

Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2015/9



## ZAKLJUČNO POROČILO CILJNEGA RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

### A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

#### 1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

<b>Šifra projekta</b>	V4-1116
<b>Naslov projekta</b>	Razvoj novih sort oljnih buč
<b>Vodja projekta</b>	9565 Borut Bohanec
<b>Naziv težišča v okviru CRP</b>	2.03.02 Razvoj novih sort oljnih buč
<b>Obseg raziskovalnih ur</b>	1667
<b>Cenovni razred</b>	C
<b>Trajanje projekta</b>	10.2011 - 09.2014
<b>Nosilna raziskovalna organizacija</b>	481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
<b>Raziskovalne organizacije - soizvajalke</b>	482 Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede
<b>Raziskovalno področje po šifrantu ARRS</b>	4 BIOTEHNIKA 4.03 Rastlinska produkcija in predelava 4.03.01 Kmetijske rastline
<b>Družbeno-ekonomski cilj</b>	08. Kmetijstvo
<b>Raziskovalno področje po šifrantu FOS</b>	4 Kmetijske vede 4.04 Kmetijska biotehnologija

#### 2. Sofinancerji

Sofinancerji	
1.	Naziv
	Naslov

## B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

### 3. Povzetek raziskovalnega projekta<sup>1</sup>

SLO

V okviru CRP projekta smo zbrali obširen genofond oljnih buč, ki so bila po izvoru ali tuje akcesije in sorte oziroma lastni (znotrajvrstni in medvrstni) križanci pridobljeni v žlahtniteljskih poskopkih prof. dr. Antona Ivančiča preteklih let. Zbrani genofond bo omogočil nadaljnje žlahtnjenje oljnih buč z namenom vnosa ciljnih lastnosti. Podrobno smo proučili zgradbo semenske ovojnice in na tej osnovi smo izvajali selekcijo tudi v smeri brezklorenhimskih buč. Izvedli smo podrobno genetsko analizo sorodnosti zbranih akcesij in ugotovili, da se lokalni tradicionalni sorti 'Slovenska golica' in 'Gleisdorfer Ölkürbis' le minimalno razlikujeta, medtem ko se novopožlahtnjeni hibridi podjetja Saatucht Gleisdorf, Avstria, od njiju močno ločijo. Razvili smo primeren postopek *in vitro* vzgoje embrijev za pospešitev generacijskega ciklusa in opozorili na tehnične zahteve za doseganje dveh generacij na leto. Izvedli smo obsežne poskuse pridobivanja inbridiranih haploidnih linij s postopki ginogeneze. Pri postopkih, kjer smo ginogenezo izzvali z uporabo pseudo-oploditve z obsevanim pelodom smo dosegli delni uspeh, pridobili smo namreč določeno število haploidnih rastlinic. Žal kljub precejšnji optimizaciji postopkov nismo dosegli zadostnega števila podvojenih haploidnih linij, uspešno pridobljene linije pa so kazale izrazito inbriding depresijo. Delni neuspeh indukcije haploidov pripisujemo morfološkim značilnostim bučnega peloda, ki je izrazito velik in kot tako zelo občutljiv na izsuševanje med obsevanjem. Izvedli smo več ciklov selekcije v preteklih letih pridobljenih križancev in izdvojili linije z izboljšanimi lastnostmi, kot na primer linije, ki se po svetlosti barve plodov močno ločijo od obstoječih. Barva plodu ima močan vpliv na propad semen ob vročih poletjih zaradi pregrevanja. Ena od odbranih linij bi lahko bila v kratkem predana v sortno potrjevanje. Dodatno smo merili koncentracije in sestavo tokoferolov, pigmentov, cisteina, glutationa in askorbatov v bučnem semenu in ugotovili znatno povečanje skupnih tokoferolov pri linijah, ki izvirajo iz medvrstnih križancev.

ANG

Within the CRP project we have collected an extensive germplasm collection of oil pumpkins that were either foreign accessions and varieties or hybrids or were derived from our own (intra-and interspecific) breeding attempts (dr. A. Ivancic) in previous years. This germplasm will serve for further breeding attempts of oil pumpkins aimed at the introduction of targeted properties. We examined in detail the structure of the seed coat types present and on this basis a selection in the direction of lines with none testa layer was initiated. We performed a detailed genetic analysis of collected accessions and found that the local traditional varieties 'Slovenska golica' and 'Gleisdorfer Ölkürbis' differ only minimally, while recently breed

hybrid cultivars bred by seed-company Saatzucht Gleisdorf, Austria, were genetically diverse. We have developed a suitable process of *in vitro* embryos cultivation in order to accelerate the generation cycle and we drew attention to the technical requirements needed to achieve two generations per year. We conducted extensive experiments to obtain haploid inbred lines through gynogenesis. In procedures where gynogenesis was induced by the use of pseudo fertilization with irradiated pollen partial success was achieved, namely a certain number of haploid plantlets did develop. Unfortunately, despite considerable optimization of procedures a sufficient number of DH lines was not achieved and plantlets also suffered from severe inbreeding depression. This partial failure is most likely attributed to the morphological characteristics of pumpkin pollen. During project we also carried out several cycles of selection and gained hybrids and lines with improved properties, including selection of lines with altered pumpkin color (bright colors). We demonstrated that fruit color might have an impact on the collapse of the seeds in hot summers. One of the lines could be shortly submitted to variety testing. In addition, we measured the concentration and composition of tocopherols, pigments, cysteine, glutathione and ascorbates in pumpkin seeds and found a significant increase in total tocopherols and changed ratio between isomers in favor of  $\alpha$ -tocopherol in the lines derived from interspecific crosses.

#### 4. Poročilo o realizaciji predloženega programa dela na raziskovalnem projektu<sup>2</sup>

Pridelovanje oljnih buč se v Sloveniji in Avstriji povečuje, vendar pridelki stagnirajo oz. celo upadajo zlasti zaradi zastarelega sortimenta. Vse do nedavnega je bil izbor sort oljnih buč zelo omejen, med njimi ni bilo hibridnih kultivarjev, ki pa so močno razširjeni pri drugih tipih buč. Rezultat avstrijskega žlahtnjenja je nekaj novih sort oljnih buč, med njimi so tudi prvi hibridi, ki do zdaj v Sloveniji niso bili konkurenčni stari populacijski sorti 'Slovenska golica', ki pa ni več optimalna sorta, prav tako je vprašljiva tudi njena genetska čistost. Izhodišče projekta je bila potreba po vzpostavitvi lastnega sortimenta oljnih buč, katerih pridelava je dolgoletna slovenska tradicija.

Za dosego dolgoročnih žlahniteljskih uspehov je bil namen CRP projekta zbrati ustrezen genofond oljnih buč in drugih sorodnih vrst buč, potencialno uporabnih za žlahtnjenje oljnih buč, izboljšati metodiko križanja in samooplojevanja, povečati učinkovitost selekcije, dodelati metode pridobivanja čistih linij ter ugotavljanja učinkov heteroze.

##### *Semenski material*

Za namen zbiranja ustreznega genskega materiala buč smo naročili semena vrste *Cucurbita pepo* iz šestih genskih bank. V zbirko smo dodali še druge vrste rodu *Cucurbita*, lastne žlahniteljske linije in semena komercialnih sort oljnih buč podjetij Semenarna Ljubljana (SLO), Saatzucht Gleisdorf (AUT) in H.S.C. New Zealand.

Zbrali smo preko 51 akcesij buč *Cucurbita pepo* iz štirinajstih držav, 3 sorodne vrste rodu *Cucurbita* (*C. argyrosperma*, *C. moschata*, *C. okeechobeensis*) ter številne medvrstne križance med *C. pepo* in ostalimi vrstami rodu *Cucurbita*.

#### *Tipi semenskih ovojníc in njihove strukture*

Zbrane vzorce semen smo vizualno pregledali in jim določili tip semenske ovojnice glede na barvo semenske ovojnice, stopnjo in način razporeditve lignificiranih delov ovojnice ter glede na debelino semenskega roba. Zbrane akcesije buč so imele dvanajst različnih tipov semenskih ovojníc od divjega tipa z dobro razvitimi in lignificiranimi vsemi petimi plastmi semenske ovojnice pa do popolnoma golih semen, ki niso bila prekrita z nobeno plastjo semenske ovojnice. Zgradbo različnih tipov semenske ovojnice smo analizirali z vrstičnim elektronskim mikroskopom, rezultati so bili podrobno opisani v Murovec in sod. (2012) in Podržaj (2012).

#### *Analiza genetske variabilnosti*

Za izbor genetsko različnih akcesij buč golic, ki bodo oz. so že vključene v žlahtniteljski proces, smo opravili genetsko analizo zbranih akcesij z 18 mikrosatelitnimi markerji iz članka Gong et al. (2008). V analizo smo vključili 51 akcesij buč, od vsake akcesije po 5 rastlin.

Analiza je pokazala genetsko variabilnost tako med kakor znotraj akcesij. Po pričakovanjih so rezultati pokazali največjo genetsko sorodnost med hibridnima sortama 'Gleisdorfer Opal' in 'Gleisdorfer Diamant', oba požlahtnjena v žlahtniteljskem podjetju Saat-zucht Gleisdorf, Avstria. Velika genetska sorodnost se je pokazala tudi med slovensko populacijsko sorto 'Slovenska golica' in avstrijsko populacijsko sorto 'Gleisdorfer Ölkürbis'. Rezultati so podrobno opisani v Murovec (2015).

#### *Reševanje nezrelih embrijev*

Za pospeševanje žlahtniteljskega procesa smo preizkusili reševanje nezrelih embrijev s kulturo *in vitro*. V ta namen smo 4 tedne po opráševanju iz 1.150 steriliziranih semen izolirali nezrele embrije ter jih gojili v *in vitro* pogojih na gojišču E20A (Sauton and Devaulx 1987) v rastni komori pri  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Poskusi so bili uspešni, saj so embriji v tkivni kulturi dozoreli in kalili ter so bili kasneje tudi uspešnoaklimatizirani. Vendar večina aklimatiziranih rastlin v rastlinjaku ni pravočasno zacvetela, zato iz njih nismo uspeli pridobiti naslednje generacije.

#### *In vitro ginogeneza*

Za vzpostavitev metode pridobivanja homozigotnih linij v eni generaciji, smo v

letu 2012 preizkusili ginogenetsko odzivnost 11 različnih akcesij buč. V ta namen smo inokulirali 299 razrezanih plodnic na 3 različna indukcijska gojišča ter inkubirali 4 dni na  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ . Regenerirali smo 2 rastlini, ki smo ju analizirali s pretočno citometrijo in molekulskimi markerji s čimer smo ugotovili, da sta bili obe rastlini somatska regeneranta.

#### *Opraševanje z obsevanim pelodom*

Preizkusili smo tudi tehniko indukcije haploidov z opraševanjem z obsevanim pelodom, saj se je v predhodnih poskusih (Košmrlj et al. 2013) izkazala kot uspešno pri oljnih bučah. V letu 2013 smo v poskuse vključili tri komercialne sorte oljnih buč ('Gleisdorfer Ölkürbis', 'GL Opal', 'GL Maximal'). Opravili smo 167 opraševanj s pelodom obsevanim z različnimi dozami »mehkih« X žarkov (od 300 Gy do 600 Gy). Ob opraševanju in v rednih tedenskih intervalih smo del plodov tretirali z rastnim regulatorjem 4-CPPU ali z rastnim regulatorjem 2,4-D. Štiri tedne po opraševanju smo nabrali plodove in aseptično izolirali embrije. Embrije smo gojili na gojišču E20A pod kontroliranimi pogoji. Regeneriranim rastlinam smo izmerili velikost genoma s pretočnim citometrom. Iz 261 uspešno oprašenih cvetov smo izolirali 275 embrijev, iz katerih smo regenerirali 198 rastlin. Dve sta bili haploidni, vseh preostalih 196 rastlin je bilo diploidnih.

V letu 2014 smo na osnovi rezultatov iz prejšnjega leta v poskuse vključili le rastline sorte 'GL Opal', ki smo jih opraševali s pelodom obsevanim s 100, 200 in 300 Gy »trdih« X-žarkov. Ob opraševanju in v rednih tedenskih intervalih smo del plodov tretirali z rastnim regulatorjem 4-CPPU. Ponovili smo enak postopek izolacije, gojenja in testiranja embrijev. Iz 36 uspešno oprašenih cvetov smo uspeli izolirati 1.031 embrijev, vse iz opraševanj s pelodom obsevanim z najnižjo dozo 100 Gy. Od 592 regeneriranih rastlin je bila samo ena haploidna, preostalih 99,83 % je bilo diploidnih.

Ugotovili smo, da je s preizkušenima metodama indukcije haploidov (*in vitro* ginogeneza iz leta 2012 in opraševanje z obsevanim pelodom iz let 2013 in 2014) sicer možno pridobiti haploidne rastline, vendar je odstotek nizek. Haploidne rastline so tudi zelo šibke rasti (najbrž posledica inbriding depresije) in zato niso dovolj uspešne za praktično uporabo v žlahtnjenju oljnih buč.

