

Agrovoc descriptors: brassica oleracea capitata, xanthomonas campestris, gene banks, collections, biodiversity, genetic resources, natural resources, data collection, varieties, land varieties, plant breeding, germplasm, hybrids, pollination, plant anatomy, inbreeding, crossbreeding, disease resistance, chemical composition

Agris category code: F30

Genska banka zelja in žlahtnjenje hibridnih sort (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. f. *alba*)

Katarina RUDOLF PILIH¹, Borut BOHANEČ², Jelka ŠUŠTAR VOZLIČ³

Received November 30, 2012; accepted December 05, 2012.

Delo je prispelo 30. novembra 2012, sprejeto 05. decembra 2012.

IZVLEČEK

V Sloveniji ima pridelovanje zelja stoletno tradicijo, kljub temu pa se danes v glavnem pridelujejo le tuji hibridi in v manjši meri stare domače sorte. Prednost domačih sort je v lastnostih (npr. za kisanje), ki so vezane na zahteve domačega trga, medtem ko so hibridni kultivarji izenačeni, dosegajo veliko višje pridelke in imajo vnesene določene gene za specifične odpornosti proti boleznim. Pri dosedanjem žlahtnjenju zelja smo se na Kmetijskem inštitutu Slovenije kot tudi na Biotehniški fakulteti osredotočili predvsem na žlahtnjenje hibridnih sort zelja, ki naj bi vključevale dednino domačih ali udomačenih sort ter imeli povečano odpornost na črno žilavko kapusnic (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, Pammel). Kot izhodiščni material smo uporabili udomačeno sorto 'Varaždinsko' in angleški hibridni kultivar 'Hawke'. Čiste linije smo v preteklih letih dobili z indukcijo haploidov s pomočjo kulture mikrospor. Linije smo ocenili in križali ter križance primerjali z že uveljavljenimi tujimi hibridi. Na osnovi teh rezultatov bo zasnovan nadaljnji postopek. V kolikor bomo določili ugodno kombinacijo dveh ali več linij, bo del projekta usmerjen v razmnoževanje linij s samoopraševanjem, del pa v ugotavljanje izražanja inkompatibilnosti in navzkrižne sposobnosti opraševanja. Na ta način bomo pridelali hibridno seme, ki ga bo možno oddati v sortno testiranje, obenem pa se bo nadaljevalo delo na zagotavljanju možnosti pridobivanja semen izbranih linij. Na novo pridobljene linije bomo vključili v nova križanja in tako pridobili material, ki je potreben za nemoteno nadaljevanje žlahtniteljskega programa.

Pomemben vir dednine za križanja predstavljajo tudi domače avtohtone sorte. V genski banki zelja na Kmetijskem inštitutu Slovenije hranimo 12 različnih akcesij iz različnih predelov Slovenije. Od tega sta dva slovenska kultivarja, 'Emona' in 'Kranjsko okroglo', ki sta bila požlahtnjena na Kmetijskem inštitutu Slovenije. Akcesijam smo v preteklih letih določili tako morfološke kot tudi biokemične lastnosti. Na podlagi

dobljenih rezultatov smo izbrali najprimernejše in le te semenili. Na ta način smo pridobili seme rastlin primernih za selekcijo kot tudi za križanja, ki bodo v nadaljevanju lahko pripeljala do požlahtnitve novih sort in hibridov zelja.

Ključne besede: zelje, žlahtnjenje, genska banka

ABSTRACT

CABBAGE GENE BANK AND BREEDING OF HYBRID VARIETIES (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. f. *alba*)

Cabbage production in Slovenia has a long tradition. Domestic varieties are bred from autochthonous population from different parts of Slovenia. The characteristics of domestic varieties (e.g. for sauering) are important for Slovenian consumers. On the other hand hybrid cultivars are uniform, give much higher yields and they are resistant to different diseases. So far, cabbage breeding at the Agricultural Institute of Slovenia and at Biotechnical faculty was focused on breeding of hybrid cultivar with germplasm of domesticated varieties and with increased resistance to black root (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, Pammel). A cross-breeds between domesticated variety 'Varaždinsko' and English hybrid cultivar 'Hawke' were used for inbreed production via microspore culture. Lines and hybrids were analysed in field trial and compared with commercial hybrids. Based on these results, the new procedure of breeding will be designed. If we will determine a favorable combination of two or more lines, the part of a project will be focused on lines reproduction with self pollination, detecting expression of incompatibility and cross-pollination abilities. In this way the hybrid seed will be produced and included in the national variety tests. At the same time we will continue with self-pollination to provide enough seeds of selected lines. The newly produced lines will be included in the new crossings. In this way we will gain the material needed for the continuation of breeding program.

