

Mr. sc. Aleš Vokurka

INTERNA SKRIPTA

vježbe za kolegij

OPLEMENJIVANJE VOĆAKA I VINOVE LOZE

Voditelj kolegija: prof. dr. Ivan Pejić

Napomena:

skripta je nerecenzirana i nelektorirana, i kao takva služi isključivo za
internu upotrebu prilikom spremanja ispita

svibanj 2006.

Pojam fenotipa, genotipa i svojstva u oplemenjivanju voćaka i vinove loze

Genotip je cjelokupna nasljedna osnova koju organizam dobiva od roditelja.

To je suma svih genetičkih informacija (gena).

Genotip određuje razvojni put organizma, ali se pri tome ne ostvaruju sve njegove mogućnosti i potencijali.

Fenotip je skup svih svojstava organizma koja nastaju zajedničkim djelovanjem genotipa i okoline u kojoj se organizam razvija, tj. organizam kakav se ispoljava u stvarnosti (**Slika 1. i 2.**).

$$F = G + E$$



Slika 1: Različite sorte jabuka su rezultat različite genetske konstitucije



Slika 2: Različiti fenotipski izgled ploda i lista smokve

Svojstvo je određena karakteristika fenotipa (komponenta fenotipa) koja je (kao i fenotip u cjelini) uvjetovana genetičkim činiocima i činiocima okoline u kojoj se organizam razvija.

Prema broju gena koji kontroliraju pojedina svojstva, razlikujemo kvalitativna i kvantitativna svojstva.

Kvalitativna (alternativna) svojstva upravljana su sa jednim ili s nekoliko dominantnih ili recesivnih gena (*major* geni) snažnog djelovanja i pod malim su utjecajem okolinskih čimbenika. Kvalitativna svojstva, budući da su pod niskim utjecajem okolinskih faktora, često se koriste kao deskriptori za ocjenjivanje i opisivanje *germplazme*, npr. boja i oblik cvjetova, plodova i listova.

Kvantitativna (metrička) svojstva upravljana su većim brojem gena sa više genskih lokusa od kojih svaki daje doprinos u ekspresiji promatranog svojstva. Ovi geni najčešće imaju aditivni efekt i stvaraju različite interakcijske odnose u upravljanju tim svojstvom. Fenotip svojstva koje je pod kontrolom ovakvih gena je suma njihovih pojedinačnih utjecaja i pod velikim je utjecajem okolinskih čimbenika (tj. takva svojstva variraju pod okolinskim utjecajem znatno više nego kvantitativna svojstva).

Mnoga svojstva zanimljiva za voćarstvo i vinogradarstvo su kvantitativna: otpornost prema bolestima, otpornost na nepovoljne okolinske utjecaje (suša, nepovoljna temperatura u pojedinim fenofazama), sadržaj aromatskih i nutritivnih tvari u plodu, sadržaj šećera i kiselina kod vinove loze, visina prinosa i dr.

Cilj oplemenjivanja je stvoriti sortu (kultivar) točno određenog svojstva ili određenih svojstava koja su poboljšana u odnosu na postojeće sorte, i kojima se rješavaju određeni problemi vezani za proizvodnju, trgovački plasman i potrošačke preferencije.

Svrha oplemenjivanja rješavanje problema koji su povezani s proizvodnjom određenog kultivara u određenim uvjetima.

Pet osnovnih koraka oplemenjivačkog programa

Objasnit ćemo pet osnovnih koraka oplemenjivačkog programa u slučajevima kad se kao sustav oplemenjivanja koristi planska hibridizacija (križanje).

1) Identifikacija problema

Identifikacija problema se uvijek provodi uz konzultacije sa stručnjacima iz prakse i sa stručnjacima iz drugih područja agronomskih znanosti (stručnjaci za pomologiju, zaštitu bilja, fiziologiju, ishranu, mehanizaciju, marketing i dr.).

Osobe zaposlene u praksi i proizvođači određenih voćarskih kultura mogu ukazati na određeni problem, a stručnjaci iz pojedinih znanstvenih grana mogu pomoći oplemenjivačima u provođenju oplemenjivačkog programa ovisno o specifičnosti problema kojeg je potrebno riješiti oplemenjivanjem.

2) Određivanje ciljeva oplemenjivanja

Ciljevi oplemenjivanja mora se zasnivati na stvarnim problemima i mora biti postavljen realno. Potrebno je postaviti prioritete ciljeva vezanih za pojedinu vrstu i za pojedino proizvodno područje.

Nije moguće dobiti 100% idealnu sortu jer realnost sorte (a da ona bude što idealnije) ovisi o mogućnosti nezavisnog kombiniranja svojstava (gena) i načinu naslijeđivanja tih svojstva.

U kombinacijskom oplemenjivanju (križanjima) često se koriste postojeće kvalitetne sorte jer one već imaju nakupljena poželjna svojstva (tzv. blokove gena) koja želimo prenijeti na potomstvo. Veličina potomstva u križanjima ovisi o načinu naslijeđivanja gena koji upravljaju pojedinim svojstvima.

3) Planska hibridizacija (križanje)

U planskoj hibridizaciji najvažnije je odabrati najbolje roditeljske kombinacije u skladu sa ciljem oplemenjivanja. Potrebno je dobro poznavati svojstva roditeljskih biljaka. Roditelji moraju biti bezvirusni (nezaraženi najvažnijim virusima), naročito majčinska biljka jer je prijenos virusa na plod vrlo izgledan.

Križanja je potrebno izvesti tehnički pravilno, a tu je osim rutine samog postupka (sakupljanje polena, emaskulacija, križanje, izolacija) neophodna i dobra organizacija koja omogućuje provedbu križanja u kratkom vremenskom roku dok traje cvatnja. Planirana veličina populacije potomstava za daljnji rad određuje broj križanja koji je potrebno učiniti, a taj broj mora biti i veći jer sva križanja ne završe uspješno.

4.) Postupci sa sjemenom

Postupci sa sjemenom odnose se na njegovo čišćenje od ostatka ploda i čuvanje, ali je najvažniji postupak stratifikacije kojim se skraćuje dormantnost sjemena i omogućuje njegovo brže klijanje.

4) Ispitivanje i selekcija potomstava

Ispitivanje i selekcija potomstava iz križanja je višegodišnji postupak u kojem se provodi evaluacija svih važnih gospodarskih svojstava. Početna populacija je relativno velika, ali selekcijski postupak je rigorozan tako da se veličina populacije smanjuje. Na kraju ostaje samo nekoliko najboljih križanaca koji se vegetativno razmnože i dalje ispituju u poljskim pokusima.

Najvažnija svojstva u oplemenjivanju voćaka i vinove loze

Urod i prinos po jedinici površine - važno je svojstvo ali nije primarno u oplemenjivanju voćaka i vinove loze, budući da je visina prinosa (kvantiteta) obrnuto proporcionalna kvaliteti plodova. Primjer za to je vinova loza: visok prinos najčešće znači nizak sadržaj šećera i loš omjer šećera i kiselina što su glavni parametri kvalitete.

Otpornost na bolesti i štetnike - selekcijom otpornih sorti i klonova smanjuje se potreba primjene kemijskih sredstava čime se smanjuje količina rezidua u plodovima, biljnim ostacima i tlu, čuva se

prirodna ravnoteža i korisna entomofauna, i ujedno se smanjuju troškovi proizvodnje. Ovo svojstvo može imati jaku marketinšku primjenu jer se proizvod može plasirati kao tzv. "*ekološku uzgojen*".

Otpornost na povremene ili stalne stresne utjecaje okoline - niske ili visoke temperature, nedostatak vlage, prevelika vlažnost tla, salinitet tla i sl. Svojstva iz ove grupe dobivaju na sve većoj važnosti zbog globalnog povećanja potreba za hranom, a i zbog toga što se urbanizacijom gube poljoprivredne površine zbog kojih se proizvodnja mora izmjestiti u područja s posebnim uvjetima tla i klime gdje su okolinski stresovi stalna prijetnja sigurnosti proizvodnje.

Prilagodba posebnim uvjetima klime može se postići indirektno korištenjem podloga adaptiranih na takve uvjete. Na **slici 3.** prikazan je uzgoj jabuke u sjevernim krajevima gdje niska (izrazito slabo bujna) podloga omogućuje prezimljavanje rodni izboja pod snijegom. Ovakve podloge kreirane za posebnu svrhu također su dobivene oplemenjivanjem i selekcijom.



Slika 3. Jabuka uzgojena na vrlo patuljastoj podlozi zbog prilagodbe uzgoja u ekstremnim uvjetima

Kvaliteta ploda - oblik, veličina i boja ploda, tekstura i boja mesa, omjer kiselina i šećera, prehrambena vrijednost. U zadnje vrijeme se sve više ističe bogatstvo pojedinih sorata vitaminima, mineralima i antioksidansima.

Mogućnost mehanizirane berbe - naročito važno za maslinu, vinovu lozu, višnju, tj. plodove koji su namijenjeni industrijskoj preradi (**Slika 4. i 5.**). Mogućnost mehanizirane berbe ovisi o čvrstoći i teksturi mesa ploda koja mora biti otporna na udarce i mehanička oštećenja.



Slika 4. Strojno branje maslina
(Izvor: www.froc.com.au)



Slika 5. Strojno branje grožđa
(Izvor: www.pacificpalate.com)

Opisivanje pojedinih svojstava u oplemenjivanju i selekciji voćaka i vinove loze

Osnovna pitanja su kako pristupiti opisu pojedinih svojstva sa ciljem dobivanja vjerodostojnog opisa sorata (genotipova, klonova) koje želimo analizirati. Važno je odrediti metodiku i način prikupljanja podataka, a podatke treba prikupljati u za to odgovarajućem vremenu, ovisno o razvojnem stadiju voćke ili trsa.

Proučavanje genotipa je posredno i uvijek se provodi preko fenotipa, bilo da se radi o proučavanju i opisivanju bilnog genetskog materijala koji će se koristiti za hibridizaciju (ulaznog materijala), materijala koji je rezultat hibridizacije (izlaznog materijala), ili materijala unutar kojeg se provodi klonska selekcija.

U postupku pronalaženja genetskog materijala koji bi se mogao iskoristiti u stvaranju novih sorata potrebno je utvrditi razliku između negenetske varijabilnosti i varijabilnosti koja je proizlazi iz genetske konstitucije i koja je naslijedna.

Svrha pravilnog pristupa i organizacije kod uzimanja podataka za analizu i opis pojedinih svojstava jest izbjagavanje negenetske varijabilnosti, odnosno njeno svođenje na najmanju moguću mjeru.

Negenetska varijabilnost je varijabilnost koja je vidljiva na fenotipskom izgledu, ali je uzrokovana biotskim i abiotskim faktorima koji nisu genetske prirode, tj. ne proizlaze iz genetske konstitucije promatrane jedinice (stabla ili trsa).

Čimbenici negenetske varijabilnosti su:

1. Virusi i viroidi, i opće zdravstveno stanje često mijenjaju izgled voćke, trsa ili ploda. Ovisno o vrsti virusa zaražena jedinka ima povećanu ili smanjenu bujnost (razlika u vigoru), može imati različit oblik ili veličinu ploda (**Slika 6. i 7.**), kvaliteta plodova je najčešće smanjena (sastav šećera, kiselina, nutritivnih tvari), a voćka ili trs je osjetljivija na napade drugih bolesti. Prisutnost virusa ponekad, kada to omogućuju ekološke prilike, može biti izražena na listu ili cijelom trsu (**Slika 8. i 9.**), no najčešće su virusi latentni i nevidljivi (za njihovu detekciju postoje biotehnoške metode: *ELISA* test, indeksiranje).



Slika 6. Plod trešnje zaražene virusom *Little Cherry Virus* (LChV) i usporedba sa zdravom (Izvor: www.bocu.ac.at)



Slika 7. Plod i list trešnje zaražene virusom *Cherry Twisted Leaf Virus* (ChTLV) (Izvor: www.bocu.ac.at)



Slika 8. List v. loze zaražene virusom *Grapevine Fanleaf Virus* (GrFV) (Izvor: www.agf.gov.ca)



Slika 9. Trs v. loze (Pinot crni) zaražen virusom *Grapevine Leafroll Virus* (GrLV) (Izvor: www.winegrapes.temu.edu)

2. Podloga na koju je cijepljena plemka sorte ima utjecaj na bujnost i vigor, ali i na vrijeme ulaska voćke ili trsa u pojedine fenofaze.
3. Ishranjenost voćke ili trsa u ekstremnim prilikama manifestira se kroz simptome vidljive na listu ili plodu koji su specifični za svako pojedino hranivo. Kod uobičajenih slučajeva pomanjkanje hraniva vidi se kroz smanjenu bujnost, veličinu i kvalitetu plodova.
4. Položaj - mikroreljef i mikroklima stvaraju razlike (modifikacije) u pojedinim svojstvima, npr. znatno viši sadržaj šećera u grožđu uzgojenom na južnim ekspozicijama u usporedbi sa manje povoljnim ekspozicijama.

