviraju na hranidbenoj podlozi da bi se razvili haploidi. U žitaricama se proizvede 2.000 – 3.000 haploidnih biljčica. Nakon toga se odgovarajućom tehnikom udvostruči broj kromosoma rezultat čega su novi dihaploidi. Sljedeće se dvije godine potomstvo dihaploidnih biljaka uzgaja u redovima kako bi se među njima napravio izbor pogodnih genotipova prema fenotipskom izgledu. Odabrane linije ispituju se u preliminarnim i potom u sortnim pokusima i na koncu slijedi umnožavanje sjemena (slika 23).



Slika 23.: Razvoj kultivara metodom dihaploida (Poehlman i Sleper, 1996)

Dihaploidi se koriste u oplemenjivanju brojnih kultiviranih vrsta ili kao novi kultivari, ili kao vrijedne oplemenjivačke linije. Ječam, riža i duhan pokazali su se najpogodnijim vrstama za primjenu androgeneze u razvoju dihaploida. Brzi razvoj inbred linija kulturom antera pruža u oplemenjivanju različitih vrsta velike mogućnosti. U ječmu je česta primjena bulbosum metode (Chen i Hayes, 1989.). U ovoj su vrsti zapaženi i mutanti iz dihaploidnih linija (Castillo i sur., 2001.). U pšenici je uspješno primijenjena kultura mikrospora u razvoju dihaploida (Lin i sur., 2002.). U duhanu već postoje komercijalni kultivari i oplemenjivačke linije razvijene kulturom antera (Chaplin i sur., 1980.; Walker i Aycock, 1994.).

Dihaploidi se u oplemenjivačkim programima koriste jer imaju brojne prednosti u odnosu na druge metode. Prije svega homozigotnost se postiže brže nego u konvencionalnom inbridingu i na taj način nova potencijalna linija. Recesivni se aleli lako otkriju, a letalni geni eliminiraju se iz populacije. Lakše se određuju genotipovi u populaciji, a selekcija među potomstvom dihaploida učinkovitija je nego u drugim metodama.

Literatura

Castillo, A.M., Cistué, L., Vallés, M.P., Sanz, J.M., Romagosa, I., Molina-Cano, J.L. 2001. Efficient production of androgenic doubled haploid mutants in barley by the application of sodium azide to anther and microspore cultures. Plant Cell Reports 20:105-109.

- Chaplin, J.F., Burk, L.G., Gooding, G.V., Powell, N.T. 1980. Registration of NC 744 tobacco germplasm. *Crop Sci.* 20:677.
- Chen, F., Hayes, P.M. 1989. A comparison of *Hordeum bulbosum* mediated haploid production efficiency in barley using in vitro floret and tiller culture. *Theor. Appl. Genet.* 77:701-704.
- Kasha, K.J., Kao, K.N. 1970. High frequency haploid production in barley. *Nature* 225:874-876.
- Lin, W., Zheng, M.V., Polle, E., Konzak, C.F. 2002. Highly efficient doubled production in wheat (*Triticum aestivum* L.) via induced microspore embryogenesis. *Crop Sci.* 46:686-692.
- Pickering, R.A., Devaux, P. 1992. Haploid production: approaches and uses in plant breeding. U Shewry, P.R. (ur.) *Barley: genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology*. CAB Intl., Wallingford, UK.
- Poehlman, J.M., Sleper, D.A. 1996. *Breeding field crops*. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Walker, D.R., Aycock, M.K. Jr. 1994. Development of anther derived dihaploids to combine disease resistance in Maryland tobacco. *Crop Sci.* 34:335-338.

Oplemenjivanje za ekološku proizvodnju

Zadnjih desetljeća, napose od trenutka objavljivanja knjige *Silent Spring* (Carson, 1962.), raste svijest o značenju održavanja ravnoteže u okolini koja nas okružuje, o njenoj zaštiti i racionalnom upravljanju. U tom kontekstu velika se pozornost poklanja poljoprivredi i njezinom održivom razvoju. U okviru održivog razvoja potiče se sustav proizvodnje koji održava ekološku ravnotežu i zadovoljava potrebe postojeće generacije bez ugrožavanja opstanka budućih generacija. Takvo gospodarenje označava se različitim nazivljima kao što su organska, biološka, biodinamička ili samoodrživa poljoprivreda. U zadnje vrijeme u nas se ustalio izraz ekološka proizvodnja kao najprikladniji za ovaj tip poljoprivredne proizvodnje (Znaor, 1996.).

Oplemenjivanje bilja, kao bitan dio poljoprivredne djelatnosti valja također na određen način prilagođavati ovom sustavu proizvodnje. U novije vrijeme zahtijeva se da sjeme za sjetvu u ekološkoj proizvodnji mora biti proizvedeno od kultivara koji su selekcionirani u skladu s ekološkim kriterijima. To je uvjetovalo izmjene postojećih oplemenjivačkih metoda i njihovu prilagodbu ekološkoj proizvodnji. Na taj način stvorena je nova grana u okviru oplemenjivanja bilja. Nazvana je oplemenjivanje za ekološku proizvodnju (organic breeding). Budući da ekološki proizvodi moraju biti certificirani i sorte za tu proizvodnju moraju biti registrirane.

Trenutno ekološka poljoprivreda ovisi o konvencionalnim oplemenjivačkim programima, premda je već u tijeku razvoj sorti žitarica za ekološku proizvodnju (Kunz i sur., 1997.). Organizacije za ekološku proizvodnju propisuju da se proizvodi s EKO oznakom proizvode od posebnih kultivara. U EU se npr. od 1. siječnja 2004. posebno regulira način uporabe sjemena za ekološku proizvodnju. Najbolji kultivari za konvencionalnu proizvodnju ne moraju biti najbolji i za ekološku.

Oplemenjivanje za ekološku proizvodnju poštuje prirodnu autentičnost vrste. Svaki pokušaj prekida autentičnosti treba zaustaviti ako se sjeme ne formira na biljci. Uzima u obzir i hranidbenu vrijednost jer se biljka mora proizvesti bez neželjenih supstanci kakvi su prirodni toksini ili ostaci pesticida i herbicida. Zbog veće ovisnosti ekološke proizvodnje o prirodnim uvjetima veću vrijednost u oplemenjivanju ima fenotipski nego genotipski pristup.

Neke su tehnike zabranjene u razvoju kultivara za ekološku proizvodnju. Trenutno su zabranjeni genetičko inženjerstvo, cms hibridi bez restorer gena, fuzija protoplasta i inducirane mutacije. Uбудуće će se vjerojatno razmotriti pogodnost kulture embrija, kulture plodnice i oplodnje *in vitro*.

Prema stupnju pogodnosti za ekološko oplemenjivanje sve metode svrstavaju se u:

- ✧ preporučene
- ✧ dopuštene, uz uvjet da ih se provjerava kroz određeno vrijeme
- ✧ neodgovarajuće (tablica 15)

Metode križanja koje obuhvaćaju prirodnu reprodukciju, tj. oprašivanje, oplodnju i formiranje sjemena, pogodne su za ekološko oplemenjivanje. Konvencionalno oplemenjene sorte razmnožavane po ekološkim normama dopušteno je koristiti u ekološkoj proizvodnji. Tehnika međuvrsne hibridizacije koja ovisi o umjetnoj intervenciji, prihvatljiva je pod uvjetom da se oprašivanje i razvoj sjemena provode na biljci. Oplemenjivačke metode koje se temelje na kulturi biljnog tkiva, djelomice su prihvatljive, i to samo u prijelaznom periodu dok se ne razviju druge pogodne metode.

Tablica 15. Lista preporuka oplemenjivačkih postupaka i njihove pogodnosti za sustav ekološkog oplemenjivanja (Lammerts van Bueren i sur., 1998.)

	Tehnike poticanja variranja	Selekcijske metode	Održavanje i razmnožavanje
Pogodno za oplemenjivanje za ekološku proizvodnju	<ul style="list-style-type: none"> ✧ kombinacijsko oplemenjivanje ✧ sorte iz križanja ✧ premošteno križanje ✧ hibridi s fertilnim F1 ✧ tretman temperaturom ✧ cijepljenje vrata tučka ✧ rezanje tučka ✧ netretirani polen kao mentor 	<ul style="list-style-type: none"> ✧ masovna selekcija ✧ pedigre selekcija ✧ selekcija za određeno mjesto ✧ promjena u okolini ✧ promjena vremena sjetve ✧ metoda klas na red ✧ test križanja ✧ indirektna selekcija ✧ dijagnostičke metoda s DNK 	<ul style="list-style-type: none"> ✧ generativno razmnožavanje ✧ vegetativno razmnožavanje - izdijeljeni gomolji - listići i lukovice - mladi pupovi - izdanci lukovica - slojeviti, rezani i cijepljeni izbojci - rizomi
Neprikladno, ali privremeno dopušteno	<ul style="list-style-type: none"> ✧ kultura embrija ✧ kultura plodnice 	<ul style="list-style-type: none"> ✧ selekcija <i>in vitro</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ✧ kultura antera ✧ kultura mikrospora ✧ kultura meristema ✧ mikropropagacija ✧ somatska embriogeneza
Neprikladno, potpuno zabranjeno	<ul style="list-style-type: none"> ✧ cms hibridi bez restorer gena ✧ fuzija protoplasta ✧ zračeni mentor polen ✧ inducirane mutacije ✧ genetičke modifikacije 		

Svi postupci genetičkog inženjerstva isključeni su iz razvoja kultivara za ekološku proizvodnju. Sa stajališta ekološke proizvodnje genetičko inženjerstvo je neekološko. Po ovom tumačenju živa priroda je kompleks interakcija u kojem svaka promjena u jednom organizmu utječe na druge mehanizme unutar i izvan organizma. Biljka je, naime, više od samog izražaja gena, jer su njena svojstva određena i okolinom.

U oplemenjivanju za ekološku proizvodnju primjenjuju se neke uobičajene metode konvencionalnog oplemenjivanja kao što su masovna selekcija i pedigre metoda, te metode prilagođene samo za ovaj tip oplemenjivanja. Među njima su selekcija za određeno mjesto, promjena u okolini, klas na gredicu, posredna selekcija, premošteno križanje. Postoje i pomoćne metode kao što su test križanje, ponovljeno povratno križanje, tehnika polenskog mentora, tretiranje tučka različitim postupcima. Ove metode se, međutim, primjenjuju rjeđe, uglavnom onda kada se drugim metodama ne može postići zacrtani cilj.

Vidljivo je da neke selekcijske metode nisu dopuštene u oplemenjivanju za ekološku proizvodnju. To usporava ili ograničava razvoj poboljšanih kultivara. Zabrana kulture embrija i plodnice ograničava križanje između različitih vrsta, a to smanjuje prostor za traženje gena za otpornost ili neka druga svojstva iz srodnih vrsta. To je naročito važno za krumpir, ozimu

pšenicu i šećernu repu, a napose za neke povrtlarske vrste. Danas većina sorti rajčice, salate, paprike i još nekih povrtlarskih vrsta nastaje uz pomoć tehnike kulture tkiva. Zabranom oplodnje *in vitro* onemogućuje se razvoj novih kultivara ukrasnog bilja. Velike poteškoće u ekološkoj proizvodnji mnogih vrsta, primjerice kupusnjača, šećerne repe, uljane repice, stvorit će zabrana cms hibrida bez restorer gena. Budući da se ne dopušta fuzija protoplasta, to će otežati prijenos gena između vrsta, posebno u krumpiru, što će produžiti oplemenjivački postupak. Druga ograničenja također usporavaju selekcijski postupak, otežavaju unošenje otpornosti na biotičke i abiotičke stresove, poskupljuju proces i na koncu smanjuju učinkovitost oplemenjivačkih programa za ekološku proizvodnju.

Literatura

Kunz P., Müller K.J., Spiess H., Heyden B., Irion E. 1997. Der Weizen Ringversuch biologisch-dynamische Weizenzüchter schliessen sich zusammen. Lebendige Erde 2.

Lammerts van Bueren E.T., Hulscher M., Jongerden J., Haring M., Hoogendorn J., van Mansvelt J.D., Ruivenkamp G.T.P. 1998. Sustainable organic breeding. Louis Bolk Institute, Driebergen, Nizozemska.

Muggli, C., Schipholt H.I., en Vries A.de. 1990. Saatgutvermehrung von Roggen auf Haus Ballheim. Lebendige Erde 3:176-182.

Spiess, H. 1996. Sortenhaltung auf den Hoefen. Saatgut, Juni, 6-8.

Wiethaler, C., Opperman, R., Wyss, E. 2000. Organic plant breeding and biodiversity of cultural plants. Reports on the international conferences. Naturschutzbund Deutschland and Research Institute of Organic Agriculture.

Znaor, D. 1996. Ekološka poljoprivreda. Nakladni zavod Globus, Zagreb.

Načela oplemenjivanja voćaka i vinove loze

Osnovna načela u nasljeđivanju svojstava i oplemenjivanju voćarskih i ratarskih vrsta su slična, a razlike proistječu iz načina razmnožavanja, uvjeta življenja i uzgoja ovih biljnih skupina. Voćne vrste su trajnice, više su izložene djelovanju vanjskih činitelja, a razmnožavaju se uglavnom vegetativno.

Voćke većinom imaju hermafroditne cvjetove, ali su najčešće stranoopodne vrste, a kao brana samooplodnji prisutna je samobesplodnost. Između nekih kultivara u pojedinim vrstama postoji i međubesplodnost o čemu treba voditi računa u hibridizaciji. U nekim voćnim vrstama izražena je partenokarpija tj. formiranje plodova bez sjemena, a u nekima je prisutna apomiksija.

Karakteristika je voćaka što nadzemni i podzemni dio biljke u najvećem broju slučajeva ne pripadaju istom genotipu. Nadzemni dio razvio se iz cijepa grančice plemenite biljke, a podzemni dio je podloga koja ima sasvim drugu funkciju i drugačija svojstva. Stoga se u voćarstvu posebno provode selekcija podloga i selekcija biljaka s kojih će se uzeti materijal za cijepljenje i razmnožavanje.

U voćarstvu je veoma važna introdukcija kao metoda povećanja genetske raznolikosti. Najveći dio suvremenih kultivara voćnih vrsta danas su introdukcije koje su potisnule stare autohtone sorte. Do pedesetih godina prošlog stoljeća npr., na našem području uzgajana je samo domaća vinogradarska breskva, a danas imamo veliki broj veoma kvalitetnih kultivara breskve gotovo isključivo stranog podrijetla. Vinogradarska breskva danas se jedva može naći u proizvodnji.

Mnoge današnje kultivirane vrste nastale su kao rezultat hibridizacije poput europske šljive *Prunus domestica* ($2n = 48$) koja je nastala hibridizacijom *P. cerasifera* (ili *P. divaricata*) ($2n = 16$) x *P. spinosa* ($2n = 32$). Hibridizacija vrsta s različitim brojem kromosoma može imati odraza u mejozi i oplodnji. Inače tehnika križanja u voćkama slična je onoj u ratarskim kulturama uz stanovite specifičnosti koje dolaze kao posljedica posebnih svojstava vrste, građe cvijeta ili načina oplodnje.

Razvoj novih kultivara voćnih vrsta znatno je sporiji nego u ratarskim i povrtlarskim vrstama zbog nekoliko ograničavajućih činitelja: dug juvenilni stadij što u velikoj mjeri produžava selekcijski postupak, potrebne su velike parcele za uzgoj oplemenjivačkih materijala, te visoka ulaganja i spor povrat uložених sredstava.

Ciljevi oplemenjivanja

Ciljevi koji se žele postići u oplemenjivanju voćaka ovise ovrsti odnosno genotipu, vanjskim uvjetima i namjeni ploda. U oplemenjivanju voćnih vrsta poboljšavaju se svojstva stabla ili svojstva ploda. Najvažnija svojstva stabla koja se oplemenjivanjem nastoje poboljšati su potencijal rodnosti, otpornost na nepovoljne abiotičke i biotičke činitelje, tip habitusa, vrijeme cvjetanja i zriobe. Istodobno se oplemenjivanje provodi radi poboljšanja kvalitete i okusa ploda. Za prinos i kvalitetu ploda važna svojstva su veličina, oblik, izgled, boja pokožice, struktura mesa, mogućnost transporta i skladištenja. Selekcija na kvalitetu ovisit će o tome upotrebljava li se plod za svjež potrošnju ili industrijsku preradu. Mogućnost mehanizirane berbe ovisi o svojstvima stabla i ploda. Povećanje prinosa ostvaruje se povećanjem težine ploda, boljim razvojem biljke ili većim brojem biljaka po jedinici površine, što se postiže u gustom uzgoju.

Otpornost na abiotičke stresove je posebno važna za preživljavanje voćnih stabala. Među tim stresovima najvažnije su niske i visoke temperature, suša i fizičko-kemijska svojstva tla. Oštećenje od niskih temperatura je jedan od najvažnijih činitelja koji ograničavaju proizvodnju voćnih kultura. Malo je kultiviranih voćnih vrsta od gospodarskog značenja u kojima je točka smrzavanja ispod -4°C ; kod većine pada između -1 i -2°C . No u vrijeme mirovanja neke drvenaste vrste mogu podnijeti i do -40°C . Neke divlje voćne vrste imaju veću sposobnost preživljavanja na niskim temperaturama, pa je hibridizacijom tih vrsta s kultiviranom vrstom moguće poboljšati otpornost na niske temperature.

Značajan napredak učinjen je u razvoju visoko kvalitetnih formi tolerantnih na hladnoću uz pomoć divljih izvora germplazme. Primjenom rekurentnog sistema povratnog križanja razvijeni su genotipovi marelice, vinove loze, šljive i maline s povećanom razinom tolerantnosti na niske temperature. U tom cilju koristi se i rekurentna masovna selekcija. U oplemenjivanju bespolno razmnožavanih vrsta, kao što su voćke, posebno je važno održavati genetsku varijabilnost, što se postiže spolnom hibridizacijom. Na taj način u potomstvu je moguća pojava transgresivnih genotipova, a takvi genotipovi se potom održavaju vegetativnim razmnožavanjem.

Većina voćnih vrsta su mezofiti i traže dosta vode za razvoj. U nekim voćnim vrstama postoji i otpornost na sušu kao npr. u marelici, breskvi, bademu, što se dijelom pripisuje sposobnosti reguliranja prometa vode preko stoma. Postoje i kultivari unutar vrsta koji su manje ili više otporni na sušu, pa je to svojstvo moguće poboljšati oplemenjivanjem. To je posebno važno u selekciji podloga. Podloge inače imaju važnu ulogu u reagiranju biljke na uvjete okoline. U selekciji podloga treba voditi računa o prilagođenosti nepovoljnim vanjskim uvjetima. Prilagodba na klimatske uvjete hladnijih područja veoma je važno svojstvo voćaka i vinove loze. To se postiže sijanjem sijanaca u hladnija područja i odabiranjem najprilagodljivijih formi.