¹ Dr. Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova 17, 1000 Ljubljana, e-mail: katarina.rudolf@kis.si

² Prof. dr. Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

³ Doc.dr. Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova 17, 1000 Ljubljana

As an important source of germplasm for crosses are the local autochthonous varieties. The gene bank of cabbage at Agricultural Institute of Slovenia combines 12 accessions from different parts of Slovenia. Two of these are Slovenian cultivars: 'Emona' and 'Kranjsko okroglo'. Both varieties were bred at Agricultural Institute of Slovenia. According to

the assessment of morphological and biochemical characteristics of all accessions in gene bank the most appropriate ones will be chosen for the production of new varieties and hybrids.

Key words: cabbage, breeding, genebank

1 UVOD

Pridelovanje zelja ima v Sloveniji stoletno tradicijo. Gojimo v glavnem domače sorte požlahtnjene iz avtohtonih populacij, ki izvirajo iz okolice Ljubljane, to so Kašeljško in Ljubljansko zelje. Z Bloške planote izhaja Bloško zelje, iz Škofjeloškega pogorja Zaloško zelje ter na meji s Hrvaško različni tipi Varaždinskega zelja.

S stališča slovenskega zelenjadarstva je pomembno žlahtnjenje novih sort in hibridnih kultivarjev zelja, ki bodo vključevali lastnosti domačih sort. Glede na to, je potrebno vzdrževati avtohtone slovenske sorte in populacije, ki so v genski banki Kmetijskega inštituta Slovenije. Žlahtnjenje lahko poteka na klasičen način, ki je dolgotrajen in delovno zahteven ali pa z uporabo biotehnoloških postopkov, s pomočjo katerih se je število let potrebnih za nastanek novih sort občutno skrajšalo. Žlahtnjenje hibridov vključuje

pridobivanje čistih linij, selekcijo linij, določanje kombinacijskih sposobnosti izbranih linij in križanje. Zelje je dvoletna tujeprašna rastlina. Postopek pridobivanja linij na klasičen način traja 10 let, saj potrebujemo najmanj pet generacij samoopraševanja. Precej hitreje lahko čiste linije pridobimo s postopkom indukcije haploidov oziroma dihaploidov. Dihaploidne rastline nastanejo s spontanim ali induciranim podvojevanjem kromosomov v haploidnih celicah in so teoretično popolnoma homozigotne. S samooprašitvijo dihaploidnih rastlin dobimo potomstvo, ki ga imenujemo čista linija. V preteklih letih smo v naš laboratorij uspešno vpeljali tehniko pridobivanja čistih linij s pomočjo kulture mikrospor. Cilj, ki smo si ga zastavili je vzgoja visoko produktivnega hibrida zelja s kvalitativnimi lastnostmi v slovenskem prostoru uveljavljenega kultivarja Varaždinsko.

2 MATERIAL IN METODE

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

Za izhodiščni material smo v poskusih indukcije haploidov iz mikrospor uporabili kultivar 'Hawke F2' in udomačeno sorto 'Varaždinsko'. Poleg navedenih genotipov smo v poskus indukcije haploidov vključili še tri križance med kultivarjem Hawke in Varaždinsko. V nadaljevanju poskusa smo proučevali čiste linije zgoraj navedenih genotipov, ki smo jih pridobili s postopkom indukcije haploidov. V poljski poskus smo vključili 54 čistih linij in križancev. Kot

kontrolno smo uporabili sorto 'Varaždinsko' ter štiri komercialne, v Sloveniji uveljavljene hibride: 'Krautami F1', 'Atria F1', 'Bravo F1' in 'Rinda F1'.