Procjena jednog genotipa preko njegovog fenotipa svodi se na opažanje svojstava većeg broja jedinki (klonova) kroz veći broj mjerenja (u više navrata kroz višegodišnje pokuse) na više lokacija.

Većim brojem mjerenja kroz vrijeme i prostor smanjuje se utjecaj okoline na statistički opravdanu razinu, čime se povećava sigurnost i vjerodostojnost istraživanja.

Opažanja na razini fenotipa uključuju:

- fenotipska opažanja kojima se prate razvojne faze tijekom vegetacijske sezone (npr. kretanje vegetacije, početak cvatnje, puna zrioba i dr.),
- opažanja morfoloških svojstava (npr. postojanje dlačica na listu, oblik lista, oblik ploda, postojanje krilca na grozdu i dr.),
- mjerenja kvantitativnih svojstava (npr. udio šećera i kiselina u plodovima, udio vitamina, antocijana, masa ploda, randman ploda, dužina peteljke i dr.),
- opažanja otpornosti i tolerancije na bolesti i štetnike,
- opažanja koja se odnose na okolinske stresove (npr. otpornost i tolerancija na izmrzavanje u fazi mirovanja, otpornost na mraz u vrijeme kretanja vegetacije i cvatnje, otpornost na sušu).

Zbog dugotrajnosti procesa oplemenjivanja voćaka i vinove loze (višegodišnje kulture) samo pažljivo odabran i analiziran genotip može poslužiti kao početni materijal za kreiranje novih kultivara i podloga.

Primjeri u opisivanju pojedinih svojstava

Cvatnja

Cvatnja je fenofaza koja ima svoj početak, vrhunac i kraj, i odvija se po određenoj vremenskoj dinamici (**Slika 10.**). Kao vremenske referentne točke bilježe se datumi:

- početka cvatnje kada je otvoreno najmanje otprilike 10% cvjetova
- pune cvatnje kada je otvoreno otprilike 50% cvjetova
- kraja cvatnje kada je otvoreno do 100% cvjetova

Zapažanje se može izvesti brojanjem ili vizualnom procjenom na temelju iskustva, a kod procjenjivanja je bitno da procjenu vrši uvijek ista osoba kako bi se izbjegla eventualna razlika u opažanju između dvije ili više osoba.

U širem kontekstu, fenofaza cvatnje se prati od samog kretanja (bubrenja) generativnih pupove do zametanja plodova.



Slika 10. Fenofaze u cvatnji jabuke (Izvor: www.vegedge.umn.edu)

Procjena tolerantnosti na niske temperature

Tolerantnost na smrzavanje voćaka i vinove loze ovisi o razvojnoj fazi, a voćke su najosjetljivije u vrijeme kretanja vegetacije i cvatnje (kasni proljetni mrazovi) (**Slike 11a, b i c**). Zapažanja se vrše na vegetativnim i generativnim pupovima i izbojima, a u opisu oštećenja obično se koriste ocjene "izmrzao", "djelomično otporan" i "otporan".

Kritične temperature u vrijeme kretanja vegetacije pri kojima izmrzavaju vegetativni i generativni pupovi u otvaranju, kao i mladi tek zametnuti plodovi su za većinu voćnih vrsta -2 do -3 °C, no štete ovise i o trajanju izloženosti niskim temperaturama.



Slika 11 a, b i c: Prikaz šteta od izmrzavanja kod jabuke: djelomično izmrznuta gronja (a) u kojoj je stradao glavni, središnji cvijet; potpuno uništeni cvjetovi (b) i štete od mraza na razvijenom plodu kao posljedica smrzavanja tek zametnutih plodova (c). (Izvor: www.vegedge.umn.edu)

Štete od niskih temperatura su moguće i u vrijeme potpunog mirovanja vegetacije (tijekom zime), a zapažanja se izводе samo za neuobičajeno hladnih zima kad minimalna temperatura padne ispod -15 °C što ovisi o vrsti. U takvim kritičnim uvjetima prvenstveno stradavaju jednogodišnji izboji.

Procjena tolerantnosti na niske temperature kod izniklih sjemenjaka (u sklopu oplemenjivačkih programa kojima je cilj otpornost na niske temperature) moguće je provesti i u klima-komorama s mogućnošću regulacije temperature. U komore se mogu na određeno vrijeme smjestiti i biljni dijelovi (npr. granu u fazi cvatnje) kako bi se dobio uvid u tolerantnost.

Oplemenjivački programi mogu ići u smjeru vremenskog pomicanja fenofaza (kasnije kretanje vegetacije, kasniji početak cvatnje) čime se posredno izbjegava opasnost od niskih temperatura - ova metoda je primjenjiva kod selekcije sjemenjaka oraha (vrsta koje često strada od izmrzavanja). Kod nekih genotipova oraha postoje lateralni generativni pupovi koji kasnije ulaze u cvatnju čime izbjegavaju periode kritične niske temperature, pa oplemenjivanje može ići i u smjeru selekcije takvih genotipova.

Procjena otpornosti i tolerantnosti na bolesti

Postoje različite skale za ocjenjivanje stupnja zaraženosti (npr. *V. inaequalis* - **Slika 12. i 13.**, *E. amylovora*) nakon prirodne ili umjetne infekcije. Skale zaraženost se obično kreću u rasponu od 0-10, ili se zaraženost izražava u postotcima što je primjenjivo prilikom ocjenjivanja zaražene površine lista.



Slika 12. Infekcija *V. inaequalis* na listu
(Izvor: www.uky.edu; www.plante-doktor.dk)

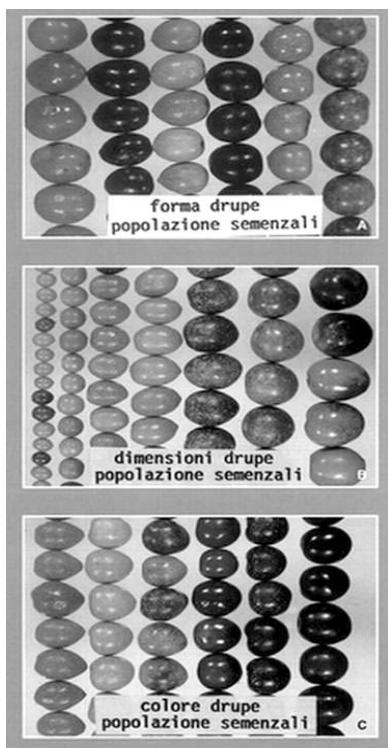


Slika 13. Infekcija *V. inaequalis* na plodu
(Izvor: www.uky.edu; www.plante-doktor.dk)

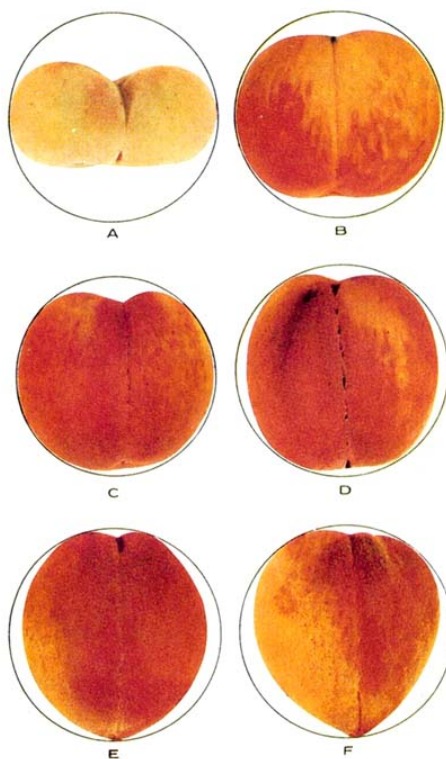
Veličina i oblik ploda

Veličina plodova (**Slika 14.**) izravno utječe na njihovo svrstavanje u kategorije prilikom plasmana na tržište. Plodovi jabuka koji imaju manje od 60 mm u promjeru nisu pogodni za stolnu upotrebu (takvi plodovi mogu proći samo za industrijsku upotrebu), a za stolnu upotrebu nisu najpogodniji niti suviše krupni plodovi. Promjer ploda se mjeri po horizontalnoj osi ploda.

Plod može biti različitog oblika (**Slika 15., 16. i 17.**), plosnat, više ili manje ovalan, izdužen (breskva), a ta karakteristika se opisuje omjerom visine i promjera ploda i izražava se u postotku. Na primjeru jabuke, ako je vrijednost manja od 65%, plod se smatra plosnatim, a ako je vrijednost oko 100% plod je izdužen.



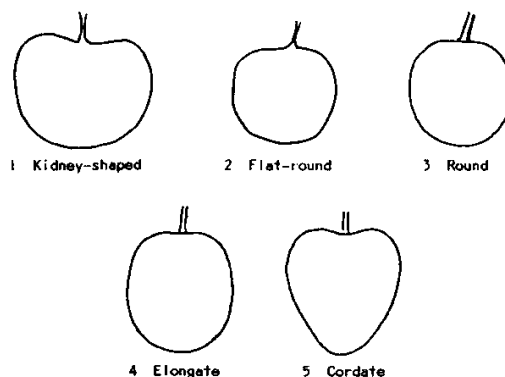
Slika 14. Razlike u obliku i veličini plodova masline



Slika 15. Razlike u izduženosti plodova



Slika 16. Razlike u obliku i veličini plodova avokada



Slika 17. Razlike u obliku plodova višnje i trešnje
(Izvor: www.ipgri.cgiar.org)

Randman ploda, jezgre ili mošta

Randman je važno svojstvo a predstavlja iskoristivi dio plodova voćaka i vinove loze. Kod vinove loze pod randmanom se smatra udio bobica u odnosu na peteljkovinu, ili udio mošta u odnosu na ukupnu masu grožđa. Kod koštičavog voća mjeri se randman (masa) mesa u odnosu na koštice, a kod lupinastog voća randman jezgre. Randman se uvijek izražava u postotcima.

Kod oraha randman jezgre mora biti veći od 45%, što znači da od ukupne mase plodova na iskoristivi dio (jezgru) otpada 45%. Najbolje sorte oraha imaju randman jezgre oko 50%.

Opća kvaliteta ploda

Opća kvaliteta ploda sa stanovišta potrošača može se ocijeniti degustacijom koju prati anketa, a u anketama se ocjenjuju svojstva koja su zanimljiva potrošačima: izgled ploda (privlačan oblik, boja), miris i okus ploda, aroma i sklad okusa. Ankete obično imaju nekoliko postavljenih pitanja (ne smiju biti preopširne), a čest pristup je i rangiranje plodova (potencijalnih sorata) u kategoriji pojedinih svojstava. Pitanja su, npr:

- ocjenite aromu ploda (a ocjene su od 1-3 ili 1-5)
- rangirajte ponuđene plodove prema jačini arome (pri čemu su plodovi označeni brojevima) od najboljeg do najlošijeg

Degustacije plodova u kojima sudjeluju potrošači su obično povezane uz izložbe (npr. "Dani jagoda" u Zagrebu ili "Dani trešanja" u Lovranu).

Zaključak

Oplemenjivački materijal za uvrštavanje u oplemenjivačke programe (ulazni materijal za križanja) ili oplemenjivački materijal koji je rezultat križanja ili klonske selekcije (koji ima potencijal sortnog ili klonskog priznavanja) može se izdvojiti samo na temelju točno opisanih i analiziranih svojstava.


Izboru materijala treba pristupiti vrlo rigorozno, jer raditi sa manjim brojem kvalitetnih potencijalnih genotipova je puno jednostavnije, učinkovitije i finansijski povoljnije.

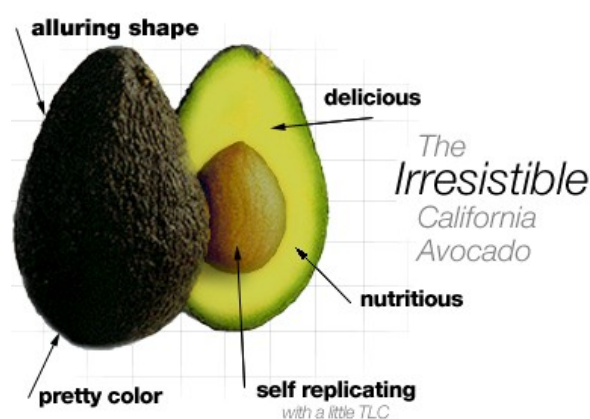
Materijal može biti vrhunski u pogledu pojedinih svojstava (npr. kvaliteta ploda ili adaptabilnost na nepovoljne uvjete klime i tla), ali ako je izrazito nepovoljan u drugim gospodarski važnim svojstvima (npr. osjetljiv na bolesti) on se odmah eliminira iz daljnjeg selekcijskog postupka. Eventualno, takav materijal se može sačuvati u kolekcijskim nasadima kao izvor gena povoljnih svojstava za buduće oplemenjivačke programe.

