

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Primož TITAN

**DERIVATI OKSANILNE KISLINE KOT
POTENCIJALNA SREDSTVA ZA KEMIČNO
HIBRIDIZACIJO NAVADNE PŠENICE (*Triticum
aestivum* L.) IN IZKORIŠČANJE HETEROZE V
SKUPINI HEKSAPLOIDNIH PŠENIC**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Primož TITAN

**DERIVATI OKSANILNE KISLINE KOT POTENCIJALNA SREDSTVA
ZA KEMIČNO HIBRIDIZACIJO NAVADNE PŠENICE (*Triticum
aestivum* L.) IN IZKORIŠČANJE HETEROZE V SKUPINI
HEKSAPLOIDNIH PŠENIC**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**DERIVATIVES OF OXANILIC ACID AS POTENTIAL CHEMICAL
HYBRIDIZING AGENTS FOR COMMON WHEAT (*Triticum aestivum*
L.) AND HETEROSESIS EXPLOITATION IN HEXAPLOID WHEAT
GROUP**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2013

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa Senata Univerze v Ljubljani z dne 27. septembra 2010 je bilo potrjeno, da kandidat izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja biotehnologije. Za mentorja je bil imenovan izr. prof. dr. Vladimir Meglič ter za somentorja doc. dr. Ludvik Rozman.

Doktorska disertacija je zaključek podiplomskega študija Bioloških in biotehniških znanosti s področja biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Sinteza derivatov oksanilne kisline, ki so obravnavani v študiji je bila izvedena na Odseku za fizikalno in organsko kemijo, Instituta "Jožef Stefan". Njihovo testiranje je potekalo na lokacijah Jablje pri Trzinu in Krog pri Murski Soboti. Križanja za testiranje kombinacijske sposobnosti in učinka heteroze so bila opravljena na Seleksijskem centru Ptuj, lokaciji Krog pri Murski Soboti in polju Poljoprivrednog instituta Osijek. Testiranje F_1 hibridnih kombinacij in pripadajočih starševskih komponent je potekalo na Seleksijskem centru Ptuj, lokaciji Jablje pri Trzinu in polju Poljoprivrednog instituta Osijek. Statistična analiza kombinacijske sposobnosti in učinka heteroze je bila opravljena na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin Oddelka za agronomijo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: Prof. dr. Borut Bohanec
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Mentor in član: Izr. prof. dr. Vladimir Meglič
Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za poljedelstvo in semenarstvo

Somentor in član: Doc. dr. Ludvik Rozman
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: Prof. dr. Anton Ivančič
Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemsko vede

Datum zagovora:

Doktorsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 633.11:606:631.528(043.3)=163.6
KG	heteroza / hibridna sorta / linijska sorta / moška sterilnost / navadna pšenica / specifična kombinacijska sposobnost / splošna kombinacijska sposobnost / sredstvo za kemično hibridizacijo / <i>Triticum aestivum L.</i> / znotrajvrstni križanec
AV	TITAN, Primož, univ. dipl. ing. kmet.
SA	MEGLIČ, Vladimir (mentor) / ROZMAN, Ludvik (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, področje: Biotehnologija
LI	2013
IN	DERIVATI OKSANILNE KISLINE KOT POTENCIJALNA SREDSTVA ZA KEMIČNO HIBRIDIZACIJO NAVADNE PŠENICE (<i>Triticum aestivum L.</i>) IN IZKORIŠČANJE HETEROZE V SKUPINI HEKSAPLOIDNIH PŠENIC
TD	Doktorska disertacija
OP	IX, 95 str., 21 pregl., 16 sl., 127 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Predstavljena študija je povezana z metodologijo oblikovanja hibridnih sort navadne pšenice (<i>Triticum aestivum L.</i>), ki predstavljajo zaradi genetskega fenomena heteroze pomembno alternativo splošno uveljavljenim linijskim sortam. Za indukcijo moške sterilnosti, ki je osnovni pogoj za razvoj hibridnih sort navadne pšenice, je bila na Odseku za fizikalno in organsko kemijo, Instituta "Jožef Stefan" izvedena sinteza devetih derivatov oksanilne kisline. Sintetizirani derivati oksanilne kisline so bili preizkušeni skupaj s komercialnim sredstvom za kemično hibridizacijo CROISOR® 100 kot potencialna sredstva za kemično hibridizacijo navadne pšenice. Rezultati poljskega preizkušanja so potrdili, da derivati oksanilne kisline delujejo kot inhibitorji mikrosporogeneze in da lahko dosegajo učinkovitost sredstva CROISOR® 100, katerega aktivna snov (sintofen) spada v kemično skupino substituiranih kinolinov. Poleg tega se je pri preizkušanju najperspektivnejšega derivata oksanilne kisline (4-bromoooksanilna kislina) na šestih različnih genotipih navadne pšenice izkazalo, da le-ta deluje na tretirane rastline manj fitotoksično in da dosega boljšo selektivnost kot sredstvo CROISOR® 100. Poleg učinkovitega sistema za indukcijo moške sterilnosti je za uspešno izkoriščanje heteroze pri navadni pšenici pomembna tudi dednina oz. vključene starševske komponente, v katerih je "konzervirana" raven heteroze, ki jo je možno izkoristiti s hibridnimi sortami. S testiranjem kombinacijske sposobnosti v dveh različnih dedninah navadne pšenice, ki prevladujeta na območju Republike Slovenije (linijske sorte francoskih žlahtniteljskih hiš in Poljoprivrednog instituta Osijek) je bila dosežena raven heteroze, ki je presegla produktivnost standardnih kultivarjev navadne pšenice. Poleg tega pa se je izkazalo, da je visoko raven heteroze možno doseči tudi s križanjem med različnimi podvrstami vrste <i>T. aestivum</i> (npr. <i>T. aestivum</i> subsp. <i>vulgare</i> × <i>T. aestivum</i> subsp. <i>sphaerococcum</i>).

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dd
DC	UDC 633.11:606:631.528(043.3)=163.6
CX	chemical hybridizing agent / common wheat / general combining ability / heterosis / hybrid wheat / intra-specific hybrid / line variety / male sterility / specific combining ability / <i>Triticum aestivum</i> L.
AU	TITAN, Primož
AA	MEGLIČ, Vladimir (supervisor) / ROZMAN, Ludvik (co-advisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Biotechnology
PY	2013
TI	DERIVATIVES OF OXANILIC ACID AS POTENTIAL CHEMICAL HYBRIDIZING AGENTS FOR COMMON WHEAT (<i>Triticum aestivum</i> L.) AND HETEROSES EXPLOITATION IN HEXAPLOID WHEAT GROUP
DT	Doctoral Dissertation
NO	IX, 95 p., 21 tab., 16 fig., 127 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	The presented study is associated with the methodology of development of common wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) hybrid varieties, which represent an important alternative to dominating line varieties. The prerequisite for the development of hybrid varieties is the induction of a reliable male sterility. For this purpose, a synthesis of nine oxanilic acid derivatives was carried out at the Department of Physical and Organic Chemistry at the Institute "Jožef Stefan". The synthesized derivatives of oxanilic acid were then tested together with the commercial chemical hybridizing agent CROISOR® 100, as potential new chemical hybridizing agents for wheat. The results of the field testing confirmed that the above mentioned derivatives of oxanilic acid acted as microsporogenetic inhibitors and that they could reach the efficiency of CROISOR® 100, whose active substance (sintofen) is classified as a substituted cinnoline. Further, the testing of the most promising derivative of the oxanilic acid (4-bromooxanilic acid) on six different wheat genotypes showed that this chemical was less phytotoxic and more selective when compared with CROISOR® 100. One of the conditions for a successful exploitation of heterosis in common wheat, associated with the induction of male sterility, is also appropriate germplasm, i.e., parental material, which can be considered as a crucial factor associated with the expression of heterosis that can be exploited in hybrid varieties. The analysis of combining ability which involved two types of germplasm shows that line varieties of the French breeding institutions and line varieties from the Agricultural Institute Osijek represent a good basis for further breeding. Our work resulted with hybrid combinations which exceeded the productivity of standard cultivars. Furthermore, this study also showed that a high level of heterosis can also be achieved by crosses between different subspecies of <i>T. aestivum</i> (e.g., <i>T. aestivum</i> subsp. <i>vulgare</i> × <i>T. aestivum</i> subsp. <i>sphaerococcum</i>).

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	IX
1 UVOD	1
1.1 INDUKCIJA MOŠKE STERILNOSTI KOT PREDPOGOJ ZA USPEŠNO ŽLAHTNJENJE NAVADNE PŠENICE	1
1.2 IZKORIŠČANJE HETEROZE V SKUPINI HEKSAPLOIDNIH PŠENIC	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	4
2 PREGLED OBJAV	5
2. 1 HIBRIDNE SORTE NAVADNE PŠENICE V PRIMERJAVI Z LINIJSKIMI SORTAMI NAVADNE PŠENICE	5
2. 2 INDUKCIJA MOŠKE STERILNOSTI PRI NAVADNI PŠENICI	7
2.2.1 Citoplazemsko-genetska moška sterilnost.....	7
2.2.2 Kemična indukcija moške sterilnosti.....	9
2.2.2 Transgena indukcija moške sterilnosti.....	12
2. 3 GENETSKI FENOMEN HETEROZE IN NJEGOVO IZKORIŠČANJE PRI NAVADNI PŠENICI	15
2.3.1 Genetski fenomen heteroze	15
2.3.2 Uporaba morfoloških, biokemijskih in molekulskih markerjev pri izkoriščanju genetskega fenomena heteroze s hibridnimi sortami navadne pšenice.....	19
3 MATERIAL IN METODE	23
3.1 VPLIV DERIVATOV OKSANILNE KISLINE NA INDUKCIJO MOŠKE STERILNOSTI PRI NAVADNI PŠENICI	23
3.1.1 Učinkovitost sintetiziranih derivatov oksanilne kisline v primerjavi s komercialnim sredstvom za kemično hibridizacijo CROISOR® 100	23
3.1.2 Selektivnost in fitotoksičnost 4-bromooksanilne kisline v primerjavi s komercialnim sredstvom za kemično hibridizacijo CROISOR® 100	26
3.1.3 Določanje učinkovitosti in fitotoksičnosti sintetiziranih derivatov oksanilne kisline in komercialnega sredstva za kemično hibridizacijo CROISOR® 100	27
3.2 TESTIRANJE KOMBINACIJSKE SPOSOBNOSTI LINIJSKIH SORT NAVADNE PŠENICE IN KVANTITATIVNA ANALIZA HETEROZE V SKUPINI HEKSAPLOIDNIH PŠENIC Z GENOMSKO STRUKTURO AABBDD	28