Otpornost na bolesti i štetnike je važan dio oplemenjivačkog programa voćaka, ali je zbog specifičnosti selekcijskog procesa manje uspješan nego u ratarskim kulturama. Način izražavanja bolesti i odnos domaćina prema patogenu isti je kao u ratarskim vrstama. Međutim, mjerenje i reagiranje na bolest na bazi cijele biljke složenije je s obzirom da broj točaka rasta (grana) i starost različitih dijelova biljke variraju.

Dva su osnovna tipa izbora u oplemenjivanju voćaka za otpornost na bolesti. Prvi je izbor individua u cijepajućoj populaciji nakon hibridizacije. Biraju se individue koje imaju željenu razinu otpornosti, nakon čega slijedi selekcija na poželjnu kombinaciju pomoloških svojstava unutar populacije. Drugi način je povratno križanje, što je najdjelotvornije sredstvo unošenja svojstva otpornosti u inače dobar genetski kompleks kultivara.

Najbolji se uspjeh postiže ako je otpornost pod kontrolom pojedinačnog dominantnog gena. Ukoliko je otpornost recesivna ili poligenska i jedini je dostupni izvor otpornosti, razvoj otpornog kultivara još uvijek može biti vrijedan pokušaja. U takvom slučaju poduzima se križanje u srodstvu ili test križanje između svake generacije povratnog križanja da bi se dobili recesivni geni u homozigotnom stanju ili koncentrirali poligeni.

U suvremenoj voćarskoj proizvodnji sve je više zahtjeva za **mehaniziranu berbu**, a za takvu berbu voćka mora biti prilagođena. Stoga se u selekciji voćaka za mehaniziranu berbu vodi računa o obliku biljke, vremenu zriobe, otpornosti korijena na udare, otpornosti stabljike na mehaničke udare, veličini i kvaliteti ploda ili opadanju ploda. Mehanička berba obavlja se tresenjem ili hvatanjem i skidanjem ploda. Jedno od najvažnijih svojstava za mehaničku berbu je sposobnost odvajanja ploda s biljke. Da bi se olakšala mehanička berba biljka mora imati odgovarajući oblik. Za jabuku je to npr. *spur* tip s tvrdim drvetom, za breskvu stablo sa širokim habitusom i slojevitom strukturom grana, stablo trešnje bolje je s kraćim internodijima i tvrdim granama. U vinovoj lozi su uz lakše odvajanje bobice duže peteljke važne za mehaniziranu berbu. Mehanizirana berba sada se primjenjuje u proizvodnji badema, oraha, lješnjaka, te za industrijsku preradu u berbi maline, borovnice, kupine, trešnje, višnje, jabuke, šljive, vinskog grožđa, a počinje također u berbi breskve i marelice (tablica 16).

Tablica 16. Ocjena mogućnosti mehaničke berbe
nekih voćnih vrsta

Vrsta	Metoda korištenja	
	svježe	prerađeno
Bajam	2	1*
Breskva	4	3
Citrusi	4	2
Grožđe	4	1
Jabuka	3	2
Jagoda	4	3
Kruška	4	3
Kupina	4	1
Lješnjak	2	1
Marelica	4	2
Šljiva	3	2
Trešnja	4	1

*1 pokazuje najveći potencijal, a 4 najmanji

Tipovi kultivara

U proizvodnji voćaka i vinove loze primjenjuju se uglavnom klonski kultivari. Klonovi mogu proisteci od homozigotne ili heterozigotne biljke. Oni uvijek zadržavaju svoja svojstva bez obzira kakav je bio prethodni selekcijski put do izdvajanja klona. Generativnim putem klon također nastaje iz apomiktičnog sjemena. U proizvodnoj praksi česte su smjese klonova, odnosno klonovi nastali od većeg broja voćnih stabala ili trsova vinove loze. Čiste linije u voćarstvu i vinogradarstvu nemaju većeg praktičnog značenja. Ako je kultivar nastao iz sjemena, odnosno izdvojen kao sijanac onda je to stranooplodni kultivar budući da su voćke uglavnom visoko heterozigotne.

Metode oplemenjivanja

Metode razvoja novih kultivara voćnih vrsta slične su metodama u ratarskim vrstama; od masovne i individualne selekcije do metoda kombinacijskog oplemenjivanja i korištenja mutacija. U voćarstvu je, međutim, najčešća klonska selekcija koja se u ratarskim kulturama primjenjuje samo u nekim vrstama. Za razvoj nove genetske varijabilnosti koriste se postupci križanja dva ili više roditelja. Dialelno križanje primjenjuje se samo u vrstama s kraćim životnim ciklusom. Inbriding je za voćke i vinovu lozu nepogodna metoda u oplemenjivanju zbog dugotrajnosti, stranooplodnje i samobesplodnosti pa je ograničen samo na neke samooplodne vrste kratkog životnog vijeka.

Izbor iz populacije

Heterogene populacije se mogu koristiti za izdvajanje elitnog materijala za uzgoj ili razmnožavanje, kao i za razvoj početnog materijala za selekciju, što se provodi masovnom i individualnom selekcijom.

Masovna selekcija

Masovna selekcija je metoda oplemenjivanja voćaka koja podrazumijeva odabiranje u masi više jednakih voćnih individua koje se već nalaze u procesu proizvodnje. Temelji se na fenotipskoj ocjeni i to samo na fenotipu majčinskog roditelja. Odabrane individue nakon toga razmnožavaju se vegetativno i sva odabrana svojstva se na taj način fiksiraju.

Primjena masovne selekcije i rezultati koji se pritom ostvaruju vezani su za način oplodnje. Učinak masovne selekcije ovisi o djelovanju gena za traženo svojstvo, heritabilnosti svojstva, interakciji genotipa i okoline te veličini uzorka za selekciju. Najbolji rezultati u ovoj metodi postižu se ako su svojstva na koja se provodi selekcija uvjetovana aditivnim djelovanjem gena. Različite vrste voćaka imaju različitu razinu heritabilnosti za pojedina svojstva. U jezgrastom i koštičavom voću, prema ocjeni istraživača, heritabilnost važnijih svojstava veća je nego u drugim vrstama voća.

Masovno odabiranje može biti pozitivno i negativno ovisno o tome što se odabire. Iz plantažnih nasada voćnjaka i vinograda u prvim godinama izdvajaju se iz mase samo negativne individue i tek nakon takvog čišćenja uzimaju se grančice za reznice i vegetativno razmnožavanje. Negativna selekcija se izvodi radi toga što u takvom nasadu ima manje negativnih formi. Pozitivna selekcija se provodi kad se želi dobiti elita ili superelita. Broj odabranih jedinki mora biti dovoljno velik da se izbjegne depresija inbridinga.

Masovna selekcija najviše se primjenjuje u autohtonim populacijama stranooplodnih vrsta, posebno poludivljih i divljih, te onih u kojima prije toga nije provedena nikakva selekcija. U samooplodnim vrstama ova je metoda manje značajna budući da su takve populacije uglavnom ujednačene. Značajni rezultati u primjeni masovne selekcije postignuti su u oplemenjivanju šljive, kajsije, breskve i badema.

Individualna selekcija

Izbor pojedinačnih biljaka je vjerojatno bila prva metoda usmjerene selekcije voćnih vrsta. Zasniva se na izdvajanju genotipova s najboljim svojstvima koji mogu potjecati od pojedinačnih voćaka, lastara vinove loze, ili onih proizašlih iz pupova. Ocjena se također temelji na fenotipu, a za razliku od masovne selekcije, proučava se potomstvo, tako da se može utvrditi genotipska vrijednost. Sve se izdvojene individue uzgajaju i proučavaju pod jednakim uvjetima okoline. U individualnoj selekciji izučavanjem se mogu odvojiti modifikacije od genotipskih varijacija i razlikovati forme i biotipovi koji su morfološki slični, ali se razlikuju u pogledu kvalitete svojstva.

Individualna selekcija može biti u širem i užem smislu. Prvi tip primjenjuje se u biljkama koje se razmnožavaju spolno i temelji se na vrijednosti individua i njihova potomstva. Postupak započinje izborom najboljih individua u heterogenoj populaciji nakon čega se sjeme svake odabrane individue ispituje u pokusima u usporedbi sa standardom. Ovaj postupak primjenjuje se najčešće u selekciji šljive (džanarike), višnje, nekih divljih vrsta, a posebno je uspješan u selekciji vinogradarske breskve.

Individualna selekcija u užem smislu temelji se na ispitivanju svojstava vegetativno razmnoženih pojedinačnih odabranih biljaka iz populacije. Ne ispituje se potomstvo tih biljaka. U ovom postupku uglavnom se provodi selekcija superiornih genotipova na određena svojstva kao što su

npr. otpornost na niske temperature, otpornost na bolesti ili štetnike, vrijeme cvjetanja ili zrenja, selekcija na rodnost ili neka druga svojstva.

Metode oplemenjivanja nakon hibridizacije

Veliki broj voćnih kultivara razvijen je nakon kontrolirane hibridizacije, bilo unutar vrste, bilo između vrsta. Međuvrsna hibridizacija pored stvaranja nove genetske varijabilnosti omogućava proučavanje nasljednosti važnih svojstava kao što su vrijeme zriobe, boja pokožice i mesa ploda ili otpornost na bolesti. Izbor roditelja mora se pažljivo provesti, a biraju se obično roditelji koji se međusobno dopunjuju za tražena svojstva.

Tablica 17. Klijanje polena pri različitim temperaturama

Temperatura u °C	Uvjeti za polen
20 – 27	Idealno
15 – 20	Dobri ali slabiji razvoj
< 10	Nema klijanja polena
> 32	Klijanje brzo, ali može doći do isušivanja

Većina voćnih vrsta, posebno voće umjerene zone, ima kratak period cvatnje, obično nekoliko dana do oko dva tjedna, ovisno o vrsti i klimatskim uvjetima. Mnoge voćne vrste cvjetaju rano u proljeće kad su niske temperature, što otežava oplodnju zbog slabe klijavosti polena (tablica 17). O tome bi trebalo voditi računa u umjetnoj hibridizaciji pa bi cvjetove trebalo zaštititi na odgovarajući način ili ako je moguće umjetno stvoriti povoljne uvjete.

Nakon hibridizacije najčešće se provodi pozitivna individualna selekcija u F_1 generaciji. Ako su roditelji diploidni treba manje potomaka nego ako su roditelji poliploidni. Za stranooplodne diploidne vrste i kultivare treba najmanje 1000 individua u jednoj populaciji, a za poliploidne stranooplodne znatno više. Za samooplodne diploide treba oko 100 individua u populaciji da bi se dobilo nekoliko individua koje se približavaju željenim svojstvima i postavljenom cilju hibridizacije i selekcije. Cijeli tok selekcijskog procesa odvija se kroz više faza:

- ✧ izbor odgovarajućih roditelja
- ✧ hibridizacija roditelja
- ✧ sjetva sjemena
- ✧ sadnja u rasadnik
- ✧ sadnja na startno mjesto ili cijepljenje
- ✧ individualno odabiranje najboljeg hibridnog potomstva
- ✧ provjeravanje potomstva
- ✧ obilježavanje elitnih stabala
- ✧ prijavljivanje najboljih klonova

Povratno križanje

Kao u ratarskim vrstama, povratno križanje u voćarskim vrstama provodi se da bi se kvalitetnom kultivaru unijelo neko posebno pozitivno svojstvo. Za majčinskog rekurentnog roditelja (A) uzima se kultivar kojemu treba popraviti neko svojstvo, a otac (B) je donor tog svojstva. Postupak se izvodi na sljedeći način:

Godina	Operacija
1.	križanje A x B
2.	sjetva sjemena u rasadnik radi proizvodnje sadnog materijala
3.	sadnja i uzgoj voćaka potomstva F_1
4 i 5.	uzgoj voćaka potomstva F_1 generacije i odabiranje najboljih individua: Križanje potomstva $F_1(A \times B) \times B$, prvo povratno križanje radi dobivanja BC_1 generacije:
7.	sjetva sjemena u rasadnik
8. i 9.	sadnja i uzgoj potomstva B_1F_1 generacije
10.	uzgoj i odabir potomstva iz populacije B_1F_1 za drugo povratno križanje:
11.	križanje potomstva B_1F_1 s povratnim roditeljem, tj. $(A \times B) \times B \times B$ i dobijanje B_2F_1
12.	sjetva sjemena B_2F_1 u rasadnik radi proizvodnje sadnog materijala
13 i 14.	sadnja i uzgoj potomstva B_2F_1
15.	uzgoj i odabir potomstva.

Ako još nisu postignuti željeni rezultati postupak se nastavlja dok se ne razvije odgovarajuće potomstvo.

Postoji velika vjerojatnost da se iz velikog broja uzgojnog materijala izvede barem jedna biljka s traženim svojstvima, koja se onda vegetativno razmnoži.

Klonska selekcija

Klonska selekcija je najčešći selekcijski postupak u voćarstvu i vinogradarstvu i predstavlja odabir klonova iz jednog kultivara ili populacije. U komercijalnoj proizvodnji u voćarstvu i vinogradarstvu uglavnom se uzgajaju klonovi. Klon je ujednačeno vegetativno razmnoženo potomstvo podrijetlom od jedne homozigotne ili heterozigotne individue. Klonovi ne mijenjaju svoju nasljednu osnovu, ali tijekom vremena pod utjecajem vanjskih činitelja tzv. selekcijskim pritiskom, na potomstvu klonova mogu nastati nasljedne promjene (za razliku od modifikacija). Ako je variranje pupova učestalo onda je trajnost klona kraća pa je potrebno provoditi klonsku selekciju u cilju izdvajanja i daljeg razmnožavanja korisnih mutanata. Sve nasljedne varijacije klonova mogu biti pozitivne i negativne.

Klonska selekcija može biti masovna i individualna. U masovnoj klonskoj selekciji bira se veći broj individua u okviru klona koji je mutirao. Postoji negativna i pozitivna masovna klonska selekcija. Masovna se negativna selekcija provodi obično u mladim nasadima kad se želi pročititi jedan kultivar izdvajanjem nepoželjnih formi. Kad voćni nasadi i vinogradi počinju plodonositi izdvajaju se pozitivni klonovi prema svojstvima ploda, otpornosti na bolesti, rodnosti i eventualno

nekom drugom svojstvu. Takvi klonovi se potom vegetativno razmnožavaju. Ako se nastavi s ispitivanjem potomstva i odabiranjem unutar takvog potomstva onda je to višestruka klonska selekcija.

U individualnoj klonskoj selekciji odabiru se pojedinačne individue koje se potom uzgajaju kao posebni klonovi. Svaki odabrani pojedinačni klon razmnožava se vegetativno, ispituje u pokusu sa standardom kako bi se utvrdilo je li došlo do nasljedne promjene ili je u pitanju prolazna modifikacija.

Klonska selekcija obavlja se tijekom vegetacije nekoliko puta, a poželjno je svake tri godine. Pritom se provodi pregled nasada i traže eventualne korisne promjene na biljkama. U fenofazi cvatnje pozornost treba obratiti na vrijeme cvatnje i svojstva cvjetova. U toku vegetativnog razvoja ocjenjuje se otpornost na bolesti, karakter listova i druga svojstva. U vrijeme zriobe plodova pozornost se obraća na oblik i krupnoću ploda, rodnost i druga svojstva kvalitete ploda.

Ako se izdvojeni klonovi razlikuju po nečemu moraju se odvojeno ispitati i cijepiti na istu vegetativnu podlogu. Obično se sadi po osam stabala svakog mutanta kako bi se njihova vrijednost što bolje iskazala. Do početka plodonošenja također se može obaviti izbor neodgovarajućih individua.

Korištenje heterozisa u voćarstvu

Heterozis se uspješno iskorištava u voćkama i vinovoj lozi jer se može fiksirati vegetativnim razmnožavanjem, a najviše se primjenjuje u sitnom voću, te vinovoj lozi i breskvi. Jedna od voćnih vrsta u kojoj se heterozis uspješno primjenjuje je breskva. Porebno je oko 10 godina da se dobije heterotično potomstvo iz dvostrukog križanja (AxB) x (CxD). Heterozis se u voćnim vrstama koristi samo u samooplodnim vrstama, dok se u stranooplodnim inbriding ne može provesti zbog dužine životnog ciklusa i samosteriliteta. Jedina mogućnost razvoja homozigotnih inbred linija u takvim vrstama bila bi razvoj haploida tehnikom kulture tkiva.

Mutacije u voćarstvu

U voćkama su nasljedne promjene kao posljedica mutacija češće zbog njihova duljeg životnog ciklusa. Mutacije se u voćarstvu mogu iskoristiti čak bolje nego u ratarstvu zbog vegetativnog načina razmnožavanja. Mutacijsko oplemenjivanje u voćarstvu može rezultirati poboljšanjem postojećih kultivara za kraće vrijeme nego se to postiže konvencionalnim oplemenjivanjem. Premda je većina mutacija nepoželjna sa stajališta oplemenjivanja, u nekim voćnim vrstama nađeni su korisni mutanti, što se potom prenijelo na potomstvo. Takva korisna mutacija je patuljast rast. U jabuci je prenesen u potomstvo kao pojedinačni dominantni gen. Tzv. «*spur*» tipovi jabuke koji se odlikuju slabijom bujnošću danas se u velikoj mjeri koriste u proizvodnji jabuke. U breskvi je patuljast rast utvrđen kao monogenski tip nasljeđivanja s nepotpunom dominantnošću.

U voćarstvu se mogu provoditi i inducirane mutacije fizičkim i kemijskim sredstvima ili jonizirajućim zračenjem. Mutageni tretman provodi se na pupovima – vršnim, pazušnim, adventivnim ili spavajućim, na dormantnom sjemenu ili na aktivnoj biljci. Za uspješnost induciranih mutacija potrebno je zadovoljiti nekoliko uvjeta: 1. velika populacija koja se tretira; 2. visoka frekvencija mutanata sa željenim svojstvom; 3. djelotvorna metoda utvrđivanja mutacija vizualnom ocjenom ili jednostavnim metodama. U mutacijskom spektru nema temeljne razlike između spontanih i induciranih mutanata. No gotovo svi mutanti voćnih vrsta primijenjeni u proizvodnji do sada su spontani mutanti.