#### *Križanja in selekcija*

Neposredno žlahtnjenje je obsegalo samooplodnje, običajna, povratna in populacijska križanja s ciljem oblikovanja fenotipsko in genotipsko čim bolj različnih materialov (linij, hibridov in populacij). Zaradi klimatskih sprememb povezanih predvsem z vročinskim stresom, smo se odločili spremeniti barvo ekzokarpa, saj se plodovi s svetlejším ekzokarpom manj segrevajo. V žlahtnjenje so bili vključeni nosilci bele, belo-rumene, rumene in sivo-zelene barve ekzokarpa, rumenega in oranžnega mezokarpa, zelo tankega mezokarpa, velikega, majhnega, okroglastega in podolgovatega ploda ter različnih tipov grmičaste rasti (juvenilno grmičasti tip, trajno zbiti grm, tipi z normalno dolgimi vrežami) in številni derivati medvrstnih križanj. Pri oblikovanju medvrstnih križancev so bili uporabljeni genetski posredniki: *C. pepo* (oljna) × *C. argyrosperma*, (*C. pepo* × *C. argyrosperma*) × (*C. moschata* × *C. argyrosperma*)

in povratna križanja s *C. argyrosperma* ter/ali *C. pepo* (oljna), ki so bila opravljena od leta 2000. Kot ključen genski vir za odpornost na ekstremne okoljske razmere in bolezni je bila uporabljena divja vrsta *C. okeechobeensis* iz Floride. Ključni viri za velikost in obliko plodov pa so bili križanci med oljnimi golicami in starimi slovenskimi debeloplodnimi *C. pepo* sortami. Materiali za žlahtnjenje so bili sajani na treh lokacijah: na polju Genske banke FKBPV v Hočah, na eksperimentalni parceli Botaničnega vrta Univerze v Mariboru in v Brežicah.

Pri medvrstnem križanju rumenoplodnih oljnih golic z divjo vrsto *C. okeechobeensis* smo v potomstvih prvega povratnega križanja z golicami uspeli že leta 2013 priti do rastlin z golimi semeni. Rumenooplodne golice, ki smo jih uporabili kot starševski material v omenjenem medvrstnem križanju, so izvirale iz križanj *C. argyrosperma* × *C. pepo*. V letu 2014 smo opravili drugo povratno križanje, v katero smo vključili sorto oljne buče 'Gleisdorfer Ölkürbis'. Potomstva križanj s *C. okeechobeensis* so bila tudi v letu 2014 nadpovprečno bujna in zdrava.

V letu 2014 smo nadaljevali s samooplodnjami in križanji, povezanimi z raziskavami kombinacijske sposobnosti s ciljem oblikovanja linijskih in sortno-linijskih hibridov. S križanji (medvrstnimi in povratnimi križanji) in odbiro smo pridobili:

1. A/O linije: Značilni so predvsem beli plodovi in malo svetlejša semena. Prvi tip teh linij ima grmičasto rast, drugi tip pa normalno dolga stebila.
2. AMo/OA linije: Značilna je predvsem oranžna barva ekzokarpa in endokarpa ter rumenkasta semena.
3. O/Oke: Ti materiali kažejo največjo odpornost. Vsi so že prevedeni v golice.
4. Populacije, ki izvirajo iz križanj starih debeloplodnih slovenskih *C. pepo* genotipov z oljnimi golicami. Cilj je oblikovati populacijsko sorto z rumenimi in debelimi plodovi ter z debelimi semeni.
5. Eksperimentalni hibridi med linijami skupine A/O in 'Gleisdorfer Ölkürbis' ter linijami skupine AMo/OA in 'Gleisdorfer Ölkürbis'.

### *Kemijske analize*

Semenski material smo vzorčili v septembru 2012 in 2013. Semena smo predhodno liofilizirali in zmleli. Askorbinsko kislino, tiolo in tokoferole smo analizirali s pomočjo HPLC, proklorofili in skupni karotenoidi so bili izmerjeni spektrofotometrično na acetonskih ekstraktih.

Izmerjene so bile količine tokoferolov, pigmentov (proklorofilov in karotenoidov), cisteina, glutationa in askorbatov v suhih semenih iz 40 različnih genotipov oljnih buč in pripadajočih starševskih materialov. Enake kemijske analize so bile opravljene tudi na celih svežih semenih in njihovih delih (na embriju in semenski lupini). Kemijske analize kažejo, da v semenski lupini prevladujejo alfa-tokoferol, cistein, askorbati in pigmenti. Največja vsebnost tokoferolov (med katerimi prevladuje gama-tokoferol) je bila izmerjena v embrijih. Te raziskave so prav tako

pokazale, da je za materiale z najboljšo kemijsko sestavo embrija in/ali semenske lupine značilno, da imajo temno rumene ali oranžne plodove in izvirajo iz medvrstnih križanj, ki so vključevala vrsti *C. argyrosperma* in *C. moschata*. Raziskave kažejo, da smo z medvrstnim križanjem spremenili predvsem razmerje med posameznimi tokoferol-izomerami v prid povečane vsebnosti  $\alpha$ - in delta-tokoferola. Podrobnejši rezultati so predstavljeni v Urbanek Krajnc in sod. (v tisku).

#### *Barva eksokarpa in pregrevanje plodov*

V letu 2012 smo s pomočjo datalogerja v mesecih julij, avgust in september spremljali temperaturo ekso-, mezo- in endokarpa plodov oljnih buč in medvrstnih križancev. Ekstremno visoke temperature in suša v poletnih mesecih leta 2012 so bile naklonjene tovrstni ekofiziološki raziskavi, saj smo s tem lahko določili povezanost barve eksokarpa in pregrevanja plodov, ki lahko privede do gnitja in/ali kalitve semen v plodu. V te raziskave smo vključili rastline z naravno belo-rumenimi, rumenimi in standardno progastimi plodovi ter črno pobarvane plodove. Elektronske senzorje smo namestili na površino ekzokarpa, v sredino mezokarpa in v endokarp. Poleg tega smo merili še temperaturo zraka v sestoji, 0.5 m nad sestojem, na površini tal in na različnih globinah tal.

Mezokarp oljne buče 'Gleisdorfer Ölkürbis' je v poletnem obdobju dosegel tudi dnevni  $T_{max}$  nad  $60^{\circ}C$ , medtem ko je dnevni  $T_{max}$  eksokarpa znašal v povprečju okoli  $40^{\circ}C$ , s posameznimi ekstremi do  $55^{\circ}C$ . Potek dnevnih maksimumov temno rumenega genotipa je bil bistveno nižji, pri tem pa je mezokarp v povprečju  $5-10^{\circ}C$  hladnejši kot eksokarp. Mezokarp belega kultivarja se je v določenih dnevih z vročinskim valom pregreval nad temperaturo eksokarpa in dosegel  $55^{\circ}C$ , kar si razlagamo z večjo absorpcijo svetlobe zaradi klorenhima pod samo povrhnjico ploda.

Rezultati kažejo, da črno obarvani plodovi, neposredno izpostavljeni soncu v sredini avgusta, postanejo mehki in spužvasti že po nekaj urah. Plodovi 'Gleisdorfer Ölkürbis' začnejo kazati podobne, vendar manj izrazite znake po štirih dneh. Pri belo-rumenih in rumenih plodovih pa ni bilo opaznih poškodb zaradi pregrevanja.

#### **5. Ocena stopnje realizacije programa dela na raziskovalnem projektu in zastavljenih raziskovalnih ciljev<sup>3</sup>**

Cilji projekta so bili doseženi, saj smo uspeli zbrati ustrezen genski material oljnih buč, drugih sorodnih vrst in medvrstnih križancev, ki so primerni za vnos želenih lastnosti za pridobitev novih sort oljnih buč prilagojenih na slovenske razmere in s povečano odpornostjo na bolezni, škodljivce in abiotični stres. Za uspešno žlahtniteljsko delo je širok nabor različnih genotipov ključnega pomena, saj globalno spreminjanje podnebja in z njim povezane stresne situacije zahtevajo stalno prilagajanje žlahtniteljskega dela. Primer sta zadnji dve leti, ki zahtevata usmeritev dela tako na odpornost na vročinski stres in sušo (2013), kakor na občasne nizke temperature v času cvetenja in prekomerne padavine ter visoko vlago zraka in tal (2014). Naši rezultati kažejo, da so A/O linije bolj tolerantne na nizke temperature in obdobja obilnejših padavin, AMo/OA linije pa so bolj tolerantne na sušo. Beli plodovi se tudi ob najhujši vročini zelo malo segrevajo. Materiali izpeljani iz križanja *C. okeechobeensis*  $\times$  *C. pepo* kažejo višjo odpornost na okužbo z ZYMV, poleg tega pa so zelo bujni in v primerjavi z ostalimi materiali dobro uspevajo v ekstremnih okoljskih razmerah. V preteklosti smo veliko uporabljali povratna križanja z najproduktivnejšimi sortami oljnih golic. Ta križanja so na eni strani povečala maso semena, zmanjšala pa se je stopnja odpornosti na bolezni in okoljski stres. Da bi čim hitreje prišli do linij, smo zadnja leta dali poudarek na samooplojevanje.

S samooplojevanjem pa se je začela manjšati genetska variabilnost. Izboljšali smo tudi potrebne postopke za žlahtnjenje sortnih materialov oljnih buč, predvsem z vzpostavitvijo metod za kemijske analize semen, ki bodo v prihodnje omogočale tudi selekcijo na izboljšano kakovost semen in posledično olja.

Na podlagi opravljenih poskusov smo ugotovili, da preizkušeni metode pridobivanja homozigotnih linij s kulturo neoprašenih plodnic (t.i. *in vitro* ginogeneza) in z opraševanjem z obsevanim pelodom za zdaj še nista dovolj primerni za indukcijo in regeneracijo haploidnih rastlin ter kasneje homozigotnih diploidnih linij. Vzrok je najverjetneje v sami zgradbi bučnega peloda, ki po svoji velikosti daleč presega druge znane vrste kmetijskih rastlin. Tak pelod je zato zelo občutljiv na mnogo dejavnikov, se hitro izsuši in ga je težko manipulirati. Pri sorodni vrsti (melonah) je bil tak pristop sicer uspešen, vendar je pelod precej manjši. Zaključujemo, da je za žlahtnjenje hibridnih sort za zdaj bolj primerna metoda samoopraševanja, ki se lahko kombinira z reševanjem nezrelh embrijev. Reševanje nezrelh embrijev z *in vitro* kulturo bi namreč omogočilo dve generaciji na leto, kar bi bistveno skrajšalo čas potreben za pridobitev homozigotnih linij.

Z izborom ustreznega genskega materiala in postopkov žlahtnjenja tekom tega projekta je vse pripravljeno za naslednjo fazo žlahtnjenja v kateri bo poglobitni cilj registracija novih sort.

#### 6. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine<sup>4</sup>

Programa CRP projekta nismo spreminjali, smo ga pa zaradi ugotovitev ter realnih možnosti, ki so se pojavile tekom izvedbe projekta, razširili z:

1. Raziskavami vpliva barve plodov, temperature zraka in temperature zemlje na pregrevanje plodov. Ta del raziskav je za žlahtnjenje oljnih buč zelo pomemben, saj pregrevanje plodov povzroča gnitje plodov in predčasno kalitev semen. Rezultati omenjenih raziskav bodo omogočili žlahtnjenje oljnih buč usmerjeno k sortam prilagojenim podnebnim spremembam.
2. Kemijskimi analizami suhih in svežih semen na prisotnost tokoferolov, pigmentov (proklorofilov in karotenoidov), cisteina, glutationa in askorbatov.

#### 7. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine<sup>5</sup>

		Znanstveni dosežek	
1.	COBISS ID	8109177	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Fenotipska in genetska raznolikost buč z mutirano semensko ovojnico
		ANG	Phenotypic and genetic diversity in pumpkin accessions with mutated seed coats
	Opis	SLO	Zaradi naraščajočega zanimanja za pridelavo bučnih semen, se povečujejo tudi obseg žlahtnjenja vrste <i>Cucurbita pepo</i> L. in potreba po širokem naboru različnih genotipov uporabnih za prenos ciljnih lastnosti. V članku je opisana morfološka analiza semen 51 akcesij buč, ki je pokazala, da je pri različnih akcesijah prisotnih 12 različnih tipov semenske ovojnice. Genetska analiza, ki ji je sledila, pa je razkrila veliko genetsko raznolikost tako med kakor znotraj posameznih akcesij.
		The increasing importance of pumpkin ( <i>Cucurbita pepo</i> L.) cultivars for seed production has led to considerable breeding efforts for novel high-yielding and disease-resistant cultivars lacking seed coats. Because it is very important to use genetically diverse genotypes for the development of	