Stvaranje sorte kod voćaka i vinove loze je dugotrajan rad koji od postavljanja oplemenjivačkog programa sa točno definiranim ciljevima, preko uzgoja križanaca i njihove selekcije u mikro i makropokusima, pa sve do administrativnog priznavanja sorte, može potrajati više od deset, pa i 15 godina.

Nakon dugogodišnjeg oplemenjivačkog rada potreban je kvalitetan marketing da sorta bude prihvaćena na tržištu (**Slika 18.**).

Kao primjer kvalitetnog marketinga može se spomenuti sorta jabuke Pink Lady (**Slika 19.**) (dobivena selekcijom križanaca sorata Zlatni delišes i Lady Williams), s tim da marketing mora biti utemeljen na vrhunskim svojstvima nove sorte (www.pinkladyapples.co.uk, www.pinklady-europe.com).

Za sortu Pink Lady osmišljen je poseban zaštitni znak (logo): , uz sva zakonski zaštićena oplemenjivačka prava (intelektualno vlasništvo). Ova sorta se na tržištu tretira kao jaka robna marka i postiže cijene nekoliko puta veće u odnosu na uobičajene sorte.



Slika 18. Prikaz sorte avokada sa naglaskom na svojstva koja imaju snagu privlačenja kupca (Izvor: www.unc.edu)



Slika 19. Pink Lady (Izvor: www.pinkladyusa.com)

Hibridizacija u funkciji oplemenjivanja voćaka i vinove loze

Umjetnom hibridizacijom (križanjem) nastoji se proizvesti genetska varijabilnost u cilju dobivanja novih sorata voćaka i vinove loze koje bi imale poboljšana svojstva.

Dobivanje genetske varijabilnosti na ovaj način nije "stihijsko" i "slučajno", nego se planskim izborom roditeljskih parova nastoje obuhvatiti najvažnija svojstva koja želimo u novonastaloj sorti.

Kod provedbe umjetne hibridizacije postoje stanovite posebnosti koje razlikuju rad sa samooplodnim i stranooplodnim vrstama i sortama koje treba imati u vidu prilikom oplemenjivačkog rada, što će biti objašnjeno u daljnjem tekstu. Prilikom objašnjavanja tehnika križanja potrebno je krenuti od fenofaze cvatnje i građe generativnog organa za razmnožavanje - cvijeta.

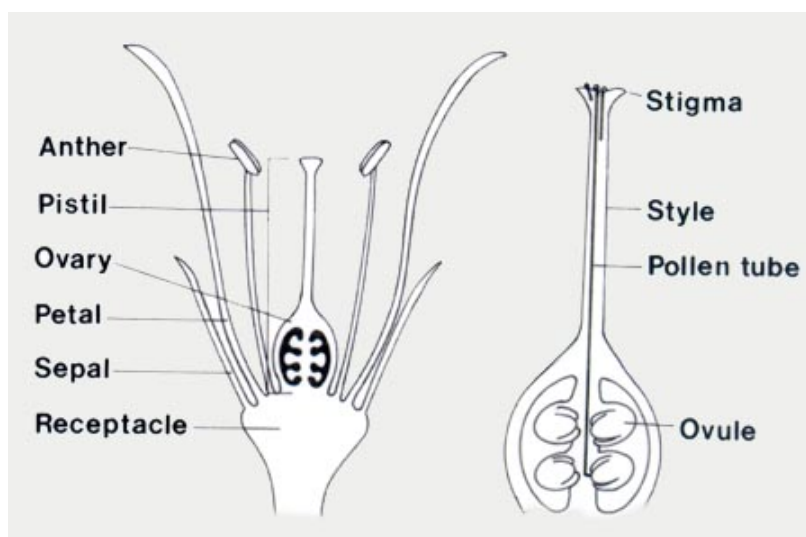
Cvatnja, samooplodnja i stranooplodnja

Cvijet (**Slika 20.**) je organ za spolno (generativno) razmnožavanje kod kritosjemenjača.

Razvija se iz cvjetnih (generativnih) pupova koji nastaju u prethodnoj vegetacijskoj sezoni.

Dva su osnovna elementa cvijeta koja sudjeluju u generativnom razvoju:

1. Tučak ili GINECEJ (ženski dio cvijeta)
2. Prašnici ili ANDRECEJ (muški dio cvijeta)



Slika 20. shematski prikaz građe cvijeta

Izvor: www.apsnet.org/education/illustratedGlossary/PhotosN-R/pistil.htm

TUČAK (eng. pistil) se sastoji od tri osnovna dijela: njuška tučka (eng. stigma), vrat tučka (eng. style) i plodnica (eng. ovule).

PRAŠNICI (eng. anther) - osnovni dio prašnika su polenovnice koje se nalaze na vrhovima dugih filamenata. Polenovnice se sastoje od dvije polutke (lat. thecae), a unutar svake se nalaze po dvije tzv. polenove vrećice u kojima se razvija polen.

Osim prašnika i tučka, cvijet se sastoji i od drugih važnih dijelova koji imaju svoju biološku funkciju, a to su:

- **Vjenčić** (corolla) koji se sastoji od latica (sepala), a pri dnu latica nalaze se žlijezde nektarije koje izlučuju nektar koji je mamac za insekte i ima funkciju u anemofilnom oprašivanju (prirodno oprašivanje kukcima)
- **Lapovi** - poredani su u čašku (calix)

Smještaj cvjetova na biljkama

Najčešće su cvjetovi dvospolni, tj. sadrže muške i ženske elemente (tučak i prašnike), i tada govorimo o hermafroditnim (dvospolnim, monoklini ili jednoložni) cvjetovima.

Postoje i jednospolni (diklini ili dvoložni) cvjetovi, a vrste koje imaju takve cvjetove mogu biti:

- monoecijske: ako su ženski i muški cvjetovi odvojeni na istoj biljci, kao što je slučaj kod oraha, lijeske i pitomog kestena (**Slika 21. i 22.**) kod kojih je muški cvijet u obliku rese koja daje velike količine polena i oprašuje se vjetrom (anemofilno)
- diecijske: postojanje biljaka koje nose odvojeno ženske i muške cvjetove (tada se govori o ženskim i muškim biljkama), kao kod kivija (**Slika 23. i 24.**) (*Actinidia* sv.) kod kojeg su ženski i muški cvjetovi vrlo slični, ali ženski imaju kratke nerazvijene filamente koji nemaju svoju funkciju.

Odvojenost spolova (monoecijske i diecijske biljke) jedan je od mehanizama koji u prirodi omogućuje stranooplodnju, a stranooplodnja osigurava genetsku varijabilnost u F1 generaciji.



Slika 21. Muški cvat - resa kod pitomog kestena (*Castanea sativa*) Izvor: www.kuleuven-kortrijk.be



Slika 22. Ženski cvijet kod pitomog kestena (*Castanea sativa*) Izvor: www.kuleuven-kortrijk.be



Slika 23. Ženski cvijet kivija (*Actinidia* sp.)
Izvor: www.cornhillnursery.com



Slika 24. Ženski cvijet kivija (*Actinidia* sp.)
Izvor: www.cornhillnursery.com

Samooplodnja i stranooplodnja

Samooplodnja (autofertilitet) je sposobnost sorte da nakon oprašivanja vlastitim polenom, tj. polenom sa istog stabla ili s bilo kojeg drugog stabla iste sorte (istog genotipa) zametne plod koji će imati razvijene sjemenke s embrijem.

Autofertilitet je kod voćaka rijetka pojava, a javlja se kod breskve, marelice, maline, ogrozda i ribiza. Većina ostalih voćnih vrsta i vinove loza su autosterilne, što znači da je za pravilan razvoj ploda i embrija potrebna sorta različitog genotipa i drugačije genetske konstitucije (sorta oprašivač).

Autofertilitet je u pravilu isključen kod jabuke, kruške, oraha, badema i smokve i starih tradicionalnih sorata trešnje (one su autosterilne i stranooplodne), dok su sorte šljive i višnje autofertilne do određenog stupnja i samo za neke sorte je potreban oprašivač.

Oplemenjivanjem je moguće unijeti gen za autofertilnost, a primjer su sorta jabuka Cox's Orange i novije sorte trešanja Lapins, Stella, Sweetheart.

Mehanizmi stranooplodnje

Stranooplodnja je u prirodi potrebna zbog osiguravanja genetske varijabilnosti i lakšeg prilagođavanja različitim okolinskim utjecajima. Stranooplodnja uzrokuje veću genetsku osnovu za prirodnu selekciju u procesu evolucije.

Postoje različiti mehanizmi kojima je u prirodi osigurana stranooplodnja.

1. Morfološki

Dvodomne biljke kod kojih su muški cvjetovi odvojeni od ženskih: orah, lijeska, pitomi kesten, kivi. Stranooplodnja, najčešće vjetrom i insektima, osigurana je fizičkom odvojenosti muških i ženskih cvjetova

2. **Dihogamija**

Dihogamija je svojstvo koje se odnosi na dinamiku sazrijevanja tučka i prašnika, kod kojeg ta dva osnovna dijela cvijeta sazrijevaju u različito vrijeme. Vremenskom odvojenosti osigurava se stranooplodnja

Protaginija - sazrijevanje tučka prije sazrijevanja prašnika - takav cvijet prima polen drugih genotipova ili sorata koje koji je zreo u isto vrijeme

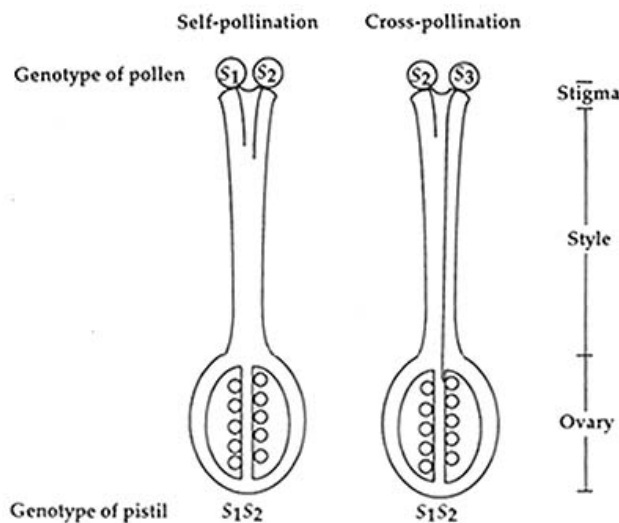
Protandrija - sazrijevanje prašnika prije sazrijevanja tučka - polen tog cvijeta služi za oprašivanje cvjetova drugih genotipova.

3. **Fiziološko-genetski**

Mehanizam stranooplodnje je postojanje multiplih *S* alela koji uzrokuje gametofitsku i sporofitsku inkompatibilnost.

U daljnjem tekstu ćemo objasniti gametofitsku i sporofitsku inkompatibilnost (varijante fiziološko-genetske inkompatibilnosti) i djelovanje *S* alela.

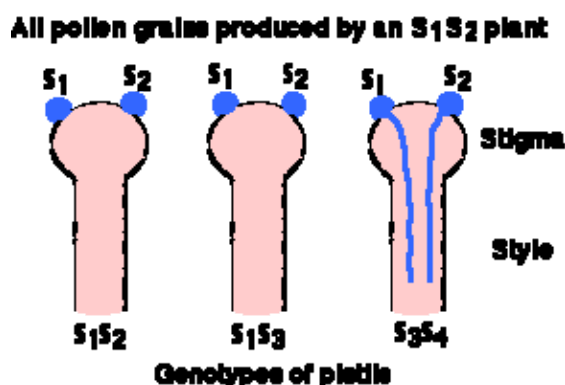
Gametofitska inkompatibilnost (Slika 25.) je genetsko svojstvo kontrolirano jednim lokusom (*S*-lokus) s više različitih alela (*S*-alela) koji se mogu nalaziti na tom lokusu u haploidnom tkivu polena. Do oplodnje može doći jedino u slučaju kada je *S* alel u haploidnom genomu polena različit od bilo kojeg *S* alela u diploidnom genomu tkiva njuške tučka. Postojanje *S* alela svojstveno je koštičavim vrstama: trešnja, šljiva, bajam. Geni na *S* lokusu su odgovorni za nastanak posebnih RNAza (enzimi koji razgrađuju RNA) iz skupine *S*-glikoproteina. Svojstvo samooplodnosti nastaje mutacijom gena koji kontroliraju sintezu RNAza i one gube svoju aktivnost.