U oplemenjivanju voća ponekad se koristi pojava himera. Himere su nađene do sada u jabuci, kupini, trešnji, vinovoj lozi, breskvi, kruški. Nastale su uglavnom spontano i nešto rjeđe induciranim mutacijama ili kao posljedica cijepljenja. U himernim mutacijama koriste se samo očigledne promjene kao što su poliploidija, nedostatak klorofila, i antocijana. Poznata je primjena himera u oplemenjivanju voća za boju pokožice u jabuci, te u induciranju i iskorištavanju poliploidije.

Tablica 18. Spontane i inducirane mutacije poznate u voćnim vrstama

S v o j s t v o	bres- kva	citru- si	jabu- ka	kruš- ka	mali- na	mare- lica	šlji- va	treš- nja	vin. loza
Bujnost biljke i habitus	x	x	x	x	-	x	x	x	x
Otpornost na bolesti	x		x	x					x
List: oblik, veličina, boja	x	x	x			x			x
defekti klorofila		x	x			x			x
Razina ploidije			x	x		x			x
Vrijeme cvatnje				x		x			
Veličina i tip cvijeta	x				x	x			
Samofertilnost				x			x	x	x
Plod: prinos	x	x	x		x	x	x	x	x
vrijeme zriobe	x	x	x	x		x	x	x	x
veličina, oblik	x		x	x	x	x		x	x
boja pokožice		x	x	x					x
aroma, okus			x						
tekstura	x								

Selekcija podloga

Selekcija podloga ima posebnu ulogu u unapređenju voćarstva i vinogradarstva s obzirom na veliko značenje podloga u ovoj djelatnosti. To je također dugotrajan proces. U vinogradarstvu je selekcija podloga počela 60-ih godina 19. stoljeća nakon pojave filoksere, a u voćarstvu je nešto mlađeg datuma.

U selekciji podloga mora se voditi računa o nekoliko činitelja koji su karakteristični samo za podloge:

- fizička okolina podloge je drukčija od one u kojoj se razvija dio biljke koji daje plod
- biotička okolina podloge je također drukčija i drukčiji su uvjeti za razvoj bolesti i štetnika
- fiziologija korijena je drukčija od nadzemnog dijela biljke no i pored toga utjecaj podloge na plemku i plemke na podlogu može biti prilično velik

Ciljevi oplemenjivanja podloga variraju s kultiviranom vrstom i područjem, ali postoje neki zajednički kriteriji za većinu, a to su:

- sposobnost umnožavanja sjemenom ili vegetativnim načinom; podloga mora zadovoljiti zahtjeve komercijalnog rasadničarstva
- kompatibilnost pri cijepljenju s komercijalnim kultivarima
- dobar potencijal, što znači da podloga mora poticati pojavu cvjetnih pupova i dobar plod; proizvodnja bi trebala biti redovita i visoka sa zadovoljavajućom kvalitetom ploda
- dugotrajnost: voćka bi trebala dobro vegetirati u prevladavajućim uvjetima uzgoja

Tri značajne karakteristike podloge - kompatibilnost s plemkom, utjecaj na cvatnju i proizvodnju, te utjecaj na razvoj i konačnu veličinu biljke, može se ocijeniti samo na temelju rezultata u voćnjaku.

Razvoj i selekcija podloga provodi se na dva načina: iz prirodnih populacija, i hibridizacijom

Selekcija podloga iz prirodnih populacija razlikuje se između vrsta koje se razmnožavaju vegetativno i onih koje se razmnožavaju generativno. U vrstama koje se razmnožavaju vegetativno radi se s klonovima.

U prvoj fazi selekcije i prikupljanja klonskog materijala pozornost treba posvetiti izdvajanju elitnog materijala za razmnožavanje. Pritom se provjerava zdravstveno stanje, eventualna inkompatibilnost s plemkom i eliminiranje negativnog materijala. Elitni materijal se zasađi u što većem broju kako bi se odabralo ono što je najbolje. Ti se klonovi potom ispituju u kompatibilnosti s određenim kultiviranim sortama.

Selekcija podloga iz prirodnih populacija koje se razmnožavaju generativno je nešto drugačija. Od samooplodnih voćnih vrsta čije se generativne podloge koriste za cijepljenje poznate su višnja, rašeljka, džanarika, breskva, marelica, a od stranooplodnih jabuka, kruška, trešnja. Sjeme za podloge mora biti iz čistih asocijacija, ne smije biti miješanja ni međukrižanja.

Selekcija se odvija u tri faze

1. izdvajanje iz populacije formi i tipova koji po fenotipskim karakteristikama zadovoljavaju postavljene uvjete što se izvodi masovnom pozitivnom selekcijom;

2. sjetva i ispitivanje u rasadniku; odbacuju se sve forme sa slabom klijavošću sjemena, potom slijedi proučavanje u rasadniku, ponašanje u simbiozi sa cijeptom u rasadniku i proučavanje ponašanja kultivara na pojedinim podlogama u različitim agroekološkim uvjetima. Prema tome selekcija formi i tipova podloga samooplodnih vrsta sastoji se u negativnoj selekciji koja se izvodi prema bujnosti, ujednačenosti razvića i vitalnosti korjenovog sustava. Budući da su voćne vrste koje se razmnožavaju generativno heterotične, treba težiti da se dobije što ujednačeniji materijal.

3. selekcija podloga u rasadniku: sve odabrane individue treba provjeriti cijepljenjem s različitim kultivarima i utvrditi stupanj kompatibilnosti.

Razvoj novih podloga hibridizacijom odvija se na standardan način za hibridizaciju bilja. Strategiju razvoja podloga prikazat ćemo na primjeru podloge jabuke NC 140 proizvedene u SAD. Cijeli tijek razvoja od izbora roditelja do priznavanja i komercijalizacije podloga na tržištu podijeljen je u 10 faza (tablica 19).

Tablica 19. Postupak razvoja podloga nakon hibridizacije

Faza	Radna operacija i broj genotipova za ocjenu	Godine (od do)
1	Izbor roditelja, hibridizacija, ispitivanje reagiranja na važnije bolesti, zasnivanje matičnih sijanaca. Ova faza traje od prve do treće godine i u njoj se uzgaja do 5000 biljaka. To je najkritičniji dio programa. Roditelji se biraju tako da se dopunjuju po svojstvima (npr. lako razmnoživi patuljasti roditelji križaju se s iznimno otpornim roditeljima). U potomstvu se provodi umjetna inokulacija i samo oni potomci koji pokazuju zadovoljavajuću otpornost sade se u polje, pa se broj biljaka za dalji rad značajno reducira.	1 - 3
2	Izbor matičnjaka za dalje razmnožavanje. Za ocjenu u ovoj fazi odabere se oko 1000 biljaka, provodi se zasnivanje rasadnika i razvoj stabala u rasadniku	4 - 6

3	Zasnivanje početnog pokusnog voćnjaka, ocjena rodnosti i izbor pogodnih genotipova. Ocjenjuje se ukupno 100 genotipova	7 - 9
4	Ocjena početnog pokusnog voćnjaka, izbor i zasnivanje elitnih matičnjaka. U ispitivanju je 50 genotipova, a postupak se provodi tri godine	10 - 12
5	Proizvodnja sadnica, ocjena matičnjaka u rasadniku, ispitivanje na 25 genotipova	13 - 15
6	Zasnivanje intermedijarne faze rasadnika i rana ocjena, 10 genotipova u ispitivanju	16 - 18
7	Ocjena intermedijarne faze voćnjaka, komercijalni pokusi s matičnim stablima, pet genotipova	19 - 21
8	Nova podloga NC 140 u širim pokusima, dva genotipa u pokusu	22- 24
9	Konačne ocjene vrijednosti genotipa, pripreme za priznavanje	25 - 27
10.	Prva komercijalna podloga, odstranjivanje svih nepriznatih podloga iz pokusa	28 - 30

Kao što se vidi postupak razvoja kvalitetnih podloga isto kao i razvoja kvalitetnih plemenitih voćki je skup i dugotrajan, a od više tisuća početnih biljaka dobije se na koncu jedan ili u najboljem slučaju nekoliko kultivara koji zadovoljavaju tražena svojstva.

9. Biljni kultivari i njihova zaštita

Obilježja kultivara

U oplemenjivanju biljaka i u poljoprivrednoj proizvodnji često se upotrebljavaju pojmovi sorta i kultivar - dva termina koji u osnovi označavaju isto. Termin sorta (stari hrvatski naziv koji se još i danas može čuti, bio je - odlika) upotrebljava se više u svakodnevnom govoru, u proizvodnji i sjemenarstvu. Noviji je izraz kultivar izveden kao međunarodna oznaka za kultiviranu sortu (**cult**ivated **vari**ety). Oba izraza upotrebljavaju se kao istoznačnice, no u znanstvenoj literaturi u svijetu više se upotrebljava pojam kultivar.

Čitavo je biljno carstvo podijeljeno na određene sistematske skupine srodnih i po nečemu sličnih biljaka. Najviša botanička sistematska skupina s kojom se u oplemenjivanju operira jest porodica (familija). Ona se dijeli na rodove (*genus*), a rodovi na vrste (*species*). Biljna vrsta može imati niže jedinice: podvrsta (*subspecies*), varijetet (*varietas*) i podvarijetet (*subvarietas*). No s agronomskog i komercijalnog stajališta vrsta se uglavnom dijeli na sorte, odnosno kultivare. Izraz kultivirana sorta uveden je upravo zato da bi se razlikovala od botaničke sorte (*varietas*) kao sistematske jedinice. Prema tome, kultivar je više agronomska i komercijalna kategorija nego što je botanička klasifikacijska jedinica.

Odnose između sistematskih jedinica, te između botaničkih i komercijalnih kategorija, prikazat ćemo na primjeru skupine kultura kakve su kupusnjače:

✧ Familija:	<i>Brassicaceae (Cruciferae)</i>
✧ Rod:	<i>Brassica</i>
✧ Vrsta:	<i>Brassica oleracea</i>
✧ Varietas	<i>Botrytis</i>
✧ Subvarietas	<i>Cauliflora</i>

U okviru vrste *Brassica oleracea* postoji više botaničkih sorti (varijeteta) i podvarijeteta. Npr. subvarietas *Cauliflora* – cvjetača, sadrži brojne oblike koji se međusobno razlikuju po nekom morfološkom, fenološkom ili drugom fenotipskom obilježju. Svaki taj posebni oblik cvjetače kao novi genotip može biti priznat kao novi kultivar i uveden u komercijalnu proizvodnju.

Ima više definicija za sortu, odnosno kultivar, ovisno o tome što je koji autor sve htio obuhvatiti tim pojmom. Općenito se pod pojmom kultivara označava skup genetički sličnih biljaka koje posjeduju određena nasljedno uvjetovana morfološka, fiziološka, agronomska ili neka druga svojstva po kojima se razlikuju od drugih skupina biljaka u okviru iste vrste, a koji je razvijen i održava se u umjetnom uzgoju. Prema međunarodnoj nomenklaturi kultiviranih biljaka (UPOV, 1980.) “kultivar je skupina biljaka koje se odlikuju po nekom svojstvu (morfološkom, fiziološkom, citološkom, kemijskom) važnom za poljoprivredu, šumarstvo ili hortikulturu i koje nakon razmnožavanja (spolno ili bespolno) zadržavaju svoja svojstva”.

Da bi neki genotip bio priznat kao novi kultivar mora, prema Međunarodnoj konvenciji za zaštitu novih biljnih kultivara (UPOV, 1991.) zadovoljiti četiri bitna kriterija, tj. mora biti:

- ✧ nov
- ✧ prepoznatljiv
- ✧ ujednačen
- ✧ stabilan (postojan)

Kultivar se smatra novim ako u vrijeme prijavljivanja za priznavanje razmnoženi ili obrani sortni materijal nije prodan ili na bilo koji drugi način prepušten drugima, s ili bez dopuštenja oplemenjivača, u cilju komercijalnog iskorištavanja.

Kultivar je prepoznatljiv (poseban) ako se jasno razlikuje od svih drugih poznatih kultivara po jednom ili više prepoznatljivih morfoloških, fenoloških, agronomskih, fizioloških, patoloških, kemijskih ili drugih svojstava što se ocjenjuje u usporedbi s drugim poznatim kultivarima. Razlike među kultivarima određuju se vizualnom ocjenom, mjerenjem, brojanjem, vaganjem, analitičkim laboratorijskim testovima ili molekularnim analizama. Molekularnim profiliranjem utvrđene su razlike između biljnih kultivara koji su bili morfološki slični (Graham i sur., 1994; Scott i sur., 2000.).

Kultivar je ujednačen, ako su biljke u svim svojim bitnim karakteristikama fenotipski ujednačene. Kako su biljke složeni biološki sustavi, podložne su variranjima te nije za očekivati da su sve apsolutno jednake. No variranja moraju biti unutar određenih granica za svaki tip kultivara. Ove granice uže su za vegetativno razmnožavane ili samooplodne nego za stranooplodne vrste.

Kultivar će biti postojan odnosno stabilan ako njegove bitne karakteristike ostaju nepromijenjene nakon ponovljenog razmnožavanja ili, u slučaju posebnog razmnožavanja u ciklusima, na kraju svakog ciklusa. Postojanost je na stanoviti način vezana za ujednačenost i predstavlja stalnu ujednačenost.

Uz priznavanje novog kultivara obvezna je i denominacija, tj. davanje imena novom kultivaru. Ime kultivara mora biti sukladno standardima UPOV-a; mora se također razlikovati od svih drugih naziva.

Da bi jedna skupina biljaka postala kultivar, mora, između ostalog, biti promišljeno uzgajana radi određene koristi. Skupina divljih jabuka koje rastu uz put nije kultivar osim ako se ne počnu uzgajati radi nekih svojstava ploda.

U identifikaciji i razlikovanju kultivara tradicionalno su se koristila morfološka svojstva. No, ona zbog interakcije okoline i nedovoljno poznate genetičke kontrole ovih svojstava često ne daju pouzdanu sliku genetičkog srodstva. Biokemijski podaci dobiveni pomoću genetičkih markera, u identifikaciji genotipova pouzdaniji su pokazatelj. Na njih okolina ne djeluje jače, a njihove su genetičke baze dobro razumljive.

Tipovi kultivara

Prema genetičkoj konstituciji u prirodi i komercijalnom uzgoju postoji devet osnovnih tipova kultivara (Borojević, 1981.):

- ✧ čista linija
- ✧ čisti kultivar
- ✧ multilinijski kultivar
- ✧ kultivar (sortna) mješavina
- ✧ kultivar (sortna) populacija
- ✧ hibridni kultivar
- ✧ sintetički kultivar
- ✧ poliploidni kultivar
- ✧ klonski kultivar

Čista linija je skupina fenotipski ujednačenih biljaka a potomstvo su jedne homozigotne biljke. Čista linija u samooplodnim vrstama nastaje nakon šest generacija samooplodnje kad je postotak homozigotnosti u genotipu preko 95%. Ako se sa

samooplodnjom nastavi dalje, nastat će potpuno homozigotan genotip sa svim individuama koje su genetički identične. Inbred linije stranooplodnih vrsta razvijene nakon šest generacija samooplodnje po genetičkom sastavu identične su čistim linijama. Dok se čiste linije upotrebljavaju kao komercijalni kultivari, inbred linije koriste se samo kao komponente za razvoj hibridnih ili sintetičkih kultivara. Čiste linije su najčešći komercijalni kultivari u većini samooplodnih vrsta (pšenica, ječam, soja, duhan i druge). Ovaj tip kultivara u proizvodnji zahtijeva intenzivne uvjete uzgoja i odgovarajuće uvjete okoline za optimalnu realizaciju svojih genetičkih potencijala.

Čisti kultivar je skupina veoma sličnih genotipova čiji je postotak homozigotnosti veći od 87,5%, a manji od 95%. Čisti kultivar u samooplodnim vrstama nastaje ako se samooplodnja prekine u F₅ generaciji. Na taj način čisti kultivar sadrži skupinu genetički sličnih biljaka koje su fenotipski gotovo ujednačene. Neki autori, pogotovo u američkoj literaturi, upotrebljavaju pojam linijski kultivar, koji podrazumijeva i čistu liniju i čisti kultivar, a hoće li biti jedno ili drugo ovisi o stupnju samooplodnje tijekom selekcijskog postupka. Ovoj skupini pripada većina kultivara samooplodnih vrsta. U zemljama u kojima je poljoprivredna proizvodnja intenzivna, u proizvodnji su čiste linije, a u državama s ekstenzivnom poljoprivredom uglavnom su zastupljeni čisti kultivari. Čisti kultivari obično imaju nešto niži potencijal prinosa od čistih linija, ali su u ekstenzivnom uzgoju prilagodljiviji i manje osjetljivi na agrotehničke nedostatke.

Multilinijski kultivar je mješavina genotipski i fenotipski sličnih linija koje se među sobom razlikuju samo u jednom do dva svojstva. To su najčešće izogene linije koje se razlikuju u otpornosti na jedan specifičan soj određenog patogena. S obzirom na poteškoće u razvoju komponenata jedne multilinije, te na brzu smjenu linijskih kultivara, multilinijski kultivari sve se manje prakticiraju u proizvodnji. Multilinijski kultivari upotrebljavaju se samo onda kad nije moguće na drugi način proizvesti kultivar otporan na nekog patogena.

Ukoliko je multilinijski kultivar sastavljen od više različitih i manje srodnih kultivara, upotrebljava se pojam **sortna mješavina**. To je u stvari mehaničko spajanje dvaju ili više različitih genotipova da bi se bolje iskoristili nepovoljni uvjeti okoline. Međutim, u intenzivnoj biljnoj proizvodnji u kojoj se primjenjuju visokoprinosni kultivari koji su prilagodljivi i na manje povoljne uvjete, sortne se mješavine rijetko koriste. Sortne mješavine primjenjuju se uglavnom u proizvodnji krmnih trava i leguminoza. U proizvodnji ovih kultura prakticira se ponekad mješavina više vrsta kako bi se povećala proizvodnja biomase u pojedinim godinama i otkosima.