		<p>cultivars with a broad genetic and phenotypic base, this study focused on phenotypic and genetic diversity within and among available pumpkin accessions with mutated seed coat phenotypes. Fifty-one accessions were collected from various sources and countries, which showed a wide variety of seed coat types. Genetic analysis with 18 simple sequence repeat (SSR) markers revealed that 37.59% of the total genetic diversity was attributable to interpopulation differentiation and 62.41% to individual differentiation within populations. The average genetic differentiation between accessions (<math>F_{ST}</math>) was from 0.030 to 0.760, whereas expected heterozygosity (<math>H_e</math>) was between 0.048 and 0.491 and observed heterozygosity (<math>H_o</math>) between 0.056 and 0.522. Based on unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) analysis, the genetic relationship among accessions reflects the primary geographical origin of accessions. Marker amplification yielded a total of 109 alleles with an average number of alleles per locus of 6.06. Gene diversity per locus varied between 0.027 and 0.879, whereas the polymorphism information content (PIC) varied between 0.027 and 0.867. This is the first report about intra-accession phenotypic and genotypic variability of pumpkins with mutated seedcoats cultivated for their seeds, which are today used in the baking industry, seed oil production, and in traditional and modern medicine.</p>
	ANG	
Objavljeno v		American society for horticultural science; HortScience; 2015; Vol. 50, No. 2; str. 211-217; Impact Factor: 0.855; Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 0.979; WoS: MU; Avtorji / Authors: Murovec Jana
Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
2.	COBISS ID	7651449 Vir: COBISS.SI
Naslov	SLO	Indukcija haploidov pri oljnih bučah golica s pomočjo opráševanja z obsevanim pelodom
	ANG	Haploid induction in hull-less seed pumpkin through parthenogenesis induced by X-ray-irradiated pollen
Opis	SLO	V članku kot prvi opisujemo razvoj partenogenetske indukcije haploidnih rastlin oljne buče golice s pomočjo opráševanja s pelodom obsevanim z X-žarki. Opisana metoda vključuje izolacijo neodprtih cvetov, obsevanje peloda z X-žarki, opráševanje z obsevanim pelodom, reševanje embrijev s kulturo in vitro, analizo ploidnosti s pretočno citometrijo in preverjanje homozigotnosti z mikrosatelitnimi markerji. Analiza 3830 regeneriranih rastlin je pokazala, da je bila večina rastlin diploidnih ter da so bile med regeneranti prisotne štiri stopnje ploidnosti ( $n$ , $2n$ , $3n$ in $4n$ ), medtem ko je molekulska analiza pokazala, da med regeneracijo ni bilo spontanega podvojevanja genoma haploidnih embrijev. V članku so analizirani številni vplivi, ki vplivajo na uspeh metode kot so: vpliv sezone, vpliv genotipa meterine rastline, vpliv genotipa očetovske rastline in vpliv doze sevanja peloda.
	ANG	The article presents the development of a parthenogenetic haploid induction protocol based on pollination with pollen irradiated with X-ray radiation at 0, 50, 100, 150, 200, 300, and 350 Gy. Various accessions were tested as the female parent or as the pollen donor and large differences were found. The ploidy level of 3,830 putative parthenogenetic embryos was determined using flow cytometry. Four ploidy levels ( $n$ , $2n$ , $3n$ , and $4n$ ) were found with the majority being diploid. Using selected simple sequence repeat markers on diploid embryos, no spontaneous chromosome doubling could be confirmed. In this study, haploid induction in styrian oil pumpkin was elaborated for the first time. We also showed that X-ray pollen irradiation provides an alternative to gamma radiation treatment, yielding a sufficient percentage of haploid plantlets.
		American Society for Horticultural Science; Journal of the American Society for Horticultural Science; 2013; Vol. 138, No. 4; str. 310-316; Impact

	Objavljeno v	Factor: 1.047;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 0.979; WoS: MU; Avtorji / Authors: Košmrlj Kristina, Murovec Jana, Bohanec Borut	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	
3.	COBISS ID	7342457	Vir: COBISS.SI
	Naslov	SLO	Analiza strukture različnih tipov semenskih ovojnic vrste Cucurbita pepo z vrstičnim elektronskim mikroskopom
		ANG	Detailed analysis of Cucurbita pepo seed coat types and structures with scanning electron microscopy
	Opis	SLO	Ob koncu devetnajstega stoletja je bil na območju tedanje Štajerske odkrit poseben genotip buče (Cucurbita pepo L.) z mutirano semensko ovojnico, zaradi katere se je močno povečalo zanimanje za pridelovanje oljnih buč, saj semen brez lignificiranih semenskih ovojnic pred stiskanjem ni bilo več potrebno namakati v vodi in luščiti. Prav tako se je povečalo zanimanje za raziskave tipov in strukture prisotnih semenskih ovojnic, za kar so v preteklosti uporabljali svetlobno in fluorescentno mikroskopijo. V članku je opisanih 12 različnih tipov semenskih ovojnic, ki smo jih odkrili v 29 akcijah zbranih iz celega sveta. Posamezni tipi semenskih ovojnic so bili nato natančno analizirani z vrstičnim elektronskim mikroskopom, kar je omogočilo odkritje doslej neznanih podrobnosti strukture plasti semenske ovojnice.
		ANG	Discovery of a mutant thin-coated seed phenotype at the end of the 19th century facilitated pumpkin (Cucurbita pepo L.) seed oil production and increased botanic interest in seed coat types and their structures. The main seed coat characteristics were usually analyzed by light and fluorescent microscopy, and more recently, seed coat traits have also been mapped on a C. pepo gene map. The aim of our research was to collect and describe various pumpkin seed types and to analyze, using scanning electron microscopy (SEM), the detailed structure of their seed coats. Seeds of 29 cultivars and landraces were collected and visually evaluated based on seed coat characteristics. Seed samples belonging to different seed types discovered in our collection were transversely sectioned and analyzed by SEM. Twelve seed types were determined, and SEM analysis revealed high variability in their seed coat structures. Using SEM, tissue and cell structures were clearly visible, and novel details of cell and tissue topography were documented. Hypodermal and aerenchyma cells in wild-type seed coats showed fibrous or reticulate secondary cell wall thickening, respectively. In mutant seed types, an absence of different seed coat layers was clearly noted, while the remaining layers were distinctly pronounced. A new completely hull-less seed type was described for the first time. Description of the variability of seed coats in pumpkin was complemented by novel seed coat types, and their structures were analyzed in detail the first time by SEM.
	Objavljeno v	National Research Council of Canada; Botany; 2012; Vol. 90, no. 12; str. 1161-1169; Impact Factor: 1.225;Srednja vrednost revije / Medium Category Impact Factor: 1.941; WoS: DE; Avtorji / Authors: Murovec Jana, Drašlar Kazimir, Bohanec Borut	
	Tipologija	1.01 Izvirni znanstveni članek	

### 8.Najpomembnejši družbeno-ekonomski rezultati projektne skupine<sup>6</sup>

	Družbeno-ekonomski dosežek		
1.	COBISS ID	3622956	Vir: COBISS.SI

	Naslov	<i>SLO</i>	Perspektive medvrstnega križanja v žlahtnjenju oljnih buč
		<i>ANG</i>	Perspectives of interspecific hybridization in oil pumpkin breeding
	Opis	<i>SLO</i>	Delo na žlahtnjenju oljnih buč na Fakulteti za kmetijstvo in biosistemske vede Univerze v Mariboru (FKBV) je bilo predstavljeno v okviru vabljenega predavanja za študente študijskega programa "Natural Sciences" na Univerzi Karl-Franzens Graz, Avstrija (18. november 2013).
		<i>ANG</i>	The invited lecture was aimed at presenting the work on interspecific hybridization of oil pumpkins at the Faculty of Agriculture and Life Sciences, University of Maribor (FKBV) for the students of the study program "Natural Sciences" at the Karl Franzens University Graz, Austria (November 18, 2013).
	Šifra	B.04 Vabljeno predavanje	
	Objavljeno v	Karl-Franzens Universität, Institut für Pflanzenwissenschaften; 2013; Avtorji / Authors: Urbanek Krajnc Andreja	
	Tipologija	3.14 Predavanja na tuji univerzi	
2.	COBISS ID	7994489	Vir: COBISS.SI
	Naslov	<i>SLO</i>	Sodobne žlahtniteljske metode uporabne za žlahtnjenje oljnih buč
		<i>ANG</i>	Report on the progress of development of biotechnological approaches for breeding pumpkins ( <i>Cucurbita pepo</i> L.)
	Opis	<i>SLO</i>	Borut Bohanec je rezultate projekta predstavil v okviru predavanj na mednarodnem simpoziju agronomov v Republiki Srbski (19.-22. 3. 2012) (COBISS.SI-ID 7046521), na mednarodni konferenci 'Applied vegetables genomics' na Dunaju (19.-20. 2. 2014) (COBISS.SI-ID 7892857) in na 6. simpoziju rastlinskih biologov Slovenije (11.-12. 9. 2014, Hoče) (COBISS.SI-ID 7994489). Rezultati dela v okviru projekta so bili predstavljeni še na drugih srečanjih/konferencah v okviru postrskih sekcij: COBISS.SI-ID 7152249, COBISS.SI-ID 7294073, COBISS.SI-ID 7294329, COBISS.SI-ID 3786540.
		<i>ANG</i>	Borut Bohanec presented projects results as lectures on the International Symposium and XVII Scientific Conference of Agronomists of Republic of Srpska, Trebinje, Bosnia and Herzegovina (19.-22. 3. 2012) (COBISS.SI-ID 7046521), on international conference 'Applied vegetables genomics' in Vienna (19.-20. 2. 2014) (COBISS.SI-ID 7892857) and on the 6th Slovenian symposium on plant biology (11.-12. 9. 2014, Hoče) (COBISS.SI-ID 7994489). The results of the project were presented also in several posters sections: COBISS.SI-ID 7152249, COBISS.SI-ID 7294073, COBISS.SI-ID 7294329, COBISS.SI-ID 3786540.
	Šifra	B.03 Referat na mednarodni znanstveni konferenci	
	Objavljeno v	Slovensko društvo za biologijo rastlin = Slovenian Society of Plant Biology; Knjiga povzetkov; 2014; Str. 38; Avtorji / Authors: Košmrlj Kristina, Murovec Jana, Kladnik Aleš, Krumpestar Tomaž, Stajič Ester, Bohanec Borut	
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	

### 9. Drugi pomembni rezultati projektne skupine<sup>2</sup>

COBISS ID: 3723564  
 Biokemična evalvacija semen različnih medvrstnih križancev oljnih buč  
 V času pripravništva za tuje študente pod okriljem programa Leonardo da Vinci se je Giulia Spada.

COBISS.SI-ID 8121721

Biotehnoški pristopi za žlahtnjenje oljnih buč: doktorska dizertacija KOŠMRLJ, Kristina. Uporaba biotehnoških pristopov za žlahtnjenje oljnih buč (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo* var. *styriaca* Greb.) : doktorska disertacija = Application of biotechnological approaches for breeding of oil-seed pumpkins (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo* var. *styriaca* Greb.) : doctoral dissertation. Ljubljana: [K. Košmrlj], 2015. XIII, 63, [6] f. pril., ilustr. Z vključenostjo v raziskovalni projekt, so 4 študentke uspešno zaključile študij z zaključnimi deli na temo sodobnih metod uporabnih za žlahtnjenje buč golic (*Cucurbita pepo* subsp. *pepo* var. *styriaca* Greb.) in sicer: 3 diplomantke (Anita Rižnik, COBISS.SI-ID 6882169; Adriana Podržaj, COBISS.SI-ID 7253113; Ester Stajič, COBISS.SI-ID 7697273) in 1 doktorandka (Kristina Košmrlj, COBISS.SI-ID 8121721).

COBISS.SI-ID 3875116

URBANEK KRAJNC, Andreja, JANŽEKVIČ, Ignac, ŠOBER, Andreja, IVANČIČ, Anton. The impact of interspecific hybridization on the chemical compositions of oil pumpkin seeds = Der Einfluss von Artkreuzung auf die chemische Zusammensetzung der Ölkürbissamen. *Phyton*, ISSN 0079-2047, v tisku.

Opis SLO: V članku je opredeljena kemijska sestava (tokoferoli, pigmenti, askorbat, tioli) semenskega materiala dobljenega z medvrstnim križanjem kultiviranih vrst buč (*C. argyrosperma*, *C. moschata* in *C. pepo*) in divje vrste (*C. okeechobeensis*). Screening metabolitov in drugih lastnosti je omogočil vzpostaviti strožje izbor, katerega namen je ustvariti visoko produktivne in visoko kakovostne sorte z željeno vsebnostjo koncentracij antioksidantov, predvsem tokoferolov in pigmentov.

## 10. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine<sup>9</sup>

### 10.1. Pomen za razvoj znanosti<sup>9</sup>

SLO

V projektu smo osvojili številne analitske postopke in izboljšali obstoječe žlahtniteljske metode, ki bodo uporabni tako za razvoj znanstvenega raziskovanja oljnih buč kakor drugih kmetijskih rastlin.

Izbor sort oljnih buč je precej omejen, poleg starejših populacijskih sort se uveljavljajo tudi novejši zlasti hibridne sorte tujega semenarskega podjetja. V okviru projekta smo na podlagi analize genetske variabilnosti ugotovili veliko sorodnost med slovensko sorto 'Slovenska golica' in avstrijsko populacijsko sorto 'Gleisdorfer Ölkürbis'. V času trajanja projekta smo vzpostavili lastni genofond oljnih buč, izboljšali smo metodiko križanja in povečali učinkovitost selekcije, dodelali metodo pridobivanja čistih linij ter ugotavljanja učinkov heteroze.

Obsežne rezultate smo objavili v šestih izvirnih znanstvenih člankih (Murovec in sod. 2012; Košmrlj in sod. 2013; Košmrlj in sod. 2014a; Košmrlj in sod. 2014b; Murovec 2015; Urbanek Krajnc in sod., v tisku) in številnih predstavitev na konferencah doma in v tujini. Tekom projekta smo:

1. Razvili postopek pridobivanja homozigotnih linij oljnih buč preko indukcije haploidnih rastlin. Za ta namen smo izvedli tudi raziskavo optimizacije obsevanja peloda.
2. Razvili postopek pospešenega generacijskega cikla pri oljnih bučah s pomočjo kulture nezrelih embrijev.
3. Analizirali genetsko sorodnost med genotipi buč s stanjšano ali brez semenske ovojnice.
4. Kvalitativno in kvantitativno ovrednotili vsebnost antioksidantov (tokoferoli, glutation, askorbinska kislina) in pigmentov (proklorofili, karotenoidi) v semenih medvrstnih križancev z namenom izboljšati ugodni učinek semen in olja na zdravstveni status ljudi.
5. Z metodo merjenja temperature na površini plodov (ekzokarpa), v sredini mezokarpa in v endokarpu smo vrednotili vpliv barve plodov na pregrevanje in razvoj plodov v času poletne vročine in izvedli selekcijo v smeri rumenoplodnosti..
6. Pridobili kompleksne medvrstne hibride, ki obsegajo več kot dva vrsti in divjo vrsto *C. okeechobeensis*.