Slika 25. Shema gametofitske inkompatibilnosti (Izvor: www.sccs.swarthmore.edu)

Mehanizam **sporofitske inkompatibilnosti** je složeniji (Slika 26.), a uzrokuje ju diploidno tkivo sporofitske generacije prije nastanka haploidnog polena tj. prije mejoze. U tom diploidnom tkivu (npr. S_1S_2) se stvaraju posebni proteini (SCR1 i SCR2) koji bivaju, budući da nastaju prije

trenutka mejoze, inkorporirani u ovoj oba haploidna polenova zrnca, i u S1, ali i u S2. U ovom slučaju S2 polen ne može proklijati na njuški tučka koja ima S1S3 genotip, i to upravo zato što S2 polen sadrži ne samo SCR2 protein, nego i SCR1 koji je identičan proteinu u vratu tučka i koji sprečava razvoj polenove mješine.



Slika 26. Shema sporofitske inkompatibilnosti (Izvor: www.sccs.swarthmore.edu)

Čest morfološki marker za sporofitsku inkompatibilnost jest heterostilija. Heterostilija sama po sebi nije uzrok samoinkompatibilnosti, ali je vezano svojstvo koje uvijek ide zajedno sa svojstvom samoinkompatibilnosti.

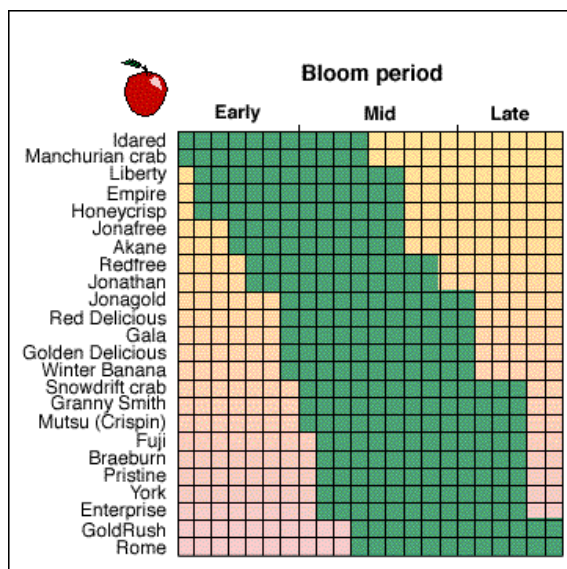
Sve autofertilne sorte mogu, osim sa polenom vlastitog genotipa, biti oplodene i polenom drugih sorata (što je važno u nastanku sorata), ali i kod samoinkompatibilnosti uvijek nalazimo manji stupanj autofertilnosti, što je uglavnom zanemarivo.

Samooplodnja u voćarskoj praksi

Samooplodnja je poželjna u voćarskoj praksi jer:

- omogućuje podizanje voćnjaka samo sa jednom sortom, što omogućuje smanjivanje manipulativnih i organizacijskih troškova kod sadnje i eksploatacije voćnjaka
- oprašivanje, a time i priroda, manje ovisi o vremenskim prilikama u vrijeme cvatnje - vremenske prilike se mogu u kratkom periodu cvatnje znatno pogoršati što onemogućuje let insekata (kiša, vjetar)
- samooplodnja se praktično koristi u selekciji i proizvodnji generativnih podloga (npr. vinogradarska breskva kao generativna podloga), a oplemenjivački postupci sa samooplodnim vrstama i sortama su drugačiji jer kod provedbe umjetne hibridizacije zahtijevaju emaskulaciju.

Kod izbora oparašivača nije potrebno samo paziti da sorta oparašivač ima genetski kompatibilan polen, nego i na vrijeme cvatnje koje mora biti podjednaka kod sorte oparašivača i glavnih sorata u voćnjaku (**Slika 27.**). Fenofaza početka i završetka cvatnje je genetski uvjetovano svojstvo jer kao što postoje sorte ranijeg ili kasnijeg dozrijevanja, tako postoje i sorte koje ranije ili kasnije cvatu, samo što interval cvatnje nije toliko širok kao interval zriobe. Kod stranooplodnih voćaka preporučljivo je locirati košnice blizu voćnjaka čime se znatno povećava sigurnost proizvodnje (**Slika 28.**).



Slika 27. Grafikon prikazuje vremensko preklapanje cvatnje pojedinih sorata jabuka prema kojem je moguće iskombinirati oparašivače



Slika 28. Organizirano dopremanje pčela u vrijeme fenofaze cvatnje znatno povećava učinkovitost oplodnje (Foto: A. Vokurka)

Tehnički koraci u provedbi planske hibridizacije

- postupci sa polenom: sakupljanje i čuvanje
- izolacija cvjetova
- emaskulacija cvjetova (kod samooplodnih (autofertilnih) vrsta sorata voćaka, kod v. loze)
- nanošenje polena na njušku tučka (plansko oparašivanje)
- postupci sa sjemenom dobivenim planskom hibridizacijom

Postupci sa polenom

Sa ciljem kvalitetne provedbe umjetnog oparašivanja potrebno je na vrijeme sakupiti polen sorte koja ima ulogu očinske sorte. To je ujedno i sorta koja ima pojedina svojstva koja prema oplemenjivačkom programu želimo imati i u novoj sorti, a nazivamu ju očinska sorta.

Većina voćnih vrsta ima vrlo kratak period cvatnje od svega nekoliko dana do najviše dva tjedna, što ovisi o vrsti (genetski je uvjetovano svojstvo) i okolinskim uvjetim (koje u znatnoj mjeri utječu na ekspresiju tog svojstva).

Neuobičajeno toplo vrijeme sa sniženom vlagom zraka može skratiti vrijeme cvatnje na dva do tri dana, i zato je važno da oplemenjivač koji izvodi umjetnu hibridizaciju raspolaže tehnikama koje bi mu omogućile izvođenje što većeg broja planskih križanja u što kraćem vremenskom periodu.

Kako bi se kratko vrijeme u kojem se može provesti hibridizacija što učinkovitije iskoristilo, uputno je imati ranije pripremljenu zalihu sakupljenog polena za korištenje u oplemenjivačkim programima. Do polena koji sadrže gene određenih svojstava moguće je doći i međunarodnom razmjenom, odnosno razmjenom između različitih institucija koje se bave oplemenjivanjem.

Sakupljanje polena kod jezgričavog i koštičavog voća

Polen se najčešće sakuplja tako da se odrežu grane na sorti (ili genotipu) kojeg želimo koristiti kao očinskog i to u vrijeme samog kretanja vegetacije, u fazi bubrenja pupova. Odrezane grane se drže u zatvorenom prostoru (laboratoriju ili stakleniku), u posudi sa vodom, na temperaturi od 20 - 25 °C, što je temperatura iznad one u prirodi. Na takvoj povišenoj temperaturi dolazi do bržeg, isforsiranog kretanja vegetacije. Grane moraju biti odrezane pod kutom od 45° jer se tako omogućuje bolje uzimanje vode. Kod jezgričavog voća (jabuka, kruška, dunja) svaka 3-4 dana preporučljivo je obnoviti rez i zamijeniti vodu. Koštičavo voće stvara veću količinu smolastih tvari, pa je rez obnavljanje reza potrebno provoditi svaki dan.

Moguće je odrezati i potpuno dormantne grane, no za forsiranje razvoja cvata kod takvih grana potrebno je i dva tjedna. Ako se uzmu grane koje su u fazi bubrenja cvijetova, za njihovo forsiranje potrebno je tek nekoliko dana.

Nakon isforsirane cvatnje cvjetovi se beru, najbolje tijekom fenofaze balona (**Slika 29.**). Uklone se latice cvijetova i pomoću žičanog sita (promjer oka 1,5 - 2 mm²) odvoje se antere. Antere koje prođu kroz sito sakupe se na bijelom papiru ili u plitkim papirnim kutijama. Zatim ih je potrebno osušiti pri temp. od 20 - 25°C, za što može poslužiti i laboratorijski termostat (inkubator), tj. uređaj koji zadržava željenu temperaturu kroz traženi vremenski period. Na toj temperaturi polenovnice (antere) se isuš, otvore se i oslobode polen koji takvim postupkom zadržava visok stupanj viabilnosti. Polen je moguće osloboditi i sušenjem antera na sobnoj temperaturi, za što je potrebno 24 - 36 sati.



Slika 29. Cvat jabuke (gronja). Strelicom su označeni cvjetovi u fazi balona kakvi se uzimaju za sakupljanje polena. Izvor: www.netstate.com

Čuvanje polena

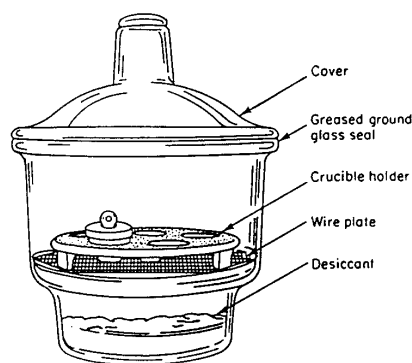
Polen se stavlja u plastične "tubice" (**Slika 30.**) (npr. *Eppendorf* tubice) ili papirne vrećice.

Polen se kratkotrajno, do nekoliko tjedana, može čuvati u desikatoru (uz anhidrirani CaSO_4) (**Slika 31.**) na temperaturi hladnjaka od $+4^\circ\text{C}$ (desikator se smješta u hladnjak). Pri temperaturi od -20°C polen se može čuvati nekoliko godina bez značajnog gubitka vijabilnosti.

U cjelokupnom postupku sakupljanja, čuvanja i rada sa polenom potrebno je biti sistematičan, pažljivo voditi bilješke i paziti da se polen različitih genotipove ne pomiješa, tj. da ne dođe do kontaminacije različitim polenom.



Slika 30. Plastične "tubice" u kojima je moguće držati sakupljen polen. Izvor: www.spexcsp.com



Slika 31. Desikator Izvor: www.ecs.umass.edu

Planska hibridizacija voćaka

Provedba planske hibridizacije zahtijeva ne samo poznavanje biologije (fiziologije cvatnje i građe cvijeta), nego i razumijevanje niza ekoloških čimbenika koji djeluju na vrijeme, dužinu i dinamiku cvatnje.

Za izvođenje svih postupaka u planskoj hibridizaciji (sakupljanje polena, emaskulacija, izolacija cvijeta, umjetno oprašivanje) potrebno je pravilno odrediti vrijeme u kojem se svaka pojedina operacija izvodi. Vrijeme izvođenja ovih postupaka određuje se prvenstveno na temelju biologije cvatnje.

Emaskulacija i izolacija cvijetova su osnovni postupci kojima se sprečava dolazak (prirodno donošenje) polena sa biljaka koje nisu predviđene u planskoj hibridizaciji.

Izolacijom se sprečava alogamno križanje, tj. dolazak polena nepoznatog porijekla na cvijet biljke koje je planom oplemenjivanja određena da bude majčinska. Izolacija cvjetova se provodi neposredno pred otvaranje cvijetova. Ako u vrijeme izolacije pokoji cvijet bude otvoren, potrebno ga je ukloniti jer nam nije poznato da li je već alogamno oprašen polenom nepoznatog porijekla koji je do cvijeta došao anemofilno (vjetrom) ili entomofilno (insektima).

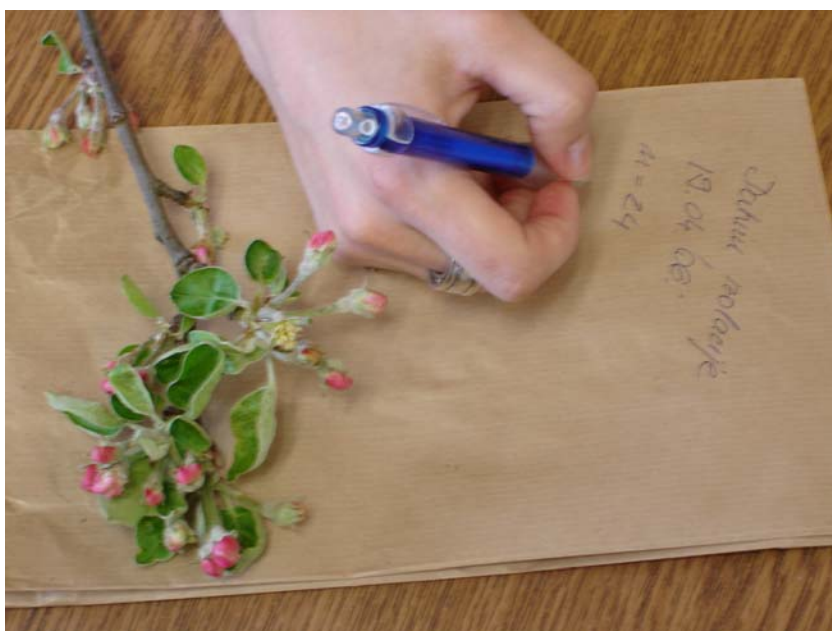
Za izolaciju se koriste papirnate vrećice različitih veličina koje je moguće lako pričvrstiti na granu voćke sa cvijetom (Slika 32. i 33.). Papirnate vrećice su prozirne, kroz njih prodire toliko svjetla koliko je potrebno za razvoj zametnutih plodova, a na njih se grafitnom olovkom mogu zabilježiti podaci o križanju (Slika 34.).