3.2.1	Testiranje kombinacijske sposobnosti linijskih sort navadne pšenice francoskih žlahtniteljskih hiš in Poljoprivrednog instituta Osijek	28
3.2.2	Preverjanje stopnje hibridnosti pri poskusni pridelavi hibridnega semena navadne pšenice	32
3.2.2.1	Rastlinski material za izolacijo DNK	32
3.2.2.2	Izolacija DNK z metodo KingFisher	33
3.2.2.3	Določanje koncentracije DNK	34
3.2.2.4	Namnoževanje mikrosatelitnih lokusov s polimerazno verižno reakcijo – PCR ..	34
3.2.2.5	Analiza namnoženih fragmentov DNK in analiza dedovanja	35
3.2.3	Statistična obdelava podatkov pri testiranju splošne in specifične kombinacijske sposobnosti linijskih sort navadne pšenice	35
3.2.4	Kvantitativna analiza heteroze v skupini heksaploidnih pšenic z genomsko strukturo AABBDD	40
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	43
4.1	VPLIV DERIVATOV OKSANILNE KISLINE NA INDUKCIJO MOŠKE STERILNOSTI PRI NAVADNI PŠENICI	43
4.1.1	Sinteza derivatov oksanilne kisline in njihova modifikacija v vodotopno stanje ter priprava škropilne suspenzije za aplikacijo na polju	43
4.1.2	Učinkovitost sintetiziranih derivatov oksanilne kisline v primerjavi s komercialnim sredstvom za kemično hibridizacijo CROISOR® 100	45
4.1.3	Selektivnost in fitotoksičnost 4-bromoooksanilne kisline v primerjavi s komercialnim sredstvom za kemično hibridizacijo CROISOR® 100	52
4.2	TESTIRANJE KOMBINACIJSKE SPOSOBNOSTI LINIJSKIH SORT NAVADNE PŠENICE IN KVANTITATIVNA ANALIZA HETEROZE V SKUPINI HEKSAPLOIDNIH PŠENIC Z GENOMSKO STRUKTURO AABBDD	55
4.2.1	Vrednosti kombinacijske sposobnosti v povezavi z učinkom heteroze za linijske sorte navadne pšenice francoskih žlahtniteljskih hiš	55
4.2.2	Vrednosti kombinacijske sposobnosti v povezavi z učinkom heteroze za linijske sorte Poljoprivrednog instituta Osijek	68
4.2.3	Kvantitativna analiza heteroze v skupini heksaploidnih pšenic z genomsko strukturo AABBDD	73
5	SKLEPI	78
6	POVZETEK (SUMMARY)	80
6.1	POVZETEK	80
6.2	SUMMARY	83
7	VIRI	87
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam linijskih sort.....	29
Preglednica 2: Seznam F ₁ križancev.....	30
Preglednica 3: Opis mikrosatelitnih markerjev uporabljenih pri določanju stopnje hibridnosti v poskusni pridelavi hibridnega semena navadne pšenice (Röder in sod., 2002).....	34
Preglednica 4: Primer zbranih podatkov za križance in starševske komponente (Warghese in sod., 1976).....	36
Preglednica 5: Primer s štirimi ponovitvami, štirimi linijami in štirimi testerji (Warghese in sod., 1976).....	37
Preglednica 6: Sorodniki navadne pšenice, ki so bili vključeni v znotrajvrstna križanja.....	41
Preglednica 7: Seznam znotrajvrstnih F ₁ križancev.....	42
Preglednica 8: Vpliv derivatov oksanilne kisline in standardnega sredstva za kemično hibridizacijo na moško sterilnost, višino rastline in število klaskov.....	48
Preglednica 9: Selektivnost 4-bromooksanilne kisline in komercialnega sredstva za kemično hibridizacijo.....	52
Preglednica 10: Analiza variance za parametre, ki so bili obravnavani pri testiranju kombinacijske sposobnosti linijskih sort francoskih žlahtniteljskih hiš.....	56
Preglednica 11: SKS vrednosti pri statistični analizi linijskih sort francoskih žlahtniteljskih hiš.....	57
Preglednica 12: Rangiranje skupin F ₁ hibridov za vrednosti povprečne starševske heteroze.....	58
Preglednica 13: Analiza linearne regresije za linijske sorte francoskih žlahtniteljskih hiš.....	59
Preglednica 14: PKS vrednosti in učinek heteroze v F ₁ generaciji za vse analizirane parametre – sezona 2010/11.....	60
Preglednica 15: PKS vrednosti in učinek heteroze v F ₁ generaciji za vse analizirane parametre – sezona 2011/12.....	64
Preglednica 16: Analiza variance za parametre, ki so bili obravnavani pri testiranju kombinacijske sposobnosti linijskih sort Poljoprivrednog instituta Osijek.....	69
Preglednica 17: SKS vrednosti pri statistični analizi linijskih sort Poljoprivrednog instituta Osijek.....	69
Preglednica 18: Analiza linearne regresije za linijske sorte Poljoprivrednog Instituta Osijek.....	70
Preglednica 19: PKS vrednosti in učinek heteroze v F ₁ generaciji za vse analizirane parametre – lokacija Osijek.....	71
Preglednica 20: PKS vrednosti in učinek heteroze v F ₁ generaciji za vse analizirane parametre – lokacija Jablje pri Trzinu.....	72
Preglednica 21: Učinek heteroze 39 znotrajvrstnih F ₁ križancev.....	77

KAZALO SLIK

Slika	1: Uporaba citoplazemsko-genetske moške sterilnosti pri pridelavi hibridnega semena.....	8
Slika	2: Klofencet (I), fenridazon (II) (Clofencet, 2012; Fenridazon 2012).....	11
Slika	3: Sintofen (Sintofen, 2012).....	12
Slika	4: Struktura genskih konstruktov pred in po rekombinaciji (Gils in sod., 2008).....	14
Slika	5: Genski konstrukt pTA29RNAi (Nawaz-ul-Rehman in sod., 2007).....	15
Slika	6: Genetski modeli za razlaganje heteroze in kvantitativen učinek gena (Chen, 2010).....	17
Slika	7: Preizkušanje devetih sintetiziranih derivatov oksanilne kisline in komercialnega sredstva za kemično hibridizacijo CROISOR® 100 v severovzhodni regiji – sezona 2009/10.....	24
Slika	8: Poskus za pridelavo hibridnega semena navadne pšenice z uporabo sredstva za kemično hibridizacijo CROISOR® 100 (Krog pri Murski Soboti, 2010/11).....	32
Slika	9: Sinteza derivatov oksanilne kisline.....	44
Slika	10: Pelodna zrna navadne pšenice (<i>Triticum aestivum L.</i>) obarvana z acetokarminom (1 % raztopina) pri 100 kratni povečavi.....	49
Slika	11: Vpliv interakcije lokacija × aktivna snov × fenofaza × poraba aktivne snovi na moško sterilnost.....	50
Slika	12: Vpliv interakcije lokacija × aktivna snov × fenofaza × poraba aktivne snovi na višino rastline.....	51
Slika	13: Vpliv interakcije aktivna snov × fenofaza × genotip na indukcijo moške sterilnosti.....	53
Slika	14: Vpliv interakcije aktivna snov × fenofaza × genotip na višino rastline.....	54
Slika	15: Distribucija heteroze za pridelek zrnja pri študiju linijskih sort francoskih žlahtniteljskih hiš.....	74
Slika	16: Distribucija heteroze za pridelek zrnja pri študiju linijskih sort Poljoprivrednog instituta Osijek.....	75

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ALS	Acetolaktat sintaza
BPH	Heterobeltiozis (angl. best-parent heterosis)
CGMS	Citoplazemsko-genetska moška sterilnost (angl. cytoplasmic-genetic male sterility)
DNK	Deoksiribonukleinska kislina
dsRNA	Dvostranski ribonukleinska kislina (angl. double-stranded ribonucleic acid)
EDTA	Etilen diamino tetraacetna kislina
EST - SSR	EST – mikrosatelitni marker (angl. expressed sequence tag simple sequence repeats)
EtOH	Etanol
HCl	Vodikov klorid
KAN	Kalcij amonijev nitrat
KS	Kombinacijska sposobnost
MDH	L-malat dehidrogenaza
miRNA	Mikro ribonukleinska kislina (angl. micro ribonucleic acid)
MPH	Povprečna starševska heteroza (angl. mid-parent heterosis)
NMS	Jedrna moška sterilnost (angl. nuclear male sterility)
PAGE	Poliakrilamidna gelska elektroforeza
PCR	Polimerazna verižna reakcija (angl. polymerase chain reaction)
PKS	Specifična kombinacijska sposobnost
Rf geni	Geni za obnovo fertilitnosti (angl. restorer fertility genes)
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. restriction fragment length polymorphism)
RNK	Ribonukleinska kislina
SH	Standardna heteroza (angl. standard heterosis)
siRNA	Majhna interferenčna ribonukleinska kislina (angl. small interfering ribonucleic acid)
SKS	Splošna kombinacijska sposobnost
SNP	"snip" (angl. single nucleotide polymorphism)
SSR	Mikrosatelitni marker (angl. simple sequence repeats)
ta-siRNA	Trans-delujoča majhna interferenčna ribonukleinska kislina (angl. trans-acting small interfering ribonucleic acid)
Tris-HCl	Tris-vodikov klorid

1 UVOD

1.1 INDUKCIJA MOŠKE STERILNOSTI KOT PREDPOGOJ ZA USPEŠNO ŽLAHTNJENJE NAVADNE PŠENICE

Glavni cilj pri žlahtnjenju navadne pšenice (*Triticum aestivum* L.), ki je med vsemi pšenicami (*Triticum* spp.) za svetovno gospodarstvo najpomembnejša je doseganje stalnega napredka pri gospodarsko pomembnih lastnostih kot je višina pridelka. Danes se za Osrednjo Evropo ocenjuje, da je letni prispevek žlahtnjena k rasti višine povprečnega pridelka zrnja navadne pšenice padel na 0,5 do 0,6 odstotka (Drezner, 2012). Ob upoštevanju, da se svetovna poraba pšenice hitro približuje meji 700 milijonov ton in, da rast povprečnega pridelka zrnja navadne pšenice v razvitem svetu že nekaj let stagnira se izrazi nuja po zamenjavi uveljavljenih tehnik žlahtnjenja navadne pšenice z učinkovitejšimi alternativami (Angus 2009; Grain..., 2012). Z drugimi besedami povedano to pomeni, da bo potrebno najti alternativo linijskim sortam navadne pšenice, ki danes skoraj v celoti prevladujejo pri pridelavi pšenice. Po mnenju tujih avtorjev predstavljajo alternativo linijskim sortam navadne pšenice hibridne sorte, ker omogočajo izkoriščanje genetskega fenomena heteroze (Angus, 1997; Longin in sod., 2012).