ANG

We have developed numerous analytical methods and improved breeding techniques, which will be used for further scientific research of oil pumpkins and other cultivated species. The number of oil pumpkin varieties is rather limited, beside older open pollinated varieties recently several hybrid cultivars have been introduced as a result of foreign breeding company. Within the project we obtained a large genofond of oil pumpkins which served as base for breeding attempts. The analysis of genetic variability showed closer relationship between the Slovenian variety 'Slovenian golica' and the Austrian population variety 'Gleisdorfer Ölkürbis'. During the duration of the project, an assortment of oil pumpkins was established, the methodology of crossing was improved and the efficiency of selection was increased. Furthermore, a method of generating clean lines was developed and the effects of heterosis assessed. The results obtained during the project were published in six original scientific articles (Murovec et al. 2012; Košmrlj et al. 2013; Košmrlj et al. 2014a; Košmrlj et al. 2014b; Murovec 2015; Urbanek Krajnc et al., in press) and presented on numerous conferences in Slovenia and abroad. During the project we:

1. Developed a haploid induction technique for obtaining homozygous lines of oil pumpkins. In this regard we also optimized the procedure of pollen irradiation.
2. Developed a method for shortening generation time of oil pumpkins through in vitro culture of immature embryos.
3. Analysed genetic similarity among pumpkins with mutated seed coats.
4. Qualitative and quantitative screening of antioxidants (tocopherols, glutathione, ascorbate) and pigments (carotenoids, prochlorophyllide) in seeds of interspecies hybrids with the aim to increase the beneficial impact of seeds and oil on human health status.
5. Spatial and temporal analyses of daily maximum temperature within pumpkin fruits (exocarp, mesocarp and endocarps) was performed in order to determine the relationship between the fruit color and overheating of fruits as well as their development during the summer period. Yellow fruit colour types were selected for this purpose.
6. Obtained complex interspecies hybrids, which are the results of hybridization of more than two Cucurbita species and involves also the wild species *C. okechobeensis*.

## 10.2. Pomen za razvoj Slovenije<sup>10</sup>

SLO

Oljne buče so že od nekdaj prevladujoča kultura predvsem v vzhodnem in še posebej za SV delu Slovenije. Problem gojenja obstoječih sort (klasičnih populacijskih sort in hibridov) je predvsem velika občutljivost na bolezni (predvsem viruse) in okoljske dejavnike (suša, vročinski stres, radiacijski stres, daljša deževna obdobja). Žlahtnjenje oljnih buč je od konca 19. stoletja usmerjeno v selekcijo tanjšega eksokarpa za lažje ročno pobiranje semen. Z mehanskim obiranjem je tanjši eksokarp zgubil na pomenu in predstavlja nezaželeno lastnost predvsem z vidika slabše odpornosti na patogene (viruse, bakterije) in okoljske dejavnike. Po drugi strani pa se spreminja tudi tehnologija pridelave. Usmerjenost v ekološko proizvodnjo zahteva, da je zgodnji porast zelo hiter, da se s hitrejšo pokrovnostjo tal z listi onemogoči razvoj plevelov. Ekološki način pridelave zahteva tudi stabilno genetsko odpornost na bolezni in škodljivce. V okviru projekta smo oblikovali hibride z dobro prilagoditvijo na specifične okoljske razmere in uporabnostjo v ekološki proizvodnji. Materiali so na grobo oblikovani in tudi kemijsko ovrednoteni, potrebno jih je še do konca dodelati in testirati v pridelavi. Ena od odbranih linij bi lahko bila v kratkem predana v sortno potrjevanje in na ta način bi pridobili prvo sodobno slovensko sorto oljne buče, primerno za naše pridelovalne razmere ter odporno na biotski in abiotski stress. Z dodatno selekcijo bi bili kmalu lahko pripravljene za sproščanje še ostali zanimivi genotipi.

Tekom projekta smo izobrazili pet študentk s področja žlahtnjenja oljnih buč s poudarkom na novejših tehnologijah žlahtnjenja.

Doseženi rezultati projekta predstavljajo pomemben doprinos k znanstvenemu in tehnološkemu napredku slovenskega kmetijstva in sovpadajo s strateškimi cilji slovenskega kmetijstva kot so zviševanje gospodarskih priložnosti za kmetijske pridelovalce in povečanje konkurenčnosti slovenskega kmetijstva.

ANG

Oil pumpkins are extremely important for the western and especially the NW part of Slovenia. In the market, it is possible to find relatively good varieties (classical population varieties and hybrids). One of the main problems associated with the existing varieties is particularly high sensitivity to diseases (especially viruses) and environmental changes (during recent years we have experienced several repeating events of extreme humidity, severe drought and heat stress). On the other hand, the production technology has changed significantly and organic production is gaining popularity. The organic production requires vigorous early growth, so that leaves cover the surface of the soil as soon as possible and in this way prevent the development of weeds. Organic farming methods also require stable genetic resistance to diseases and pests. The aim of our work is the creation of varieties and hybrids which will be adapted to our specific environments and suitable for organic farming. The breeding lines are roughly formed and chemically evaluated. They need to be finalised and tested in the production. One of the lines could be shortly submitted to variety testing. It will present the first modern Slovenian variety of oil pumpkin which would be resistant to biotic and abiotic stress. The other genotypes could be released in following years.

During this project five students were trained in the field of modern plant breeding of oil-seed pumpkins.

The results of the project are facilitating the scientific and technological approaches for pumpkin breeding and provide advances needed to meet the challenges facing Slovenian agriculture. The project results encompass several strategic goals of Slovenian agriculture, such as enhancing economic opportunities for agricultural producers and to increase the competitiveness of Slovene agriculture.

## 11. Vpetost raziskovalnih rezultatov projektne skupine

### 11.1. Vpetost raziskave v domače okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- v domačih znanstvenih krogih
- pri domačih uporabnikih

**Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?**<sup>11</sup>

Po naših spoznanjih in rezultatih že izražajo interes domače semenarsko podjetje Semenarna Ljubljana d.d. in avstrijsko semenarsko podjetje Saatzzucht Gleisdorf (Gleisdorf seed breeding institute) Ges.mbH v sodelovanju s slovenskim hčerinskim podjetjem AGROSAAT proizvodnja, zastopanje in trgovina, d.o.o.

### 11.2. Vpetost raziskave v tuje okolje

Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- v mednarodnih znanstvenih krogih
- pri mednarodnih uporabnikih

**Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujini raziskovalnimi inštitucijami:**<sup>12</sup>

-

**Kateri so rezultati tovrstnega sodelovanja:**<sup>13</sup>

-

## 12. Izjemni dosežek v letu 2014<sup>14</sup>

### 12.1. Izjemni znanstveni dosežek

COBISS.SI-ID 7651449

KOŠMRLJ, K, MUROVEC, J, BOHANEK, B. Haploid induction in hull-less seed pumpkin through parthenogenesis induced by X-ray-irradiated pollen. JASHS, 2013, vol. 138, no. 4, str. 310-316

V članku kot prvi opisujemo metodo partenogenetske indukcije haploidnih rastlin buč golic s pomočjo opravevanja s pelodom obsevanim z X-žarki. V članku so analizirani številni dejavniki, ki vplivajo na uspeh metode, kot so: vpliv sezone, vpliv genotipa materine rastline, vpliv genotipa očetovske rastline in vpliv doze sevanja peloda. Analiza 3.830 regeneriranih rastlin je pokazala, da je bila večina rastlin sicer diploidnih, vendar smo z optimiziranimi pogoji uspeli regenerirati tudi haploidne rastline. Med regeneranti so bile prisotne štiri stopnje ploidnosti, z molekulsko analizo s pomočjo mikrosatelitnih markerjev pa smo dokazali, da med tovrstnim pridobivanjem čistih linij ne prihaja do spontanega podvajanja genoma haploidnih embrijev.

### 12.2. Izjemni družbeno-ekonomski dosežek

COBISS.SI-ID 3786540

URBANEK KRAJNC, A, ŠOBER, A, JANŽEKOVIČ, I, IVANČIČ, A. Interspecific hybridization in genetic breeding of "Styrian green gold" - oil pumpkins. V: DOLENC KOCE, Jasna (ur.), URBANEK KRAJNC, A (ur.), GREBENC, T (ur.). Knjiga povzetkov. Ljubljana: Slovensko društvo za biologijo rastlin, 2014, str. 40

V projektu smo uporabili medvrstno križanje z namenom razširitve genetske osnove oljih buč s ključnimi merili kot so tanka semenska ovojnica, večja vsebnost olja, boljše kemijska sestava semen, toleranca na biotski in abiotski stres. Vključili smo tri kultivirane vrste buč (*C. argyrosperma*, *C. moschata* in *C. pepo*) in divjo vrsto (*C. okeechobeensis*). Z merjenjem temperature v in na plodovih smo ugotavljali povezanost barve plodov s pregrevanjem, razvojem plodov in predčasno kalitvijo semen. V raziskavi smo prav tako spremljali kemično sestavo semen izbranih semenskih materialov. Z medvrstnim križanjem smo dosegli višjo vsebnost antioksidantov in pigmentov.

## C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja in obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta
- bomo sofinancerjem istočasno z zaključnim poročilom predložili tudi elaborat na zgoščenki (CD), ki ga bomo posredovali po pošti, skladno z zahtevami sofinancerjev.

### Podpisi:

*zastopnik oz. pooblaščen oseba  
raziskovalne organizacije:*

in

*vodja raziskovalnega projekta:*

Univerza v Ljubljani, Biotehniška  
fakulteta

Borut Bohanec

**ŽIG**

Kraj in datum:

Ljubljana

16.3.2015

## Oznaka poročila: ARRS-CRP-ZP-2015/9

---

- <sup>1</sup> Napišite povzetek raziskovalnega projekta (največ 3.000 znakov v slovenskem in angleškem jeziku). [Nazaj](#)
- <sup>2</sup> Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja, rezultate in učinke raziskovalnega projekta in njihovo uporabo ter sodelovanje s tujimi partnerji. Največ 12.000 znakov vključno s presledki (približno dve strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)
- <sup>3</sup> Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikost pisave 11). [Nazaj](#)
- <sup>4</sup> V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta, napišite obrazložitev. V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)
- <sup>5</sup> Navedite znanstvene dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta.  
Raziskovalni dosežek iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'. [Nazaj](#)
- <sup>6</sup> Navedite družbeno-ekonomske dosežke, ki so nastali v okviru tega projekta.  
Družbeno-ekonomski rezultat iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) vpišete tako, da izpolnite COBISS kodo dosežka – sistem nato sam izpolni naslov objave, naziv, IF in srednjo vrednost revije, naziv FOS področja ter podatek, ali je dosežek uvrščen v A'' ali A'.
- Družbeno-ekonomski dosežek je po svoji strukturi drugačen kot znanstveni dosežek. Povzetek znanstvenega dosežka je praviloma povzetek bibliografske enote (članka, knjige), v kateri je dosežek objavljen.
- Povzetek družbeno-ekonomskega dosežka praviloma ni povzetek bibliografske enote, ki ta dosežek dokumentira, ker je dosežek sklop več rezultatov raziskovanja, ki je lahko dokumentiran v različnih bibliografskih enotah. COBISS ID zato ni enoznačen izjemoma pa ga lahko tudi ni (npr. prehod mlajših sodelavcev v gospodarstvo na pomembnih raziskovalnih nalogah, ali ustanovitev podjetja kot rezultat projekta ... - v obeh primerih ni COBISS ID). [Nazaj](#)
- <sup>7</sup> Navedite rezultate raziskovalnega projekta iz obdobja izvajanja projekta (do oddaje zaključnega poročila) v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 7 in 8 (npr. ni voden v sistemu COBISS). Največ 2.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- <sup>8</sup> Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)
- <sup>9</sup> Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- <sup>10</sup> Največ 4.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- <sup>11</sup> Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- <sup>12</sup> Največ 500 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- <sup>13</sup> Največ 1.000 znakov, vključno s presledki. [Nazaj](#)
- <sup>14</sup> Navedite en izjemni znanstveni dosežek in/ali en izjemni družbeno-ekonomski dosežek raziskovalnega projekta v letu 2014 (največ 1000 znakov, vključno s presledki). Za dosežek pripravite diapozitiv, ki vsebuje sliko ali drugo slikovno gradivo v zvezi z izjemnim dosežkom (velikost pisave najmanj 16, približno pol strani) in opis izjemnega dosežka (velikost pisave 12, približno pol strani). Diapozitiv/-a priložite kot priponko/-i k temu poročilu. Vzorec diapozitiva je objavljen na spletni strani ARRS <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/>, predstavitev dosežkov za pretekla leta pa so objavljena na spletni strani <http://www.arrs.gov.si/sl/analize/dosez/> [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-CRP-ZP/2015 v1.00  
BB-18-B0-73-DE-9F-9F-48-6C-65-F2-8C-7C-89-61-C4-4A-3D-13-15



## CRP V4-1116 Razvoj novih sort oljnih buč

Izvajalci: Borut Bohanec, Jana Murovec, Kristina Košmrlj, Nevenka Valič, Viktorija Dolenc, Anton Ivančič, Metka Šiško, Andreja Urbanek Krajnc