Slika 32. Izolacijske vrećice mogu se spojnica pričvrstiti na granu voćke (Foto: A. Vokurka)



Slika 33. Izolacijske vrećice mogu stajati na stablu nekoliko tjedana (Foto: A. Vokurka)



Slika 34. Na izolacijske vrećice mogu se grafitnom olovkom napisati podaci o broju izoliranih cvjetova i križanju (Foto: A. Vokurka)

Emaskulacijom (Slika 39.-40.) se sprečava oplodnja cvijeta majčinske biljke vlastitim polenom (samooplodnja) tako da se pravovremeno odstrane prašnici (ili samo antere). Emaskulacija je nužna kod autofertilnih sorata voćaka i kod vinove loze.

Emaskulaciju je moguće izvesti:

- **odstranjivanjem antera (polenovnica) ili cijelih prašnika:** češljem, odnosno malim škarama ili pincetom. Ovaj pristup zahtjeva brzinu jer postupak treba provesti u kratkom vremenskom roku kada su svjetovi već otvoreni, ali prije otvaranja (pucanja) samih antera.

Pri vrlo toplim i suhim vremenskim prilikama antere pucaju vrlo brzo, pa je i rok za provedbu emaskulacije vrlo kratak.

- **odstranjivanjem latica i prašnika:** škalicama ili pincetom, ili jednostavno prstima. Koristi se kad su cvjetovi neposredno pred otvaranjem, a da bi se uklonili prašnici potrebno je prije toga ukloniti i laticice.

Pri emaskulaciji potrebno je odstraniti nedovoljno razvijene cvjetove i cvjetove koji su već otvoreni, čime se ujedno postiže i prorijeđivanje cvatova.

Nakon emaskulacije samooplodnih cvjetova potrebno ih je izolirati jer samooplodni cvjetovi se također mogu oploditi i polenom koji dolazi sa strane. Međutim, ako se prilikom emaskulacije odstranjuju i laticice, tada izolacija nije nužna jer cvjet bez laticice ne može privući insekte - ali je ipak preporučljiva zbog zaštite cvijeta.



Slika 39. - 40. Prikaz emaskulacije cvijeta jabuke (Foto: A. Vokurka i studenti gen. 2005./06.)

Cvat kod jabuka i krušaka (gronja), trešnje i višnje (štitac) svakako je pred provođenje izolacije odnosno emaskulacije samooplodnih sorata potrebno prorijediti. Za uspješniju hibridizaciju odabiru se jače razvijeni cvjetovi, a to su uglavnom cvjetovi koji se nalaze na središnjem dijelu cvata.

Umjetno oprašivanje

Umjetnom oprašivanju pristupa se nakon što se prema planu hibridizacije obave sve pripremne radnje. Pripremne radnje kod samooplodnih, odnosno stranooplodnih voćaka uključuju sljedeće:

Samooplodne voćke: Emaskulirani cvjetovi (i eventualno izolirani ako prilikom emaskulacije nisu odstranjene latice, i ako cvjet želimo dodatno zaštititi).

Stranooplodne voćke: Izolacija cvjetova kako bi se spriječio dolaz polena nepoznatog porijekla.

Umjetnom oprašivanju pristupa se nekoliko dana nakon što je izvedena emaskulacija i izolacija, budući da je obje radnje potrebno obaviti 2-3 dana prije potpunog otvaranja cvijeta i vremena kad njuška tučka postaje spremna za prihvatanje polena.

Polen se na njušku tučku može nanijeti finim tankim kistom, staklenim štapićem, pumpicom, ili jednostavno prstom.

Osim gore spomenutih radnji na cvjetovima majčinskih biljaka, potrebno je na vrijeme imati sakupljen i pripremljen polen. Iznimno, polen se na njušku tučku majčinske biljke može nanijeti i izravno sa prašnika očinske biljke, tj. izravno sa ubranih cvjetova očinske biljke. Uvjet za takav pristup je istovremenost sazrijevanja polena i njuške tučka kod oba genotipa koje je potrebno iskrížati, tj. istovremenost fenofaza cvatnje.

Praktične vježbe

A: Provjera stupnja samooplodnje

Stupanj samooplodnje može se jednostavno provjeriti metodom izolacije cvjetova prema sljedećem postupku:

- prije cvatnje izolira se 100 (200 ili 300) cvjetova pergament vrećicama kako bi se spriječilo alogamno oprašivanje polenom nepoznatog porijekla i osiguralo oprašivanje tučka polenom istog cvijeta
- prilikom izoliranja cvjetova odstrane se slabije razvijeni cvjetovi i cvjetovi koji su već otvoreni
- precizno se izbroji koliko je cvjetova pod svakom vrećicom i taj broj se zapiše na vrećicu običnom grafitnom olovkom (jer je grafitna olovka najpostojanija na kiši i sunčevu svjetlu)
- zametnuti plodovi mogu se opaziti kroz 15-20 dana, a vrećice možemo skinuti kad na stablu više nema cvjetova
- zametnuti plodovi se pobroje, a stupanj samooplodnje se izražava kao postotak od ukupno izoliranih cvjetova prije izolacije

B: Utvrđivanje najboljeg oprašivača

Za ovu vježbu potrebno je imati unaprijed prikupljen polen sorata (npr. jabuke, šljive ili trešnje) za koje se pretpostavlja da bi bili dobri oprašivači nekoj stranooplodnoj sorti. Postupak je identičan kao i kod planske hibridizacije prema utvrđenom oplemenjivačkom planu.

- izolacija cvjetova neposredno pred otvaranje, s tim da se uklone cvjetovi koji su otvoreni jer za njih postoji vjerojatnost da su već oprašeni
- emaskulacija nije potrebna jer utvrđivanje najboljih oprašivača ima smisla samo za stranoplodne sorte kod kojih sprečavanje samooplodnje emaskulacijom nije potrebno
- nekoliko dana nakon postavljanja izolacije, u trenutku kad njuška tučka postane "zrela" za primanje polena, papirna izolacija se skine
- polen koji je unaprijed pripremljen nanosi se kistom, staklenim štapićem, pumpicom ili prstom na njušku tučka
- ovako oprašen cvijet ponovno se zaštititi papirnom vrećicom za izolaciju

Dormantnost i stratifikacija sjemena

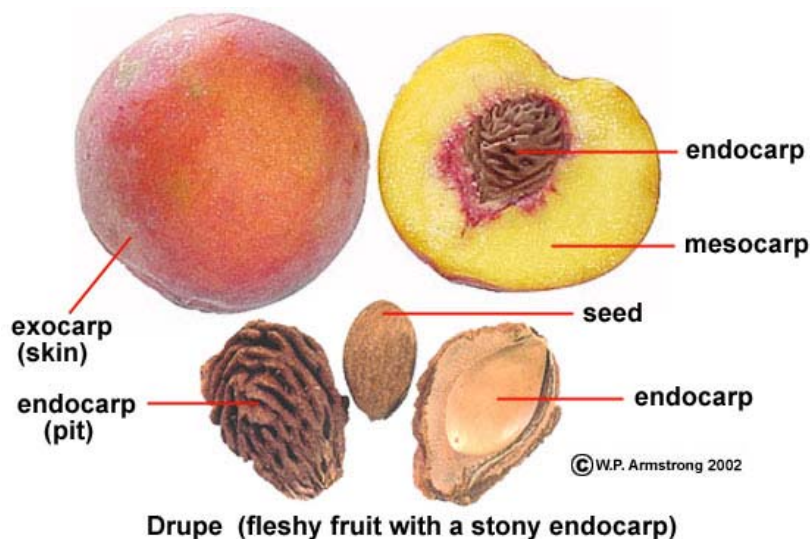
Dormantnost je jedan od najvažnijih faktora koji utječu na uspjeh klijanja sjemena i u proizvodnji križanaca je potrebno razumjeti fiziološke mehanizme koji djeluju na njeno trajanje.

Dormantnost je svojstvo sjemena da neko vrijeme nakon zriobe miruje - privremena nesposobnost klijanja u periodu jarovizacije (vernalizacije). Ovaj period se još naziva period naknadnog dozrijevanja sjemena (*afterripening*).

Dormantnost je fiziološki mehanizam prilagodbe razvijen kod biljaka umjerenog klimatskog područja kako bi u ranijim stadijima razvitka izbjegle nepovoljne prilike tijekom kasne jeseni, zime i ranog proljeća.

Dormantnost ima ulogu prevencije klijanja u nepovoljnim zimskim uvjetima što omogućuje preživljavanje potomstva.

Priroda dormantnosti nije u potpunosti razjašnjena - ranije se smatralo da je glavni uzrok dormantnosti čvrst endokarp (kod koštičavog voća - *Prunoideae*) (**Slika 41**), što je samo djelomično točno. Tvrd endokarp samo donekle usporava klijanje, jer otežava upijanje vlage i disanje, a glavni uzrok dormantnosti je kemijsko-fiziološke prirode.



Slika 41: Građa ploda koštičavog voća (Izvor: <http://waynesword.palomar.edu>)

Unutar sjemena nalaze se specifične tvari koje inhibiraju klijanje (koje se zajednički nazivaju dormeni), a pod utjecajem niskih temperatura te se tvari postupno razgrađuju.

Dvije vrste dormantnosti: **primarna i sekundarna.**

Primarna dormantnost je dormantnost prisutna u zreloom sjemenu u trenutku ubiranja ploda (kad je plod fiziološki zreo).

To je endogena dormantnost, koju uzrokuju kemijski činioci koji se nalaze u samom sjemenu - dormeni - kemijske tvari koje se nalaze u integumentima sjemenog zametka (iz kojeg nastaje zaštitni omotač sjemena), ali ih ima i u samom embriju.

Sjeme kojemu je dormantnost u primarnoj fazi ne može proklijati kad bi se i našlo u uvjetima pogodnim za klijanje (temperatura, vlaga, tlo) zato što su dormeni fizički prisutni u sjemenu (nisu se još razgradili pod utjecajem niskih temperatura). Dormeni sprečavaju klijanje, ali se pod utjecajem niskih temperatura tijekom zimskog perioda razgrađuju što omogućuje klijanje sjemena nakon što temperature porastu.

Tvari koje uzrokuju dormantnost su po kemijskom sastavu vrlo raznolike, a produkt su fizioloških i biokemijskih reakcija metabolizma: derivati benzojeve kiseline: ABA, salicilna i cimetna kiselina, kumarin, apscisinska kiselina i dr.

Sekundarna dormantnost je dormantnost koja onemogućuje klijanje i nakon razgradnje dormena, a uzrokovana je nepovoljnim ekološkim uvjetima kao što su previsoka ili preniska temperatura, ili nedostatak vlage u tlu. U ovakvim uvjetima sjeme ne može proklijati unatoč tome što su dormeni (primarna dormantnost) već razgrađeni utjecajem niskih temperatura. Čim ekološki uvjeti za klijanje sjemena postanu povoljni, a nakon što sjeme prođe stadij vernalizacije (jarovizacije) ili stratifikaciju, sjeme može proklijati.

Vernalizacija (jarovizacija):

je period u kojem je sjeme dormantno i tijekom kojeg postupno dolazi do gubitka dormantnosti u prirodnom okruženju.

Stratifikacija:

je biotehnički postupak kojim se skraćuje period dormantnosti i pospješuje brže i ujednačenije klijanje sjemena za potrebe rasadničarske proizvodnje (npr. generativnih podloga breskve) ili oplemenjivanja voćaka

Metode stratifikacije

- Čuvanje sjemena na suhom i hladnom mjestu.
- Čuvanje sjemena na vlažnom i hladnom mjestu - ova metoda se najviše koristi jer je učinkovita i jednostavna. Sastoji se od naizmjeničnog slaganja redova vlažnog pijeska ili piljevine i redova sjemena u plastične ili drvene sanduke koji se ostavljaju stajati od nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci uz povremeno polijevanje.
- Natapanje sjemena u kemijskim razrijeđenim otopinama (tiourea, KNO₃, polietilen glikol, sumporna kiselina, natrijev hidroksid, aceton, etanol)
- Mehaničko razbijanje tvrdog endokarpa
- Mehaničko struganje i grebenje sjemena - *skarifikacija*
- Kratko potapanje sjemena u kipućoj vodi
- odvajanje embrija od ostatka sjemenke

U praksi se koristi metoda držanja sjemena na hladnom i vlažnom mjestu, i eventualno skarifikacija (za što su konstruirani posebni uređaji), dok ostale metode imaju ograničenu i uglavnom eksperimentalnu primjenu. Niske temperature mogu imati različit efekt ovisno o tome koliko sjeme upije vlage.