Fenomen heteroze oziroma hibridnega vigorja se najpogosteje povezuje s superiornostjo prve filialne generacije (F_1 generacija) s heterozigotno genetsko strukturo nad starševsko generacijo s homozigotno genetsko strukturo (Schnable in Swanson-Wagner, 2009). Za izkoriščanje heteroze se najpogosteje uporablajo F_1 hibridi oziroma hibridne sorte, ki nastanejo z nadzorovanim križanjem dveh genetsko različnih homozigotnih starševskih komponent ($\text{♀ AA} \times \text{♂ BB}$). Pri pridelavi hibridnega semena hermafroditnih rastlinskih vrst, kot je na primer navadna pšenica, je pogoj za nadzorovano križanje starševskih komponent indukcija moške sterilnosti v materini komponenti. Indukcija moške sterilnosti pomeni, da se pri rastlinski vrsti z dvospolnimi ali hermafroditnimi cvetovi začnejo tvoriti le ženske gamete, ki po združitvi z gametami opraševalca rezultirajo s heterozigotnim potomstvom prve filialne generacije (Borojević, 1981).

Za indukcijo moške sterilnosti pri navadni pšenici je bilo v preteklosti predlaganih več pristopov na genetski osnovi kot, so kromosomska moška sterilnost (XYZ sistem), jedrna moška sterilnost (NMS sistem) in uporaba citoplazemsко-genetske moške sterilnosti (CGMS sistem ali po starem CMS sistem) (Cisar in Cooper, 2002). Najdlje je znana uporaba moško sterilne citoplazme vrste *Triticum timopheevi* Zhuk., ki pa zahteva večkratna povratna križanja in učinkovit sistem za obnovo fertiliti v F_1 generaciji (Mohr in sod., 1993). Vir moško sterilne citoplazme za indukcijo moške sterilnosti pri navadni pšenici predstavljajo tudi vrste iz rodu *Aegilops* L., genotipi \times *Triticordeum* Ascherson et Graebner (heksaploidni amfiploid z genetsko strukturo AABBHchHch) in vrsta *Hordeum chilense* Roem. et Shult. (Martin in sod., 1995). Poleg pristopov na genetski osnovi so

znane še transgene rešitve za indukcijo moške sterilnosti (RNA interferenca, ekspresija citostatičnih in citotoksičnih polipeptidov) in izkoriščanje fototermične in fotoperiodične občutljivosti nekaterih linij navadne pšenice (Mansoor in sod., 2006; Huang in sod., 2007). Kljub vsemu pa se danes pri razvoju hibridnih sort navadne pšenice najpogosteje uporablja kemična indukcija moške sterilnosti s sredstvi za kemično hibridizacijo (Longin in sod., 2012). Sredstva za kemično hibridizacijo so kemikalije, ki v določeni fazи razvoja materine komponente prekinejo nastajanje cvetnega prahu ali mu odvzamejo zmožnost oploditve in tako povzročijo, da se dvospolna rastlinska vrsta ni sposobna samooploditi (Pravilnik ..., 2003). Da lahko govorimo o učinkovitem delovanju sredstva za kemično hibridizacijo mora biti dosežena vsaj 98 odstotna moška sterilnost (Zakon ..., 2005). Predstavniki sedanje generacije sredstev za kemično hibridizacijo so predvsem heterociklične karboksilne kisline s poudarkom na piridazinskem strukturnem tipu. Primeri teh aktivnih snovi so klofencet, fenridazon, sintofen in azetidin-3-karboksilna kislina. Glavna slabost te generacije sredstev za kemično hibridizacijo je izrazito toksično delovanje na okolje, tretirane rastline in uporabnika (Chakraborty in Devakumar, 2006a).

Razvoj sodobnih sredstev za kemično hibridizacijo se nadaljuje, predvsem v smeri doseganja boljše selektivnosti gametocidnega delovanja ter manjšega vpliva na okolje. Do danes je znano, da derivati oksalne kisline – oksanilati (arilamidi oksalne kisline) delujejo kot anti-alergeni, anti-astmatiki in da regulirajo izločanje kisline v prebavnem traktu (Sellstedt in sod., 1975; Cheney in sod., 1978). Poleg tega pa je znano tudi, da etilni estri zavirajo nastanek cvetnega prahu (Chakraborty in Devakumar, 2006b). Vendar pa so raziskave glede sinteze teh kemijskih učinkovin redke in tako ni veliko znanega o povezavi med njihovo strukturo in aktivnostjo. Zato je eden izmed namenov naše študije določiti potencial oksanilatov za indukcijo moške sterilnosti pri navadni pšenici, oziroma jih ovrednoti kot potencialna sredstva za kemično hibridizacijo.

1.2 IZKORIŠČANJE HETEROZE V SKUPINI HEKSAPLOIDNIH PŠENIC

Genetski fenomen heteroze je evolucijsko opredeljen kot superiornost heterozigotnega stanja nad homozigotnim stanjem, do njegovega učinka pa prihaja poleg prve filialne generacije (F_1 generacija) tudi v segregirajočih populacijah in stabilnih alopoliploidih kot je na primer navadna pšenica (*Triticum aestivum L.*) (Ni in sod., 2009). To pomeni, da je učinek heteroze že "konzerviran" v dednini navadne pšenice, ki predstavlja "gene pool" za razvoj hibridnih kombinacij oziroma hibridnih sort. Torej poleg učinkovitega sistema za indukcijo moške sterilnosti predstavlja pogoj za uspešno izkoriščanje heteroze pri navadni pšenici tudi dednina, ki neposredno vpliva na raven heteroze, ki jo je možno izkoristiti s hibridnimi sortami.

V dani dednini je najvišjo raven heteroze možno doseči s testiranjem splošne in specifične kombinacijske sposobnosti starševskih komponent (Shoran in sod., 2003). Pri tem gre za

kvantitativno analizo aditivnega in dominantnega učinka genov v celotnem genotipu F₁ hibrida. Aditivni učinek pomeni, da je učinek posameznega starševskega alela zajet v heterozigotnem stanju, dominanten učinek pa pomeni, da je heterozigotno stanje odvisno od učinka samo enega starševskega alela (Schnable in Swanson-Wagner, 2009). Cilj testiranja kombinacijske sposobnosti starševskih komponent je določiti hibridne kombinacije, v katerih je dominantni učinek genov najbolj izrazit. Drugače povedano, najperspektivnejše hibridne kombinacije rezultirajo z najvišjo specifično kombinacijsko sposobnostjo (Corbellini in sod., 2002).

Do danes je bilo objavljenih več študij, ki so že zelele določiti raven heteroze, ki jo je možno izkoristiti s hibridnimi sortami navadne pšenice. Odvisno od študije, različni avtorji navajajo, da lahko ob upoštevanju običajne gostote setve vrednosti za heterobeltiozis (heteroze glede na boljšega starša) presežejo 40 %, za standardno heterozo (heteroze glede na standarden kultivar) pa 30 %. V primeru, da je šlo za določanje ravni heteroze pri posamezni rastlini, so vrednosti za heterobeltiozis presegale tudi 160 %. V vseh obravnavanih primerih je bila raven heteroze določena za lastnosti, povezane s pridelkom zrnja (Cisar in Cooper, 2002).

V preteklosti se je pogosto izkazalo, da hibridne sorte navadne pšenice v primerjavi z najprodukтивnejšimi linijskimi sortami niso dosegale zadovoljive prednosti v smislu višje produkтивnosti. Možnost za zvišanje ravni heteroze, ki jo je možno izkoristiti v dednini navadne pšenice, predstavljajo medvrstna in znotrajvrstna križanja med predstavniki rodu *Triticum* L. Predvsem perspektiven se zdi razvoj heterotičnih amfidiploidov, ki temeljijo na križanju vrst, ki so sodelovali pri nastajanju današnje navadne pšenice (npr. križanje *Triticum turgidum* L. × *Triticum tauschii* (Coss.) Schmalh.). To predstavlja razvoj tako imenovanih sintetičnih heksaploidov (angl. synthetic wheat), ki lahko izražajo hkrati visok heterotičen učinek in dobro odpornost na abiotski stres (Morten, 2012). Za hitrejši razvoj "obogatene" dednine navadne pšenice pa je primernejša uporaba znotrajvrstnih križancev (angl. intra-specific hybrids), ki temeljijo na podvrstah vrste *Triticum aestivum* L. Vrsta *Triticum aestivum* L. obsega poleg navadne pšenice (lat. *Triticum aestivum* subsp. *vulgare* (Vill.) Mk.) še naslednje podvrste: *T. aestivum* subsp. *macha* (Dek. et Men.) Mk., *T. aestivum* subsp. *spelta* (L.) Thell., *T. aestivum* subsp. *sphaerococcum* (Perc.) Mk., *T. aestivum* subsp. *compactum* (Host.) Mk., *T. aestivum* subsp. *vavilovii* (Vill.) Mk., *T. aestivum* subsp. *zhukovskyi* A. M. Menabde & Eritzman. in *T. aestivum* subsp. *petropavlovskyi* Udachin & Migush (Ivančič, 2002; Wheat ..., 2012).

Poleg testiranja modificiranih derivatov oksanilne kisline kot potencialnih sredstev za kemično hibridizacijo navadne pšenice, temelji naša študija tudi na testiranju splošne in specifične kombinacijske sposobnosti linijskih sort navadne pšenice ter na znotrajvrstnih križanjih med predstavniki skupine heksaploidnih pšenic z genomsko strukturo AABBDD.

Namen tega je določiti potencial za razvoj hibridnih sort navadne pšenice in oceniti raven heteroze, ki jo je možno izkoristiti v skupini heksaploidnih pšenic s poudarkom na dednini navadne pšenice.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

V nadaljevanju predstavljene raziskave, ki obravnavajo derive oksanilne kisline poskušajo potrditi naslednje delovne hipoteze:

- da modificirani derivati oksanilne kisline (kislinski analogi izbranih oksanilatov in njihove soli) lahko pri navadni pšenici inducirajo 98 odstotno moško sterilnost,
- da derivati oksanilne kisline dosežejo 98 odstotno moško sterilnost pri enaki ali višji porabi aktivne snovi v primerjavi s komercialnim sredstvom za kemično hibridizacijo CROISOR® 100.

S testiranjem splošne in specifične kombinacijske sposobnosti starševskih komponent ter znotrajvrstnimi križanji med predstavniki skupine heksaploidnih pšenic želimo potrditi:

- da se z višanjem produktivnosti materine komponente viša tudi raven povprečne starševske heteroze,
- da je za pridelek zrnja hibridnih sort navadne pšenice splošna kombinacijska sposobnost pomembnejša od specifične kombinacijske sposobnosti,
- da je pri križanju navadne pšenice z ostalimi podvrstami vrste *Triticum aestivum L.* možno doseči višjo raven heteroze kot pri križanju navadne pšenice z navadno pšenico.