### Povzetek

V okviru CRP projekta smo zbrali obširen genofond oljnih buč, ki so bila po izvoru ali tuje akcesije in sorte oziroma lastni križanci (znotraj in medvrstni) pridobljeni v žlahtniteljskih poskopi (dr. A. Ivančič) preteklih let. Zbrani genofond bo omogočil nadaljnje žlahtnjenje oljnih buč z namenom vnosa ciljnih lastnosti. Podrobno smo proučili zgradbo semenske ovojnice in na tej osnovi izvajamo selekcijo tudi v smeri brezklorohimskih buč. Izvedli smo podrobno genetsko analizo sorodnosti zbranih akcesij in ugotovili, da se lokalni tradicionalni sorti 'Slovenska golica' in 'Gleisdorfer Ölkürbis' le minimalno razlikujeta, medtem ko se novopozlahtnjeni hibridi firme Saatucht Gleisdorf, Avstria, od njiju močno ločijo. Razvili smo primeren postopek *in vitro* vzgoje embrijev za pospešitev generacijskega ciklusa in opozorili na tehnične zahteve za doseganje dveh generacij na leto. Izvedli smo obsežne poskuse pridobivanja inbridiranih haploidnih linij s postopki ginogeneze. Pri postopkih, kjer smo ginogenezo izzvali z uporabo navidezne oploditve z obsevanim pelodom smo dosegli delni uspeh, namreč tvorili določeno število haploidnih rastlinic. Žal kljub precejšnji optimizaciji postopkov nismo dosegli zadostnega števila, DH linije so tudi kazale izrazito inbriding depresijo. Delni neuspeh pripisujemo morfološkim značilnostim bučnega peloda. Izvedli smo več ciklov selekcije v preteklih letih pridobljenih križancev in izdvojili linije z izboljšanimi lastnostmi, med drugim linije, ki se po barvi buč (svetle barve) močno ločijo od obstoječih. To ima vpliv na propad semen ob vročih poletjih. Ena od linij bi lahko bila v kratkem predana v potrjevanje. Dodatno smo merili koncentracije in sestavo tokoferolov, pigmentov, cisteina, glutationa in askorbatov v bučnem semenu in ugotovili znatno povečanje skupnih tokoferolov pri linijah, ki izvirajo iz medvrstnih križancev.

### Abstract

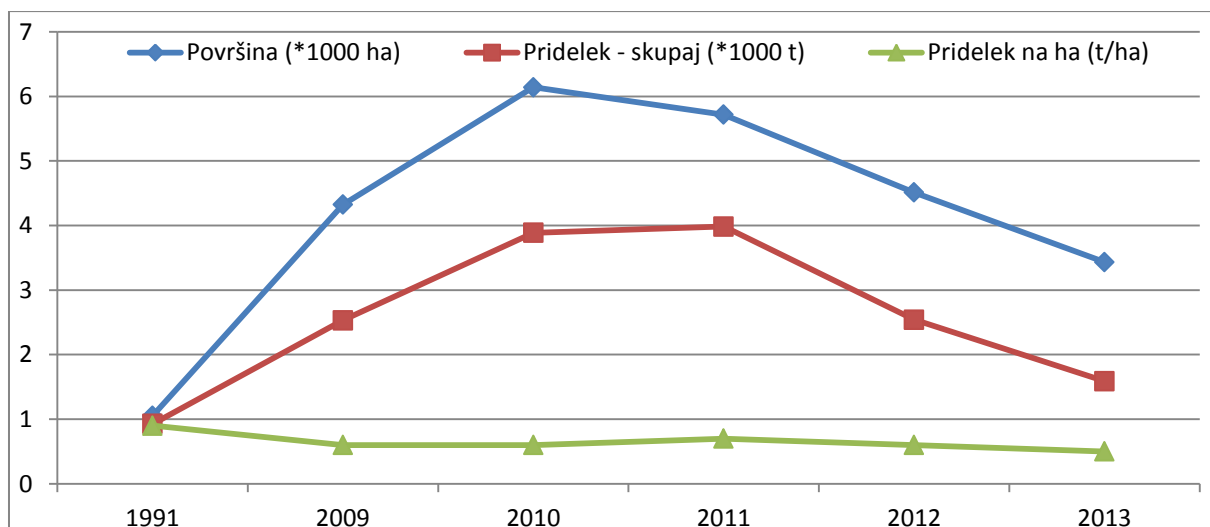
Within the CRP project we have generated extensive germplasm collection of oil pumpkins that were either foreign accessions and varieties or hybrids or being derived from our own (intra- and interspecific) breeding attempts (dr. A. Ivancic) in previous years. This germplasm will serve for further breeding attempts of oil pumpkins with aimed to the introduction of targeted properties. We examined in detail the structure of the seed coat and on this basis a selection in the direction of lines with none chlorochymal layer was initiated. We performed a detailed genetic analysis of collected accessions and found that the local traditional varieties 'Slovenska golica' and 'Gleisdorfer Ölkürbis' differ only minimally, while recently breed hybrid cultivars bred by seed-company Saatucht Gleisdorf, Austria, were genetically diverse. We have developed a suitable process of *in vitro* embryos cultivation in order to accelerate the generation cycle and we drew attention to the technical requirements needed to achieve two generations per year. We conducted extensive experiments to obtain haploid inbred lines through gynogenesis. In procedures where ginogenesis was induced by the use of pseudo fertilization with irradiated pollen partial success was achieved, namely a certain number of haploid plantlets did develop. Unfortunately, despite considerable optimization of procedures a sufficient number of DH lines was not achieved and plantlets also suffered from severe inbreeding depression. This partial failure is most likely attributed to the morphological characteristics of pumpkin pollen. During project we also carried out several cycles of selection and gained hybrids and lines with improved properties, including selection of lines with altered pumpkin color (bright colors). We demonstrated that color might have an impact on the collapse of the seeds in hot summers. One of the lines could be shortly submitted to variety testing. In addition, we measured the concentration and composition of tocopherols, pigments, cysteine, glutathione and ascorbates in pumpkin seed and found a significant increase in total tocopherols in the lines derived from interspecific crosses.

## Uvod

Buče izvirajo iz Mehike in Severne Amerike, v Evropi pa jih pridelujemo že več stoletij. Izmed petih vrst buč je ekonomsko najpomembnejša vrsta *Cucurbita pepo*, ki jo pridelujemo zaradi mladih poletnih plodov (bučk) ali zrelih zimskih plodov (buč), ter za pridobivanje bučnih semen. Bučna semena se prodajajo kot prigrizki, uporabljajo pa se tudi v pekarski in farmacevtski industriji.

Ena izmed varietet vrste *Cucurbita pepo* je tudi tako imenovana 'buča golica' ali 'oljna buča' (*Cucurbita pepo* L. subsp. *pepo* var. *styriaca* Grebenšč) z nelignificirano semensko ovojnico, zaradi katere je vidna temno zelena notranja plast semenske ovojnice (klorenhim). Spremembo v strukturi semenske ovojnice je povzročila mutacija gena (genov) odgovornih za lignifikacijo zgornjih plasti semenske ovojnice, ki je nastala med letoma 1870 in 1880 (Teppner 2000) na območju tedanje Štajerske. Zaradi mutacije se je močno povečalo zanimanje za pridelovanje oljnih buč, saj semen brez lignificiranih semenskih ovojnic pred stiskanjem ni bilo več potrebno namakati v vodi in luščiti. Iz istega razloga so postala semena zanimiva za pekarsko industrijo in v prodaji prigrizkov.

Pridelovanje oljnih buč se v Sloveniji in Avstriji povečuje. Tako smo v letu 1991 pridelovali oljne buče le na 1.053 ha, leta 2010 že na 6.141 ha, leta 2013 pa na 3.433 ha (Slika 1). Razlogi za povečanje pridelave so med drugim v opustitvi pridelave sladkorne pese v severovzhodni Sloveniji in vse večjem povpraševanju po bučnem olju v srednjeevropskem prostoru in širše. Interes izvira iz kulinarčnih specifik bučnega olja in rastočem spoznanju o njegovih zdravilnih učinkih.



Slika 1: Pridelava oljnih buč v Sloveniji: površina v 1000 ha, pridelek v 1000 ton in pridelek na hektar. Vir: Statistični urad Republike Slovenije

Po naši oceni je razlog za stagniranje oz. upadanje pridelka na hektar zlasti zastarel sortiment, ki se je v omenjenem obdobju le malo spremenil. Vse do nedavnega je bil izbor sort oljnih buč zelo omejen, med njimi ni bilo hibridnih kultivarjev, ki pa so močno razširjeni pri drugih tipih buč (kot na primer pri bučkah). Rezultat avstrijskega žlahtnjenja je nekaj novih sort oljnih buč, med njimi so tudi prvi hibridi, ki do zdaj v Sloveniji niso bili konkurenčni stari populacijski (tradicionalni) sorti 'Slovenska golica', ki pa po številnih karakteristikah ni več optimalna sorta, prav tako pa je vprašljiva tudi njena genetska čistost. Izhodišče projekta je

bila potreba po vzpostavitvi lastnega sortimenta oljnih buč, katerih pridelava je dolgoletna slovenska tradicija.

Za dosego dolgoročnih žlahniteljskih uspehov je bil namen CRP projekta zbrati ustrezen genofond oljnih buč in drugih sorodnih vrst buč, primernih za vnos ciljnih lastnosti, izboljšati metodiko križanja in samooplojevanja, povečati učinkovitost selekcije, dodelati metode pridobivanja čistih linij ter ugotavljanja učinkov heteroze.

Cilji projekta so bili:

1. Zbrati ustrezen genski material (genofond) oljnih buč in drugih sorodnih vrst primernih za vnos ciljnih lastnosti za žlahtnjenje hibridnih in klasičnih sort oljnih buč. Zbrani genotipi bodo omogočili pozitivno rekombinacijo zelenih lastnosti kot so visok pridelek, ugodno razmerje seme/plod, visoka vsebnost olja, povečana odpornost proti glivičnim in virusnim boleznim ter škodljivcem, povečana odpornost na sušo in vročinski stres, večja prilagodljivost na manj ugodna pridelovalne okolja in razmere.
2. Vzpostaviti in/ali izboljšati potrebne postopke za žlahtnjenje sortnih materialov oljnih buč (linij, hibridov in klasičnih populacijskih sort) s pomočjo indukcije haploidov, reševanja nedozorelih embrijev in kemijskimi analizami semen.
3. Izbrati ustrezen genski material in postopke za naslednjo fazo žlahtnjenja oljnih buč.

## **Materiali in metode dela**

### *Semenski material*

Za namen zbiranja ustreznega genskega materiala buč potencialno uporabnih za žlahtnjenje oljnih buč smo naročili semena vrste *Cucurbita pepo* iz šestih genskih bank:

1. AGES Linz - Austrian Agency for Health and Food Safety / Seed Collection, Avstria;
2. Institute of Special Crops, Agricultural Research Center Styria, Avstria;
3. Arche Noah Association, Avstria;
4. Crop Research Institute, Češka republika;
5. CRA Consiglio per la ricerca e la sperimentazione in agricoltura, Italija;
6. USDA, ARS, NCRPIS, Iowa State University, Regional Plant Introduction Station, Ames, Iowa, Združene države Amerike.

V zbirko semen smo dodali tudi druge vrste rodu *Cucurbita*, lastne žlahniteljske linije in semena komercialnih sort oljnih buč podjetij Semenarna Ljubljana, Slovenija, Saatucht Gleisdorf, Avstria in H.S.C. New Zealand.

### *Ugotavljanje tipov semenskih ovojnica in njihove strukture*

Zbrane vzorce semen smo vizualno pregledali in jim določili tip semenske ovojnice glede na barvo semenske ovojnice, stopnjo in način razporeditve lignificiranih delov semenske ovojnice ter glede na debelino semenskega roba. Različne tipe semenske ovojnice smo analizirali z vrstičnim elektronskim mikroskopom JEOL JSM 7500F (Murovec et al., 2012; Podržaj 2012).

### *Analiza genetske variabilnosti*

Za izbor genetsko različnih akcesij buč golic, ki bodo oziroma so že vključene v žlahtniteljski proces, smo opravili genetsko analizo zbranih akcesij z 18 mikrosatelitnimi markerji iz članka Gong et al. (2008): CMTp55, CMTp79, CMTp80, CMTp88, CMTp109, CMTm115, CMTp125, CMTm131, CMTp131, CMTp142, CMTp175, CMTp177, CMTp193, CMTp224, CMTp235, CMTm239, CMTp245, CMTp252. V analizo smo vključili 51 akcesij buč, od vsake akcesije po 5 rastlin. Po kalitvi smo iz prvih pravih listov izolirali DNA po CTAB metodi. Mikrosatelitne markerje smo namnožili v verižni reakciji s polimerazo po protokolu opisanem v Gong et al. (2008). Fragmentna analiza je potekala na kapilarni elektroforezi ABI 3130xl Genetic Analyzer z internim standardom GeneScan™ 600 LIZ. Elektroferogrami so bili analizirani s programom GeneMapper software version 3.5 (Applied Biosystems, CA, USA). Na podlagi mikrosatelitnih profilov je bil izračunan koeficienta sorodstva in izrisan dendrogram.