Svi postupci kod kojih nije uključena niska temperatura ne mogu zamijeniti djelovanje niskih temperatura na sjeme, već samo donekle omogućuje klijanje. Praksa je pokazala da sjeme nakon perioda od 2-3 godine ima bolju klijavost nego sjeme koje je prošlo kroz proces stratifikacije i koje je posijano iduće vegetacijske sezone, ali u proizvodnji se ne može čekati.

Kod temperature od 0-10 °C, prirodno mirovanje sjemena pojedinih vrsta traje od 36 do 180 dana, ali pojedine sjemenke i znatno dulje. Prema različitim literaturnim navodima, prirodno trajanje dormantnosti sjemena pojedinih vrsta je varijabilno, a ovisi i o genotipu (genetski je uvjetovano svojstvo):

Jabuka	76 - 120 dana
Kruška	74 - 119 dana
Trešnja	90 - 143 dana
Višnja	180 dana
Šljiva bistr.	100 - 149 dana
Breskva	70 - 117 dana

Stratifikacija sjemena *Prunoidea*

Tijekom stratifikacije simuliraju se prirodni uvjeti kojima je sjeme inače izloženo u prirodi preko zime. Optimalna temperatura za stratifikaciju *Prunoidea* je u interval između 3 i 5 °C, u trajanju od nekoliko mjeseci.

Prema nekim autorima ovu temperaturu treba u nekoliko intervala izmjenjivati sa višom temperaturom zbog uspostave ravnoteže između rasta korjenčića i hipokotila (na nižim temperaturama korijen puno brže raste od hipokotila). Osim toga, topli intervali omogućuju slabije razvijenim embrijima da se u potpunosti razviju.

Stratifikacija sjemena *Pomoidea*

Dormantnost je u *Pomoidea* zbog nepostojanja tvrdog endokarpa nešto slabije izražena nego kod koštičavog voća, pa su i postupci za njeno uklanjanje blaži. Dormantnost svježeg sjemena jabuka i krušaka se gubi ukoliko ga podvrgnemo hladnoj stratifikaciji na 3-5 °C u trajanju od 6 mjeseci.

Za sjeme izdvojeno iz potpuno zrelih ili čak natrulih jabuka dovoljan je kraći period stratifikacije nego za sjeme iz plodova nižeg stupnja zrelosti.

Kod krušaka je ustanovljena jača dormantnost sorata koje su porijeklom iz klimata sa hladnijim zimama, dok stratifikacija sorti iz toplijeg klimata traje kraće i odvija se pri nešto višim temperaturama, što je logična pojava jer dormantnost i služi za sprečavanje klijanja tijekom zime.

Dormantnost se kod sjemena jabuke može prekinuti uklanjanjem ovojnice sjemena a da se sjeme ne podvrgne hladnoj stratifikaciji. Biljke iznikle iz takvog sjemena pokazuju patuljast ili rozetast rast, sa kratkim internodijima - nakon nekoliko mjeseci poprimaju normalan rast. Za većinu sorata krušaka i jabuka skidanje ovojnice nije dovoljno za prekid dormantnosti - ono može samo skratiti dormantnost.

Da bi se postigla klijavost od 50% na 25 °C, prema nekim literaturnim navodima cijelo sjeme jabuke traži 65 dana hladne stratifikacije na 3-5 °C, a oguljeno samo 30 dana. Kemijska sredstva za uklanjanje dormantnosti kod jabuke i kruške nisu dala dobar rezultat.

Teško je reći koji je optimalni period za hladnu stratifikaciju kod Pomoidea zbog velike genetske varijabilnosti u duljini dormantnosti.

Planska hibridizacija kod vinove loze

Kod vinove loze se tradicionalne tehnike oplemenjivanja također temelje na saznanjima o razvoju i morfološkoj građi cvijeta, oplodnji i klijanju sjemena. Posebnost vinove loze je postojanje tri osnovne vrste cvijeta.

- 1.) Dvospolni (hermafroditni) cvijet (**Slika 42. i 43.**) ima razvijene prašnike i tučak i samooplodan je. Ovakav cvijet je najčešći kod vinove loze.



Slika 42. Dvospolni cvijet vinove loze (Izvor: www.nysaes.cornell.edu)



Slika 43. Cvat vinove loze (grozd) (Izvor: www.nysaes.cornell.edu)

- 2.) Pistilarni cvijet - funkcionalno ženski cvijet. Filamenti prašnika su nerazvijeni i svinuti su prema dolje. Polen takvih cvjetova se morfološki razlikuje od normalnog polena (nema poru i brazdu po kojoj polen puca prilikom klijanja na njušci tučka). Sorte sa ovakvim cvjetovima zahtijevaju drugu sortu oparašivača, a primjer su neke naše autohtone sorte: Grk i Muškat ruža.
- 3.) Staminalni cvijet (**Slika 44.**) - morfološki i funkcionalno muški cvijet kod kojega do zastoja u razvoju tučka dolazi u različitim fazama nastanka embrionske vreće (megasporogeneze). Kod nekih genotipova embrionska vreća se uobičajeno razvija samo što je upola manja, ali se ne razviju ostali dijelovi tučka potrebni za oplodnju.



Slika 44. Staminalni cvijet koji nema razvijen tučak (Izvor: www.nysaes.cornell.edu)

Primjena citokinina na reguliranje cvatnje:

Dodatak citokinina u ranim fazama nastanka embrionske vreće može promijeniti ravnotežu inhibitora (kod staminalnih cvjetova), tako da se tučak ipak može normalno razviti, što može imati praktičnu primjenu u oplemenjivanju.

Primjena citokinina kod pistilarnih cvjetova da bi se dobili hermafroditni, ne daje rezultate.

Dinamika cvatnje vinove loze

Cvatnja (otvaranje cvjetova) je najintenzivnije između 6 i 11 sati prije podne, a popodne samo sporadično.

Emaskulacija i kontrolirana hibridizacija (praktična vježba):

Postupak je prikazan na slikama 45. - 48.

1. emaskulacija: prije otvaranja cvjetova otkinuti pincetom kapicu i prašnike na 20-30 cvjetova po grozdu, a ostale ukloniti (prorijedivanje cvata)
2. izolirati grozdove emaskulirane cvatove (cvatove majke)
3. čekati 1-2 dana za oplodnju kako bi tučak bio zreo za primanje polena
4. oprašivanje nanošenjem prethodno sakupljenog polena kistom ili prstima



Slika 45. Skidanje kapica i emaskulacija
Izvor: www.nysaes.cornell.edu



Slika 46. Nanošenje polena kistom Izvor: www.nysaes.cornell.edu



Slika 47. Izgled grozda (cvat) kojem su uklonjene polenovnice. (Izvor: www.nysaes.cornell.edu)



Slika 48. Polen se može nanositi i izravno sa cvijeta očinske biljke Izvor: www.nysaes.cornell.edu

O križanjima vinove loze može se više saznati na:
www.nysaes.cornell.edu/hort/faculty/reisch/breeding/crossing1.html

Skraćivanje juvenilnog stadija kod vinove loze

Juvenilni stadij je vremenski period koji počinje nicanjem sjemenjaka iz sjemena, a završava zametanjem prvih generativnih (cvjetnih) pupova i uolaskom u rod.

Upravo juvenilni stadij je najvažniji čimbenik dugotrajnosti u oplemenjivanju voćaka i vinove loze, i cilj je skratiti ga na najmanju moguću mjeru prilikom ispitivanja sjemenjaka.

Juvenilni period kod vinove loze traje od 3 - 6 godina, a može se skratiti na različite načine.

1. U uvjetima staklenika uz rezidbu koja stimulira nastanak rodnih pupova.
2. Okuliranje - uzimanje pupova i plemki juvenilnih biljaka i njihovo okuliranje na trsove koje su u fazi rodosti
3. Primjena citokinina - na vegetativni vrh biljke križanca uzgojene u loncu djeluje se citokininima što dovodi do nastanka fertilnih cvatova, na mjestima gdje bi se inače razvile vitice.

Na taj način moguće je dobiti cvjetove već 4 tjedna nakon klijanja sjemena.

Somatske mutacije i klonska selekcija vinove loze

Prirodne i inducirane mutacije su važan izvor varijabilnosti kod vinove loze. Prirodni mutanti su rezultat promjene u genimu stanica meristemskog tkiva iz kojih započinje razvoj organa (vidljive mutacije) - pojava novog svojstva ili poboljšanje postojećeg svojstva često je rezultat pozitivne mutacije.

Klonske sorte su sorte nastale kao vegetativni potomci jednog genotipa. Takve sorte, pogotovo ako su već dugo u uzgoju (stotinu i više godina) i ako su rasprostranjene na širem geografskom području nakupile su veliku količinu mutacija (vidljivih ili latentnih). Takve sorte su somatski heterogene i dobar su izvor genetske varijabilnosti unutar kojeg se može provoditi klonska selekcija.



Slika 49. Pinot crni



Slika 50. Pinot sivi

Mutacije se najvidljivije kao promjene u boji bobica, razlike u obliku lista, obraslosti dlačica, promjeni veličine ploda, i ovakve mutacije je lako uočiti unutar polazne populacije. Grupa sorata Pinot (Bijeli, Sivi, Crni) (**Slika 49. i 50.**), kao i neki besjemeni mutanti koji su zanimljivi kod stolnog grožđa, nastali su uočavanjem prirodnih mutacija unutar postojećih populacija.

Postoje i mutacije koje imaju utjecaj na fenološka svojstva (npr. ranija ili kasnija zrioba) ili svojstva koja utječu na kvalitetu (sadržaj šećera i kiselina, visina prinosa). Promjene u ovakvim svojstvima teže se uočavaju, ali ih je moguće zapaziti redovitim promatranjem fenofaza ili mjerenjima (kemijske analize mošta, vaganje).

Ponekad male fenotipske razlike slične klonskim proizlaze i od djelovanja virusa i viroida ali i zbog djelovanja abiotičkih faktora. Ovo je negenetska varijabilnost koju treba razlikovati od genetske nasliedne varijabilnosti.

Ocjenjivanje svojstava i odabir potencijalnih klonova za priznavanje provodi se po razrađenim shemama klonske selekcije tijekom koje se većina početno odabranih kandidata eliminira.

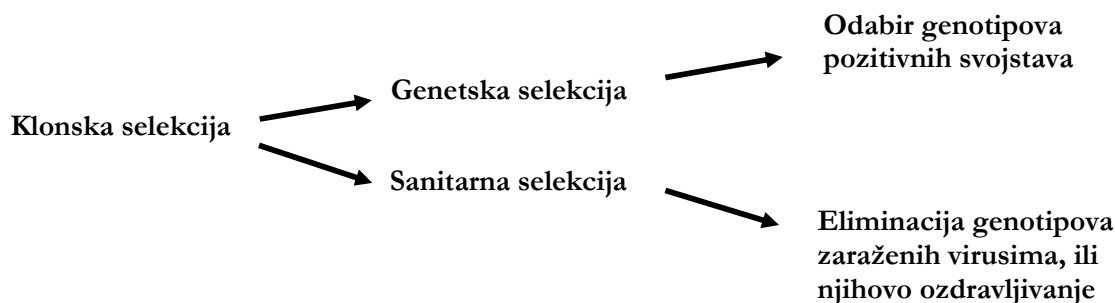
Nova ili poboljšana svojstva moraju imati ekonomsku važnost - u početnim koracima klonske selekcije izabiru se superiorni "potencijalni klonovi", a nakon višegodišnjeg ocjenjivanja njihovih svojstava eventualno se pristupa proceduri administrativnog priznavanja klona i puštanju u proizvodnju.

Tijekom klonske selekcije potrebno je eliminirati materijal koji je zaražen virusima i virusima sličnim organizmima, jer klonovi koji će se priznati i uvrstiti u rasadničarsku proizvodnju kao matični trsovi moraju biti bezvirusni (*virus free*).

Unutar populacija koje su se tradicionalno razmnožavale cijepljenjem plemki uzetih iz proizvodnih vinograda (a ne od matičnih trsova koji su rezultat klonske selekcije), osim trsova sa pozitivnim mutacijama postoje i trsovi zaraženi virusima kakve je potrebno eliminirati. Eliminacija takvih genotipova provodi se sanitarnom selekcijom, koja je uz genetsku selekciju jednako važna komponenta klonske selekcije.

Ako među genotipovima koji imaju neka dobra gospodarska svojstva ima onih koji su zaraženi virusima, može se pristupiti biotehnološkim metodama njihova ozdravljanja (termoterapija, kultura tkiva). Ove metode su ponekad skupe, pa dobra gospodarska svojstva i potencijal genotipa mora opravdati njihovu primjenu.