V naši študiji pridobljeni rezultati predstavljajo pomemben prispevek k sodobnemu žlahtnjenju navadne pšenice, ker v nadaljevanju predstavljena doktorska disertacija temelji na problematiki razvoja hibridnih sort navadne pšenice, ki danes predstavljajo pomembno alternativo splošno uveljavljenim linijskim sortam navadne pšenice.

2 PREGLED OBJAV

2. 1 HIBRIDNE SORTE NAVADNE PŠENICE V PRIMERJAVI Z LINIJSKIMI SORTAMI NAVADNE PŠENICE

V preteklosti so bile podane različne definicije za tako širok pojem, kot je sorta. Po UPOV-u bi lahko sorto iz biotehnološkega vidika definirali, kot skupino rastlin ali delov rastlin, če iz njih lahko spet pridobimo popolne rastline, znotraj najnižje znane botanične razvrstitev, ki jih je mogoče (Plant..., 2012):

- določiti po lastnostih, ki izvirajo iz določenega genotipa ali kombinacije genotipov,
- ločiti od katere koli druge skupine rastlin vsaj po eni od teh lastnosti,
- obravnavati, kot sistemsko enoto, če se te lastnosti med razmnoževanjem ne spreminjajo.

Sorta je agronomski kategoriji in ne more biti botanična sistematska enota, ker lahko isti varieteti pripadajo različne sorte. Takšen primer so sorte navadne pšenice, ki pripadajo dvema različnima varietetama, varieteti *lutescens* in varieteti *erythrospermum* (Borojević, 1992). Če gledamo na sorto kot celoto in pri tem upoštevamo delež posameznega genotipa, se pri samoprašnih vrstah žit, kot je navadna pšenica v splošni poljedelski praksi uporablja dva tipa sort:

- linijska sorta,
- hibridna sorta.

Poleg teh dveh tipov sort obstajajo pri pridelavi pšenice še multilinijske sorte, ki pa ne predstavljajo pomembne alternative, kar se tiče genetske strukture sorte (Briggle, 1963, Longin in sod., 2012). Danes večina svetovne pridelave pšenice temelji na linijskih sortah. Linijska sorta predstavlja skupino izenačenih oziroma uniformnih fenotipov. Pri tem je potrebno upoštevati, da ni nujno, da fenotipsko uniformnost oblikuje samo en genotip. Danes je na evropski sortni listi vpisanih 1789 sort navadne pšenice, od tega jih je kar 1756 linijskih (Skupni ..., 2012). Poleg tega, da morfologija socvetja in način oprasitve (izrazita kleistogamija) navadne pšenice govorita v prid razvoju linijskih sort, je razvoj linijskih sort močno pospešila tudi uporaba dihaploidov. Danes stroški vzgoje ene dihaploidne rastline znašajo že manj kot 25 € (Angus, 2012).

Ob upoštevanju, da rast višine povprečnega pridelka zrnja navadne pšenice v razvitem svetu že nekaj let stagnira, poraba te vrste žita pa permanentno narašča, bo potrebno v bližnji prihodnosti preiti na učinkovitejše pristope za razvoj novih sort navadne pšenice

(Angus 2009; Grain..., 2012). To pomeni, da bo potrebno najti alternativo linijskim sortam navadne pšenice, ki jo pa po mnjenju številnih avtorjev predstavlja ponovni razvoj hibridnih sort, s katerimi je možno izkorističati genetski fenomen heteroze. Prizadevanja za razvoj hibridnih sort navadne pšenice obstajajo že od začetka prejšnjega stoletja, intenziven razvoj komercialno zanimivih hibridnih sort navadne pšenice pa lahko razdelimo v dve obdobji. Prvo obdobje je trajalo v 70. in 80. letih prejšnjega stoletja, drugo obdobje pa predstavlja ponovno oživljanje v zadnjih nekaj letih (Longin in sod., 2012).

Učinkovitost razvoja hibridnih sort navadne pšenice v primerjavi z razvojem linijskih sort lahko določamo z računanjem seleksijskega napredka. Po Cochran-u (1951) se seleksijski napredek računa kot $\Delta G = (ih\sigma_G) / y$, pri čemer i predstavlja intenzivnost selekcije, h je kvadratni koren iz heritabilitete, σ_G skupna genetska varianca in y ševelo let, ki so potrebne za en seleksijski ciklus. Poleg dednine, ki predstavlja osnovo za razvoj linijskih sort oziroma izkorističanje heteroze in intenzivnosti selekcije, je v predstavljeni enačbi zelo pomembna dolžina seleksijskega ciklusa. V primeru, da temelji razvoj hibridnih sort navadne pšenice na uporabi sodobnih pristopov za indukcijo moške sterilnosti, ki ne temeljijo na povratnih križanjih, je seleksijski napredek nagnjen v korist razvoja hibridnih sort. Na drugi strani govori v prid razvoju linijskih sort navadne pšenice, kar se tiče parametra y uporaba tehnologije dihaploidov. V primeru, da gre pri razvoju hibridnih sort navadne pšenice za kombinacijo sodobnih pristopov za indukcijo moške sterilnosti in uporabo tehnologije dihaploidov, pa je razmerje spet nagnjeno v korist razvoja hibridnih sort (Longin in sod., 2012).

Po mnenju večih tujih avtorjev govori v prid razvoja hibridnih sort tudi enostavnejše doseganje visoke skupne genetske variance (σ_G^2), ker je pri hibridnih sortah skupna genetska varianca odvisna od aditivnega in ne-aditivnega ali dominantnega učinka genov, pri linijskih sortah pa vpliv ne-aditivnega ali dominantnega učinka genov odpade (Koemel in sod., 2004; Oettler in sod., 2005; Gowda in sod., 2012a, 2012b).

Nekateri tuji avtorji sklepajo, da so hibridne sorte navadne pšenice v prednosti v primerjavi z linijskimi sortami navadne pšenice tudi zaradi nižje variance, ki sledi iz interakcije genotip \times okolje. Na osnovi te interakcije je bila razvita hipoteza, da bi naj hibridne sorte navadne pšenice dosegale stabilnejše pridelke v primerjavi z linijskimi sortami (Jordaan, 1996; Bruns in Peterson, 1998; Koekemoer in sod., 2011). Zaradi nesorazmernega deleža med hibridnimi in linijskimi sortami v setveni strukturi navadne pšenice, pa je potrebno omenjeno hiptezo še dodatno podkrepiti s študijami, ki bi temeljile na primerjavi med hibridnimi in linijskimi sortami navadne pšenice v zelo različnih okoljih.

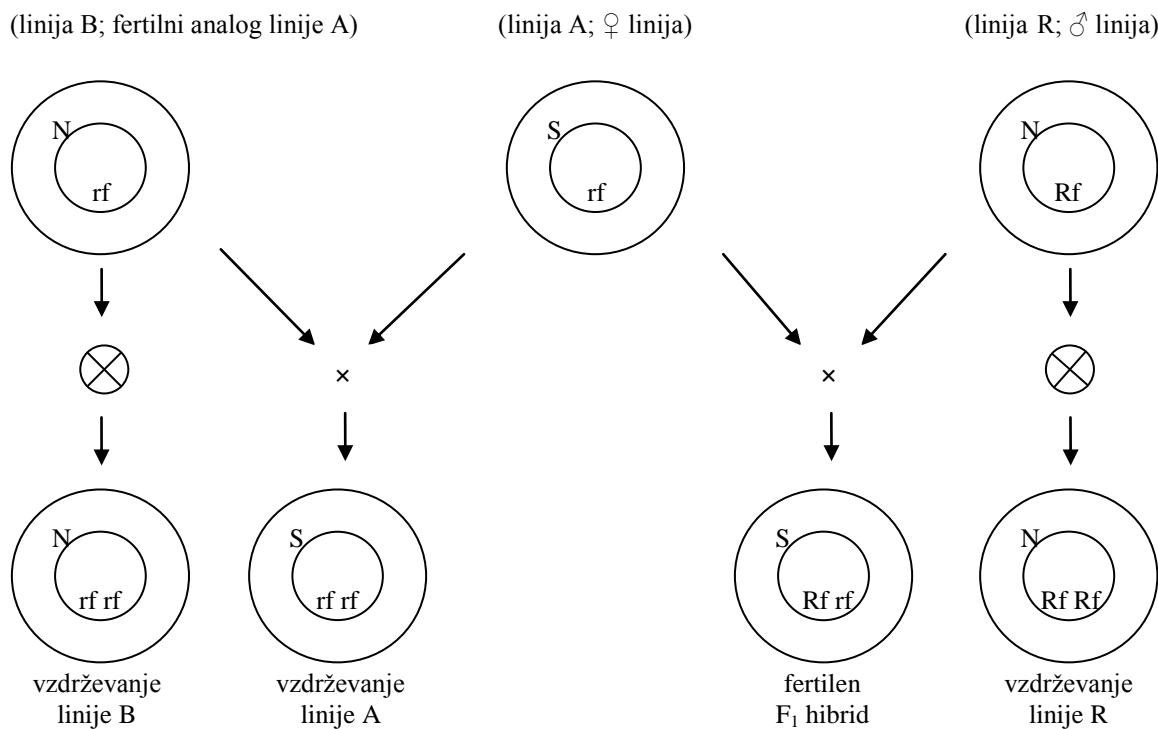
2. 2 INDUKCIJA MOŠKE STERILNOSTI PRI NAVADNI PŠENICI

2.2.1 Citoplazemsko-genetska moška sterilnost

Učinkovita indukcija moške sterilnosti je osnovni pogoj za izkoriščanje heteroze pri samoprašnih rastlinskih vrstah z izrazito kleistogamijo, kot je na primer navadna pšenica (*Triticum aestivum*). Za indukcijo moške sterilnosti pri navadni pšenici je bilo v preteklosti predlaganih več pristopov na genetski osnovi; kromosomska moška sterilnost (XYZ sistem), jedrna moška sterilnost (NMS sistem) in različne oblike citoplazemsko-genetske moške sterilnosti (CGMS sistem, starejša terminologija uporablja okrajšavo CMS). Od navedenih pristopov je najbolj proučen sistem citoplazemsko-genetske moške sterilnosti (Driscoll, 1972; Ogihara, 1999; Cisar in Cooper, 2002). Pri navadni pšenici je bila citoplazemsko-genetska moška sterilnost odkrita v petdesetih letih prejšnjega stoletja. O stabilni obliki citoplazemsko-genetske moške sterilnosti so prvič poročali leta 1962 na osnovi križanja navadne pšenice s timofejevo pšenico (*Triticum timopheevi*). Istega leta so poročali tudi o genih za obnovo fertilnosti v F₁ generaciji (Rf geni), ki so jih prav tako odkrili v timofejevi pšenici (Mahajan in Nagarajan, 1998). Vzgoja hibridnih sort navadne pšenice z uporabo citoplazemsko-genetske moške sterilnosti poteka na naslednji način (Borojević, 1991; Cisar in Cooper, 2002; Ivančič, 2002):

1. vnos citoplazemsko-genetske moške sterilnosti v linijo, ki bo predstavljal materino komponento hibridne sorte (linija A). Pri navadni pšenici se, kot vir citoplazemsko-genetske moške sterilnosti najpogosteje uporablja timofejeva pšenica (*Triticum timopheevi*), nekateri predstavniki rodu *Aegilops* in vrsta *Hordeum chilense* (Longin in sod., 2012),
2. vzdrževanje moško sterilne linije A s pomočjo izogene linije (linija B),
3. vnos genov za obnovo fertilnosti v F₁ generaciji v oprševalca (linija R),
4. pridelava hibridnega semena s križanjem linije A z linijo R.