### *Reševanje nezrelih embrijev*

Z namenom odkrivanja postopkov, ki bi v prihodnosti pospešili žlahtniteljski proces, smo preizkusili reševanje nezrelih embrijev s kulturo *in vitro*. V ta namen smo 4 tedne po opravevanju iz steriliziranih semen izolirali 1.150 nezrelih embrijev ter jih gojili v *in vitro* pogojih na gojišču gojišču E20A (Sauton and Devaulx 1987) v rastni komori pri  $24\pm 1^\circ\text{C}$ .

### *In vitro ginogeneza*

Za vzpostavitev metode pridobivanja homozigotnih linij v eni generaciji, smo kot prvo v letu 2012 preizkusili ginogenetsko odzivnost 11 različnih sort oz. akcesij buč. V ta namen smo nabrali, sterilizirali in razrezali 299 neodprtih (in neoprašenih) cvetov. Le te smo inokulirali na 3 različna indukcijska gojišča ter inkubirali 4 dni na  $35\pm 1^\circ\text{C}$ . Po končani indukcijski fazi smo izsečke predstavili na regeneracijsko gojišče in inkubirali pri  $24\pm 1^\circ\text{C}$  (dvostopenjska *in vitro* ginogeneza). Poleg tega smo preizkusili še metodo enostopenjske *in vitro* ginogeneze pri kateri smo izsečke inokulirali na regeneracijsko gojišče na  $27\pm 1^\circ\text{C}$  brez predhodne indukcijske faze.

### *Indukcija haploidov z opravevanjem z obsevanim pelodom*

Preizkusili smo tudi tehniko indukcije haploidov z opravevanjem z obsevanim pelodom, saj se je v predhodnih poskusih (Košmrlj et al. 2013) izkazala kot uspešno pri oljnih bučah. V letu 2013 smo v poskuse vključili tri komercialne sorte oljnih buč in sicer: 'Gleisdorfer Ölkürbis',

'GL Opal' in 'GL Maximal'. Opravili smo 167 opráševanj s pelodom obsevanim z različnimi dozami »mehkih« X žarkov (od 300 Gy do 600 Gy). Ob opráševanju in v rednih tedenskih intervalih smo del plodov tretirali z rastnim regulatorjem 4-PPU (10 mg/l N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea) ali z rastnim regulatorjem 2,4-D (100 mg/l 2,4-dichlorophenoxyacetic acid). Štiri tedne po opráševanju smo nabirali plodove, izločali semena, sterilizirali semena in iz njih aseptično izolirali embrije. Embrije smo gojili na hranilnem gojišču E20A (Sauton and Devaulx 1987) pod kontroliranimi pogoji. Regeneriranim rastlinam smo izmerili velikost genoma s pretočnim citometrom.

V letu 2014 smo na osnovi rezultatov iz prejšnjega leta v poskuse vključili le rastline sorte 'GL Opal', ki smo jih opráševali s pelodom obsevanim s 100, 200 in 300 Gy »trdih« X-žarkov. Ob opráševanju in v rednih tedenskih intervalih smo del plodov tretirali z rastnim regulatorjem 4-PPU (10 mg/l N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea). Ponovili smo enak postopek nabiranja plodov, sterilizacije semen, izolacije embrijev ter njihovega gojenja na hranilnem gojišču E20A. Regeneriranim rastlinam smo izmerili velikost genoma s pretočnim citometrom.

### *Križanja in selekcija*

Neposredno žlahtnjenje je obsegalo samooplodnje, običajna, povratna in populacijska križanja s ciljem oblikovanja fenotipsko in genotipsko čim bolj različnih materialov (linij, hibridov in populacij). Zaradi klimatskih sprememb povezanih predvsem z vročinskim stresom, smo se odločili spremeniti barvo ekzokarpa, saj se plodovi s svetlejšim ekzokarpom manj segrevajo. V žlahtnjenje so bili vključeni nosilci bele, belo-rumene, rumene in sivo-zelene barve ekzokarpa, rumenega in oranžnega mezokarpa, zelo tankega mezokarpa, velikega, majhnega, okroglastega in podolgovatega ploda ter različnih tipov grmičaste rasti (juvenilno grmičasti tip, trajno zbiti grm, tipi z normalno dolgimi vrežami) in številni derivati medvrstnih križanj (oljni genotipi, križani z genetskimi posredniki, namenjeni za nove medvrstne kombinacije križanj). Pri oblikovanju medvrstnih križancev so bili uporabljeni genetski posredniki (to so bili različni genotipi, ki pripadajo vrsti *Cucurbita argyrosperma*, in potomstva križanj te vrste s predstavniki drugih vrst): *C. pepo* (oljna) × *C. argyrosperma*, (*C. pepo* × *C. argyrosperma*) × (*C. moschata* × *C. argyrosperma*) in povratna križanja s *C. argyrosperma* ter/ali *C. pepo* (oljna), ki so bila opravljena v glavnem po letu 2000. Kot ključen genski vir za odpornost na ekstremne okoljske razmere in bolezn je bila uporabljena divja vrsta *C. okechobeensis* (iz Floride). Ključni viri za velikost in obliko plodov pa so bili križanci med oljnimi golicami in starimi slovenskimi debeloplojnim *C. pepo* sortami.

Materiali za žlahtnjenje so bili sajani na treh lokacijah:

1. na polju Genske banke FKBB v Hočah,
2. na eksperimentalni parceli Botaničnega vrta Univerze v Mariboru,
3. v Brežicah.

### *Kemijske analize celih semen, embrijev in semenske lupine*

Semenski material različnih medvrstnih križancev in kultivarjev smo vzorčili v septembru 2012 in 2013. Semena smo predhodno liofilizirali in zmleli. Askorbinsko kislino, tiolo in tokoferole smo analizirali s pomočjo tekočinske kromatografije (HPLC) po metodah delno modificiranih po Tausz et al. 2003.

Proklorofili in skupni karotenoidi so bili izmerjeni spektrofotometrično na acetonskih ekstraktih po metodi Brouers in Michel-Wolwertz (1983).

Rezultate biokemijskih analiz smo podali z srednimi vrednostmi in standardnimi odmiki štirih do osmih vzorcev v treh ponovitvah.

### *Povezava med barvo eksokarpa in pregrevanjem ploda*

V letu 2012 smo s pomočjo datalogerja Campbell CX1000 v poletnih mesecih (julij, avgust, september) kontinuirano spremljali temperaturo ekso-, mezo- in endokarpa plodov oljnih buč in medvrstnih križancev. Ekstremno visoke temperature in suša v poletnih mesecih leta 2012 so bile naklonjene tovrstni ekofiziološki raziskavi, saj smo s tem lahko določili povezanost barve eksokarpa in pregrevanja plodov, ki temeljijo na predpostavki, da temnejša barva ploda (kot je npr. pri sorti 'Slovenska golica') povzroča v poletnem obdobju s temperaturnimi ekstremi pregrevanje ploda, ki posledično lahko privede do gnitja in/ali kalitve semen v plodu. V te raziskave smo zato vključili rastline z naravno belo-rumenimi, rumenimi in standardno progastimi plodovi ter črno pobarvane plodove. Elektronske senzorje (termočlene), povezane z datalogerjem, smo namestili na površino ekzokarpa, v sredino mezokarpa in endokarp. Poleg tega pa smo merili še temperaturo zraka v sestoji, 0.5 m nad sestojem, na površini tal in na različnih globinah tal.

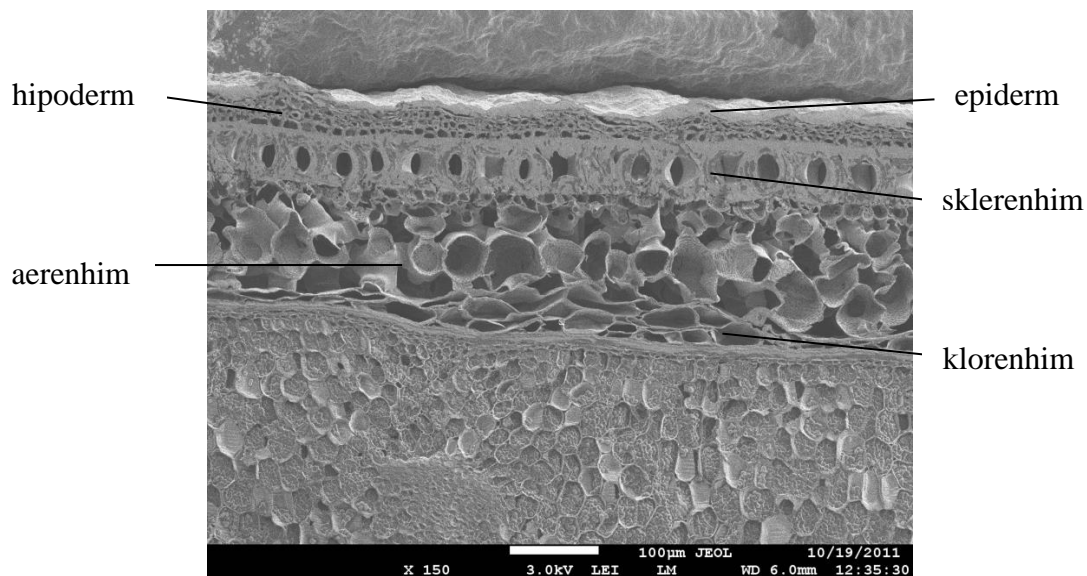
## **Rezultati in diskusija**

### *Semenski material*

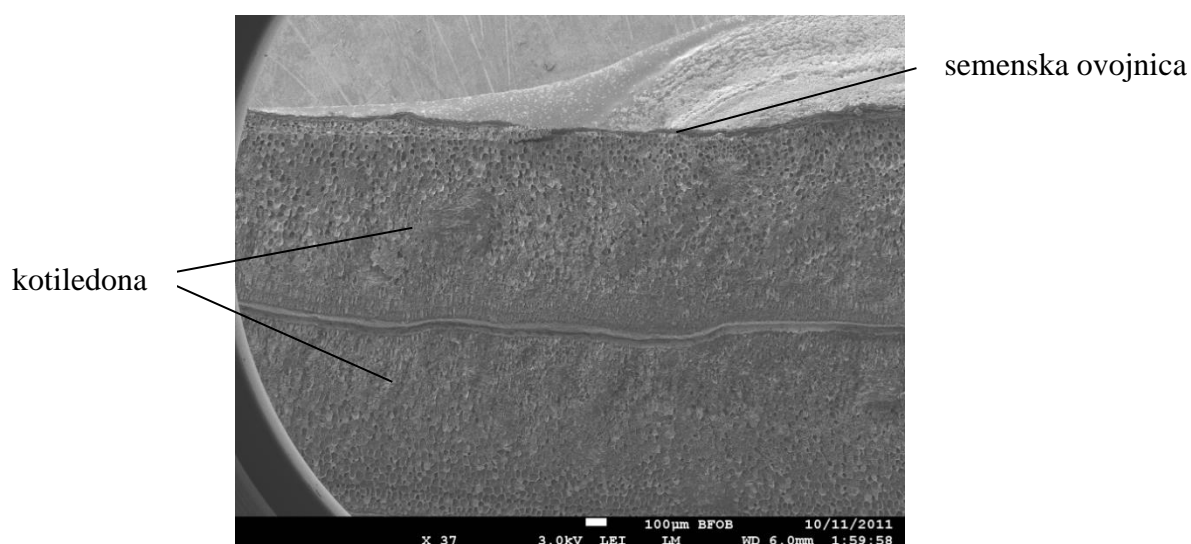
Zbrali smo preko 51 akcesij buč *Cucurbita pepo* iz štirinajstih držav, 3 sorodne vrste rodu *Cucurbita* (*C. argyrosperma*, *C. moschata*, *C. okechobeensis*) ter številne medvrstne križance med *C. pepo* in ostalimi vrstami rodu *Cucurbita*. Zbrani genofond bo omogočil nadaljnje zlahtnjenje oljnih buč z namenom vnosa ciljnih lastnosti.

### *Ugotavljanje tipov semenskih ovojníc in njihove strukture*

Zbrane akcesije buč so imele dvanajst različnih tipov semenskih ovojníc od divjega tipa z dobro razvitimi in lignificiranimi vsemi petimi plastmi semenske ovojnice (epiderm, hipoderm, sklerenhim, aerenhim, klorenhim; Slika 2) pa do popolnoma golih semen, ki niso bila prekrita z nobeno plastjo semenske ovojnice. Zgradba teh dvanajstih tipov semenske ovojnice pri bučah je bila raziskana z vrstičnim elektronskim mikroskopom, rezultati so bili podrobno opisani v Murovec et al. (2012) in Podržaj (2012).



Slika 2: Semenska ovojnica suhega semena divjega tipa pod vrstičnim elektronskim mikroskopom (Podržaj, 2012)



Slika 3: Prečni prerez skozi suho seme sorte 'Slovenska golica' pod vrstičnim elektronskim mikroskopom (Podržaj, 2012)

### *Analiza genetske variabilnosti*

Analiza je pokazala razlike v genetski variabilnosti tako med kakor znotraj posameznih akcesij. Po pričakovanjih so rezultati pokazali največjo genetsko sorodnost med hibridnima sortama 'Gleisdorfer Opal' in 'Gleisdorfer Diamant', oba požlahtnjena v žlahtniteljskem podjetju Saatzucht Gleisdorf, Avstria. Velika genetska sorodnost se je pokazala tudi med slovensko populacijsko sorto 'Slovenska golica' in avstrijsko populacijsko sorto 'Gleisdorfer Ölkürbis'. Rezultati so bili podrobno opisani v Murovec (2015).