Kultivar (sortna) populacija predstavlja skup različitih genotipova i relativno ujednačenih fenotipova jedne samooplodne ili stranooplodne vrste. To je obično neka prirodna ili lokalna populacija nastala kao ekotip prilagođavanjem uvjetima okoline. Što su ekološki uvjeti ekstremniji, to su svojstva ekotipova izraženija. Tako će se najranije sorte žitarica naći u uvjetima kratkog vegetacijskog perioda u sjevernim geografskim širinama ili u sušnim i vrućim područjima Mediterana da bi izbjegle ljetne žege. Sortna populacija u samooplodnim vrstama sastavljena je od većeg broja homozigotnih linija u određenoj frekvenciji. Ovakve populacije postoje uglavnom u vrstama u kojima nije razvijena selekcija, kakve su trave i krmne leguminoze. One se koriste u razvoju linijskih kultivara masovnom ili individualnom selekcijom. Sortna populacija u stranooplodnim vrstama predstavlja skup više ili manje heterozigotnih genotipova. Za ovakav kultivar još se upotrebljava izraz **stranooplodna sorta (kultivar)**. Takvi kultivari komercijalno se primjenjuju u kulturama u kojima je teško ostvariv hibridni ili neki drugi tip kultivara. To su neke vrste stranooplodnih trava i krmnih leguminoza. Stranooplodni kultivar upotrebljava se također u uzgoju važnijih stranooplodnih vrsta u područjima u kojima selekcija nije dovoljno razvijena.

Hibridni kultivar je F_1 potomstvo nastalo križanjem dviju ili više inbred linija. Ovisno o broju linijskih komponenata, hibridni kultivar može biti dvolinijski ili *single cross* - $(A \times B)$, trolinijski ili *three way cross* - $(A \times B) \times C$, te četverolinijski ili *double cross*, - $[(A \times B) \times (C \times D)]$, koji predstavlja rezultat križanja dva dvolinijska hibrida. Hibridni kultivari više se upotrebljavaju u stranooplodnim nego u samooplodnim vrstama, budući da je u stranooplodnim vrstama izraženiji fenomen heterozisa, odnosno hibridnog vigora. Dvolinijski F_1 hibridi su maksimalno heterozigotni, ali su sve biljke genotipski i fenotipski ujednačene. Trolinijski hibridi su nešto manje ujednačeni od dvolinijskih, a četverolinijski još manje. Kao rezultat maksimalne heterozigotnosti hibridi imaju veliku plastičnost i adaptabilnost na različite uvjete okoline. U nekim stranooplodnim vrstama kao što su kukuruz, suncokret i šećerna repa, u proizvodnji su gotovo isključivo hibridi.

Sintetički kultivar predstavlja potomstvo prve generacije međukrižanja posebne skupine klonova ili inbred linija. Koristi se uglavnom u stranooplodnim vrstama. On sadrži mješavinu sjemena koje potječe iz stranooplodnje, oplodnje u srodstvu i samooplodnje. U komercijalnom uzgoju najčešći su u travama i krmnim leguminozama, ali se, radi nekih posebnih ciljeva, primjenjuju i u drugim vrstama. U kukuruzu su rekurentnom selekcijom stvorene sintetičke populacije iz kojih su potom izvedene inbred linije dobrih kombinacijskih svojstava za razvoj hibridnih kultivara. Sintetički kultivari obično su stabilni za ograničen broj generacija ili reprodukcija, a obnavljaju se od originalnih roditeljskih linija ili klonova.

Poliploidni kultivar nastaje promjenom stupnja ploidnosti u odnosu na izvorni kultivar. Ovisno o razini ploidije i genetičkoj konstituciji prvobitnog diploidnog kultivara, poliploidni kultivar može biti genetički različit. Poliploidni se kultivari upotrebljavaju radi povećanja vegetativnih organa što je rezultat povećanja stupnja ploidnosti. Kod nekih poliploidnih kultivara, kao što je slučaj u triploidnoj šećernoj repi ili lubenici u kojima je većina genskih lokusa heterozigotna, uz učinak ploidnosti dolazi do izražaja učinak hibridnog vigora. Povećanje stupnja ploidnosti uspješno je provedeno u selekciji jagode, u cvjećarstvu, povrću, posebno onom koje se razmnožava vegetativno, te oplemenjivanju nekih drugih vegetativno razmnožavanih vrsta.

Klonski kultivar je genetički nepromijenjeno vegetativno potomstvo izvedeno od jedne homozigotne ili heterozigotne biljke. Po fenotipskom izražavanju klonski kultivar odgovara čistoj liniji, ali po genskom sastavu ovi su tipovi kultivara različiti. Po svojoj genotipskoj strukturi klonski kultivar može biti homozigotan ili heterozigotan, ovisno o tome potječe li od homozigotne ili heterozigotne individue. To određuje i način njegova reagiranja na uvjete okoline. Što je heterogeniji, lakše se prilagođava različitim uvjetima okoline. Klonski kultivari primjenjuju se u proizvodnji voćaka i vinove loze, no i u nekim ratarskim vrstama koje se razmnožavaju vegetativno (krumpir).

Tehnika poljskih pokusa

Svojstva novih genotipova i njihova vrijednost nakon završetka selekcijskog postupka ispituju se u uvjetima okoline u kojima bi se trebali normalno uzgajati. Najprije se provodi ocjena u preliminarnim pokusima. Preliminarni pokusi obično se izvode jednu do dvije godine. Novi genotipovi se uspoređuju sa standardom. Cilj je preliminarnih pokusa izbor linija koje će se dalje ispitivati u usporednim pokusima. Svojstva visoke heritabilnosti ocjenjuju se vizualno i već u preliminarnim pokusima moguće je izdvojiti genotipove koji imaju zadovoljavajuća takva svojstva. Međutim, svojstva niske heritabilnosti moraju se provjeravati u širem opsegu.

Nakon preliminarnih pokusa izvode se usporedni sortni pokusi u kojima će se testirati prinos, kvaliteta i sva druga svojstva značajna za vrednovanje novog kultivara. Pokusi se izvode na više lokacija i više godina da bi se odredila veličina interakcije genotip x okolina i stabilnost kultivara u različitim okolinama. Za svaku kultiviranu vrstu određuju se karakteristične lokacije za izvođenje pokusa. Oplemenjivač sam odabire postupak i tijek ispitivanja u kojem će dobiti optimalne pokazatelje. U jednom pokusu treba biti onoliko genotipova koliko je to tehnički moguće provesti.

Uvjeti u kojima se izvode poljski pokusi nisu nikad savršeni; u pokusnim podacima uvijek su prisutne stanovite pogreške. Te pogreške su posljedica razlika u okolinama u kojima se genotipovi uzgajaju i nepreciznosti u provođenju pokusa. Brižljivim odabirom mjesta i preciznim provođenjem pokusa oplemenjivač ima mogućnosti smanjiti eksperimentalnu pogrešku.

Najčešći izvor pogreške je varijabilnost tla. Čak i između bliskih mikrolokacija tlo varira u produktivnosti ili drugim karakteristikama. Eksperimentalna se pogreška uzgojem genotipova u više ponavljanja smanjuje, odnosno rezultati se pokusa ujednačavaju. Naime, prinos s jedne parcelice nije pravo mjerilo vrijednosti kultivara, jer je podložan nekoj grešci, pa tek prinos s više parcelica pokazuje prosječnu vrijednost tog genotipa.

Broj ponavljanja u poljskom pokusu varira od tri do pet, ovisno o broju članova u pokusu, planu pokusa, željenoj preciznosti rezultata i ostalim tehničkim mogućnostima. Ponavljanjem se povećava točnost pokusa, preciznost u identifikaciji boljih genotipova, te osigurava prosjek za statističke analize pokusa i procjenu veličine eksperimentalne pogreške. Broj biljaka u jednom ponavljanju ovisi o vrsti koja se ispituje i metodici izvođenja pokusa.

Da bi se smanjila eksperimentalna pogreška pokusa pokusna parcelica mora biti reprezentativne veličine, treba biti dobra ujednačenost sklopa, a svi članovi pokusa moraju biti jednako tretirani i imati što sličnije mogućnosti za optimalnu realizaciju svojih genetičkih potencijala. Ponekad se u pokusu odstranjuju rubne biljke i to onda kad su preostale biljke dovoljno razvijene, tako da im uklanjanje rubnih biljaka neće donijeti prednost u razvoju.

Usporedni rezultati genotipova razlikuju se kad se pokusi izvode na jednoj lokaciji u različitim godinama kao i kad se izvode na različitim lokacijama u istoj ili različitim godinama. Izvođenje pokusa u različitim godinama i lokacijama služi za određivanje interakcija genotip x lokacija, genotip x godina i genotip x lokacija x godina. U takvim pokusima određuje se također stabilnost svojstava kultivara u različitim okolinama.

Sortni poljski pokusi izvode se po određenoj metodici, unaprijed pripremljenoj i pogodnoj za ispitivanje kultivara i lokacije. Analizu pokusnih podataka određuje plan ili shema pokusa (Vasilj, 2000.). Plan pokusa pravi se prema kulturi, broju genotipova koji se ispituju i planiranoj preciznosti vođenja eksperimentalnih podataka. Postoji više modela izvođenja usporednih pokusa, primjerice blokni raspored, latinski kvadrat, pojasni pokus, mrežni pokus. Danas se najčešće u pokusima prakticira slučajni blokni raspored, koji može biti potpun i nepotpun.

U svakom pokusu nalazi se jedan ili dva standardna kultivara s kojima se novi genotipovi uspoređuju. Standardni ili kontrolni kultivari obično su najbolji kultivari koji su rašireni u praksi, ispitani su za sva važnija svojstva i poznato je njihovo reagiranje na uvjete okoline u kojima se pokus provodi. Oplemenjivači u sortnim pokusima najčešće koriste standarde koji se primjenjuju u državnim sortnim pokusima za priznavanje novih kultivara. Takve standarde za svaku kultiviranu vrstu određuje posebna državna komisija. No oplemenjivači mogu u pokus uvrstiti i druge kultivare i linije za usporedbu pojedinih svojstava.

Osobine kultivara u pokusu ocjenjuju se prema određenim normama. Svojstva koja su na bilo koji način mjerljiva, ocjenjuju se obično po metodici UPOVa po vrijednosnoj ljestvici od 1 – 9. Kao primjer poslužiti će nam dužina lista (tablica 20). Kvalitativna svojstva obično se ocjenjuju opisno i usporedbom s odgovarajućim standardom. U cvijeću, primjerice, te nekim povrtlarskim i voćarskim vrstama, bitno svojstvo ponekad je boja što se ocjenjuje pomoću histograma. Metode testiranja razvijaju se zajedno s unapređenjem oplemenjivanja. Posebno su važne nove tehnike ispitivanja genetičkih informacija vezane za razvoj transgenskih kultivara.

Tablica 20. Procjena svojstava po metodici UPOVa

Vrijednost na ljestvici	Opis
1	Veoma kratak
2	Veoma kratak do kratak
3	Kratak
4	Kratak do umjereno dug
5	Umjereno dug
6	Umjereno dug do dug
7	Dug
8	Dug do veoma dug
9	Veoma dug

Statistička obrada podataka prikupljenih u pokusu provodi se uglavnom primjenom analize varijance (ANOVA – Analysis of variance). To je jednostavan matematički postupak kojim se mjere relativne vrijednosti dvije ili više grupa činitelja koji uvjetuju variranja u pokusu. Da bi se rezultati pokusa obradili što točnije, prikupljanje eksperimentalnih podataka u tijeku izvođenja pokusa mora zadovoljiti tri osnovna zahtjeva: cjelovitost, točnost i jednostavnost. Oplemenjivač uzima sve one podatke koji su mu nužni za precizno vrednovanje jednog genotipa, od morfoloških, fenoloških, fitopatoloških, agronomskih do preciznih kemijskih analiza. Svi podaci moraju se uzimati na vrijeme i precizno bilježiti. Temeljem tih podataka i analize varijance utvrđuju se linije koje su pouzdano bolje od standarda.

Priznavanje i zaštita biljnih kultivara

Nakon obrade svih rezultata pokusa i usporedbe sa standardom, linije ocijenjene bolje od standarda ulaze u postupak za priznavanje. Ni jedna sorta, bilo domaća ili strana, ne uvodi se u komercijalnu proizvodnju ako nije upisana u listu sorata jedne države. Da bi nova linija bila priznata kao kultivar, oplemenjivač ili oplemenjivačka institucija podnose zahtjev Državnoj sortnoj komisiji koja vodi postupak priznavanja. Komisija organizira mrežu sortnih pokusa na točno određenim lokacijama dvije do tri godine, a pokusi i obrada rezultata provode se na već opisani način.

Tijekom postupka priznavanja provode se dva posebna testa. Prvi je ispitivanje prepoznatljivosti, ujednačenosti i stabilnosti novog kultivara, tzv. DUS (Distinctness, Uniformity, Stability) ispitivanja. Analiza svojstava provodi se prema pravilnicima na razini države ili vodičima UPOVa za pojedine vrste. Takvi vodiči napravljeni su za gotovo sve kultivirane vrste. Njima su propisani tehnički detalji od podrijetla ispitivanog materijala do načina izražavanja svojstava i obračuna rezultata. Drugi test je ispitivanje vrijednosti novog kultivara u uzgoju i uporabi ili VCU (Value for Cultivation and Use). Tim testom utvrđuje se stvarna vrijednost novog materijala za komercijalnu proizvodnju u usporedbi s postojećim kultivarima.

Na temelju rezultata svih navedenih ispitivanja Sortna komisija utvrđuje koje su linije bolje od standarda i koje će biti priznate kao novi kultivari. Kultivari koje sortna komisija prizna kao nove, upisuju se u sortnu listu, a autor kultivara stječe oplemenjivačka prava na novi kultivar.

U razvoju novih kultivara sve je veća konkurencija a postupak oplemenjivanja sve skuplji. Razvoj jedne sorte soje ili kukuruza u SAD iziskuje 6 – 8 godina rada uz cijenu od 0,5 do 7 milijuna dolara i ocjenu do 10^5 potomaka. Obično samo troškovi osoblja i materijalnih sredstava iznose nekoliko milijuna dolara (Lee, 1998.). Sredstva uložena u razvoj kultivara moguće je vratiti prodajom sjemena. Da bi se to ostvarilo isključiva prava na prodaju mora imati vlasnik kultivara. Stoga oplemenjivači odnosno vlasnici kultivara, nastoje zaštitom autorskih prava spriječiti neovlašteno širenje sortnog reproduksijskog materijala.

Zaštita autorstva postiže se stjecanjem oplemenjivačkih prava ili patentiranjem. U većini zemalja u svijetu autorska prava vlasnika kultivara zaštićena su Međunarodnom konvencijom o zaštiti oplemenjivačkih prava, jedino se u SAD biljni kultivari patentiraju kao i drugi tehnički izumi. Svaka država, sukladno Međunarodnoj konvenciji, donosi vlastiti zakon o zaštiti novih biljnih kultivara. Zakonom se jamči da samo vlasnik ili njegov opunomoćenik ima pravo proizvoditi, trgovati ili uvoziti sjeme ili drugi reproduksijski materijal određenog kultivara.

Zaštita oplemenjivačkih prava traje 20 godina od dana priznavanja novog kultivara. Za voćne vrste i vinovu lozu taj period je 25 godina. Iznimka je nekomercijalno korištenje sortnog materijala u oplemenjivačkim programima u razvoju drugih kultivara ili za druga znanstvena istraživanja. Za te svrhe sjeme se može koristiti bez naknade. Postoje i tzv. farmerske povlastice, koje dopuštaju farmerima da proizvode sjeme za vlastite potrebe za sjetvu na farmi, ali ne i za prodaju.

Literatura

Borojević, S. 1981. Principi i metodi oplemenjivanja bilja. Ćirpanov, Novi Sad.

Graham, G.C., Henry, R.J., Redden, R.J. 1994. Identification of navy bean varieties using random amplification of polymorphic DNA. Australian J. Exp. Agriculture 34:1173-1176.

Lee, M. 1998. Genome projects and gene pools: New germplasm for plant breeding? National Acad. of Sci. USA 95(5):2001-2004.

Scott, K.D., Ablett, E.M., Lee, L.S., Henry, R.J. 2000. AFLP markers distinguish an early mutant of Flame Seedless grape. Euphytica 113:245-249.

UPOV 1991. International Convention for the production of new varieties of plants. Rome.

UPOV 2002. General introduction to the examination of distinctness, uniformity and stability and development of harmonized descriptors of new varieties of plants. Rome.

Vasilj, Đ. 2000. Biometrika. HAD Zagreb.

10. Biljni genetski izvori

Osnovna obilježja biljnih genetičkih izvora

Sav genetički materijal jedne vrste ili populacije unutar nje naziva se jednim imenom biljni genetički izvori. Sinonim je biljna **germplazma**, premda pojam germplazma ima dva značenja: genetičko i oplemenjivačko. U genetičkom smislu germplazma predstavlja živu supstancu stanične jezgre koja određuje nasljedna svojstva organizma i koja ova svojstva prenosi u sljedeću generaciju. Biljna germplazma u oplemenjivačkom smislu obuhvaća ukupni izvorni genetički materijal koji se koristi za razvoj novih kultivara. Dalji razvoj oplemenjivanja nezamisliv je bez odgovarajuće germplazme. Biljna germplazma je općenito jedno od najvažnijih obnovljivih prirodnih bogatstava.

Brojni potencijalno korisni geni i genske kombinacije koje postoje u kultiviranim i divljim biljnim vrstama, temeljni su izvor za razvoj produktivnijih i stabilnijih kultivara, novih proizvoda i poboljšanih sustava gospodarenja. Kako se oplemenjivački ciljevi mijenjaju, kao odgovor na promjene u poljoprivrednoj tehnologiji, pojavi novih patogena ili tržišnim zahtjevima, i oplemenjivači moraju stalno imati na raspolaganju dovoljan obujam genetičke raznolikosti i biljne germplazme iz koje će praviti nove kombinacije gena i nove kultivare.

Prisutnost širokog opsega germplazme olakšava razvoj kultivara koji povećavaju obujam proizvodnje. Povijesni primjer za to je šećerna repa razvijena od stočne repe nakon povećanja sadržaja šećera u korijenu, ili pak soja koja je također selekcionirana iz krmne biljke. Otkriće samo jednog agronomski vrijednog gena u nekoj glavnoj kultiviranoj vrsti može biti od neprocjenjive vrijednosti. Takav je slučaj s otkrićem divljeg kukuruza *Zea diploperennis*. Geni koje on nosi iskorišteni su u oplemenjivanju kultiviranog kukuruza što je u velikoj mjeri povećalo komercijalnu vrijednost kukuruza (Small i Cayouette, 1992.).