Slabosti sistemov, ki temeljijo na citoplazemsko-genetski moški sterilnosti (slika 1) so uporaba treh različnih linij, potreba po večkratnem povratnem križanju za vnos moško sterilne citoplazme v materino komponento hibridne sorte, pleiotropične lastnosti (primer je visoka občutljivost na *Helminthosporium maydis* pri koruzi zaradi cms-T citoplazme), prekinitev sterilnosti zaradi interakcij z okoljem (biotični in abiotični stres) in vpliv na morfologijo visoko produktivnega kultivarja, ki bi naj bil linija A (Nawaz-ul-Rehman in sod., 2007).



S – sterilna citoplazma, ki se deduje po materini komponenti, N – fertilna citoplazma
Rf – dominanten gen, ki s svojo ekspresijo "prekriva" sterilno citoplazmo (obnovi fertilnost v F₁ generaciji)

Slika 1: Uporaba citoplazemske moške sterilnosti pri pridelavi hibridnega semena
Figure 1: The use of cytoplasmic-genetic male sterility in the hybrid seed production

Kljudno je, da številnim pomanjkljivostim, ki jih povzroča uporaba citoplazemske moške sterilnosti pri pridelavi hibridnega semena navadne pšenice, se je naveden sistem uveljavil pri ostalih samoprašnih in tujeprašnih vrstah žit (npr. rž, riž, ječmen). Ravno zaradi tega dejstva še vedno nekatera semenarska podjetja (npr. Monsanto / WestBred LLC, Sensako, Syngenta, ...) stavijo na razvoj hibridnih sort navadne pšenice z uporabo CGMS sistema (Longin in sod., 2012).

2.2.2 Kemična indukcija moške sterilnosti

Sistemom za indukcijo moške sterilnosti, ki temeljijo na citoplazemsko-genetski moški sterilnosti, je skupno vzdrževanje moško sterilne materine komponente z njenim fertilnim analogom (Longin in sod., 2012). Za razliko od genetskih in transgenih pristopov za vzgojo hibridnih sort avtогамnih rastlinskih vrst, ki temeljijo na treh različnih linijah (♀ AA , izogena linija A'A' , ♂ BB), sta pri kemični indukciji moške sterilnosti potrebni le starševski komponenti hibridne sorte. Poleg tega je pomembna prednost kemične indukcije moške sterilnosti tudi odsotnost zahtevnega genetskega inženiringa in dolgotrajnega vnosa moško sterilne citoplazme s povratnimi križanji (Virmani in sod., 2003).

Povezavo med selektivnim vplivom kemikalije na metabolizem rastline v smislu indukcije moške sterilnosti (gametocidno delovanje) in pridelavo hibridnega semena je bilo možno zaslediti že leta 1957. V tem letu je bila opisana metoda za pridelavo hibridnega semena bombaža (*Gossipium hirsutum L.*) z uporabo kemikalije FW-450 (McRae, 1985). Uveljavljen izraz za kemikalije, ki imajo izrazit selektivni vpliv na mikrosporogenezo oziroma razvoj viabilnega peloda in s katerimi je možna pridelava hibridnega semena, je sredstvo za kemično hibridizacijo (angl. Chemical hybridizing agent – kratica CHA). Po definiciji v uradnem listu Republike Slovenije so sredstva za kemično hibridizacijo kemikalije, ki ob uporabi v določeni fenofazi materine komponente hibridne sorte povzročijo prenehanje nastajanja cvetnega prahu ali mu odvzamejo zmožnost oploditve in tako povzročijo, da samoprašna rastlinska vrsta ni sposobna samooploditve (Pravilnik o trženju semena žit, 2003). Osnovna definicija sredstva za kemično hibridizacijo ne določa povezave med kemijsko strukturo aktivne snovi in njeno aktivnostjo. Glede na način delovanja aktivne snovi ločimo vsaj štiri osnovne skupine sredstev za kemično hibridizacijo (Blouet in sod., 1999):

- rastni regulatorji in snovi, ki prekinejo razvoj cvetnega primordija,
- inhibitorji metabolismu,
- inhibitorji kalitve peloda,
- inhibitorji mikrosporogeneze.

Za večino aktivnih snovi z gametocidnim delovanjem velja, da spadajo v skupino rastnih regulatorjev s herbicidnim delovanjem. Rastni regulatorji in snovi, ki vplivajo na razvoj cvetnega primordija, so predvsem rastlinski hormoni in njihovi antagonisti (NAA, IBA, 2,4-D, TIBA, GA₃, GA₄₊₇, 2-kloretil-trimetil amonijev klorid, abscizinska kislina) ter nekateri pirazoli (npr. 5-(aminokarbonil)-1-(3-metilfenil)-1H-pirazol-4-karboksilna kislina) (McRae, 1985).

Sinteza makromolekul, ki so gradniki peloda in delovanje njegovih organelov (ribosomi, mitohondriji, grobi endoplazmatski retikulum, diktiosomi...), ni možna brez energijsko

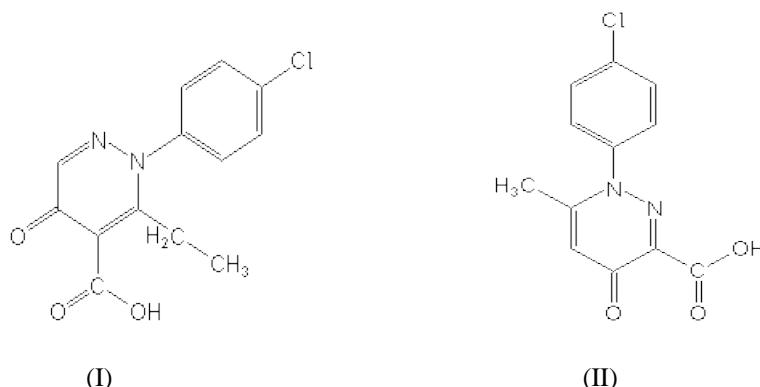
bogatih molekul, kot je na primer adenozin trifosfat. Energijsko bogate molekule se tvorijo v procesu celičnega dihanja, ki sestoji iz glikolize, piruvat dehidrogenaznega kompleksa, ciklusa trikarboksilnih kislin, verige za prenos elektronov in oksidativne fosforilacije. Pomemben del celičnega dihanja, ko se acetil-CoA popolnoma oksidira do CO_2 in H_2O pri čemer se sproščajo energijsko bogate molekule (ATP, NADH, FADH_2), poteka v notranji membrani mitohondrija in v njegovem matriksu. Že dalj časa je znano, da genetsko pogojena disfunkcija mitohondrijev povzroča moško sterilnost (npr. moško sterilna citoplazma vrste *Triticum timopheevi*) (Mohr in sod., 1993). S toksičnim vplivom na proteine, ki se sintetizirajo v citosolu in se prenesejo v matriks (npr. alkohol dehidrogenaza), medmembranski prostor (npr. ADP/ATP antiporter) ali se vgradijo v notranjo in zunanjou membrano mitohondrija (npr. citokrom c, porin P70), je možno doseči disfunkcijo mitohondrijev tudi na kemičen način (Lodish in sod., 2000). Znane kemikalije, ki na ta način inducirajo moško sterilnost, so halogenirane alifatske kisline (alfa, beta dikloroizobutirat in 2,2 dikloropropionat) in arzenati (McRae, 1985).

Predstavnik skupine kemikalij, ki zavirajo kalitev peloda je N-formil-3-karboksiazetidin. Kemikalijo je razvilo podjetje Shell v osemdesetih letih prejšnjega stoletja (komercialni oblici kemikalije sta WL 84811 in A-3-C) (Porter in sod., 1985). Za N-formil-3-karboksiazetidin je značilno, da pri navadni pšenici (*Triticum aestivum*) inducira moško sterilnost med fenofazama EC 32 (drugo kolence vsaj 2 cm nad 1. kolencem) in EC 49 (vidne prve rese pri resastih sortah). Optimalno delovanje je doseženo v času, ko znaša dolžina klase od 3,5 do 4 cm pri porabi aktivne snovi od 0,25 do 2,5 kg ha^{-1} . Za delovanje N-formil-3-karboksiazetidina je značilna strukturna sprememba veziklov eksine in intime, pri čemer ne pride do splošne retardacije (kolaps) peloda. Manjši odstotek pelodnih zrn še vedno ohrani sposobnost kalitve, vendar pelodne cevke niso sposobne sprožiti oploditev (Ciha in Ruminski, 1991).

Zaviralen vpliv na razvoj mikrospor imajo kelatni kompleksi, kot so na primer kompleksi Cu^{2+} z metilaminom in etilendiaminom. Do zaviralnega vpliva na razvoj mikrospor pri tem pride zaradi inhibicije delovanja oksidaz, ki katalizirajo metabolizem avksinov (Tschabold, 1988). Kljub temu, da je z bakrovimi kelati, posebej z benzotriazolom možno doseči indukcijo moške sterilnosti pri navadni pšenici, le-ti zaradi svoje kompleksnosti (vplivi na njihovo delovanje niso znani), kot sredstva za kemično hibridizacijo v praksi niso nikoli doživeli širše uporabne vrednosti (Wong in sod., 1995). Podobno kot benzotriazol se tudi 2-kloroetilfosfonska kislina (etefon) uvršča v skupino inhibitorjev mikrosporogeneze (Blouet in sod., 1999). 2-kloroetilfosfonska kislina sproži sintezo etilena, biosinteza katerega sicer poteka v kloroplastih z oksidacijo 1-aminociklopropan-1-karboksilne kisline (Hale in sod., 1970). Že dalj časa je znano, da etilen vpliva na razvoj cvetnih organov, o njegovem vplivu na kemično indukcijo moške sterilnosti pri navadni pšenici pa so v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja med drugim poročali Rowell in Miller (1974), Law in Stoskopf (1973) ter Dotlacil in Apltauerova (1978). Zaradi velike porabe 2-

kloroethylfosfonske kisline na enoto površine in pogoste fitotoksičnosti, se navedena aktivna snov ni nikoli uveljavila kot komercialno sredstvo za kemično hibridizacijo (Wong in sod., 1995). Drugače kot benzotriazol in 2-kloroethylfosfonska kislina, so se v skupini kemikalij, ki inhibirajo mikrosporogenezo kot komercialna sredstva za kemično hibridizacijo navadne pšenice, uveljavili predstavniki iz skupine oksopiridazinov in oksi ter amino substituiranih kinolinov (Chakraborty in Devakumar, 2006a).