2.2 Kultura mikrospor

Izolirane mikropore petih genotipov smo kultivirali na saharozno (NLN) gojišče brez rastnih regulatorjev, kateremu smo dodali sredstva za podvojevanje genoma: trifluralin in orizalin v različnih koncentracijah. Za induciranje sporofitnega razvoja mikrospor smo uporabili 48 urno tretiranje pri temperature 30 °C (Duijs, 1992; Hansen,

1994). Po preteku 21 do 30 dni od kultiviranja mikrospor v gojišče smo prešteli inducirane embrije.

2.3 Izsuševanje embrijev in dodajanje abscezinske kisline

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

2.4 Regeneracija rastlin iz embrijev in aklimatizacija

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

2.5 Merjenje ploidnosti

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

2.6 Vernalizacija dihaploidov

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

2.7 Samoopraševanje in križanje dihaploidov

Pri samoopraševanju dihaploidov zelja prihaja velikokrat do izražanja samoinkompatibilnosti. Z namenom, da bi efekt samoinkompatibilnostnih mehanizmov zmanjšali, smo pri samoopraševanju in križanju uporabili 6 % CO₂ in 3 % NaCl. Rastlinam, ki so imele 5-10 odprtih cvetov, smo le-te porezali. Zaprte cvetove primerne dolžine smo s pinceto odprli. Tako pripravljene cvetove smo oprášili s cvetnim prahom predhodno porezanih cvetov. Oprášene cvetove smo nato 12 ur tretirali s CO₂ v posebni komori. V primeru, ko smo rastline tretirali z NaCl, smo oprášene cvetove, po preteku 30 minut od opráševanja, poškopili. Oprášene cvetove smo pokrili s papirnatimi vrečkami in tako onemogočili neželjena križanja. Po oprášitvi so se formirali luski. Ko so se le-ti posušili, smo jih pobrali in pridobili seme čistih linij in križancev.

2.8 Preizkušanje čistih linij in križancev

V poljskem poskusu smo proučevali dihaploidne linije in križance. Kot kontrolne rastline smo uporabili sorto 'Varaždinsko' in štiri v Sloveniji uveljavljene hibride. Vse rastline vključene v poskus smo na koncu rastne dobe ocenili in jim določili izbrane parameter. Ohranili smo tiste čiste linije, ki so imele po statističnem izrednotenju najboljše lastnosti. Ponovno smo jih vernalizirali ter izvedli nova križanja med 18 različnimi genotipi, od tega smo jih sedem križali dialelno.

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

V raziskave odpornosti zelja proti črni žilavki smo vključili 6 čistih linij, 3 genotipe F1 generacije, ki izhajajo iz križanj med občutljivimi in tolerantnimi linijami ter za kontrolo tolerantni hibrid 'Matsumo F1' in občutljiv hibrid 'Krautman F1'. Štiri tedenske

sadike smo okužili s suspenzijo bakterij rase 1, 3 in 4 koncentracije 10^8 - 10^9 cfu (Vincente in sod., 2000; Jensen in sod., 2005). Ločeno smo gojili rastline, ki jih nismo okužili in smo jih uporabili kot kontrolo. Rastline smo gojili še

tri tedne v lončnih platojih in jih nato presadili na polje. Okuženost smo ocenili ob presajanju rastlin na prosto, drugič v polni rasti in tretjič ob spravilu pridelka.

3 REZULTATI

V poskusih indukcije haploidov smo s križanjem med odzivnim in neodzivnim genotipom zelja dosegli visoko stopnjo embriogeneze in dokazali, da je lastnost odzivnosti na indukcijo haploidov iz mikrospor močno dedna in v največji meri odvisna od genotipa. Število embrijev na genotip je bilo od 13,6 do 40,4 na petrijevko. Predno se odločimo za podvojevanje genoma, je potrebno proučiti stopnjo spontane diploidizacije, ki se močno razlikuje že med sorodnimi genotipi. Orizalin na podvojevanje genoma ni imel vpliva, medtem ko je bil trifluralin pri višjih koncentracijah deloma učinkovit. Trifluralin na embriogenezo ni imel vpliva, orizalin pa je delno ali popolno inhibiral indukcijo embrijev. Tretiranje embrijev z abscizinsko kislino in izsuševanje omogoča visoko stopnjo regeneracije in normalen razvoj rastlin zelja. Dosegli smo 54,7- 70,6 % regeneracijo. Za nadaljnje postopke žlahtnjenja je potrebno z indukcijo haploidov pridobiti čim večje število dihaploidov. Obdobje aklimatizacije in vernalizacije preživi določen odstotek rastlin, ki se jih lahko uporabi v postopkih