Biljni genetički izvori tijekom evolucije razvijali su se veoma dugo. Kao rezultat selekcije, mutacija, prilagođavanja i drugih evolucijskih procesa, u prirodi je nastalo mnoštvo pojavnih oblika, ne samo u različitim vrstama, već i unutar iste vrste. To se označava kao **genetička raznolikost (varijabilnost)**. Prema tome, genetička raznolikost je nasljedno variranje na razini individue ili populacije koje je stvoreno i održava se evolucijom i selekcijom. Ukupna varijabilnost živih formi naziva se jednim imenom **bioraznolikost**. Bioraznolikost postoji na razini ekosustava, vrste ili genoma. Posebna kategorija bioraznolikosti je **agrobioraznolikost** kao ukupnost komponenata i funkcija biljnih genetičkih izvora u agro-ekosustavima bitnim za poljoprivrednu proizvodnju.

Obujam variranja u jednoj vrsti može biti veoma velik. Kao ilustraciju za mnoštvo formi u prirodi navest ćemo istraživanje divlje zobi (*Avena fatua*) u Kaliforniji. Uzorci te samooplodne vrste skupljeni na rastojanju od samo nekoliko metara bili su međusobno veoma raznoliki. Jedan genotip nađen na kosini razlikovao se za 15 dana u vremenu klasanja od drugog genotipa na ravnoj površini iznad te kosine. Razlike su također nađene u drugim morfološkim i fiziološkim svojstvima (Poehlman i Sleper, 1996.).

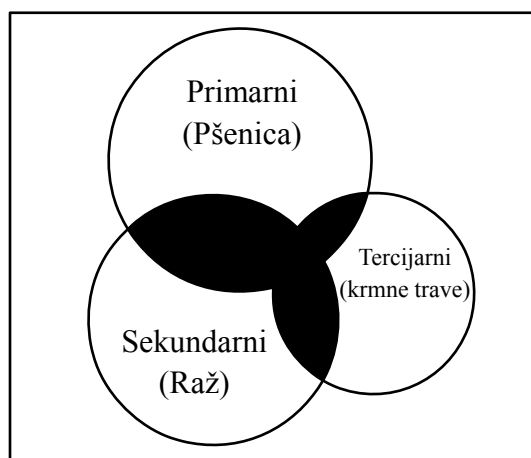
Genetičke izvore kultiviranih biljnih vrsta Frankel (1977.) i Komisija za biljne genetičke izvore FAO (FAO, 1983.) svrstali su u više kategorija. Među njima su:

- ✧ moderni kultivari u tekućoj uporabi
- ✧ zastarjeli kultivari, često nekadašnji elitni kultivari, od kojih se mnogi nalaze u pedigreu modernih kultivara
- ✧ lokalne sorte i populacije

- ✧ oplemenjivačke linije
- ✧ divlji srodnici kultiviranih vrsta
- ✧ genetičke i citogenetičke rezerve

Prema proširenom konceptu genskog fonda svi genetički izvori, s obzirom na srodnost i mogućnost međusobne oplodnje dijele se u primarni, sekundarni i tercijarni genski fond (slika 24) i izolirane gene (Harlan i de Wet, 1971.; Becker, 1993.). **Primarni genski skup (fond)** obuhvaća genetički materijal u okviru iste vrste, te blisko srodne vrste s kojima je moguća oplodnja bez poteškoća; potomstvo je potpuno fertilno.

Sekundarni genski skup uključuje udaljenije vrste. Križanje oprašivanjem provodi se teže pa se ponekad da bi se ostvarilo potomstvo, primjenjuju metode kulture embrija. Pri oplodnji je sparivanje kromosoma nepotpuno, a u potomstvu se pojavljuje djelomična sterilnost.



Slika 24. Koncept tri genska skupa

Tercijarni genski fond predstavlja genetički udaljene i spolno neznatno podudarne vrste. Križanja su općenito neuspješna, a izražena je sterilnost F_1 potomstva. Stvaranje potomstva je veoma teško i to samo uz primjenu posebnih postupaka kulture tkiva ili genetičkog inženjerstva.

U novije vrijeme, s razvojem tehnika genetičkog inženjerstva, neki su znanstvenici uveli termin **četvrti genski skup** koji predstavlja izolirane gene. Ti geni mogu potjecati od srodnih ili nesrodnih biljnih vrsta, od životinja ili mikroorganizama a iz jednog organizma u drugi prenose se metodama genetičke transformacije.

Pripadnost genskom fondu određena je genetičkim srodstvom, odnosno genetičkom udaljenošću. Ti kriteriji koriste se kao putokaz za odabir roditelja u oplemenjivačkim programima. Što je veća razlika između roditelja, veće je variranje u potomstvu. Kao mjera razlika potencijalnih roditeljskih linija koristi se **indeks raznolikosti**. To je vjerojatnost da se dvije linije slučajno uzorkovane u danoj skupini razlikuju na nekom lokusu (Nei, 1973.).

Gubitak biljnih genetičkih izvora

Nasuprot velikoj raznolikosti koja postoji u prirodi, intenzivna poljoprivreda i oplemenjivanje bilja često smanjuju genetičku varijabilnost. Gotovo svugdje u tehnološki naprednoj poljoprivredi nekoliko veoma dobrih kultivara obično pokriva široko uzgojno područje. Ti dobri kultivari najčešće su i sami genetički bliski. Programi razvoja novih kultivara kultiviranog bilja koncipirani su tako da se korisna svojstva iz širokog niza genetički

raznolikih ali relativno neproduktivnih izvora koncentriraju u nekoliko visoko produktivnih i genetički ujednačenih linija. Ovakva praksa često ima za rezultat korištenje samo nekoliko izvora kao roditelja; to ima za posljedicu suženu genetičku osnovu potomstva.

Takvo je stanje u gotovo svim važnim poljoprivrednim kultiviranim vrstama. Većina oplemenjenih kultivara ječma potječe od samo nekoliko križanja ili blisko srodnih serija križanja. Sorta Triumph roditelj je najraširenijih dvorednih sorti pivarskog ječma u Europi. U Kanadi i SAD sorta dvorednog ječma Klages ima isti utjecaj (Gilmour i sur., 1995.). Dvije trećine kultivara jabuke priznatih zadnjih 30 godina potječu od samo pet roditelja što očito govori kako oplemenjivači rade s veoma uskom genetičkom bazom. Slično je i u drugim važnijim kultiviranim vrstama, jer su zahtjevi poljoprivrede i prehrambene industrije za visokim prinosima, ujednačenošću proizvoda i dobrom kvalitetom proizvoda, ograničili uporabu raznolike germplazme.

Stanje u kojem je kultura zbog genetičke ujednačenosti nesposobna da se prilagodi biotičkim i abiotičkim promjenama i mogućim rizicima, naziva se **genetička ranjivost**. Genetička ranjivost kultiviranih vrsta glavni je uzrok velikih gubitaka u poljoprivredi koje bi inače bilo moguće izbjeći. Plamenjača krumpira (*Phytophthora infestans*) sredinom 40-ih godina 19. stoljeća uništila je nasade krumpira, tada glavnog izvora hrane u Irskoj. Gotovo sve površine bile su zasađene sortom Lumper. To je prouzročilo veliku glad i iseljavanje milijuna ljudi iz Irske. Populacija Irske za nekoliko godina smanjena je za polovinu. Četrdesetih godina prošlog stoljeća pjegavost lista zobi (*Helminthosporium victoriae*) zarazila je 97% površina zasijanih ovom kulturom u Iowi kao i veliki postotak u drugim državama SAD. Napadnute biljke nosile su isti plejotropni gen za osjetljivost na tu bolest.

Poznat je slučaj epidemije sive pjegavosti lista kukuruza (*Helminthosporium maydis*) 1970. koja je smanjila prinos kukuruza u SAD za 15%. Procijenjena šteta iznosila je milijardu dolara. Napadnute biljke, kao rezultat uvođenja citoplazmatske muške sterilnosti u majčinske inbred linije kukuruza, imale su jedan zajednički gen. Sterilnost je bila poznata kao teksaški tip ili *cms-T*. Taj gen bio je povezan s osjetljivošću na *Helminthosporium*. Čim su se stvorili povoljni uvjeti za patogena, nastala je epidemija. Kukuruz, zob i krumpir kulture su koje se razlikuju po biološkim svojstvima, tehnologiji proizvodnje i patogenima koji ih napadaju no na isti su način zbog genetičke ranjivosti podlegle.

Proces modernizacije poljoprivrede i zamjena lokalnih sorti visoko produktivnim modernim kultivarima rezultirali su velikim gubicima jedinstvenih genetičkih materijala. Gubitak genetičke raznolikosti i nestajanje genetičkih izvora iz njihovih prirodnih staništa, proizvodnih polja ili genskih banaka označava se kao **genetička erozija**. Genetička erozija podrazumijeva trajni gubitak bilo koje kategorije biljnih genetičkih izvora, ali isto tako i gubitak pojedinačnih gena ili genskih kombinacija. Visok obujam genetičke erozije može ugroziti čak i ljudsku civilizaciju, na više načina ovisnu o biološkoj raznolikosti (Ehrlich i Wilson, 1992.).

Posebno su ugrožene lokalne sorte i populacije koje su u odnosu na moderne kultivare nisko produktivne, ali imaju neke veoma korisne gene, nastale dugotrajnim prilagođavanjem lokalnim uvjetima. Bila su potrebna stoljeća i tisućljeća da se u nekom staništu stvori odgovarajuća razina raznolikosti. Dovoljno je samo kratko vrijeme nemara ili nepovoljnih utjecaja okoline da se ta raznolikost izgubi zauvijek. Jedna nedavna analiza iz SAD pokazala je da je od 7.098 sorti jabuka za koje je utvrđeno da su uzgajane između 1804. i 1904. približno njih 86% izgubljeno. Isto tako 95% lokalnih sorti kupusa, 91% kukuruza, 94% graška i 81% rajčice iz tog perioda više ne postoji.

Skupljanje i održavanje biljnih genetičkih izvora

Čuvanje i održavanje biljnih genetičkih izvora nužno je za razvoj nove i obnavljanje nedostajuće genetičke baze. Time se, uz to, spašavaju trenutno nepoznati geni koji nam mogu pomoći u nekom budućem oplemenjivačkom programu. To je posebno važno u svladavanju kritičnih situacija kao što je pojava bolesti ili promjena zahtjeva u tehnologiji ili na tržištu. Razvoj modernih formi kultiviranih vrsta ne bi bio moguć bez ranijih lokalnih sorti i populacija. Stoga je očuvanje takvih genetičkih izvora bitno za budućnost oplemenjivanja.

Čuvanje i održavanje biljnih genetičkih izvora nije nova praksa. Od samih početaka poljoprivredne proizvodnje farmeri su čuvali i održavali sjeme i klonove najboljih individua, prenosili ih u slijedeću godinu ili ih razmjenjivali. Ono što jest novo je sustavno prikupljanje i čuvanje raznolikih biljnih formi, uključujući čuvanje divljih srodnika kultiviranih vrsta, što je počelo nakon Vavilova.

Prva faza čuvanja i održavanja biljnog genetičkog materijala je njegovo skupljanje. Iz velikog mnoštva biljnih formi koje postoje u prirodi, treba kao potencijalni oplemenjivački materijal skupljati različite genotipove kultiviranog, divljeg ili korovskog bilja. Taj materijal najčešće se traži u područjima u kojima postoji visoka razina genetičke raznolikosti, zatim u područjima u kojima su prirodni uvjeti pogodovali nastanku specifičnih genotipova.

Prikupljanje germplazme veoma je odgovoran i zahtjevan posao. Uspješnom planiranju tog posla doprinosi poznavanje staništa i terena, vremenskih uvjeta, fenologije biljke i reproduktivnog sustava ciljne vrste. Nije moguće u jednoj heterogenoj populaciji uzorkovati i skladištiti sve biljke ili sve moguće genotipove. Osnovni je cilj u prikupljanju genetičkih izvora dobiti što veću razinu genetičke raznolikosti u uzorku s kojim se normalno može manipulirati.

Veličina uzoraka koji se skupljaju ovisi o prirodi materijala (sjeme ili vegetativni dijelovi), veličini populacije i obujmu unutarpopulacijske raznolikosti. Zbog velikog variranja znatno je teže napraviti dobar uzorak u stranooplodnim nego u samooplodnim populacijama. Dobar se uzorak definira na dva načina: 1. uzorak u kojem frekvencije gena odražavaju one iz izvorne populacije, i 2. tip uzorka koji sadrži najveću raznolikost u najmanjem uzorku (Holden i sur., 1993.). Za oplemenjivačke svrhe prednost ima zadnji tip uzorka.

Germplazma se čuva i održava u različitim kolekcijama u znanstvenim ili drugim institucijama, ili u tzv. **bankama biljnih gena**, gdje se katalogizira sa svim potrebnim podacima (tablica 36). Ako nema dovoljno podataka onda se svojstva pojedinih genotipova ispituju u poljskim pokusima, da bi se utvrdilo njihovo reagiranje na lokalne uvjete. Optimalna strategija za čuvanje genetičkih izvora ovisi o prirodi organa koji se skladišti (sjeme, gomolji), reproduktivnoj biologiji vrste, obujmu geografskog širenja raznolikosti, te financijskim mogućnostima i ljudskim potencijalima.

Biljna germplazma održava se *in situ* i *ex situ*. *In situ* je održavanje i čuvanje biljnih zajednica u njihovom prirodnom staništu, u divljini ili komercijalnom uzgoju. Ovakav način održavanja genetičkih izvora smatra se dinamičnom formom konzerviranja, jer omogućuje stalnu evoluciju unutar prirodnog staništa. *In situ* se uglavnom održavaju lokalne sorte uzgojene u izvornim ekološkim lokalitetima u tradicionalnim ekosustavima, a divlje vrste u njihovim biljnim zajednicama. Takvo održavanje osigurava široku genetičku bazu, stabilnost obujma populacije i mogućnost za povećano prilagođavanje.

Osnovni je nedostatak održavanja *in situ* što su ocjena i opisivanje takvih materijala nešto teži, budući da su biljke osjetljivije na različite biotičke i abiotičke činitelje. Održavanje

in situ, pored toga, iziskuje više brige i veće stručno znanje, pa se na ovaj način održava manji broj kultura.

Ex situ predstavlja postupak održavanja biljnih genetičkih izvora izvan njihova prirodnog staništa u obliku sjemena, biljaka i biljnih dijelova. Provodi se u klimatiziranim skladištima u bankama gena za sjemenske vrste, poljskim rasadnicima za vegetativno razmnožavane biljke (klonove), kulturi tkiva ili zamrzavanjem u tekućem dušiku.

Najraširenija metoda održavanja germplazme *ex situ* je skladištenje sjemena u manje ili više klimatiziranim prostorima u odgovarajućoj ambalaži. Sjeme je najpogodniji materijal za čuvanje budući je dormantno, relativno sitno i tvrdo. S obzirom na svojstva i mogućnosti čuvanja postoje dvije kategorije sjemena: tipično (ortodoksno) i netipično (neortodoksno). **Tipično** se sjeme normalno suši i skladišti na niskim temperaturama. Ako sjeme sadrži visok postotak škroba, suši se brže do oko 5% vlage. Tipično se sjeme čuva u klimatiziranim prostorima do 50 godina. Sjeme koje ima visok sadržaj ulja ili proteina, kao što su uljarice, iziskuje sporije sušenje i skladištenje iznad temperature smrzavanja. Ovakvo sjeme čuva se maksimalno do 20 godina.

Netipično sjeme, međutim, ne podnosi isušivanje i ne skladišti se na temperaturama od 0°C ili nižim. Takve su neke vrste krupnog sjemena, biljke koje rastu na vodi kao i većina tropskih voćnih vrsta.

Održavanje sjemenskih genetičkih materijala prema dužini čuvanja može biti:

- ✧ dugoročno, ako se sjeme čuva na temperaturi od -20° do -10°C uz nisku relativnu vlagu u hermetički zatvorenim posudama; na ovaj način čuvaju se osnovne kolekcije.
- ✧ srednjoročno, čuvanje sjemena na temperaturi od oko 0°C uz nisku relativnu vlagu; ovako se obično održavaju aktivne kolekcije.
- ✧ kratkoročno skladištenje je čuvanje sjemena na temperaturama iznad 5°C s relativnom vlagom ispod 60%, a ovakav postupak uglavnom se koristi za održavanje radnih kolekcija.

Uzorci germplazme održavaju se kao osnovne, aktivne ili radne kolekcije.

Osnovna kolekcija je skup uzoraka maksimalne genetičke raznolikosti jedne vrste. Može biti na državnoj ili međunarodnoj razini. Obuhvaća najčešće cjelokupni genski fond određene vrste. Ovakve kolekcije su stalne i obično se održavaju u uvjetima dugotrajnog skladištenja. Osnovne kolekcije koriste se za razmjenu i uporabu biljnog materijala; međutim, potrebno ih je periodično obnavljati. Održavaju se u jednom institutu ili razdijele u nekoliko manjih kolekcija i čuvaju u drugim institucijama kao sigurnosne, odnosno rezervne kolekcije.

Poseban oblik osnovne kolekcije je **sržna kolekcija** kao reprezentativna podgrupa. U nju se obično izdvoji 10% uzoraka koji predstavljaju maksimalnu raznolikost unutar najmanjeg mogućeg broja uzoraka osnovne kolekcije. Sržna kolekcija pospješuje uporabu biljnog materijala jer olakšava provedbu različitih istraživanja, npr. traženje izvora otpornosti ili nekog drugog svojstva. Sržne kolekcije ocjenjuju se za više svojstava i u različitim uvjetima okoline tako da se sastavlja značajan skup podataka. To cijelu kolekciju čini još upotrebljivijom.

Aktivna kolekcija je zbirka uzoraka koji su odmah dostupni za umnožavanje, distribuciju i uporabu. Ova kolekcija može sadržavati sve uzorke ili podskupinu osnovne kolekcije. Održava se u uvjetima srednjoročnog ili kratkoročnog skladištenja. Uzorci aktivne kolekcije brže se upotrebljavaju.

U određenim slučajevima skuplja se kolekcija germplazme za posebne namjene kao npr. kolekcija genotipova za trenutnu uporabu u oplemenjivanju. Takve kolekcije nazivaju se **radne kolekcije**. Ovakve kolekcije obično se sastoje od često korištenih i regeneriranih selekcijskih rezervi, oplemenjivačkih linija i modernih kultivara; čuvaju se u uvjetima kratkotrajnog skladištenja.

Tablica 21. Kolekcija uzoraka nekih važnijih vrsta u genskim kolekcijama u svijetu (Chang, 1992.)