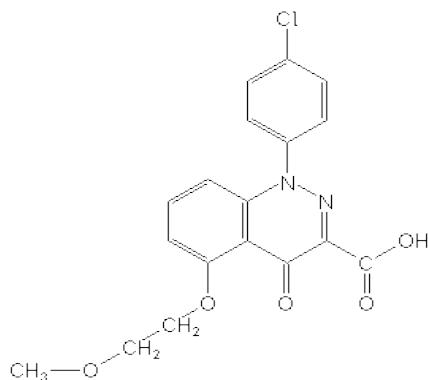
Znana predstavnika oksopiridazinov z gametocidnim delovanjem sta fenridazon (1-(4-klorofenil)-1,4-dihidro-6-metil-4-oksopiridazin-3-karboksilna kislina) in klofencet (2-(4-klorofenil)-3-etil-2,5-dihidro-5-oksopiridazin-4-karboksilna kislina) (Schultz in sod., 1993; Cukadar in Ginkel, 2001). Podjetje Rohm & Haas je v sedemdesetih in osemdesetih letih prejšnjega stoletja razvilo serijo oksopiridazinov (RH-531, RH-532, RH-2956, RH-4667, RH-5148, RH-0007), med katerimi je aktivna snov fenridazon (RH-0007) dosegla komercialno vrednost v obliki pripravka Hybrex® (Bucholtz, 1988). Klofencet je v obliki pripravka GENESIS® (tudi MON 21200) leta 1997 registriralo podjetje Monsanto, vendar ga je moralo po nekaj letih zaradi okoljske nesprejemljivosti umakniti iz uporabe (Longin in sod., 2012). Za učinkovito indukcijo moške sterilnosti je potrebno pripravek GENESIS® (22,4 %) aplicirati med fenofazama EC 32 in EC 39 (viden jeziček zastavičarja) v odmerku od 1,4 do 2,7 kg aktivne snovi na hektar. Pelodna zrna tretiranih rastlin imajo valovito površino in eksina je za 80 % tanjša. Pelodna zrna zaradi plazmolize niso sposobna kalitve (Pesticides..., 1997).



Slika 2: Klofencet (I), fenridazon (II) (Clofencet, 2012; Fenridazon, 2012)

Med substituiranimi kinolini po gametocidnem delovanju izstopata kemikaliji SC-1271 (1-(4-klorofenil)-4-okso-5-propoksikinolin-3-karboksilna kislina) in SC-2053 (1-(4-klorofenil)-4-okso-5(metoksietoksi) kinolin-3-karboksilna kislina), ki ju je razvil Orsan/DuPont (Wong in sod., 1995). Kemikalija SC-2053 predstavlja aktivno snov sintofen, ki se uporablja kot komercialno sredstvo za kemično hibridizacijo CROISOR® 100. Pripravek CROISOR® 100 se aplicira, ko znaša dolžina klasa na glavnem poganjku od 14 do 18 mm v odmerku od 13 do 15 l ha⁻¹ (1,3 do 1,5 kg aktivne snovi na hektar).

Pelodna zrna tretiranih rastlin imajo valovito površino in degenerirano citoplazmo (splošna retardacija) (Blouet in sod., 1999).



Slika 3: Sintofen (Sintofen, 2012)

Razvoj sodobnih sredstev za kemično hibridizacijo se nadaljuje, predvsem v smeri doseganja boljše selektivnosti gametocidnega delovanja ter manjšega vpliva na okolje. Znano je, da derivati oksanilne kisline – oksanilati delujejo kot anti-alergeni, anti-astmatiki in, da regulirajo izločanje kisline v prebavnem traktu (Sellstedt in sod., 1975; Cheney in sod., 1978). Poleg tega pa je znano tudi, da etilni estri zavirajo nastanek cvetnega prahu (Chakraborty in Devakumar, 2006b). Iz stališča razvoja novih okolju prijaznejših sredstev za kemično hibridizacijo, lahko struktura oksanilne kisline zaradi svoje enostavnosti služi tudi kot aktivni most med dvema molekulama z različnima aktivnostima. V nadaljevanju predstavljena študija temelji zaradi redkih raziskav, ki so bile opravljene v zvezi s vplivom derivatov oksanilne kisline na tvorbo cvetnega prahu predvsem na raziskavi povezave med kemijsko strukturo in aktivnostjo nekaterih derivatov oksanilne kisline. Pri tem je pomembno poudariti tudi to, da bo jasno definiran način delovanja derivatov oksanilne kisline, ki so v tej študiji zajeti.

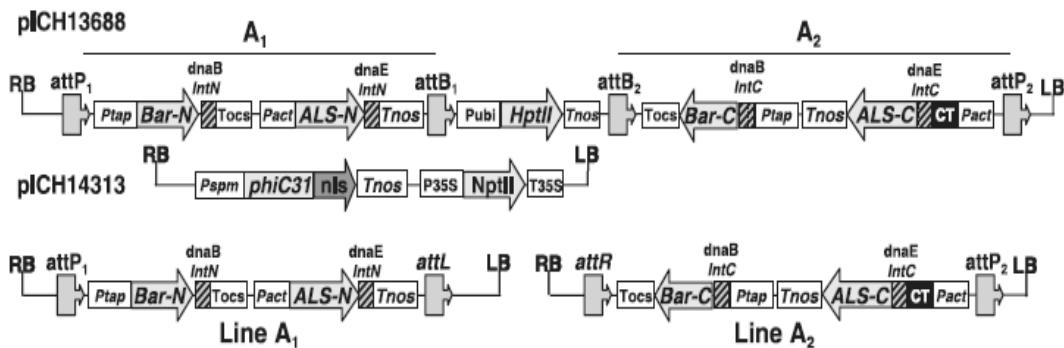
2.2.2 Transgena indukcija moške sterilnosti

Stabilno ekspresijo moške sterilnosti v materini komponenti hibridne sorte omogoča genetski inženiring. Že dolgo je znano, da povezava med tkivno specifičnimi oziroma inducibilnimi promotorji in sekvencami, ki kodirajo citotoksične ali citostatične polipeptide, omogoča učinkovito indukcijo moške sterilnosti pri širokem naboru rastlinskih vrst (Wang in sod., 2011). Polipeptidi, ki vplivajo na razgradnjo tapetuma oziroma zavirajo dozorevanje mikrospor (citotoksično, citostatično delovanje) so na primer pektat liaza, 1-3 β glukanaza, avidin, streptavidin, DTA (angl. diphtheria Toxin A-chain), URF13, toksin CytA, Rnaza TI, encim barnaza (ribonukleaza vrste *Bacillus amyloliquifaciens* (ex Fukumoto 1943)) in citokinin oksidaza (Armstrong, 1994; Albertsen in Huffman, 2002; Huang in sod., 2007). Sistem, ki temelji na povezavi med za tapetum peloda specifičnim promotorjem gena TA29 in Rnaza genom vrste *Bacillus amyloliquifaciens*, je dosegel tudi

komercialno vrednost kot SeedLinkTM (Mariani in sod., 1990; Mariani in sod., 1992). Zaradi vzdrževanja moško sterilne materine komponente s fertilnim analogom in sistemom za obnovo fertilnosti, ki temelji na ribonukleaznem inhibitutju (*barstar*), sistem SeedLinkTM ni doživel širše praktične uporabne vrednosti (Havey, 2004).

Pomanjkljivosti sistema SeedLinkTM bi naj odpravil tako imenovani dvokomponentni sistem za vzgojo hibridnih sort, ki temelji na fuziji toksičnega encima barnaza in mutirane acetolaktat sintaze (Gils in sod., 2008). Pri tem sistemu fuzija obej polipeptidov omogoča vzdrževanje moško sterilne materine komponente z aplikacijo herbicida na osnovi sulfonilsečnine in imidazolinonov. Genetska determinanta za toksičen encim barnaza je pri tem pod kontrolo za tapetum peloda specifičnega promotorja, genetska determinanta za mutirano acetolaktat sintazo (ALS) pa je pod kontrolo riževega promotorja. Obe genetski determinanti sta deljeni a se nahajata na istem fragmentu (A1 oz. A2), tako da le heterozigoti vsebujejo vse fragmente za tvorbo funkcionalnih proteinov. Fragmenti se nahajajo na identičnih lokusih na homologih kromosomih, posamezen fragment pa določa le nefunkcionalen protein. Aktivni genski produkt nastane s fuzijo produktov dveh različnih fragmentov, do katere pride s pomočjo sekvenc modrozelenih alg *Synechocystis* sp. (*DnaE* in *DnaB* sekvence). Genotipi, ki vsebujejo dve kopiji posameznega fragmenta (A1 ali A2), so normalno fertilni in občutljivi na sulfonilsečinske herbicide, le heterozigoti, ki vsebujejo obe vrsti genskih fragmentov so moško sterilni in odporni na sulfonilsečinske in imidazolinonske herbicide (Gils in sod., 2008).

Dvokomponentni sistem vzgoje hibridnih sort v svoji prvotni izvedbi temelji na konstruktih pICH13688 in pICH14313, ki sta klonirana v pBIN19 binarni vektor. Genski konstrukt pICH13688 pri tem nosi N in C terminalne sekvence *Bar-N* in *Bar-C* iz *Bacillus amyloliquifaciens* ter *ALS-N* in *ALS-C* terminalne sekvence mutiranega *ALS* gena *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Poleg tega konstrukt pICH13688 vsebuje tudi tarčna mesta (*attB* in *attP*) za delovanje mestno specifične rekombinaze, ki jo determinira sekvenca *PhiC31* na genskem konstraktu pICH14313 (indukcija mestno specifične rekombinacije) in *Int-N* ter *Int-C* terminalne sekvence, ki omogočajo fuzijo genskih produktov. S pomočjo indukcije mestno specifične rekombinacije je možno vzpostaviti mehanizem vzdrževanja moško sterilne materine komponente pri avtogamni rastlinski vrsti, kot je to npr. navadna pšenica (Gils in sod., 2008).