samoopraševanja. Samooprašijo se le rastline, ki nimajo izraženih samoinkompatibilnostnih mehanizmov. Z uporabo CO_2 je možno te mehanizme oslabiti. Čiste linije kažejo manjšo stopnjo inbriding depresije, medtem ko je pri križancih močno izražen heterotičen efekt. Od skupno 980 regenerantov smo aklimatizirali 387 dihaploidov, od tega je vernalizacijo preživel 33 % rastlin. Ob uporabi CO_2 smo uspešno samooprašili 54 linij zelja. Na podlagi morfoloških znakov smo odbrali 18 najprimernejših linij in jih medsebojno križali ter tako pridobili veliko število križancev, ki smo jih ovrednotili v poljskih poskusih. V raziskavah odpornosti na črno žilavko kapusnic smo določili dve liniji, ki sta tolerantni na tri rase te bakterijske bolezni. Tako smo pridobili material, ki je uporaben v namene slovenskega žlahniteljskega programa kot tudi širše. Tolerantne linije smo vključili v nova križanja in se tako približali požlahnitvi hibrida, ki bo imel poleg primernih morfoloških lastnosti tudi odpornost na črno žilavko kapusnic. Dobljeni rezultati so tudi osnova za proučevanje odpornosti na nivoju genoma.

4 SKLEPI

Skladno z vsem navedenim lahko ugotovimo, da nam je s postopkom indukcije haploidov rastlin uspelo inducirati veliko število dihaploidnih rastlin, ki smo jih lahko uporabili v postopkih samoopraševanja. Na ta način smo pridobili čiste linije, ki smo jih medsebojno križali. Izvedli smo 187 križanj med 18 čistimi linijami. Na podlagi poljskih poskusov

križanci niso v celoti izpolnili naših pričakovanj, zato smo zasnovali nov žlahniteljski cikel, v katerega smo vključili genotipe, ki imajo poleg primernih morfoloških lastnosti, tudi odpornost na črno žilavko kapusnic. Celoten postopek žlahtnjenja se tako nadaljuje in trenutno smo v fazi preverjanja novih čistih linij. Sledi križanje

odbranih čistih linij in ocenjevanje linij v poljskem poskusu. Tako se približujemo požlahnitvi prvega slovenskega hibrida zelja, ki bo imel lastnosti domačih sort, ki so zanimive tako za slovenskega potrošnika, kot tudi širše.

5 ZAHVALA

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

6 VIRI

- Duijs J.C., Voorrips R.E., Visser D.L., Custers J.B.M. 1992. Microspore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea* L. *Euphytica*, 60: 45-55
- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50:151-158
- Hansen M. 1994. Gametic embryogenesis in *Brassica*: optimisation of production and germination of embryos. V: Proceedings of the international Colloquium on Impact of Plant Biotechnology on Agriculture. Rogla, 5-7 dec. 1994. Javornik B., Bohanec B., Kreft I. (eds). Ljubljana, Biotechnical Faculty, Agronomy Department, Centre for Plant Biotechnology and Breeding:15-18
- Jensen D.B., Massomo S.M.S., Swai I.S., Hockenhull J., Bode Andersen S. 2005. Field evaluation for resistance to the black rot pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in cabbage (*Brassica oleracea*). *European Journal of Plant Pathology*, 113:297-308
- Otto F.J., Oldiges H., Gohde W., Jain W.K. 1981. Flow cytometric measurement of nuclear DNA content variations as a potential *in vivo* mutagenicity test. *Cytometry*, 2:189-191
- Vincente J. G., Conway J., King G.J., Taylor J.D. 2000. Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in *Brassica* spp. *Acta Horticulturae* 593:61-67