Vrsta	Ukupan broj uzoraka	Različiti uzorci	Divlji uzorci	% neskupljenih kultivara
Pšenica	410.000	125.000	10.000	10
Zrnate leguminoze i uljarice	260.000	132.000	5.000	30 - 50
Riža	250.000	120.000	5.000	10
Kukuruz	100.000	50.000	1.500	5
Soja	100.000	30.000	7.500	30
Krumpir	42.000	30.000	15.000	10 - 20

Dugotrajnost sjemena ovisi o njegovoj početnoj vijabilnosti, prisutnosti ili odsutnosti patogena, te mogućim mehaničkim ili fiziološkim oštećenjima. Najvažniji činitelji su sadržaj vlage i temperatura skladištenja. U kolekcijama se povremeno ispituje klijavost sjemena i ako klijavost padne ispod određene razine, sjeme treba obnoviti. Kako se ne bi poremetio genetički integritet održavanog uzorka obnavljanje se mora izvesti pažljivo. Za mnoge stranooplodne vrste mora se provesti umjetna oplodnja i izolacija.

Vegetativno razmnožavane vrste održavaju se kao klonovi u poljskom rasadniku; u tom slučaju predstavljaju «poljske banke» biljnih gena. Gomolji krumpira skladište se i čuvaju pri umjereno visokim temperaturama u tamnoj prostoriji, ali samo do jedne godine i stalno ih treba obnavljati u polju. Klonski materijali traže češće obnavljanje i veće troškove održavanja nego sjemenske kulture. Također su ranjivije na biotičke i abiotičke rizike. Prednost je ovih vrsta što se njihov genetički identitet tijekom održavanja rijetko mijenja. Pojedine sjemenske kultivirane vrste također se održavaju u polju ako sjeme zbog određenih razloga nije moguće skladištiti. To su vrste čije je sjeme osjetljivo na sušenje i hladnoću. Kao dopuna poljskim bankama za održavanje genetičkih izvora nekih vrsta koristi se tehnika *in vitro*.

Genetičke izvore moguće je održavati u smrznutom stanju. To je tzv. krioprezervacija tj. metoda održavanja kulture stanica ili tkiva u tekućem dušiku na veoma niskim temperaturama (-150°C do - 196°C) za duži period. Nakon odmrzavanja moguća je regeneracija funkcionalnih biljaka. Ovaj način čuvanja germplazme posebno je pogodan za kulture koje se vegetativno razmnožavaju i koje treba održavati kao žive biljke. Kombiniranje kulture meristema sa čuvanjem u smrznutom stanju omogućuje dugotrajno skladištenje germplazme bez patogena. Kultura meristema olakšava međunarodnu razmjenu takve germplazme. S razvojem molekularne biologije i tehnologije skladištenja, vjerojatno će u budućnosti biti moguće u posebnim bankama čuvanje izolirane DNK kao biljnog genetičkog izvora.

Svaki uzorak koji se nalazi na čuvanju, bez obzira na metodu održavanja, prati odgovarajuća dokumentacija sa svim bitnim podacima koji pomažu u identifikaciji genetičkog izvora. Da bi se olakšala i ujednačila karakterizacija informacija nužnih za identifikaciju genetičkih izvora, IPGRI je za mnoge kultivirane vrste objavio listu tehničkih vodiča (descriptor). Uz podatke o vrsti i podrijetlu germplazme u vodiču su upiti o morfološkim

svojstvima, posebno onim koja su visoko nasljedna i ne mijenjaju se u različitim uvjetima okoline, zatim podaci o fenologiji, otpornosti na bolesti i drugim bitnim obilježjima te vrste. Takvi podaci služe za identifikaciju biljnih genetičkih izvora, a od velike su pomoći također u oplemenjivačkim programima.

Literatura

- +Becker, H. 1993. Pflanzenzuechtung. Stuttgart, Verlag Eugen Uhner.
- +Chang, T.T. 1992. Availability of plant genetic resources for use in crop improvement. U: Plant breeding in the 1990s, str. 17-35, ur. Stolker, H.T. i Murphy, J.P., C.A.B. International, Oxon.
- +Ehrlich, P.R., Wilson, E.O. 1992. Biodiversity studies: science and policy. Science 253:758-763.
- +FAO 1983. Commission on plant genetic resources. Resolution 8/83 of the 22nd Session of the FAO Conference, Rome.
- +Frankel, O.H. 1977. Natural variation and its conservation. U: Genetic Diversity of Plants. ur. Muhammed, A., von Botstel, R.C. New York, Plenum Press str. 21-24.
- +Gilmour, P., Broughton, S., Boyd, W.J.R. 1995. Barley breeding. 97-109, u Howes, M. (ur.) The barley book. Bull. 4300. Department of Agriculture, Perth, Australia.
- +Harlan, J.R., de Wet, J.M.J. 1971. Toward a rational classification of cultivated plants. Taxon 20:509-517.
- Haussman, B.I.G., Parzies, H.K., Presterl, T., Sušić, Z., Miedaner, T. 2004. Plant genetic resources in crop improvement. Plant Gen. Resources 2(1):3-21.
- +Holden, J., Peacock, J., Williams, T. 1993. Genes, Crops and Environment. New York: Cambridge University Press.
- +Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70:3321-3323.
- +Poehlman, J.M., Sleper, D.A. 1996. Breeding field crops. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.

11. Biotehnologija u oplemenjivanju bilja

Konvencija o biološkoj raznolikosti definira biotehnologiju kao «svaku tehnološku primjenu koja koristi biološke sustave, žive organizme ili njihove derivate za proizvodnju ili modificiranje proizvoda ili procesa za posebnu upotrebu» (FAO, 1993). U širem smislu ova definicija obuhvaća mnoga sredstva i tehnike koje se koriste u poljoprivredi i proizvodnji hrane, a u užem smislu odnosi se na manipuliranje genetičkim materijalom na razini DNK.

Biljna biotehnologija podrazumijeva manipuliranje biljnim materijalom što može biti na razini tkiva, stanice, genoma ili samog gena. Velika postignuća u kulturi biljnog tkiva, molekularnoj biologiji i genskoj transformaciji, omogućila su oplemenjivačima mnogo širi prostor rada, jer se teorijski sve biljne vrste mogu koristiti kao potencijalni donori određenih svojstava, budući da je sada s pojedinim svojstvima moguće manipulirati kao s molekulama.

Premda postoji više različitih biotehnoloških postupaka koji se uspješno primjenjuju u znanstvenim istraživanjima u poljoprivredi, dva su ključna područja biotehnologije koja služe kao sredstvo u razvoju novih biljnih formi ili na neki drugi način pomažu u oplemenjivačkim programima. To su kultura biljnih stanica ili biljnog tkiva i tehnika rekombinantne DNK.

Kultura biljnog tkiva

Kultura tkiva i biljnih stanica, poznata i kao kultura *in vitro* ili mikrokultura, postupak je razvoja nove biljke iz jedne stanice ili skupine stanica. Razvoj nove biljke iz jedne stanice temelji se na totipotentnosti biljne stanice. U svakoj stanici postoje genetičke informacije za razvoj cjelokupnog organizma i svih njegovih dijelova. Što će se točno razviti ovisi o informaciji i vanjskim poticajima. Teorijski sve su žive stanice totipotentne, ali uspješnost regeneracije ovisi o tkivu, genotipu i biljnoj vrsti. Što su stanice mlađe i manje diferencirane, lakše ih je kultivirati u potpunu biljku.

Regeneracija biljaka u kulturi tkiva općenito se provodi iz eksplantata, odnosno tkiva ili biljnih organa koji su izdvojeni s biljke i upotrijebljeni za kultiviranje. Eksplantati potječu od dijelova lista, korijena, stabljike, kotiledona, mogu biti embriji ili gamete. Eksplantati se kultiviraju na hranidbenom mediju koji može biti u tekućem ili polutekućem stanju; najčešće je ukrućen na agaru. Medij je najvažniji dio kulture biljnog tkiva jer o njemu ovisi uspjeh regeneracije. On sadrži sve organske i neorganske tvari potrebne za rast i razvoj biljke, a dodaju im se također vitamini i hormoni rasta. Vrsta i sastav medija ovisi o biljnoj vrsti i biljnom materijalu odabranom za kultiviranje. Najviše se upotrebljava medij koji su još 1962. razvili Murashigi i Skog. U tehnici izvođenja kulture tkiva ovaj se medij često označava kao MS.

Iz eksplantata se na mediju u roku 4 – 8 tjedana razvije nediferencirana masa stanica poznata kao kalus. Kalus se obično podijeli na više dijelova, te prenese na svježiji medij gdje se kao rezultat organogeneze razviju mlade biljčice. Te biljčice se presađuju u tlo, najprije u laboratoriju a potom na otvorenom polju.

Kultura biljnog tkiva prema tome predstavlja tehnologiju regeneracije funkcionalnih biljaka iz fragmenata biljnog tkiva ili pojedinačnih stanica kao što su protoplasti, mikrospore ili embriji. U biljnim oplemenjivačkim programima tehnika kulture biljnog tkiva *in vitro* koristi se u mikrorazmnožavanju odnosno kloniranju i kontroliranom manipuliranju biljnim materijalom na staničnoj razini radi stvaranja nove genetičke raznolikosti.

Pored toga tehnologija kulture tkiva u komercijalne svrhe iskorištava se i na druge načine. Ovom tehnologijom moguće je umnožavanje jednog heterozigotnog genotipa, umnožavanje nekog samoinkompatibilnog genotipa, umnožavanje muško sterilnih roditelja u hibridnom oplemenjivačkom programu, umnožavanje bezvirusnog sadnog materijala i očuvanje germplazme smrzavanjem, odnosno postupak poznat kao krioprezervacija. Tako se čuvaju ugrožene i rijetke biljne vrste iz biljnog genofonda i zdrave matične biljke za kolekciju germplazme.

Najčešći postupci kulture biljnog tkiva su kultura meristema, somatska embriogeneza, kultura mikro- i makrospora, kultura embrija i fuzija protoplasta.

Kultura meristema

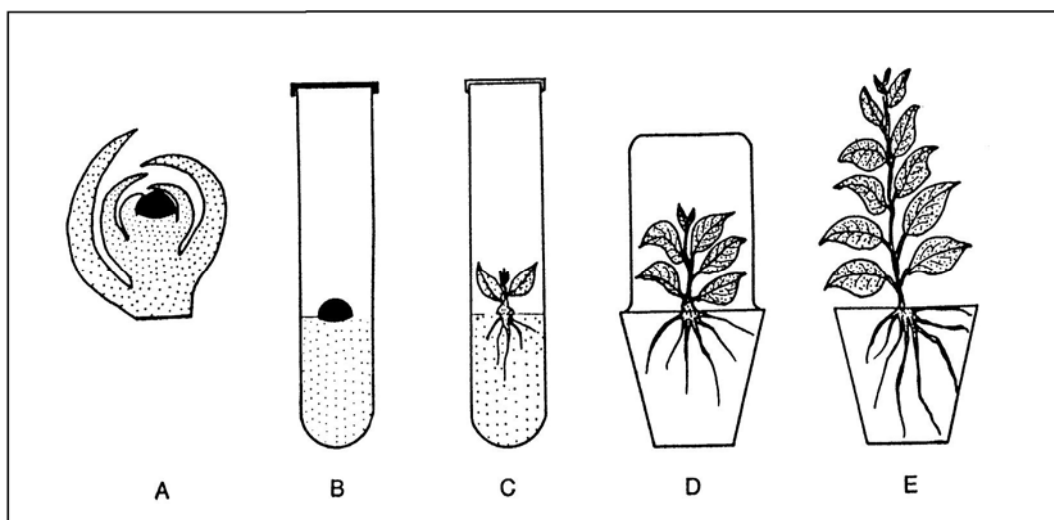
Kultura meristema je regeneracija novih biljaka iz stanica vršnog tkiva (slika 25). To je tkivo koje se aktivno dijeli, ima promjer oko 0,1 mm, a naziva se meristem. Ova tehnika provodi se izoliranjem stanica meristema i njihovim kultiviranjem na hranidbenom mediju. Primjena kulture meristema u istraživačke i komercijalne svrhe ima dva osnovna cilja:

- ✧ vegetativno mikrorazmnožavanje ili mikropropagacija (kloniranje)
- ✧ proizvodnja bezvirusnog sadnog materijala

Tehnika mikrorazmnožavanja omogućuje proizvodnju velikog broja biljaka iz malih biljnih dijelova u relativno kratkom vremenu. Ova tehnika se koristi jer ima stanovite prednosti u odnosu na konvencionalno razmnožavanje. U mnogim slučajevima konvencionalno umnožavanje je spor proces u toku kojeg bolesti i štetnici mogu ograničiti proizvodnju novih biljaka. Mikropropagacijom se pojedinačni eksplantat umnožava u nekoliko tisuća biljaka za manje od godinu dana, a originalna biljka se u većini slučajeva ne uništava, što ima posebno značenje za rijetke i posebno vrijedne biljke. Jednom određena i aktivno dijeljena kultura stalni je izvor mikrorazmnožavanja; to omogućuje rad u zatvorenim prostorima bez sezonskih prekida. Koristeći se tehnikom mikropropagacije rasadničar može brzo proizvesti dovoljne količine odabranih klonova ukrasnih biljaka.

Kultura meristema je veoma pogodan postupak za masovnu proizvodnju biljaka bez patogena. To mogu biti biljke bez bakterija, gljivica ili virusa, ovisno o cilju, no najčešće se proizvode bezvirusne biljke. Virusi su veoma postojani patogeni, a u bespolno razmnožavanim vrstama mogu preći na podlogu. No bez obzira na njihovo brzo razmnožavanje i širenje kroz biljku, nikad ne stignu u stanice vršnog tkiva biljke koje se brzo dijeli. Ta okolnost koristi se u proizvodnji bezvirusnog sadnog materijala u mnogim biljnim vrstama korištenjem tkiva vršnog meristema kao eksplantata za kultiviranje i proizvodnju novih biljaka. Prisutnost virusa utvrđuje se tzv. ELISA testom a zdrave biljke dalje se koriste kao matične biljke.

Kultura meristema najviše se primjenjuje u proizvodnji sadnog materijala cvijeća i ukrasnog bilja. U proizvodnji karanfila, gerbera i anturiuma to je postala gotovo jedina metoda proizvodnje sadnog materijala. Ova tehnika uspješno se primjenjuje i u proizvodnji drugih vrsta: voćnih sadnica, vinove loze, presadnica jagode, povrća. U nekim sortama krumpira i jagoda na ovaj su način eliminirani virusi. U proizvodnji jagode se razmnožavanjem *in vitro* uz zdrav sadni materijal postiže i razmnožavanje u svako vrijeme, neovisno o sezoni. Time se postiže bolje planiranje proizvodnje.

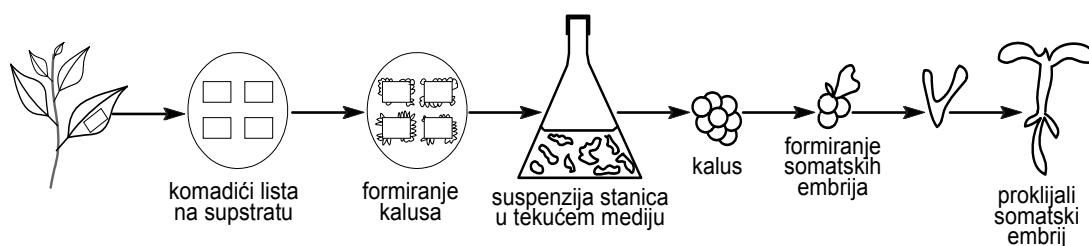


Slika 25. Kultura meristema. A – vršni meristem, B – meristem na hranjivoj podlozi, C – biljčice regenerirane iz meristema, D – biljčice prenesene u sterilni supstrat, E – bezvirusne biljke (Poehlman i Sleper, 1996.)

Tehnika mikrorazmnožavanja koristi se i u nekim posebnim slučajevima: kada je teško razmnožiti posebno vrijedne biljke, ako se uvode novi kultivari, za vegetativno razmnožavanje roditeljskih biljaka, za održavanje germplazme. Nedostatak je kulture meristema što se još ne može primijeniti u svim biljnim vrstama. Regeneranti ponekad mogu biti neujednačeni i imati različitu brzinu zrenja i razvoja, a mogu se također pojaviti mutacije i promjene genotipa.

Somatska embriogeneza

Somatska embriogeneza je regeneracija biljaka iz somatske stanice nespolnim putem, bez spajanja muške i ženske spolne stanice. Regeneracija se provodi kultiviranjem na hranidbenoj podlozi, a nove biljke identične su onoj s koje su somatske stanice izdvojene. Embrij se razvija tijekom procesa embriogeneze koji obuhvaća diobu stanice, uvećavanje i diferencijaciju. I zigota i somatski embrij imaju u osnovi isti obrazac razvoja. Eksplantat, koji se uzima s različitih biljnih dijelova, kultivira se na posebnom mediju a nakon 4 – 8 tjedana formira se embriogeno tkivo iz kojeg se potom razvija embrij (slika 26).



Slika 26. Proces somatske embriogeneze

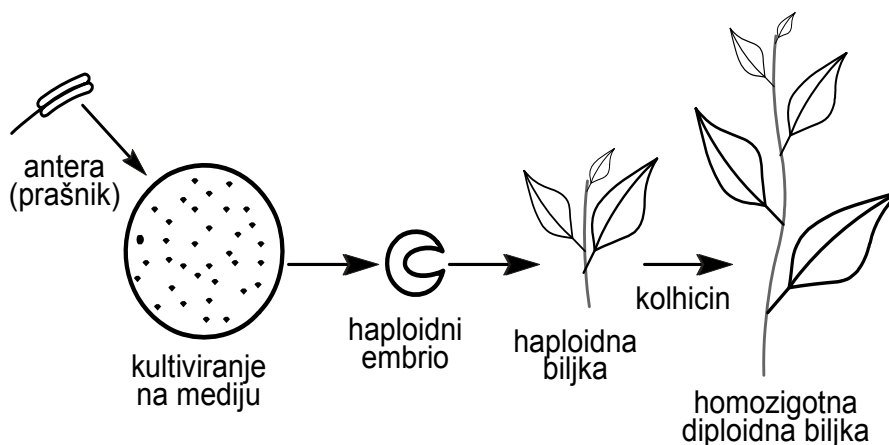
Somatska embriogeneza može imati značajnu komercijalnu primjenu. Somatski embriji u nekim slučajevima predstavljaju jednu vrstu izvornog sjemenskog materijala. Takvi embriji formiraju sekundarne embrije rezultat čega je kontinuirano umnožavanje. Ova tehnika ima najveći potencijal umnožavanja, a radno je u usporedbi s drugim metodama mikrorazmnožavanja *in vitro* manje intenzivna. Somatska embriogeneza koristi se kao

alternativna metoda razmnožavanja u biljnim vrstama, posebno voćnim, u kojima postoje poteškoće vegetativnog razmnožavanja ili cijepljenja.