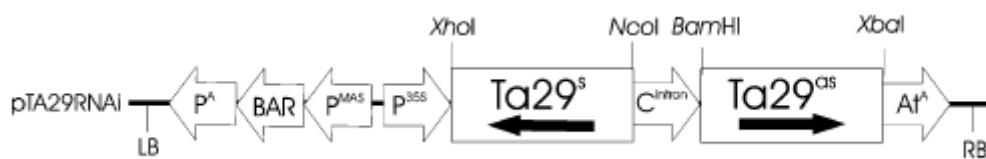
Slika 4: Struktura genskih konstruktorjev pred in po rekombinaciji (Gils in sod., 2008)

Pred vnosom konstruktorjev v primarni ekspresijski sistem vrste *Arabidopsis thaliana* je bil sistem fuzije ločenih N in C terminalnih sekvenc preiskušen z agroinfiltracijo v liste vrste *Nicotiana benthamiana* Domin. Končni cilj navedenega sistema je bil doseči moško sterilnost pri enokaličnicah, posebej pri navadni pšenici, zato sta oba konstrukta vsebovala tudi promotorje iz družine trav. Ekspresija *Bar-N* in *Bar-C* sekvence je bila pod kontrolo za tapetum peloda specifičnega promotorja *Ptap*, eksresija *ALS-N* in *ALS-C* sekvence mutirane verzije *ALS* gena *Arabidopsis thaliana* pa je bila pod kontrolo riževega promotorja *Pact*. Kot terminatorske sekvence so bile konstruktoma dodane *Tnos* (nopaline synthase terminator), *Tocs* (octopine synthase terminator) in T35S sekvence (Gils in sod., 2008).

Alternativni pristop za indukcijo moške sterilnosti na transgeni način predstavlja utišanje genov z uporabo RNA interference (Mansoor in sod., 2006). Pojem RNA interferenca je nastal ob vnosu dvostranske RNK (angl. dsRNA) v vrsto nematod *Caenorhabditis elegans* Caeno (ex *rhabditis*), kar je povzročilo sekvenčno-specifično utišanje gena. Pred tem so podoben pojav, ko je prišlo do zmanjšanega izražanja endogena zaradi vnosa transgena imenovani ko-supresija izražanja genov (Kunej, 2010). Indukcija moške sterilnosti z uporabo RNA interference temelji na utišanju tapetum ali mejoza specifičnih genov kot so *AtCDC45*, *TAZ1*, *MEZ1* in *TA29* oziroma tkivno specifičnih promotorjev, ki omogočajo njihovo izražanje (Wang in sod., 2011). Za sekvenčno-specifično utišanje gena oziroma njegovega promotorja se mora v celici oblikovati dvostransna RNK, ki jo proteinski kompleks (Dicer) prepozna in razcepi na 21 do 25 baznih parov dolge fragmente imenovane mala interferenčna RNK (angl. siRNA). Ti kratki fragmenti vstopijo v kompleks za utišanje genov, ki je inducirana z RNK (angl. RISC-RNA Induced Silencing Complex), kar pomeni, da sodelujejo pri razgradnji endogene enoverižne RNK (Abe in sod., 2005; Kapoor in Takatsuji, 2006; Small, 2007).

Pogoj za nastanek dvoverižne RNK molekule, ki vpliva na sekvenčno-specifično utišanje gena, je integracija smerne in protismjerne RNK sekvence ciljnega gena v rastlinski genom (Nawaz-ul-Rehman in sod., 2007).

Učinkovit pristop za indukcijo moške sterilnosti z RNA interferenco predstavlja oblikovanje genskega konstrukta pTA29RNAi za utišanje tapetum specifičnega gena *TA29* (Slika 2). Genski konstrukt pTA29RNAi ima zaradi učinkovitejše RNA interference poleg promotorjev (P^{MAS} , P^{35S}), poliadenilacijskega signala (P^A), seleksijskega gena *bar* in mejnih sekvenc (LB in RB) dodan še intron kalkon sintaze (C^{intron}), ki se nahaja med smerno in protismerno RNK sekvenco gena *TA29* (Nawaz-ul-Rehman in sod., 2007).



Slika 5: Genski konstrukt pTA29RNAi (Nawaz-ul-Rehman in sod., 2007)

Transgeni pristopi za indukcijo moške sterilnosti pri navadni pšenici predstavljajo pomembno alternativo pristopom na genetski in kemični osnovi, vendar je njihova praktična uporaba zaenkrat še vedno precej omejena zaradi številnih zakonskih regulativ. Številne zakonske in administrativne prepreke pri uporabi in razvoju transgenih pristopov za indukcijo moške sterilnosti so tudi poglaviten razlog, da je predstavljena doktorska disertacija omejena le na kemično indukcijo moške sterilnosti pri navadni pšenici.

2.3 GENETSKI FENOMEN HETEROZE IN NJEGOVO IZKORIŠČANJE PRI NAVADNI PŠENICI

2.3.1 Genetski fenomen heteroze

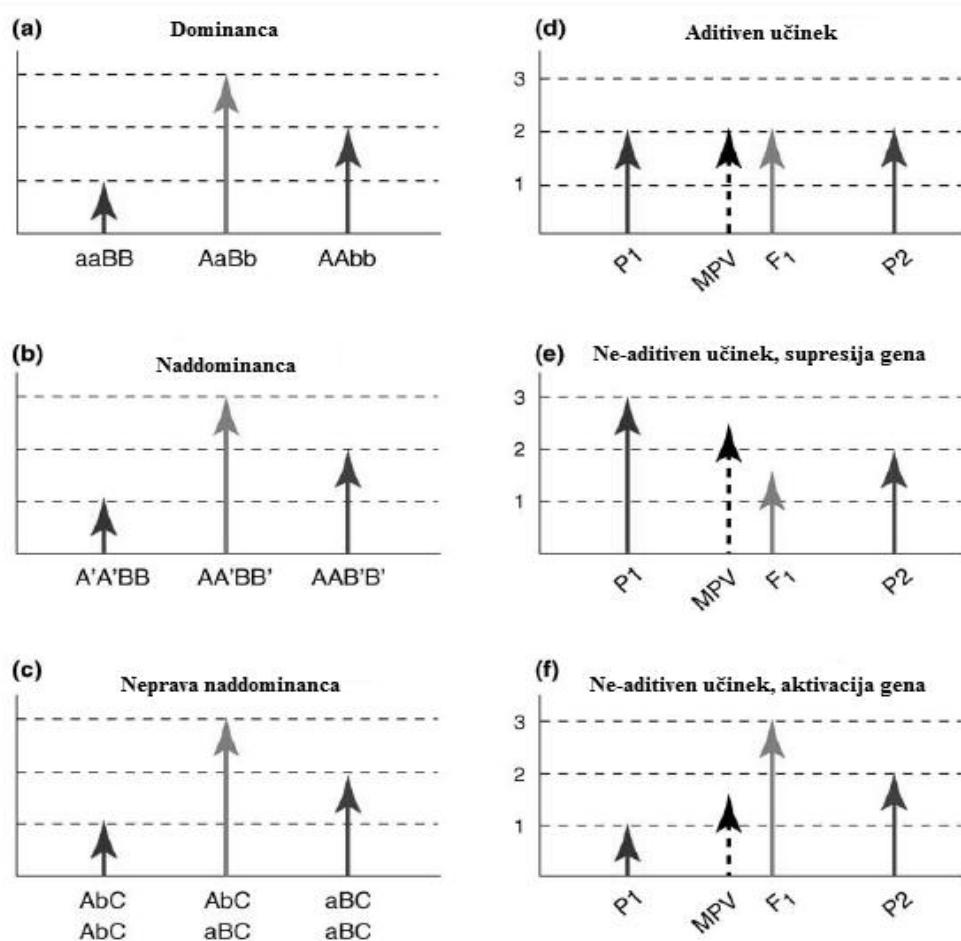
Fenomen heteroze oziroma hibridnega vigorja se najpogosteje povezuje s superiornostjo prve filialne generacije (F_1 generacija) s heterozigotno genetsko strukturo nad starševsko generacijo s homozigotno genetsko strukturo (Birchler in sod., 2003; Birchler in sod., 2006). Prve študije, ki so že ele pojasniti mehanizem zaradi katerega pride v prvi filialni generaciji do superiornega stanja, so bile opravljene že pred več kot sto leti. Leta 1910 je Bruce predstavil genetski model dominance ali komplementacije (slika 6a), ki temelji na tem, da pri intraalelni interakciji recesivni alel predstavlja nezaželeno (inferiorno) lastnost, dominanten alel pa zaželeno (superiorno) lastnost. Torej je v heterozigotnem stanju, do katerega pride zaradi nadzorovanega križanja dveh genetsko različnih homozigotnih starševskih komponent, delovanje recesivnega alela dopolnjeno-komplementirano z delovanjem dominantnega alela (Schnable in Swanson-Wagner, 2009). Naslednji model, ki

tudi temelji na intraalelni interakciji, je model naddominance (slika 6b), pri katerem heterozigotno stanje že samo po sebi predstavlja prednost pred homozigotnim stanjem (Shull, 1908; Shull, 1909; East 1936). Primer naddominance predstavlja *pl* lokus koruze. Križanje inbred linij koruze z različnimi aleli na *pl* lokusu vodi do superiornega potomstva ne glede na to, da je na posameznih lokusih možno zaslediti tudi homozigotno stanje (Hollick in Chandler, 1998).

Alternativo obema genetskima modeloma, ki temeljita na intraalelnih interakcijah, predstavlja neprava naddominanca (angl. pseudo-overdominance) (Semel, 2006). Po tem genetskem modelu (slika 6c) je naddominanca rezultat komplementacije med dominantnim in recesivnim aleлом na dveh ali več genskih lokusih. Za razliko od naddominance je pri tem genetskem modelu potrebno upoštevati, da gre za heterozigotno zaporedje, pri čemer dominantni aleli, ki si sledijo, nikoli ne izhajajo od enakega starša ampak se izmenjujejo (Chen, 2010).

Poleg modelov oz. genetskih hipotez, ki temeljijo na intraalelnih interakcijah, je bil v preteklosti predlagan tudi genetski model, ki predvideva interalelnu interakcijo. Po tem modelu bi naj bilo superiorno stanje prve generacije potomstva nad parentalno generacijo rezultat medsebojnega vpliva alelov, ki se nahajajo na različnih lokusih – epistatično delovanje (Swanson-Wagner, 2006; Longin in sod., 2012).