Ozdravljanju nekom od biotehnoloških metoda može se pristupiti i u slučaju očuvanja starih sorata koje su na granici izumiranja, što je čest slučaj kod hrvatskih autohtonih sorata.



Lista svojstava za opis vrsta *Vitis* i sorata *Vitis vinifera* - lista deskriptora

Međunarodna organizacija za vinovu lozu i vino (OIV) napravila je standardizirani popis svojstava i ocjenjivanja tih svojstava sa ciljem da se osigura jedinstvo u ocjenjivanju i izbjegne subjektivnost.

Svako svojstvo je označeno kodom (brojem) i za svako svojstvo postoje razine ekspresije koje se označavaju brojevima od 1 do 9 (u nekim slučajevima i 10).

Za svako svojstvo je točno definirano vrijeme opažanja tj. razvojni stadij u kojem se vrši opažanje, što je od iznimne važnosti za pravilnu provedbu ocjenjivanja. Za svaku razinu ekspresije se kao primjer navodi sorta ili vrsta koja se odlikuje upravo tom razinom ekspresije, a pojedina morfološka svojstva i njihova različita ekspresija prikazani su crtežom.

Promatranje svojstava obavlja se vizualno ili drugim osjetilima (miris, okus), a kvantitativna svojstva se mjere i svrstavaju u razrede prema razini ekspresije. Svojstva kao što su otpornost na bolesti i štetnike, visina prinosa, udio šećera u moštu potrebno je pratiti kroz više godina.

Popisom je obuhvaćeno 128 morfoloških i kvalitativnih svojstava koja se u praksi najčešće sva ne koriste, nego postoje minimalne liste koje određuju svojstva obavezna za određeni cilj. Za kolekcioniranje germplazme i osnivanje "banaka gena" postoji minimalna lista od 21 svojstva (tzv. primarni deskriptori).

Primjena molekularnih tehnika u detekciji mutacija i identifikaciji sorata

Molekularne tehnike u detekciji mutacija i identifikaciji sorata zasnivaju se na analizi DNA, a osnovni uvjet za DNA analizu je postojanje kvalitetna DNA, tj. izolirane (ekstrahirane) na način da se analiza može provesti na najbolji mogući način.

Što znači “kvalitetna DNA” ?

- što manje primjesa koje onečišćuju (polifenoli, polisaharidi)
- što manji stupanj razlomljenosti DNA
- što veća koncentracija DNA

Kvaliteta DNA varira ovisno o

- vrsti s kojom se radi
- metodi ekstrakcije (postoje razne modifikacije)
- stanju uzorka (način uzimanja i čuvanja, starost uzorka)

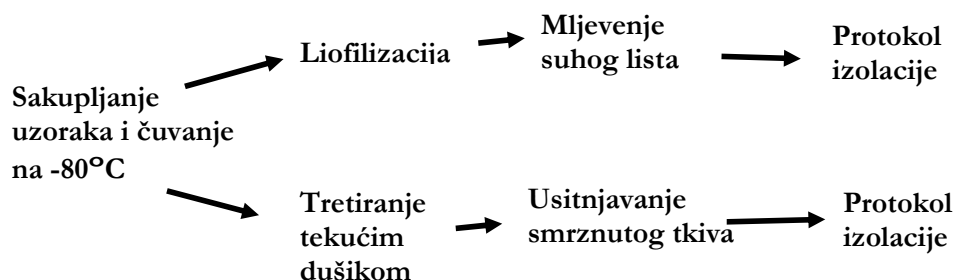
Uzorke DNA za rutinsku analizu najbolje je uzimati početkom vegetacije kada je list još mlad. U stanicama mladog lista vakuole su još male i u njima nema puno nakupljenih sekundarnih produkata metabolizma (polifenoli, polisaharidi) koji onečišćuju uzorak i otežavaju optimizaciju PCR reakcije.

Uzorci se sakupljaju tako da se ubere list (nekoliko mladih listova) i stavi između filter papira u običnu plavu papirnatu kuvertu. Kovertu je potrebno označiti kodom uzorka i imenom sorte, a potrebno je napisati datum sakupljanja. Nekoliko takvih kuverti stavlja se u PVC vrećicu i u prijenosni hladnjak u kojem uzorci mogu stajati nekoliko sati do dolaska u laboratorij. Uzorci mogu stajati i nekoliko dana u hladnjaku na temperaturi od +4°C.

U laboratoriju se uzorci odlažu u zamrzivač s temperaturom od -80°C (**Slika 51.**) u kojem se mogu čuvati i više godina, odnosno do trenutka izolacije. Ovako niska temperatura sprečava degradaciju DNA.

Princip izolacije DNA

Priprema za izolaciju nakon sakupljanja i čuvanja uzoraka može se odvijati na dva načina:



Sušenje lisnog tkiva odvija se u vakuumu u uređaju koji se zove liofilizator (**Slika 52.**), a traje od jednog do nekoliko dana. Sušenje u vakuumu sprečava degradaciju DNA čime se postiže visoka koncentracija uzorka DNA nakon izolacije. Suhi uzorak se samelje u fini prah (**Slika 53.**) koji se inkubira u izolacijskom puferu, ovisno o daljnjem protokolu izolacije.

Drugi način pripreme uzoraka je njihovo tretiranje tekućim dušikom koji prilikom isparavanja ima temperaturu od -196°C na kojoj se tkivo trenutno smrzne i moguće ga je lagano zdrobiti.



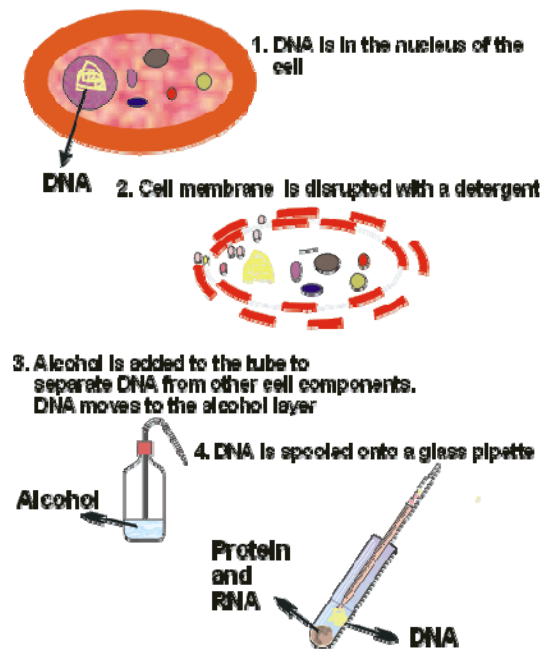
Slika 51. Čuvanje uzoraka lista na temp. od -80°C (Foto: S. Bolarić)



Slika 52. Liofilizator (Foto: S. Bolarić)



Slika 53. Uređaj za mljevenje suhog lista (Foto: S. Bolarić)



Slika 54: Osnovni princip izolacije DNA

Osnovni princip izolacije DNA (Slika 54.):

1. inkubacija u izolacijskom puferu (deterđent - CTAB, DTAB i dr.) (Slika 55.)
2. odvajanje DNA od ostalih komponenti (proteini, RNA, polifenoli i polisaharidi)
3. daljnje ispiranje DNA u alkoholu
4. resuspendiranje u puferu i provjera čistoće i koncentracije DNA
5. čuvanje uzorka DNA na -20 °C

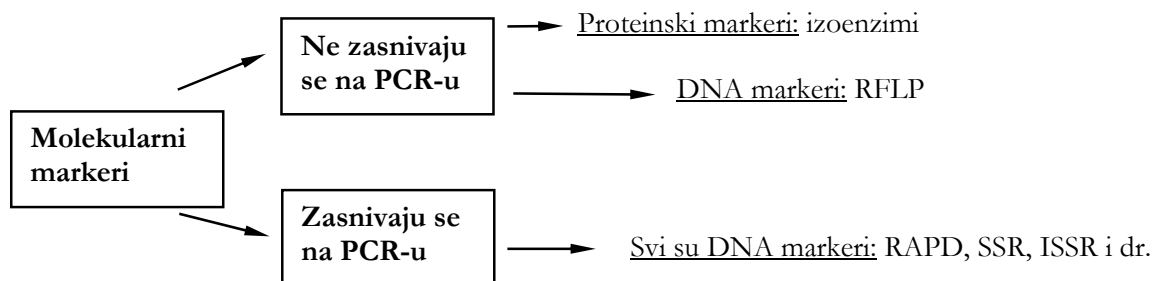


Slika 55. Inkubacija uzoraka u izolacijskom puferu (Foto: S. Bolarić)

Uvod u molekularne markere

Molekularni markeri: proteini, enzimi ili dijelovi kromosoma (fragmenti DNA) koji su specifični za neki genotip i imaju specifičnu mobilnost u električnom polju.

Još 1970ih godina su se razvile tehnologije molekularnih markera koje se baziraju na proteinima i na DNA, ali bez njenog umnažanja u lančanoj reakciji polimeraze (PCR - *Polymerase Chain Reaction*).



Izoenzimi:

- Izolacija proteina (ne DNA)
- Elektroforeza proteina - razdvajanje proteina prema veličini u električnom polju
- Ova metoda se napušta jer postoje nove metode zasnovane na PCR-u koje su jednostavnije, informativnije i preciznije

RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

- Potrebna je veća količina DNA (jer nema PCR amplifikacije) koja se tretira DNA endonukleazama koje cijepaju lanac DNA
- Elektroforezom se u gelu razdvajaju fragmenti - dobiva se neprekidan “razmaz” koji sam po sebi ne nosi korisnu informaciju
- U gelu se u postupku “*southern blot*” označuju pojedini fragmenti, i to pomoću specifičnih radioaktivno označenih proba koje se “lijepe” na njima komplementarne fragmente u gelu
- Tako označen gel se vizualizira radiogramski - rendgenska slika

PCR - *Polimerase Chain Reaction* (Lančana reakcija polimeraze)

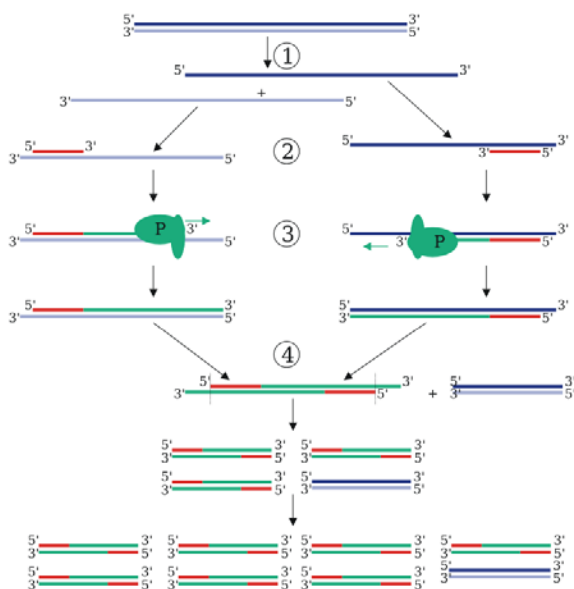
Ovaj postupak je označio revoluciju u molekularnoj biologiji i drugim znanostima koje primjenjuju metode molekularne biologije. Bit lančane reakcije polimeraze je umnažanje fragmenata DNA koje se odvija geometrijskom progresijom (1 - 2 - 4 - 16 - 256 itd.), čime se povećava broj lanaca DNA različite dužine koji se nakon razdvajanja u električnom polju (elektroforeza) mogu vizualizirati (UV svjetlo nakon bojanja posebnim bojama ili radiografski).

PCR se sastoji od tri osnovne faze:

1. denaturacija: razdvajanje dvostrukog lanca DNA na 94 °C čime se omogućuje nalijeganja oligonukleotidnog *primera*
2. nalijeganje oligonukleotidnih početnica ili *primera* (annealing) pri temp. od 50-68 °C na njima komplementarna mjesta na DNA.
3. amplifikacija ili elongacija (amplification / extension) pri 72 °C pri čemu dolazi do produljenja (elongacije) novonastalog lanca ugradnjom deoksinukleotida (građevne jedinice za DNA)

PCR reakciju (**Slika 56.**) je potrebno optimizirati ovisno o biljnoj vrsti, kvaliteti DNA, sustavu molekularnih markera i početnicama koje se koriste.

Svaki od ovih koraka traje od 30 do 120 sekundi, a ciklus se ponavlja 20 - 40 puta. Reakcija se odvija u aparatu tzv. *thermocycleru* (**Slika 57.**) kojeg je moguće programirati i koji omogućuje brzu izmjenu temperatura pojedinih koraka.



Slika 56: Shematski prikaz PCR reakcije.

- (1) Denaturacija na 94-96°C
- (2) Nalijeganje oligonukleotidnih početnica
- (3) Produljenje lanca na 72°C (P=Taq polimer.).
- (4) Završetak prvog ciklusa.