Kultura mikrospora (androgeneza)

Nove biljke moguće je regenerirati iz muških gameta – mikrospora, odnosno polenovih zrna ili iz prašnika. Postupak se temelji na kultiviranju nezrelih polenovih zrna ili cijelih prašnika na hranidbenoj podlozi iz čega nastaju haploidne biljke. Ova tehnika obično se izvodi na početku oplemenjivačkog programa u cilju razvoja homozigotnih linija u kratkom periodu. Kultura mikrospora uspješno se primjenjuje u više od 50 vrsta u različitim familijama. Razvoj haploidnih biljaka genetički je uvjetovan; može nastati spontano u manjoj mjeri u nekim vrstama, no obično se provodi *in vitro*. Najlakše se izvodi u ječmu i duhanu koji se smatraju kao biljke modeli za androgenezu (Castillo i sur., 2001.).

Postupak kultiviranja u načelu se ne razlikuje od ostalih postupaka kulture biljnih stanica. Kao početni materijal za kultiviranje koriste se nezreli prašnici ili polenova zrna s biljaka F₁ ili F₂ generacije budući da oni osiguravaju maksimalnu genetičku varijabilnost među regeneriranim biljkama. Nezrela antera koja sadrži jednojezgreni polen u vrijeme prve mitotičke diobe najpogodniji je materijal za androgenezu (Jelaska, 1992.). Umjesto nezrelih antera za razvoj haploida koriste se i izolirana polenova zrna (Nitsch, 1974.). Haploidnim biljkama koje će se koristiti u oplemenjivačkim programima mora se udvostručiti broj kromosoma, Takav postupak naziva se diploidizacija. Postupak diploidizacije provodi se tretiranjem kolhicinom ili kultiviranjem izrezanih diskova srednje žile na drugom mediju iz kojih se spontano u određenom postotku razviju diploidi (slika 27).



Slika 27. Shema kulture antera

Kultura makrospora (ginogeneza)

U nekim biljnim vrstama u kojima razvoj haploida nije moguće provesti androgenezom, provodi se ginogeneza tj. razvoj haploidnih biljaka iz neoplođene ženske gamete. Taj se proces još naziva, haploidna partenogeneza. Razvoj haploida ginogenezom provodi se indukcijom i nepravilnom oplodnjom *in situ* ili kultiviranjem *in vitro*. Nepravilna oplodnja je moguća s polenom iste vrste, polenom divljih srodnika ili nesrodnih vrsta ili pak zračenim polenom iste vrste. Mehanizam indukcije takvom oplodnjom još nije u potpunosti razjašnjen. Pretpostavka je da se materinski haploidi pojavljuju zbog pogreške u oplodnji,

nakon čega slijedi razvoj neoplođene jajne stanice u embrij. Najpoznatiji primjer razvoja haploida nepravilnom oplodnjom s divljim srodnicima je križanje ječma *Hordeum vulgare* s divljim ječmom *Hordeum bulbosum*. To je tzv. **bulbosum** metoda razvoja haploida. U novije vrijeme sličan postupak provodi se u duhanu križanjem vrsta *Nicotiana tabacum* i *Nicotiana africana*.

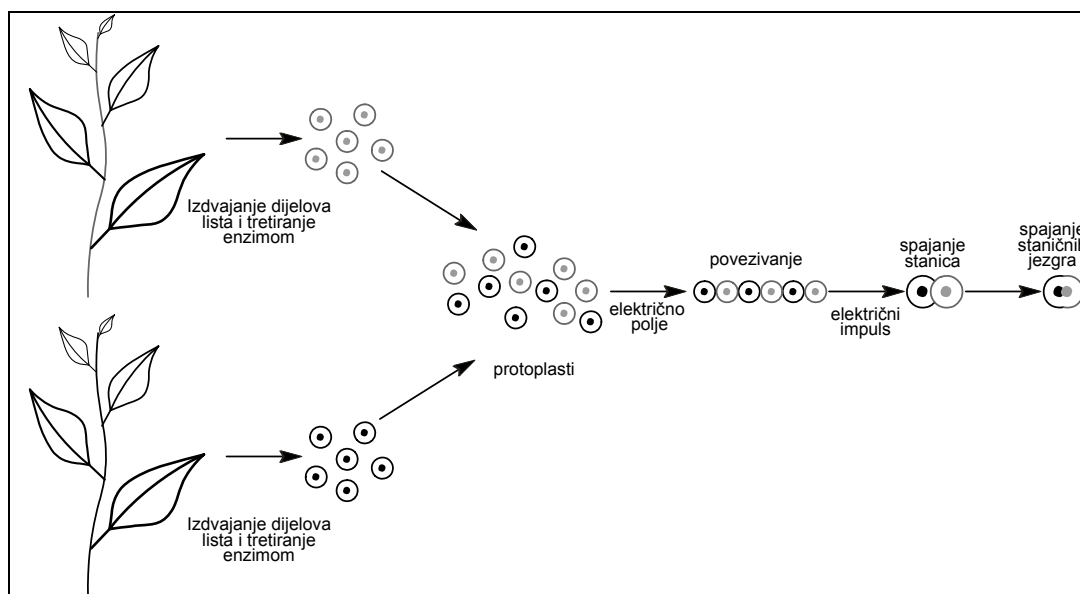
Kultura embrija i megagametofita

Kultura embrija je postupak razvoja biljaka *in vitro* iz izoliranih embrija. Usprkos uspješnoj oplodnji embriji se ne razvijaju uvijek u zrelo sjeme zbog spolne inkompatibilnosti ili nekih drugih uzroka. Stoga se od takvih embrija nove biljke proizvode kultiviranjem *in vitro*. Embriji se izoliraju iz oplođenih cvjetnih pupova i stavljaju na hranidbeni supstrat. Kao eksplantati za kultiviranje uz nezreli i zreli embrij mogu još poslužiti embrijska vrećica (megagametofit), ili čitavi cvijet odnosno njegovi dijelovi.

Kultiviranje embrija *in vitro* bila je prva tehnika kulture tkiva primijenjena izravno u oplemenjivanju. Do sada je uspješno izvedeno u oplemenjivanju rajčice, paprike, pšenice, salate i nekih drugih vrsta. U nekim je slučajevima više od 80% kultivara ovih vrsta rezultat međuvrsnih križanja, a kultura embrija se potom koristi u regeneraciji novih biljaka. Ova metoda posebno se široko primjenjuje u razvoju kultivara otpornih na bolesti i štetnike kada gene za otpornost treba prenijeti iz blisko srodne divlje vrste. Stoga se pretpostavlja da će se kultura embrija sve više primjenjivati s povećanim korištenjem međuvrsne hibridizacije.

Fuzija protoplasta

Fuzija protoplasta je tehnika spajanja protoplasta različitih vrsta, najčešće onih koje su spolno nepodudarne. Na taj način izvede se novi međuvrsni hibridi u kojima su spojena svojstva dvije vrste. Budući da se fuzijom protoplasta spajaju somatske stanice, ovaj se postupak naziva somatska hibridizacija.



Slika 28. Shema fuzije protoplasta

Protoplasti su biljne stanice kojima je odstranjena stanična stijenka, ali je ostala plazmatska membrana. Pogodnim enzimatskim postupkom protoplasti se izoliraju iz bilo koje

biljne vrste ili tipa biljnog tkiva. Nakon izolacije protoplasta provodi se postupak njihovog spajanja radi stvaranja novih somatskih hibrida (slika 28). Spajanje protoplasta i poticanje razvoja somatskih hibrida moguće je provesti kemijskom i električnom metodom.

Fuzija protoplasta u načelu je hibridizacija na vegetativnoj osnovi. Spajanjem dva protoplasta nastat će mješavina citoplazme iz čega, kao rezultat fuzije protoplasta, proistječe stanica kći nazvana cibrid (cybrid), odnosno citoplazmatski hibrid. Prvi somatski hibrid bio je hibrid između krumpira i rajčice (Melchers i sur., 1978.), a do sada su uspješno regenerirane biljke nakon fuzije protoplasta u krumpiru, duhanu, lucerni i nekim drugim vrstama. Ova tehnika uspješno je primijenjena u citrusima (Gmitter i sur., 1992.) te u križanju kruške i trešnje (Ochat i sur., 1989.).

Somaklonsko variranje

Regeneracijom biljnih eksplantata u cjelovite biljke tijekom kulture biljnih stanica u pravilu bi se trebali dobiti klonovi, odnosno biljke koje su genotipski i fenotipski identične onima s kojih su uzeti eksplantati. Utvrđeno je, međutim, da među izvedenim regenerantima ima biljaka s drugačijim svojstvima. Kultura biljnih stanica *in vitro* može prouzročiti nakupljanje genetičkih i citogenetičkih promjena u obrađenoj stanici i regeneriranim biljkama te u tim biljkama izazvati promjene. Ovakve pojave poznate su pod imenom somaklonsko variranje ili somaklonska promjenljivost (Larkin i Scowcroft, 1981.). Promjene se događaju spontano tijekom normalnog provođenja kulture tkiva, ili mogu biti potaknute dodavanjem u medij za kultiviranje različitih mutagenih sredstava. Zapravo je i kultura tkiva sama po sebi jedna vrsta mutagenog postupka (Jelaska, 1993.).

Mutanti u somaklonskom variranju češći su nego u drugim postupcima induciranih mutacija poput zračenja ili kemijskih mutagena. Genetičke promjene tijekom kulture tkiva iskazuju se kao promjene u broju kromosoma, kromosomska premještanja ili citoplazmatska preuređenja. Najčešći tip variranja je razlika u broju kromosoma pa se kao posljedica toga pojavljuje aneuploidija, poliploidija ili čak miješana ploidija. Ponekad se pojavljuju promjene na samom kromosomu kao što su duplikacije, delecije, translokacije ili inverzije.

Fenotipske promjene na biljkama očituju se u habitusu, otpornosti na bolesti i štetnike, boji ili veličini ploda ili na nekom drugom korisnom svojstvu. Ako su promjene nasljedne i prenose se na potomstvo, somaklonsko variranje može u oplemenjivanju biti koristan izvor genetičke varijabilnosti. Varijabilnost stvorena tijekom kulture biljnih stanica nađena je među regeneriranim biljkama ječma, kukuruza, rajčice, pšenice, krumpira, duhana. U regeneriranju nekoliko tisuća biljaka krumpira iz protoplasta sorte Russet Burbank zapaženo je da je ovakva varijabilnost za mnoga svojstva više pravilo nego iznimka (Shepard i sur., 1980.). Po sugestiji istraživača jednostavnije bi bilo iskoristiti ovaj tip varijabilnosti za razvoj novih genotipova krumpira nego provoditi selekciju konvencionalnim oplemenjivanjem.

Somaklonsko variranje koristi se u voćarstvu nakon regeneracije biljaka iz tkiva (Fasolo i sur., 1990.) jer je zbog heterozigotnosti i dugog perioda do dolaska na rod učinkovitost konvencionalnog oplemenjivačkog programa ograničena.

Oplodnja i selekcija *in vitro*

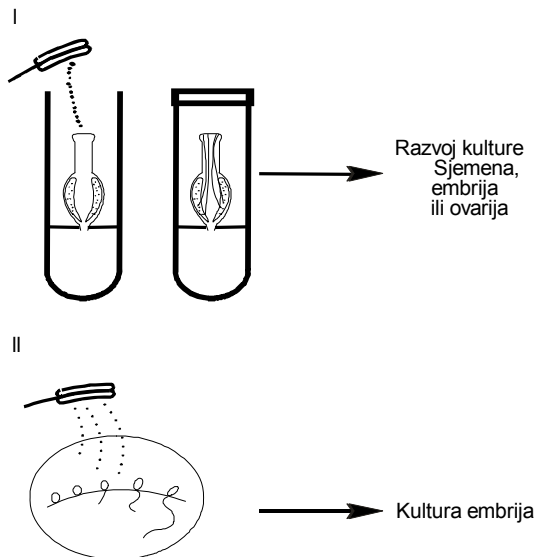
Oplodnja *in vitro* je postupak oplodnje biljaka u kontroliranim uvjetima. Primjenjuje se u slučajevima kad nije moguće provesti oplodnju na samoj biljci. To se često događa u međuvrsnim križanjima u vrstama suviše udaljenim za prirodnu reprodukciju. Na taj način se

prevladavaju spolne barijere između vrsta. Oplodnja *in vitro* s pojedinačnim izoliranim gametama kod viših biljaka prvi put je uspješno izvedena 1989. (Kranz i Lörz, 1990.). To je postalo moguće povezivanjem metoda izolacije gameta s tehnikama kulture tkiva.

Najprije se posebnom tehnikom iz biljke izoliraju gamete. Izolirane plodnice, sa ili bez dijelova vrata ili njuške tučka, postavljaju se na hranidbeni supstrat. Oplodnja se obavlja polenom koji se nanese na njušku ili na supstrat. Polen mora biti aseptičan, tj. bez prisutnosti bilo kakvih patogena. Uneseni polen normalno klija prema plodnici i oplođuje jajnu stanicu omogućujući formiranje zigote iz koje se diobom razvije embrij (slika 29). Nakon nekoliko dana ili tjedana, ovisno o brzini razvoja, embriji se kultiviraju već opisanom tehnikom kulture embrija. Razvoj embrija *in vitro* usporediv je s razvojem *in vivo*; razlika je jedino što se *in vitro* postupak izvodi u kontroliranim uvjetima. Regeneracijom na posebnom mediju nastaju nove biljke s odgovarajućim fenotipom.

Uspješnost ove metode ovisi o biljnoj vrsti, genotipu i napravljenosti kombinaciji. Oplodnja *in vitro* uglavnom se primjenjuje na početku oplemenjivačkog programa, a može također prethoditi selekciji *in vitro*. Ova se tehnika najviše koristi u cvjećarstvu, budući da se u cvjećarskim vrstama često primjenjuje međuvrsto križanje radi formiranja novih oblika ili posebne boje cvijeta.

Kultura *in vitro* učinkovito je sredstvo u oplemenjivanju bilja kao izvor mutacija u razvoju novih formi, što se još naziva **selekcija *in vitro***. Tim je postupkom moguće stvoriti biljke sa specifičnim svojstvima. Najčešće se postiže tolerantnost ili otpornost na neke biotičke ili abiotičke rizike u proizvodnji. Selekcija *in vitro* je zapravo jedna vrsta prethodne selekcije kojom se smanjuje broj biljaka za ocjenu u poljskim pokusima. Ova tehnika je već uspješno primijenjena u oplemenjivanju bilja (Dumas i sur., 1995.).



Slika 29. Postupak oplodnje *in vitro*

Postupak selekcije *in vitro* izvodi se kultiviranjem izoliranog tkiva ili stanica na hranidbenom supstratu. Biljke se iz svoje uobičajene uzgojne okoline prethodno izoliraju. Ako oplemenjivač želi odabrati biljke tolerantne na neku supstancu, dodat će tu supstancu u supstrat u kojem se eksplantat kultivira. Regenerirane biljke najvjerojatnije će biti otporne na supstancu dodanu supstratu. Biljna regeneracija općenito se provodi somatskom embriogeneza. Nove biljke prebacuju se u drugi medij, a kad se razvije korijen, prenose se u staklenik ili na otvoreno polje.



Slika 30. postupak selekcije *in vitro*

Genetičko inženjerstvo

Genetičko inženjerstvo predstavlja prijenos točno određenog svojstva iz jednog organizma u drugi, rezultat čega je formiranje novog organizma s genetički preinačenim svojstvima. Konvencionalno oplemenjivanje također je manipuliranje genetičkim materijalom, ali na razini cijelog genoma, dok se genetičkim inženjerstvom u genom domaćina unosi točno određeni gen. Postupak prijenosa genetičkog materijala iz jednog organizma u drugi naziva se genetička transformacija, a organizmi koji nastaju takvim postupkom nazivaju se transgenski organizmi, transformanti, genetički modificirani organizmi (GMO) ili genetički preinačeni organizmi.

Konvencionalnim oplemenjivanjem moguće je križanje biljaka unutar vrste ili s blisko srodnim vrstama. U potomstvu takvih križanja odabiraju se genotipovi odgovarajuće kombinacije gena. U genetičkom inženjerstvu takva ograničenja ne postoje. Nema spolnih barijera za prijenos gena iz jednog organizma u drugi. Nova tehnologija omogućuje prijenos gena iz bilo koje biljne vrste, bez obzira na srodnost. Moguć je čak prijenos genetičkog materijala iz životinje u biljku i obratno.

Biljna biotehnologija nudi poboljšanja u gotovo svakom području proizvodnje kultiviranog bilja s mogućim koristima za farmere, prerađivačku industriju, potrošače i okoliš. Genetički preinačene kulture uvedene su u komercijalnu proizvodnju polovinom devedesetih godina prošlog stoljeća. Genetički preinačena sorta RoundupReady soja kreirana je u SAD još 1985., ali je nakon dugogodišnjih ispitivanja priznata tek 1995. U komercijalnu je proizvodnju uvedena 1996. Do danas je genetičkom transformacijom uspješno proveden prijenos gena u više kultiviranih vrsta. Neke od tih transgenskih biljaka su komercijalizirane, neke su u fazi ispitivanja, a neke su ostale samo na razini eksperimenta budući da ih nije moguće komercijalizirati iz tehničkih, etičkih, financijskih ili nekih drugih razloga.

Lista potencijalnih ciljeva koje je moguće postići genetičkim inženjerstvom veoma je široka, a važniji među njima za razvoj poljoprivrede su:

- ✧ razvoj kultivara otpornih na štetne patogene, koji se inače teško postižu konvencionalnim oplemenjivačkim postupcima
- ✧ unošenje u postojeće kultivare gena za otpornost na herbicide
- ✧ razvoj biljnih kultivara tolerantnih na suvišak soli u tlu, suvišak vode, te otpornih ili tolerantnih na sušu ili niske temperature

- ✧ fiksacija atmosferskog dušika u žitaricama i drugim važnim poljoprivrednim vrstama, čime se smanjuje potreba gnojidbe dušikom
- ✧ mogućnost poboljšanja i produljenja vremena čuvanja voća i povrća
- ✧ sinteza bioloških tvari važnih za prehrambenu i farmaceutsku industriju

U komercijalnom smislu najviše je uspjeha postignuto u razvoju kultivara otpornih ili tolerantnih na bolesti, štetnike ili herbicide. Ta su svojstva obično pod kontrolom jednog gena s major učinkom pa ih je relativno lako prenijeti, a u proizvodnji imaju dobar ekonomski učinak. Danas gotovo 99% komercijalno uzgajanih transgenskih kultivara ima ova svojstva. U pokusnoj proizvodnji su različite druge transgenske linije kao što su citrusi manje osjetljivi na niže temperature, rajčica s mogućnošću duljeg čuvanja te linije s drugim korisnim svojstvima.