### *Reševanje nezrelih embrijev*

Reševanje nezrelih embrijev s pomočjo tkivne kulture je bilo uspešno, saj so embriji v tkivni kulturi dozoreli in kalili ter so bili kasneje tudi aklimatizirani. Vendar aklimatizirane rastline v rastlinjaku zvečinoma niso pravočasno zacvetele, zato iz njih nismo uspeli pridobiti naslednje generacije. Za izkoriščanje sicer uspešnega reševanja embrijev s kulturo *in vitro* bi morali v prihodnje postopke začeti zelo zgodaj spomladi s setvijo v ogrevan rastlinjak, kar bi omogočilo pravočasno aklimatizacijo rastlin in bi zagotovilo dve generaciji letno. Pripomnimo lahko, da kolegi, ki žlahtnijo oljne buče v Gleisdorfu, dve generaciji na leto dosežejo tako, da eno generacijo izvedejo na Kanarskih otokih.

### *In vitro ginogeneza*

Iz poskusov *in vitro* ginogeneze s kulturo neoprašenih plodnic smo regenerirali 2 rastlini, ki smo ju analizirali s pretočno citometrijo. Ugotovili smo, da sta obe rastlini diploidni in sta zato lahko rezultat somatske regeneracije iz diploidnega tkiva plodnice ali pa spontano podvojena haploida. Kasnejše molekulska analiza z mikrosatelitnimi markerji je pokazala, da sta bili obe rastlini somatska regeneranta.

### *Indukcija haploidov z oprашevanjem z obsevanim pelodom*

V letu 2013 je bilo iz 261 uspešno oprášenih cvetov izoliranih 275 embrijev, od tega smo regenerirali 198 rastlin in jih analizirali s pretočnim citometrom. Odkrili smo 2 haploidni rastlini, vseh preostalih 196 rastlin je bilo diploidnih. V letu 2014 je bilo iz 36 uspešno oprášenih cvetov izoliranih 1.031 embrijev, vse iz opráševanj s pelodom obsevanim z najnižjo dozo 100 Gy. Od 592 regeneriranih rastlin, katerim smo izmerili velikost genoma s pretočno citometrijo, je bila samo ena haploidna, preostalih 99,83 % je bilo diploidnih.



Tabela 2: Rezultati indukcije haploidov z opraševanjem z obsevanim pelodom

Leto poskusa	Doza obsevanja (Gy)	Število oprašenih cvetov	Število izoliranih embrijev	Število rastlin analiziranih s pretočno citometrijo	Število regeneriranih haploidov	Število regeneriranih diploidov
2013	300	49	49	25	0	25
2013	400	20	0	0	0	0
2013	500	65	1	0	0	0
2013	600	127	225	173	2	171
2014	100	21	1031	592	1	591
2014	200	10	0	0	0	0
2014	300	5	0	0	0	0

Glede na rezultate in izkušnje iz prejšnjih let predvidevamo, da so bile diploidne rastline nezaželeni heterozigotni hibridi in ne samostojno podvojeni haploidi. Ugotovili smo, da je s preizkušenima metodama indukcije haploidov (*in vitro* ginogeneza iz leta 2012 in opraševanje z obsevanim pelodom iz let 2013 in 2014) sicer možno pridobiti haploidne rastline, vendar je odstotek nizek. Haploidne rastline so tudi zelo šibke rasti (najbrž posledica inbriding depresije) in zato niso dovolj uspešne za praktično uporabo v žlahtnjenju oljnih buč.

Poleg zgoraj opisanih poskusov, so bili v okviru doktorske disertacije Kristine Košmrlj opravljeni še številni drugi poskusi z namenom pridobitve haploidnih rastlin oljnih buč s pomočjo opraševanja z obsevanim pelodom (Košmrlj et al. 2013). Ugotavljal se je vpliv materinega in očetovega genotipa na uspešnost indukcije haploidov ter vpliva različnih doz obsevanja peloda (0, 50, 100, 150, 200, 300 in 350 Gy). Ploidnost je bila izmerjena 3.830 regeneriranim rastlinam, od tega je bilo 28 haploidnih, 3743 diploidnih, 2 triploidna in 57 tetraploidnih. S pomočjo mikrosatelitnih markerjev smo določali izvor diploidnih regenerantov in ugotovili, da so bili diploidni regeneranti hibridi in ne spontano podvojeni haploidi. V okviru iste naloge je bil izveden še obširen poskus optimizacije pogojev obsevanja peloda s katerimi bi omogočili obsevanje tudi pri višjih dozah (Košmrlj et al. 2014a), kar bi lahko povišalo odstotek haploidnih regenerantov.

## *Križanja in selekcija*

Pri medvrstnem križanju rumenoplodnih oljnih golic z divjo vrsto *C. okeechobeensis* smo v potomstvih prvega povratnega križanja z golicami uspeli že leta 2013 priti do rastlin z golimi semeni. Rumenooplodne golice, ki smo jih uporabili kot starševski material v omenjenem medvrstnem križanju, so izvirale iz križanj *C. argyrosperma* × *C. pepo*, kar pomeni, da je tudi tu bila *C. argyrosperma* uporabljena kot genetski posrednik (genetski most). V letu 2014 smo opravili drugo povratno križanje, v katero smo vključili sorto oljne buče 'Gleisdorfer Ölkürbis'. Potomstva križanj s *C. okeechobeensis* so bila tudi v letu 2014 nadpovprečno bujna in zdrava. Ena od značilnosti, ki je dominirala pri večini rastlin drugega povratnega križanja, je bila ločitev peclja od ploda v času zrelosti.

V letu 2014 smo nadaljevali s samooplodnjami in križanji, povezanimi z raziskavami kombinacijske sposobnosti s ciljem oblikovanja linijskih in sortno-linijskih hibridov. Leto 2014 je bilo sorazmerno hladno in vlažno. Dozorevanje je bilo poznejše, še posebej pa se je to kazalo pri materialih z belim in belorumenim ekzokarpom. Ti materiali so očitno prikladnejši za toplejše oz. vroče razmere (pred več leti smo jih testirali na Novi Kaledoniji na Pacifiku).

S križanji in odbiro smo dobili:

1. A/O linije (dva tipa linij, ki so oblikovane s pomočjo medvrstnih križanj *C. argyrosperma* × *C. pepo*, povratnih križanj z oljnimi tipi in samooplojevanjem). Značilni so predvsem beli plodovi in malo svetlejša semena. Prvi tip teh linij ima grmičasto rast, drugi tip pa normalno dolga stebila.
2. AMo/OA linije (nastale s kompleksnim križanjem, ki vključujejo tri vrste (*C. argyrosperma*, *C. moschata* in *C. pepo*). Značilna je predvsem oranžna barva ekzokarpa in endokarpa ter rumenkasta semena.
3. O/Oke materiali, ki so potomstva drugega povratnega križanja hibrida *C. okeechobeensis* × *C. pepo* z različnimi oljnimi genotipi in samooploditev prvega povratnega potomstva. Ti materiali kažejo največjo odpornost na viroze. Vsi so že prevedeni v golice.
4. Populacije, ki izvirajo iz križanj starih debeloplodnih slovenskih *C. pepo* genotipov (katerih plodovi so se v preteklosti uporabljali kot hrana za živali) z oljnimi golicami. Cilj je oblikovati populacijsko sorto z rumenimi, debelimi plodovi, z debelimi semeni.
5. Eksperimentalni hibridi med linijami skupine A/O in 'Gleisdorfer Ölkürbis' ter linijami skupine AMo/OA in 'Gleisdorfer Ölkürbis'. Zaradi maternalnega efekta so hibridi oblikovani po principu  $A \times B$  in  $B \times A$ .

## *Kemijske analize celih semen, embrijev in semenske lupine*

V 2013 in 2014 smo na FKBV opravili kemijske analize vzorcev glavnih skupin požlahtnjenih materialov, ki so bili pobrani leta 2012. Rezultati so sistematično prikazani v članku: "The impact of interspecific hybridization on the chemical compositions of oil pumpkin seeds - Der Einfluss von Artkreuzung auf die chemische Zusammensetzung der Ölkürbissamen" avtorjev A. Urbanek Krajnc, I. Janzekoviča, A. Šober in A. Ivančiča, ki je bil poslan v *Phyton* in pozitivno recenziran (pričakujemo, da bo objavljen v polovici naslednjega

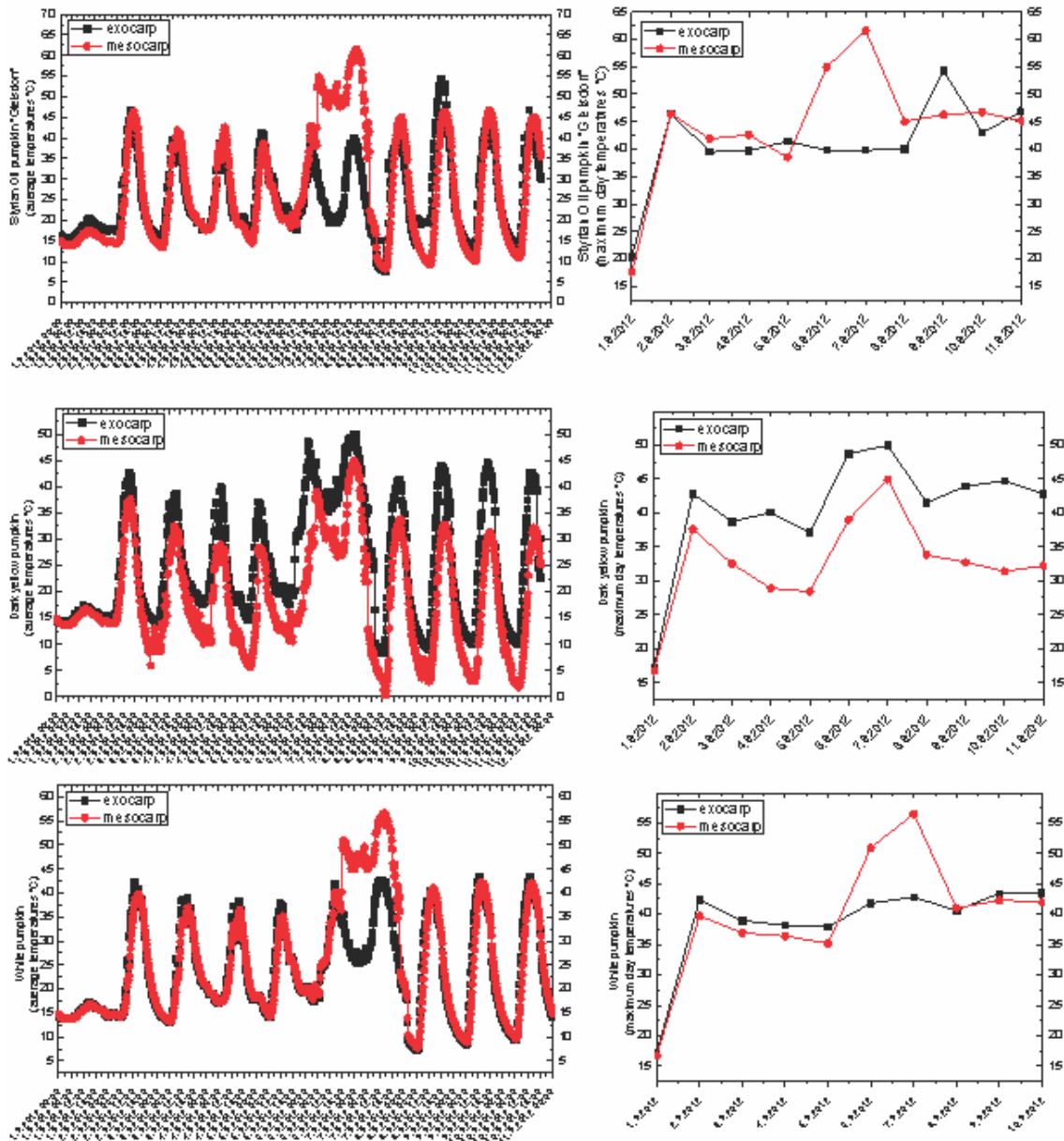
leta). Izmerjene so bile količine tokoferolov, pigmentov (proklorofilov in karotenoidov), cisteina, glutationa in askorbatov v suhih semenih iz 40 različnih genotipov oljnih buč in pripadajočih starševskih materialov, ki so predstavljali različne vrste in sorte buč ter različne kombinacije medvrstnih križanj. Enake kemijske analize so bile opravljene tudi na celih svežih semenih in njihovih delih (na embriju in semenski lupini). Kemijske analize kažejo, da v semenski lupini prevladujejo alfa-tokoferol, cistein, askorbati in pigmenti. Največja vsebnost tokoferolov (med katerimi prevladuje gama-tokoferol) je bila izmerjena v embrijih. Te raziskave so prav tako pokazale, da je za materiale z najboljšo kemijsko sestavo embrija in/ali semenske lupine značilno, da imajo temno rumene ali oranžne plodove in izvirajo iz medvrstnih križanj, ki so vključevala vrsti *C. argyrosperma* in *C. moschata*. Raziskave kažejo, da smo z medvrstnim križanjem spremenili predvsem razmerje med posameznimi tokoferol-izomerami v prid povečane vsebnosti  $\alpha$ - in delta-tokoferola. Med 40 izbranimi genotipi, ki smo jih vključili v analize, smo pri 18 genotipih izmerili več kot 1200 nmol/g SS skupnih tokoferolov. Najvišjo vsebnost skupnih proklorofilov PCHL(ide) in karotenoidov smo določili v trispecies-hibridu (AMO  $\times$  OAA )  $\times$  OA, pri katerem smo tudi določili najvišjo vsebnost  $\alpha$ -tokoferola. Ker je semenska lupina pomemben vir alfa-tokoferola, cisteina, askorbatov in pigmentov, je pri oblikovanju hibridov zelo pomembno upoštevati, da se semenska lupina deduje po materi. Zaradi tega je smiselno, da se genotipi z večjo vsebnostjo teh komponent uporabijo kot matrne komponente. Kemijske analize kažejo, da je uporaba medvrstnih križanj v žlahtnjenju oljnih buč smiselna. Z njimi se zelo popestri genetska variabilnost, ki ima za posledico večjo raznolikost, povezano s kemijsko sestavo semen in olja. Izkušnje kažejo, da sterilnost, ki se običajno pojavlja v prvih potomstvih medvrstnih križanj pri bučah ni problem. Po dveh ali treh generacijah samooplodenj ali križanj se plodnost običajno skoraj povsem normalizira.