Dva novonastala lanca DNA služe kao kalup za slijedeći ciklus udvostručujući količinu novonastale DNA

(Izvor: www.wikipedia.org)

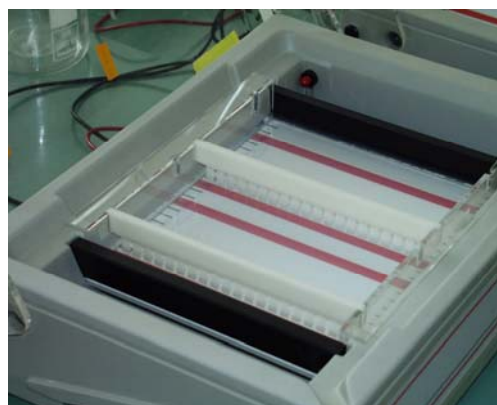
Komponente koje su sastavni dio PCR reakcije:

- 1.) **DNA** - služi kao "kalup" na osnovu kojeg u reakciji nastaju novi fragmenti koji se kasnije razdvajaju u električnom polju u procesu elektroforeze.
- 2.) **Deoksinukleotidi** (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) koji su "građevne jedinice" koje služe za nastanak novog lanca (dužeg ili kraćeg fragmenta)
- 3.) **Početnice (primeri)** - oligonukleotidni lanci tzv. klice (prema Stryerovom udžbeniku za biokemiju) dužine 10 - 25 baza. Primeri naljezu na osnovni lanac i amplifikacija DNA ide smjerom 3' → 1' Primeri, da bi mogli nalijegati na osnovnu DNA, moraju biti u tom segmentu od 10 - 25 baza homologni osnovnom lancu.
- 4.) **Taq polimeraza** (čita se "Tag") - enzim čijim djelovanjem, uz prisustvo svih ostalih komponenti nastaju novi fragmenti. Enzim podnosi temperature i do 98°C, a izoliran je iz bakterije *Thermus aquaticus* koja obitava u toplim izvorima podzemnih voda (nacionalni park Yellowstone)
- 5.) **MgCl₂** - magnezijev ion ima ulogu kofaktora bez kojeg polimeraza ne može raditi
- 6.) **Pufer** - pufer ima određeni kemijski sastav koji osigurava optimalan pH pod kojim se odvija cijela reakcija
- 7.) **BSA** - *bovine serum albumine* ima ulogu pojačivača reakcije, no nije neophodan u reakciji

Sve ove komponente su komercijalno dostupne, neke su vrlo skupe (Taq polimeraza), osim DNA koju je potrebno analizirati i koju prethodno treba izolirati iz uzorka svježeg ili liofiliziranog lisnog tkiva.



Slika 57. Uređaj za umnažanje DNA (*Thermal cycler*)
(Izvor: www.wikipedia.org)



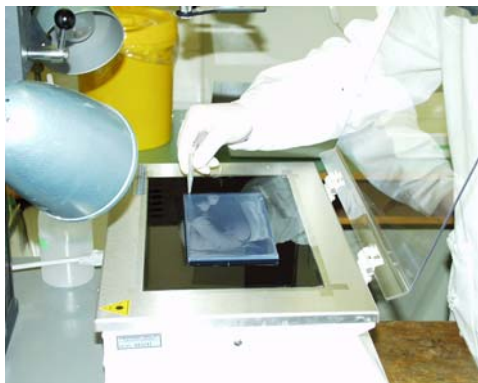
Slika 58. Sustav za elektroforezu "Gibco"
(Foto: A. Vokurka)

RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*)

Kod ove metode umnažamo (amplificiramo) fragmente DNA, i to randomizirano, "napamet", i nije nam unaprijed poznato koliko ćemo fragmenata dobiti, koje su oni dužine..., i da li ćemo ih uopće dobiti.

Kod različitih uzoraka (genotipova) dolazi do amplifikacije DNA na različitim mjestima pri čemu nastaju fragmenti različitih dužina koji u elektroforezi prevladavaju različite putove. Ovo je primjer slike koja nastaje primjenom RAPDa, a slična je i za ISSR i AFLP

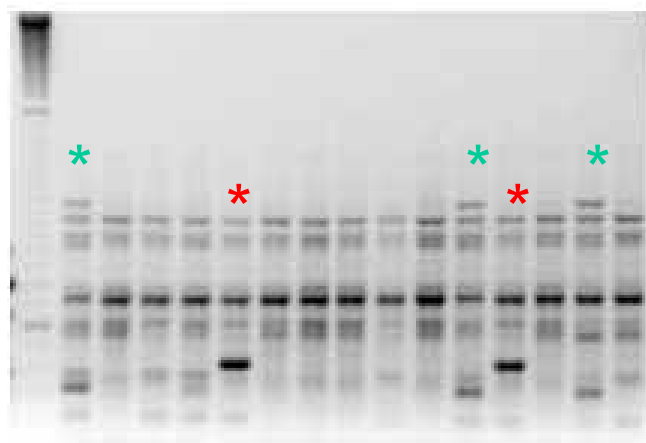
- Manja količina DNA se amplificira PCR reakcijom
- Početnice su nespecifične, slučajno odabrane, što znači da amplificiraju nepoznatu regiju DNA
- Elektroforeza produkata na agaroznom gelu (**Slika 58.**)
- Bojanje gela u ethidium bromidu, vizualizacija fragmenata preko UV transiluminatora (**Slika 59. i 60.**) i očitavanje fotografije (**Slika 61.**).



Slika 59. Namještanje agaroznog gela na UV transiluminator (Foto: A. Vokurka)



Slika 60. Priprema za fotografiranje Polaroid kamerom (Foto: A. Vokurka)



Slika 61 Izgled gela sa RAPD markerima nakon elektroforeze, bojanja i osvjetljivanja UV svjetlom. Zvezdicama su označeni genotipovi koji imaju pojedine specifične markere

SSR (*Simple Sequence Repeats*)

Ovom metodom se amplificira tzv. mikrosatelitska DNA. Primjer mikrosatelitske DNA jest npr AGAGAGAGAGAGAGAG... ili ATATATAT... n puta, pri čemu je $n=50 - 150$, što se označava kao $(AG)_n$ ili $(AT)_n$. Mikrosatelitska regija ima 100 do 300 baza.

Za pojedine mikrosatelite potrebno je unaprijed dizajnirati početnice koji će naliježati neposredno uz mikrosatelit i omogućiti amplifikaciju samog mikrosatelita. Dizajniranje početnica je poseban postupak koji se zasniva na određivanju slijeda baza u DNA (sekvencioniranje).

SSR regija

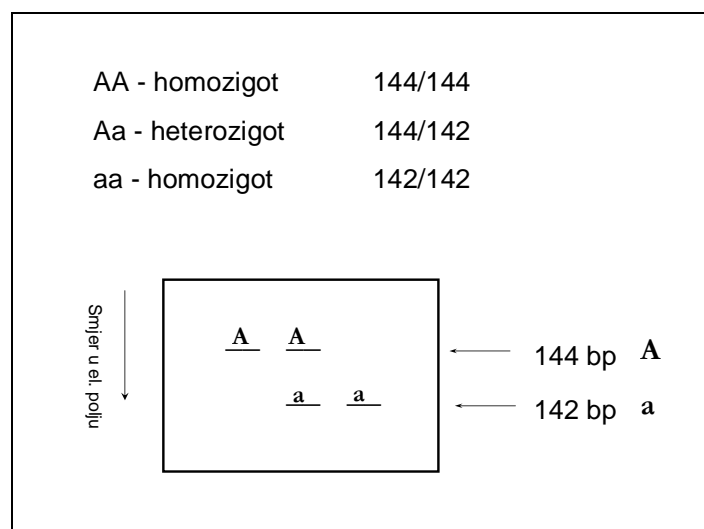
ACTCGGGCTTTTAATGGCATATATATATAT...

Početnica: TGAGCCCGAAAATTACCG

Mikrosatelitska regija kod diploidnih organizama može biti istovjetna na oba kromosoma (AA ili aa = dominantni ili recesivni homozigot), ili različita (heterozigot = na jednom kromosomu A što predstavlja duži lanac, a na drugom kromosomu a , ili kraći lanac). Varijabilnost se detektira na osnovu dužine mikrosatelita: sorte se razlikuju u broju parova mikrosatelitskih baza, a mogu biti heterozigoti ili homozigoti - pomoću ove činjenice moguće je dokazivanje očinstva

Na donjoj shemi vide se tri uzorka, prvi je dominantni homozigot (AA), zatim heterozigot (Aa), i zadnji je recesivni homozigot (aa). U elektroforezi kraći lanac (142 baze) prevladuje duži put u el. polju, dok duži lanac (144 baze) u istom vremenu prevladuje kraći put. Heterozigot (Aa) sadrži oba lanca, duži i kraći, što se vidi na gelu nakon razdvajanja fragmenata.

- Manja količina izolirane DNA se amplificira u PCRu
- Početnice su specifične, amplificiraju regiju mikrosatelita
- Elektroforeza produkata na poliakrilamidnom gelu, ili na sintetskom *Spreadex* gelu
- Bojanje gela Sybr-gold ili Sybr-green bojama i vizualizacija fragmenata preko UV transiluminatora



Slika 62: Analiza mikrosatelita (SSR) i princip određivanja roditeljskih veza

ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*)

U metodi se koriste primeri koji naliježu na mikrosatelitsku regiju, dakle za razliku od mikrosatelita, ne amplificiraju se mikrosateliti, nego regije DNA između mikrosatelita, dok mikrosatelitska regija služi kao "sidro" za primer. Dobiva se slika slična RAPDu.

AFLP (*Amplified Fragment Length Polimorphism*)

Ova metoda je nešto zahtjevnija jer se izolirana DNA prvo tretira restrikcijskim enzimima (*MseI* i *EcoRI* su najčešći) - nastaje čitav niz fragmenata nepoznatih slijedova na čije krajeve se "nakače" adapteri poznatog slijeda. Adapteri su potrebni jer je njihov slijed poznat, a svrha im je da se na osnovu adaptera u reakciji koriste homologni primeri koji na njih naliježu, i od kojih dalje kreće amplifikacija pojedinih fragmenata.

- Zahtjeva DNA velike čistoće i nefragmentiranu
- DNA se prvo tretira restrikcijskim endonukleazama, npr. *MseI* i *EcoRI*, ali postoje i druge
- Pomoću specijalnih adaptera amplificira se zona neposredno uz područje djelovanja endonukleaze tako da početnice prepoznaju adapter
- Vertikalna elektroforeza u poliakrilamidnom gelu
- Početnice su označene radioaktivno (radiogramska vizualizacija), ili se poliakrilamidni gel boji u srebrnom nitratu

Da li fragmenti ("crtice" ili markeri) nastali u PCRU predstavljaju i pojedina svojstva?

Odgovor je i DA i NE, ali ipak najčešće ne. Naime, svojstva ili fenotip kao rezultat djelovanja okoline i gena je rezultat samo jednog malenog dijela genoma koji predstavlja gene i koji se transkribira u proteine. Najveći dio genoma ne predstavlja gene, nego ima neku drugu funkciju, za sada nepoznatu (to je evolucijski zaostatak DNA, i moguće je da takva DNA koja se ne transkribira ima ulogu u npr. strukturi kromosoma i dijeljenju stanica).

Ipak, jedna "crtica" u gelu može predstavljati svojstvo u slučajevima kad se amplificirana regija nalazi u zoni dijela DNA koji predstavlja gen, ili ako je dovoljno blizu njega tako da crossing-overom ne dolazi do razdvajanja (vezana svojstva). Takvi markeri su iznimno važni u oplemenjivanju bilja, naročito u višegodišnjih vrsta, jer omogućuju brži oplemenjivački rad i brže izdvajanje pojedinih genotipova samo na osnovu DNA analize.

Zašto su ipak važni i ostali fragmenti koji nužno ne predstavljaju svojstva?

Važni su zbog toga što služe kao "osobna karte" ili "fingerprint" svakog pojedinog genotipa na osnovu kojih se obavlja identifikacija sorata - važno je u kontroli sadnog materijala i u rasadničarstvu.

Mogu poslužiti i u oplemenjivačke svrhe za procjenu genetskih sličnosti i različitosti pojedinih populacija, što može biti važno prilikom odabira roditelja. Molekularni markeri se koriste i za stvaranje genskih mapa.

Ograda: Nekoliko fotografija kojima nije naveden izvor ili su djelo autora, ili izvor zbog tehničkih razloga nije bilo moguće navesti, a da pri tome nije bila namjera oštetiti ničija prava. Skripta nije rađena zbog komercijalne dobiti, a koristit će se samo za edukacijske svrhe.

Disclaimer: Several photographs which do not have quoted its source are author's own work or, due to technical reasons, the quotation of its source was not possible, with no intention to harm any rights. The manuscript was not written for commercial gain and will be used only for educational purposes.