Uzgoj se transgenskih biljaka nakon početka komercijalizacije brzo proširio. Sjetvene površine pod genetički preinačenim biljkama u razdoblju 1997. – 2011. povećane su za 15 puta. Uvođenje transgenskih biljaka u proizvodnju najbrže se širi u SAD. Predviđa se da će uskoro u SAD čak 40% sjetvenih površina biti zasijano transgenskim biljkama.

Premda se broj transgenskih kultura brzo povećava, u usporedbi sa konvencionalno razvijenim kultivarima još uvijek je relativno malo transgenskih kultivara priznato i komercijalizirano. Razlog za to su uglavnom rigorozni postupci ispitivanja prije nego se genetički preinačenim kultivarima dopusti uvođenje u proizvodnju. Ograničavanje širenja transgenskih biljaka u proizvodnji zbog mogućih rizika za čovjeka i okoliš tema je stalnih rasprava u javnosti. Naime, i pored nesumnjivih koristi koje genetičko inženjerstvo može polučiti u različitim djelatnostima, primjena ove tehnologije povezana je s brojnim kontroverzama i dvojabama. Šteta za ljudsko zdravlje potrošnjom hrane od genetički preinačenih organizama mogla bi nastati zbog alergenosti, toksičnosti, ili promjene razine prehranbene vrijednosti. Poremećaji u okolišu nakon primjene genetički preinačenih biljaka mogu nastati kao posljedica bijega gena, povećanja otpornosti na antibiotike, ispiranja genetički preinačenih proteina u tlo, štetnog djelovanja na korisne insekte, širenja transgenskih biljaka u okoliš ili zbog promjena u biogeokemiji tla.

Odnos biotehnologije i konvencionalnog oplemenjivanja

Potencijalna je vrijednost biotehnologije i genetičkog inženjerstva u oplemenjivanju bilja u ostvarenju ciljeva koje nije moguće postići konvencionalnim metodama. Genetičko inženjerstvo ne može zamijeniti konvencionalno oplemenjivanje, ali može pomoći pri unošenju svojstava koja se ne mogu prenijeti klasičnim metodama.

Genetičko inženjerstvo nije jednostavno proširenje konvencionalnog oplemenjivanja, odnosno provođenje *in vitro* onog mehanizma koji se prirodno provodi u bilju nakon križanja. Između ova dva postupka postoje razlike, kako u procesu, tako u genetičkoj konstituciji konačnog proizvoda. Konvencionalno oplemenjivanje izvodi se na razini cijele biljke, a odgovarajuće kombinacije u potomstvu križanja traže se na temelju fenotipskog izgleda. Genetičkim se inženjerstvom u biljku domaćina unose kratki segmenti DNK koji sadrže gene za tražena svojstva. Na taj način omogućeno je oplemenjivanje u točno određenom pravcu.

Genetičko je inženjerstvo umjetno unošenje jednog ili nekoliko gena; konvencionalno oplemenjivanje predstavlja kombinaciju nasljednih svojstava nakon prirodne oplodnje. Svojstva stečena konvencionalnim oplemenjivanjem nisu nova za vrstu (osim u slučaju mutacija), jer su već tisućljećima prisutna u genskoj konstituciji vrste. Nasuprot tome genetičkim inženjerstvom u neki organizam mogu se unijeti svojstva koja nikada nisu bila u

toj vrsti ili u srodnim vrstama. To je horizontalni prijenos gena, za razliku od vertikalnog prijenosa iz nekih genetski bližih ili daljih vrsta.

Biotehnologija teško može proizvesti komercijalno održive kultivare; ona samo dodaje svojstva kojima oplemenjivači manipuliraju. Transgenske biljke predstavljaju poboljšanje, a ne zamjenu za elitnu germplazmu. Od vremena unošenja nekog svojstva genetičkim inženjerstvom strategija transgenskog poboljšanja ne razlikuje se od konvencionalnog oplemenjivanja; valja provesti selekciju da bi se odabrali odgovarajući genotipovi. Radi toga se transgenske linije križaju s elitnom germplazmom u koju se na taj način unosi odgovarajući gen. Nakon toga provode se uobičajena poljska ispitivanja.

Premda je biotehnologija, a posebno genetičko inženjerstvo veoma učinkovita tehnika za unošenje različitih svojstava u biljke ovi postupci nisu svemoćno rješenje u oplemenjivanju. Samo kad se zajedno kombiniraju tehnike kulture tkiva ili molekularne biologije s konvencionalnim metodama oplemenjivanja, moguće je dobiti nove komercijalno vrijedne kultivare.

Literatura

Castillo, A.M., Cistue, L., Valles, M.P., Sanz, J.M., Romagosa, I., Molina-Cano, J.L. 2001. Efficient production of androgenic doubled haploid mutant in barley by the application of sodium azide to anther and microspore cultures. *Plant Cell Reports*, 20:105-110.

Dumas, C., Faure, J-E. 1995. Use *in vitro* fertilization and zygote culture in crop improvement. *Current Opin. Biotechnol.* 6:183-188.

FAO, 1993. Convention on Biological Diversity. UN Conference on Environment and Development. Rio de Janeiro, Brasil. <http://www.biodiv.org/convention/articles.asp>

Fasolo, F., Fabbri, A., Malavasi, N., Predieri, S. 1990. Cultivar dependent responses to regeneration from leovesin apple. *Acta Horticulturae*, 280:61-68.

Gmitter, F.G., Grosser, J.W., Moore, G.A. 1992. Citrus. U *Biotechnology of Perennial Fruit Crops* (ur. Hammerschlag, F.A., Litz, R.E.), 335-370.

Jelaska, S. 1994. Kultura biljnih stanica i tkiva. Školska knjiga Zagreb.

Kranz, E., Lörz, H. 1990. Micromanipulation and *in vitro* fertilization with single pollen grains of maize. *Sexual Plant Repr.* 3:160-169.

Larkin, P.J., Scowcroft, W.R. 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, 60:197-214.

Melchers, G., Sacristan, M.D., Holder, A.A. 1978. Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Research Communications* 43:203-218.

Nitsch, C. 1974. La culture de pollen isole sur milieu synthetique. *Comptes Rendus de l'Academie Science* 278 D:1031-1034.

Ochat, S.J., Patat-Ochat, E.M., Rech, E.L., Davey, M.R., Power, J.B. 1989. Somatic hybridization of sexually incompatible top fruit rootstocks, wild pear (*Pyrus communis* var. *pyraster* L.) and Colt cherry (*Prunus avium* x *pseudocerasus*). *Theor. Appl. Genetics* 79:35-41.

Poehlman, J.M., Sleper, D.A. 1996. *Breeding field crops*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA.

Shepard, J.F., Bidney, D., Shahin, E. 1980. Potato protoplasts in crop improvement. *Science*, 208:17-24.

Osnove sjemenarstva

Sjemenarstvo je poljoprivredna djelatnost koja se bavi svim aspektima sjemena od proizvodnje, dorade ispitivanja normi kvalitete do tržišta. Osnovni je cilj sjemenarstva kao znanstvene i stručne discipline proizvodnja kvalitetnog sjemena priznatih kultivara poljoprivrednog bilja uz održavanje njegovog genetskog identiteta

Sjeme poljoprivrednog bilja predstavlja generativne dijelove poljoprivrednog, ljekovitog i aromatičnog bilja, kao i vegetativne biljne dijelove (gomolji, lukovice, lučice, presadnice i sl.) koji se upotrebljavaju kao reproduksijski materijal za sjetvu, sadnju i razmnažanje s ciljem poljoprivredne proizvodnje. U biološkom smislu sjeme je mala embrijska biljka omotana sjemenskom ovojnicom, obično s nešto rezervne hrane. Ono je proizvod zrelog sjemenog zametka što nastaje nakon oplodnje i stanovitog razvoja unutar majčinske biljke. Formiranjem sjemena završava se proces reprodukcije u biljkama. Sjeme je osnovno sredstvo regeneracije većine biljnih vrsta i prijenosa genetičkog materijala od jedne generacije do druge. Sjeme štiti i hrani embrij ili mladi izdanak.

Sjeme ima simboličnu vrijednost u predodžbi ekološke poljoprivrede, posebno na koncept integriteta i pouzdanosti. Štoviše, profesionalna ekološka poljoprivreda ima visoke zahtjeve u pogledu kvalitete sjemena (čistoća, sposobnost klijanja, zdravstveno stanje), dok tržište ekoloških proizvoda ima posebne zahtjeve u kvaliteti proizvoda (organoleptička svojstva, lokalne sklonosti, pogodnost za doradu), a da bi se primijenila najbolja ekološka agrotehnika nužna su neka druga sortna svojstva (niski zahtjevi za hranjivima, visoki prag konkurentnosti prema korovima, otpornost na bolesti).

Sjeme u prodaji može biti golo (naturalno) ili obloženo. Obloženo sjeme je: pilirano, inkrustrirano i granulirano sjeme, sjeme u vrpčama i drugi oblici obloženog sjemena. Sjeme se oblaže radi lakšeg manipuliranja i sjetve.

Važna funkcija većine sjemena je zadržavanje klijavosti da bi se omogućilo širenje i spriječilo klijanje odmah kad su uvjeti povoljni što se naziva **dormantnost**. Time se sprečava gubljenje sjemena za lošeg vremena. Dormantnost sjemena definira se kao izostanak klijanja u uvjetima optimalnim za klijanje.

Sjeme se često brka s plodom koji ga okružuje. Plodovi su sazrele embrijske vrećice koje sadrže sjeme. Perikarp (pokožica ploda) je diploidno materinsko tkivo.

Stručni nadzor sjemenskog usjeva u vegetaciji je postupak koji se provodi radi priznavanje sjemenskog usjeva. U ovom dijelu nadzora najvažnije je provjeriti da li sjeme usjeva pokazuje karakteristike sorte (prepoznatljivost sorte) i osigurati da ne bude okolnosti koje bi mogle biti štetne za kakvoću sjemena koje treba požeti (sortna čistoća). Stručni nadzor provodi ovlaštenu aprobator svake godine u vrijeme cvatnje sjemenskog usjeva ili drugo vrijeme koje je najpogodnije za određivanje genetske čistoće. Pri provođenju aprobacije aprobator će identificirati kulturu, utvrditi nečistoće i izolaciju

Nakon zriobe sjemena obavlja se berba, vršidba i sušenje. Ove se operacije izvode ovisno o tipu ploda: jesu li to kulture sa suhim (žitarice, leguminoze, kupusnjače) ili sočnim plodom (rajčica, paprika i brojne druge povrtarske vrste), pa se tomu prilagođava berba i izdvajanje sjemena. Poslije toga slijedi dorada. Dorada sjemena provodi se što je moguće prije nakon što su plodovi ili tobojci, mahune i sl. skupljeni. Pravilna dorada sjemena podrazumijeva sortiranje, odvajanje sjemena od ploda, čišćenje, klasiranje i sušenje. Cilj je dorade sjemena održati kvalitetu. Ako dorada nije provedena pravilno i na vrijeme većina sjemena može propasti.

Kategorije poljoprivrednog sortnog sjemena

Poljoprivredno sortno sjeme obuhvaća predosnovno sortno sjeme i sjemenske kategorije koje se proizvode višekratnim cikličkim umnažanjem predosnovnog sjemena sorti upisanih u upisnike novostvorenih domaćih i stranih sorti poljoprivrednog bilja u Republici Hrvatskoj. Poljoprivredno sortno sjeme su i lokalne prirodne populacije kultiviranog bilja kao eko-tipovi, klonovi i sl., koji se nalaze u proizvodnji i koje su upisane u Upisnik zatečenih domaćih i udomaćenih sorti poljoprivrednog

Oplemenjivačevo sjeme je sjeme ili vegetativni materijal za umnožavanje pod izravnom kontrolom oplemenjivača ili oplemenjivačke institucije. Oplemenjivač osigurava izvor za početno i periodično umnažanje osnovnog sjemena.

Predosnovno sjeme proizvodi i održava oplemenjivač, odnosno fizička ili pravna osoba na koju je oplemenjivač prenio pravo održavanja ili registrirani umnažatelj umnažanjem odabranih biljaka izvorne generacije. Predosnovno (ili osnovno) sjeme zadnja je generacija umnažanja sjemena pod nadzorom oplemenjivača, a kasnije kategorije proizvode se u sjemenskim firmama

Osnovno sjeme proizvodi se iz predosnovnog sjemena pod kontrolom oplemenjivača ili ovlaštenog umnažatelja. Osnovno sjeme je prva generacija umnožavanja oplemenjivačkog sjemena ili njegova ekvivalenta. Proizvodnju mora nadzirati certificirajuća agencija ili pokusna stanica. Od osnovnog sjemena je dopušteno proizvoditi registrirano ili certificirano sjeme.

Registrirano sjeme je potomstvo osnovnog sjemena koje je proizvedeno i dorađeno tako da se održi zadovoljavajući genetski identitet i čistoća, a potvrđeno je od odgovarajuće institucije ili agencije za certifikaciju. Od registriranog sjemena je dopušteno proizvoditi certificirano sjeme.

Certificirano sjeme je potomstvo osnovnog, registriranog ili certificiranog sjemena koje je proizvedeno i dorađeno tako da se održi zadovoljavajući genetski identitet i čistoća, a potvrđeno je od agencije za certifikaciju. Certificirano sjeme može biti prve, druge ili treće generacije.

Samooplodna linija je potomstvo homozigotne biljke uzgojene u kontroliranoj samooplodnji u tijeku više generacija pod kontrolom oplemenjivača.

Jednostruki hibrid (SC) je prva generacija križanja dviju inbred ili samooplodnih linija.

Dvostruki hibrid (DC) je prva generacija križanja dvaju jednostrukih hibrida.

Trojni hibrid (TWC) je prva generacija križanja jedne samooplodne linije i jednostrukog hibrida

Partija sjemena je određena količina sjemena, izjednačene kakvoće iste vrste, sorte, kategorije, sortne čistoće, godine proizvodnje i podrijetla, obilježena i opskrbljena propisanim dokumentima.

Kategorije poljoprivrednog sadnog materijala jesu:

Predosnovni sadni materijal za umnažanje koji se proizvodi pod odgovornošću oplemenjivača ili njegovih sljednika, služi za proizvodnju osnovnog sadnog materijala, a bez bolesti je, štetočina, virusa, mikoplazmi i viroida.

Osnovni sadni materijal za umnažanje koji potječe od biljaka predosnovnog sadnog materijala, uzgaja se pod nadzorom Zavoda, bez virusa je, namijenjen je za podizanje matičnih nasada certificiranog sadnog materijala. U prodaji je označen deklaracijom bijele boje.

Certificirani sadni materijal za umnažanje koji potječe iz osnovnog sadnog materijala. Može se koristiti u obliku materijala za umnažanje. Namijenjen je i za proizvodnju reznica ili za proizvodnju cijepova kategorija standard. Bez virusa je. U prodaji je označen deklaracijom plave boje.

Standardni sadni materijal koji potječe od certificiranih matičnih stabala, odnosno grmova, kojima su identitet, čistoća sorte i zdravstveno stanje utvrđeni i zajamčeni. Koristi se za proizvodnju sadnica namijenjenih za podizanje voćnih i loznih nasada. U prodaji je označen deklaracijom žute boje i slovima S-A.

Cilj je certifikacije – kategorizacije da se uspostave pravila za održavanje i dostupnost visoke kvalitete sjemena i materijala za umnožavanje priznatih biljnih sorti tako uzgajanih i distribuiranih da osigura genetski identitet i čistoću

Sve certificirano sjeme mora odgovarati standardima čistoće i identiteta sorte prema standardima OECD.

Norme kvalitete sjemena

Najvažnije norme kvalitete sjemena su klijavost, sadržaj vlage, čistoća i masa 1000 sjemenki.

Ispitivanje klijavosti je analitički postupak kako bi se ocijenila energija klijanja i ukupna klijavost u standardnim uvjetima. Time se omogućuje proizvođaču sjemena da odredi i uspoređi kvalitetu sjemenske partije prije nego ode na tržište do potrošača. Definicija klijavosti prema Association of Official Seed Analysts: „klijanje je pojava i razvoj iz sjemenskog embrija bitnih struktura koje, za sjeme o kojem se radi, su pokazatelji sposobnosti da proizvede normalnu biljku u povoljnim uvjetima“ Ispitivanje klijavosti poduzima se u standardnim uvjetima koja su definirana Pravilima za testiranje sjemena. Pritom se ispituje energija klijavosti i ukupna klijavost, a trajanje ispitivanja određeno je za pojedine biljne vrste.

Energija klijanja je broj normalnih klijanaca prema broju sjemenki stavljenih na klijanje, utvrđen nakon proteka vremena predviđenog za ovo ocjenjivanje odnosno za utvrđivanje energije klijanja.

Klijavost sjemena predstavlja broj normalnih klijanaca prema ukupnom broju sjemenki stavljenih na klijanje, utvrđeno nakon proteka vremena predviđenog za završno ocjenjivanje.

Energija klijanja i klijavost sjemena iskazuju se u postocima.

Vlaga sjemena predstavlja postotak slobodne vode, a to se još označava kao kritična vlaga. Za svaku kulturu postoji stanoviti maksimalno dopušteni sadržaj vlage.

Čistoća sjemena je u postocima izražen odnos količine čistog sjemena vrste koja se ispituje i

zajedno količina sjemena drugih vrsta poljoprivrednog bilja, korova i inertnih tvari.

Masa 1000 sjemenki je svojstvo sjemena koje pokazuje koliko grama teži 1000 sjemenki. To svojstvo ovisi o vrsti, odnosno kultivaru i težini pojedinačne sjemenke. Važno je pri određivanju norme sjetve. U okviru iste vrste težina 1000 sjemenki može varirati u širokom rasponu, što ovisi o rastu i razvoju biljke, o uvjetima proizvodnje i godine.