#### *Povezava med barvo eksokarpa in pregrevanjem ploda*

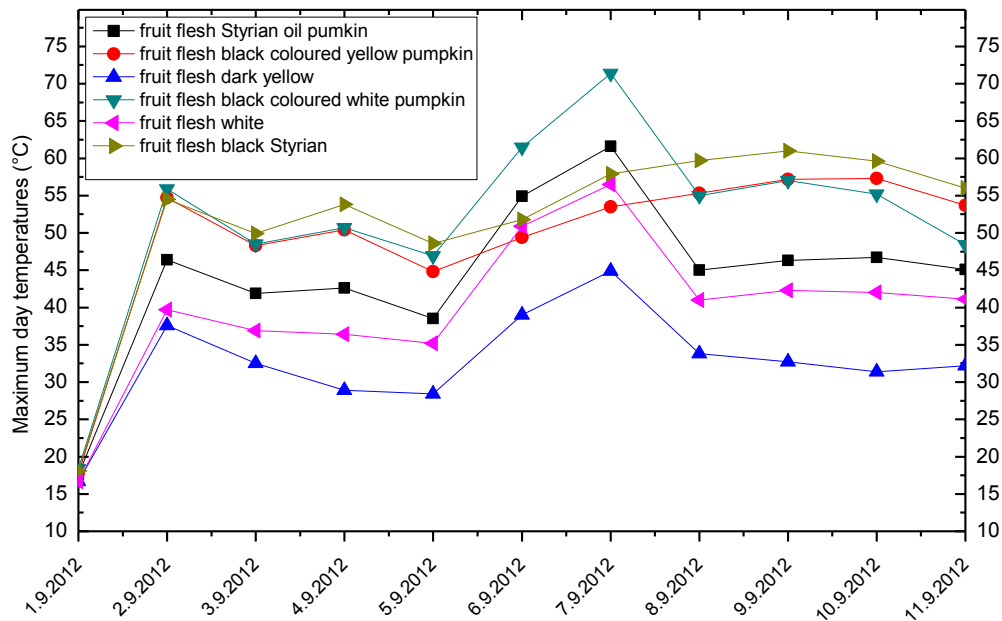
Mezokarp oljne buče 'Gleisdorfer Ölkürbis' je v poletnem obdobju dosegel tudi dnevni maksimum temperatur nad 60 °C, medtem ko je dnevni temperaturni maksimum eksokarpa znašal v povprečju okoli 40 °C, s posameznimi ekstremi do 55 °C (Slika 4). Potek dnevnih maksimumov temno rumenega genotipa je bistveno nižji, pri tem pa je mezokarp v povprečju 5-10 °C hladnejši kot eksokarp (Slika 4), kar govori v prid temu kultivarju. Mezokarp belega kultivarja se je v določenih dnevih z vročinskim valom pregreval nad temperaturo eksokarpa in dosegel 55 °C, kar si razlagamo z večjo absorpcijo svetlobe zaradi klorenhima pod samo povrhnjico ploda.

Najnižje povprečne temperature so bile merjene v mezokarpu temno rumenih plodov, navišje pa v mezokarpu oljne golice 'Gleisdorfer Ölkürbis' (Slika 5). Temperature mezokarpa genotipa z belimi plodovi so se gibale v povprečju med oljno bučo 'Gleisdorfer Ölkürbis' in temno rumenim genotipom. Temperaturna razlika med oljno bučo 'Gleisdorfer Ölkürbis' in temno rumenim genotipom znaša v povprečju 10 °C.

Opravljene raziskave kažejo, da črno obarvani (dozoreli) plodovi, neposredno izpostavljeni soncu v sredini avgusta, postanejo mehki in spužvasti že po nekaj urah. Plodovi 'Gleisdorfer Ölkürbis' začnejo kazati podobne, vendar ne tako izrazite znake po štirih dneh, pri belorumenih in rumenih plodovih pa ni bilo opaznih poškodb zaradi pregrevanja (Urbanek Kranjc et al. 2015).



Slika 4: Spremljanje temperature v ekso- in mezokarpu plodov buč (a) oljne buče 'Gleisdorfer Ölkürbis', (b) kultivarja s temno rumenim eksokarpom, (c) kultivarja z belim eksokarpom.



Slika 5: Spremljanje temperature v mezokarpu plodov buč: (a) oljna buča 'Gleisdorfer Ölkürbis', (b) črno pobarvana oljna buča 'Gleisdorfer Ölkürbis', (c) črno pobarvan kultivar z rumenim eksokarpom, (d) kultivar z rumenim eksokarpom, (e) črno pobarvan kultivar z belim eksokarpom, (f) kultivar z belim eksokarpom.

## Zaključek

Cilji projekta so bili doseženi, saj smo uspeli zbrati ustrezen genski material (genofond) oljnih buč, drugih sorodnih vrst in medvrstnih križancev, ki so primernih za vnos zelenih lastnosti za pridobitev novih sort oljnih buč prilagojenih na slovenske razmere in povečano odpornostjo na bolezn, škodljivce in abiotški stres.

Izboljšali smo tudi potrebne postopke za žlahtnjenje sortnih materialov oljnih buč, predvsem z vzpostavitev metod za kemijske analize semen, ki bodo v prihodnje omogočale selekcijo tudi na izboljšano kakovost semen in posledično olja. Globalno spreminjanje podnebja in z njim povezane stresne situacije zahtevajo stalno prilagajanje žlahtniteljskega dela. Primer sta zadnji dve leti, ki zahtevata usmeritev dela na odpornost na vročinski stres in sušo ter hkrati na občasne nizke temperature v času cvetenja in prekomerne padavine ter visoko vlago zraka in tal. Izkušnje kažejo, da so A/O linije bolj tolerantne na razmere kot smo jih imeli letos, AMo/OA linije pa so bolj tolerantne na razmere kot smo jih imeli preteklo leto. Beli plodovi se tudi ob najhujši vročini zelo malo segrevajo. Materiali izpeljani iz križanja *C. okechobeensis* × *C. pepo* kažejo občutno višjo odpornost na viroze in druge bolezni listov, poleg tega pa so zelo bujni in v primerjavi z ostalimi materiali dobro uspevajo v ekstremnih okoljskih razmerah. V preteklosti smo veliko uporabljali povratna križanja z najproduktivnejšimi sortami oljnih golic. Ta križanja so na eni strani povečala maso semena, zmanjšala pa se je stopnja odpornosti na bolezn in okoljski stres. Da bi čim hitreje prišli do linij, smo zadnja leta dali poudarek na samooplojevanje. S samooplojevanjem pa se je začela manjšati genetska variabilnost. V prihodnosti bomo verjetno morali ponovno intenzivirati rekurentno selekcijo in potomstva testirati v vseh ključnih stresnih razmerah. Pred nekaj leti smo v ta namen uporabljali nekatera tropska območja (Nova Kaledonija in Madagaskar), naslednje leto bo to verjetno Kuba. Žlahtnjenje na FKBV je stabilno in nikoli od 1996, ko se

je začelo, ni bilo prekinjeno, ne glede na to, ali je bilo vključeno v nek financiran projekt, ali ne. Rezultati zadnjih kemijskih analiz in okoljske razmere v letošnjem letu kažejo, da je delo smiselno nadaljevati. Letošnje leto je bilo za žlatniteljski proces neprecenljive vrednosti, saj smo dobili zanesljive podatke o odpornosti/tolerantnosti na ekstremno vlago in nizke temperature v času vegetacije. Del selekcijske površine je bil večkrat poplavljen (tudi sedaj je pod vodo). Res je, da je del plodov propadel, vendar pa jih je tudi dosti ostalo zdravih in ti bodo predstavljali genski vir za ekstremno vlago.

Na podlagi opravljenih poskusov smo ugotovili, da preizkušeni metode pridobivanja homozigotnih linij s kulturo neoprašenih plodnic (t.i. *in vitro* ginogeneza) in z opraševanjem z obsevanim pelodom za zdaj še nista dovolj primerni za indukcijo in regeneracijo haploidnih rastlin ter kasneje homozigotnih diploidnih linij. Vzrok je najverjetneje v sami zgradbi bučnega peloda, ki po svoji velikosti daleč presega druge znane vrste kmetijskih rastlin. Tak pelod je zato zelo občutljiv na mnogo dejavnikov, se hitro izsuši in ga je težko manipulirati. Pri sorodni vrsti (melonah) je bil tak pristop sicer uspešen, vendar je pelod precej manjši. Zaključujemo, da je za žlahtnjenje hibridnih sort za zdaj bolj primerna metoda samoopraševanja, ki se lahko kombinira z reševanjem nezrelih embrijev. Reševanje nezrelih embrijev z *in vitro* kulturo bi namreč omogočilo dve generaciji na leto, kar bi bistveno skrajšalo čas potreben za pridobitev homozigotnih linij.

Z izborom ustreznega genskega materiala in postopkov žlahtnjenja tekom tega projekta je vse pripravljeno za naslednjo fazo žlahtnjenja v kateri bo poglobitni cilj registracija novih sort.

## Literatura

Brouers M, Michel-Wolwertz MR (1983) Estimation of protochlorophyll(ide) contents in plant extracts; re-evaluation of the molar absorption coefficient of protochlorophyll(ide). *Photosynth Res* 4:265-270.

Gong L, Pachner M, Kalai K, Lelley T (2008) SSR-based genetic linkage map of *Cucurbita moschata* and its synteny with *Cucurbita pepo*. *Genome* 51 (11):878-887. doi:10.1139/g08-072

Košmrlj K, Kastelec D, Bohanec B (2014a) Styrian oil pumpkin pollen germinability at higher irradiation doses: optimization of the *in vitro* germination protocol and irradiation procedure. *Turk J Biol* 38 (4):516-522. doi:10.3906/biy-1402-58

Košmrlj K, Kladnik A, Bohanec B (2014b) Adventitious regeneration in styrian oil pumpkin in relation to the endoreduplication pattern and induced tetraploidy on fusaric acid-supplemented media. *Plant Growth Regul*:1-8. doi:10.1007/s10725-014-9961-5

Košmrlj K, Murovec J, Bohanec B (2013) Haploid induction in hull-less seed pumpkin through parthenogenesis induced by X-ray-irradiated pollen. *J Am Soc Hortic Sci* 138 (4):310-316

Murovec J, Drašlar K, Bohanec B (2012) Detailed analysis of *Cucurbita pepo* seed coat types and structures with scanning electron microscopy. *Botany-Botanique* 90 (11):1161-1169. doi:10.1139/b2012-088

Murovec J, Drašlar K, Bohanec B (2012) Detailed analysis of *Cucurbita pepo* seed coat types and structures with scanning electron microscopy. *Botany-Botanique* 90 (11):1161-1169. doi:10.1139/b2012-088

MUROVEC, Jana. (2015) Phenotypic and genetic diversity in pumpkin accessions with mutated seed coats. *HortScience* 50: 211-217

Podržaj A (2012) Mikroskopska analiza zgradbe semenske ovojnice pri bučah (*Cucurbita pepo* L.) : diplomsko delo, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Diplomsko delo visokošolskega strokovnega študija - 1. stopnja, 26, Ljubljana

Rižnik A (2011) Proučitev postopkov pospešenega generacijskega cikla pri oljnih bučah (*Cucurbita pepo* L. subsp. *pepo* var. *stryriaca* Grebensč.) s kulturo nezrelih embrijev *in vitro* in poskus medvrstnega križanja *C. pepo* x *C. maxima* : diplomsko delo, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Diplomski dela, 70, Ljubljana

Sauton A, Devaulx RD (1987) Induction of gynogenetic haploid plants in muskmelon (*Cucumis melo* L.) by use of irradiated pollen. *Agronomie* 7 (2):141-148. doi:10.1051/agro:19870209

Stajič E (2013) Indukcija haploidov pri bučnicah (*Cucurbitaceae*) : diplomski seminar, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Diplomski seminar univerzitetnega študija - 1. stopnja, 145, Ljubljana

Tausz M, Wonisch A, Grill D, Morales D, Jimenez MS (2003) Measuring antioxidants in tree species in the natural environment: from sampling to data evaluation. *J Exp Bot* 54(387):1505–1510

Teppner H (2000) *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae) — history, seed coat types, thin coated seeds and their genetics. *Phyton-Ann Rei Bot* 40:1-42

URBANEK KRAJNC, Andreja, JANŽEKOVIČ, Ignac, ŠOBER, Andreja, IVANČIČ, Anton (2015) The impact of interspecific hybridization on the chemical compositions of oil pumpkin seeds *Phyton*, ISSN 0079-2047, v tisku