V preteklosti je več študij pokazalo, da je heteroza za lastnosti povezane s pridelkom zrnja v večji meri odvisna od intraalelnih interakcij (dominanca, naddominanca) in v manjši meri od epistatitičnega delovanja genov (Melchinger, 1993; Melchinger in Gumber, 1998; Melchinger, 1999; Hinze in Lamkey, 2003). V nasprotju s tem je študija Kusterer in sod. (2007) pokazala, da na heterozo za lastnosti povezane z biomaso, poleg intraalelnih interakcij značilno vpliva tudi digena in večredna epistaza. Kljub vsemu pa veliko pomankljivost genetskih modelov predstavlja neznan vpliv intraalelnih in interalelnih interakcij na skupno raven heteroze, ki se razlikuje za vsako posamezno rastlinsko vrsto in genotip (Chen, 2010).



Slika 6: Genetski modeli za razlago heteroze in kvantitativni učinek gena (Chen, 2010)

Na ravni genske ekspresije lahko učinek posameznega gena kvantitativno opišemo kot aditivni učinek, če je učinek posameznega starševskega alela zajet v heterozigotnem stanju (heterozigotno stanje je enakovredno vsoti učinkov obeh starševskih alelov) in ne-aditivni ali dominantni učinek v primeru, da je heterozigotno stanje odvisno od učinka samo enega starševskega alela (heterozigotno stanje je enakovredno enemu starševskemu alelu) (Schnable in Swanson-Wagner, 2009). Ob upoštevanju dveh najpogosteje predstavljenih genetskih modelov, model dominance predpostavlja, da je genska ekspresija rezultat kombiniranega oziroma aditivnega delovanja obeh starševskih alelov ($1 + 1 = 2$) (slika 6d), medtem ko model naddominance predpostavlja, da je genska ekspresija rezultat ne-aditivnega delovanja obeh starševskih alelov ($1 + 1 \neq 2$) (slika 6e in 6f) (Li, 2001).

Na molekularni ravni je že dalj časa znano, da je heteroza poligeni fenomen, pri čemer oba najpogostejsa genetska modela, dominanca in naddominanca, zagovarjata ne-aditivno ekspresijo alelov. Model dominance zagovarja monoalelno ekspresijo, ko je fenotip hibrida odvisen samo od ekspresije enega (dominantnega) alela, model naddominance pa bialelno ekspresijo. Bialelna ekspresija pomeni, da F_1 hibrid presega ekspresijo alelov obeh staršev

ali pa, da F_1 hibrid ne dosega ekspresije niti enega starševskega alela (Schnable in Swanson-Wagner, 2009; Chen, 2010). Kljub vsemu je danes znano, da samo kvantitativna analiza učinka posameznega gena oziroma skupine genov ne more podati odgovora na vprašanje zakaj lahko prva filialna generacija izraža superiornost nad starševsko ali parentalno generacijo (Oettler in sod., 2005).

Neposreden odgovor na to vprašanje je možno najti na biokemijski ravni. Že Robertson in Reeve (1952) navajata, da je razlog za superiornost prve filialne generacije v večji biokemijski pestrosti heterozigotnega stanja v primerjavi s homozigotnim stanjem starševske generacije. Po njuni hipotezi dodatni aleli na heterozigotnem lokusu prispevajo k večjemu številu različnih interakcij v molekularni mreži, večje število različnih interakcij med molekulami pa predstavlja večjo verjetnost, da se hibrid pravilno odzove na spremenjeno stanje v okolju. Torej je fenomen heteroze rezultat večje adaptabilnosti heterozigotnega stanja v primerjavi s homozigotnim stanjem (Andorf in sod., 2009).

Vpliv večjega števila interakcij med molekulami zaradi heterozigotnega stanja na raven heteroze (povprečna starševska heteroza, heterobeltiozis) je bil preučen v študiji, ki je temeljila na dveh linijah navadnega repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*) in njunih recipročnih križancih (liniji: C24, Col; križanca C24 \times Col, Col \times C24). Genska ekspresija je bila pri tem analizirana z uporabo mikromreže kit $4 \times 44k$, PIN 62519F. Rezultati študije so pokazali, da je večje število interakcij med molekulami zaradi heterozigotnega stanja pozitivno vplivalo na povprečno starševsko heterozo pri obeh hibridih, pozitivni vpliv na heterobeltiozis pa je bil potrjen le pri enem hibridu (Andorf in sod., 2009).

Poleg tega, da je z uporabo mikromrež možno določiti vpliv heterozigotnega stanja na število interakcij med različnimi molekulami, je še posebej pomembno to, da je z uporabo mikromrež možno določiti razliko v akumulaciji transkriptov med starševsko in hibridno generacijo (Stupar in Springer, 2006). V raziskavi, ki je temeljila na določanju ekspresije 14400 genov koruze na cDNA mikromreži se je izkazalo, da je 9 % analiziranih genov doseglo različno raven ekspresije v starševski in hibridni generaciji. Od tega je približno 22 % genov izražalo ne-aditivni učinek, kar pomeni, da se je raven njihove ekspresije razlikovala od obeh starševskih komponent (linija B73 in Mo17). Vzorec izražanja genov z ne-aditivnim učinkom je po tej študiji možno povezati z modelom naddominance (Swanson-Wagner, 2006). Zaključek podobne raziskave, ki je tudi temeljila na enakih linijah ter njunih recipročnih hibridih, vendar je bila genska ekspresija analizirana z RNA mikromrežo (Affymetrix gene chip) je bil tudi, da je približno 20 % genov, ki izražajo različno raven ekspresije med starševsko in hibridno generacijo povezanih z ne-aditivnim učinkom. Vendar je vzorec izražanja genov z neaditivnim učinkom po tej študiji možno povezati z modelom dominance (Stupar in Springer, 2006). Vzroke za različne rezultate gre iskati v platformi mikromreže (cDNA mikromreža proti RNA mikromreži), številu ponovitev in statistični obdelavi podatkov (Schnable in Swanson-Wagner, 2009).

Nadaljni korak pri preučevanju vpliva heterozigotnega stanja na gensko ekspresijo je opazovanje ekspresije posameznega starševskega alela v hibridnem potomstvu. Z uporabo alelno-specifičnega RT PCR-ja se je v študiji Guo-a in sod. (2006) izkazalo, da 11 od 15 preučevanih genov koruze izraža razlike pri akumulaciji starševskih alelov v hibridni generaciji (Schnable in Swanson-Wagner, 2009). V dodatni študiji, kjer je bila opazovana alelno-specifična ekspresija za 355 genov koruze, je bil poudarek na preučevanju regulacije genov, ki so dosegli statistično značilne razlike v ekspresiji med starševsko in hibridno generacijo. Rezultati te študije so pokazali, da je 70 % preučevanih genov, ki so dosegli statistično značilne razlike v ekspresiji med starševsko in hibridno generacijo reguliranih na *cis* način, se pravi, da se njihova regulatorna sekvenca nahaja znotraj gena (Springer in Stupar, 2007).

Prednost razlage heteroze na biokemijski ravni je, da poleg intraalelnih interakcij (dominanca, naddominanca) upošteva tudi interalelne interakcije (epistatično delovanje genov), vpliv RNK molekul (npr. miRNA, siRNA, ta-siRNA) na gensko ekspresijo in epigenetsko regulacijo genov (vpliv dolžine dneva, temperature, intenzivnosti osvetlitve) (Chen, 2010; Ni in sod., 2009). Na ta način je možno pojasniti zakaj lahko pride do pozitivnega učinka heteroze tudi v generacijah, ki sledijo F₁ generaciji in stabilnih aloploidih, kot je na primer navadna pšenica (Ng in sod., 2012). Za navadno pšenico se danes namreč predvideva, da je nastala pred približno 8.000 do 10.000 leti s križanjem med domestificirano tetraploidno pšenico in vrsto *Triticum tauschii* (DD, 2n = 14). Torej se lahko za izkoriščanje genetskega fenomena heteroze pri navadni pšenici poleg razvoja heterotičnih F₁ kombinacij ali hibridnih sort uporablajo tudi heterotični aloploidni (angl. synthetic wheat), ki temeljijo na križanju med diploidnimi, tetraploidnimi in heksaploidnimi predstavniki rodu *Triticum* in *Aegilops* (Dubcovsky in Dvorak, 2007).

Kljub vsemu se danes za izkoriščanje genetskega fenomena heteroze pri navadni pšenici najpogosteje uporablajo hibridne sorte, katerih kreiranje temelji na testiranju splošne in specifične kombinacijske sposobnosti, s katerim je možno kvantificirati učinek genov, ki oblikujejo fenotip F₁ generacije (Longin in sod., 2012).

2.3.2 Uporaba morfoloških, biokemijskih in molekulskih markerjev pri izkoriščanju genetskega fenomena heteroze s hibridnimi sortami navadne pšenice

Glavni cilj pri razvoju hibridnih sort navadne pšenice je določitev starševskih komponent, ki pri načrtнем križanju rezultirajo z visoko specifično kombinacijsko sposobnostjo. Pri komercialnem izkoriščanju heteroze gre namreč za razvoj visoko produktivnih F₁ hibridnih kombinacij oziroma hibridnih sort in specifična kombinacijska sposobnost je osnovni pokazatelj produktivnosti dednine, ki predstavlja množico starševskih komponent (Krystkowiak in sod., 2009; Gowda in sod., 2012a, 2012b).

Razvoj hibridnih sort navadne pšenice (*Triticum aestivum*) danes temelji predvsem na kemični indukciji moške sterilnosti (Longin in sod., 2012). Za razliko od pristopov na genetski ravni (npr. uporaba citoplazemsko-genetske moške sterilnosti) in transgeni ravni (npr. uporaba RNA interference in ekspresije citotoksičnih ter citostatičnih polipeptidov) je pri kemični indukciji moške sterilnosti potrebno upoštevati, da na učinkovitost sredstva za kemično hibridizacijo vplivajo genotip, ki predstavlja materino komponento, fiziološko stanje rastlin v času tretiranja (indeks listne površine, potencialna absorpcijska površina) in vremenski pogoji v času tretiranja (temperatura zraka, relativna zračna vlaga...) (Lein, 2012). Zaradi številnih dejavnikov, ki vplivajo na delovanje sredstva za kemično hibridizacijo, je pri testiranju splošne in specifične kombinacijske sposobnosti linij navadne pšenice še posebej pomembno upoštevati stopnjo hibridnosti v pridelanem semenu (Nikolić, 2010).

Najenostavnnejši način za določanje stopnje hibridnosti je uporaba morfoloških markerjev, kot so na primer morfološke značilnosti socvetja, barva in oblika zrn, oblika listnega ježička (ligula), posebnosti v organogenezi in podobno (Pallavi in sod., 2010). Kljub enostavnosti pa se pri testiranju splošne in specifične kombinacijske sposobnosti, uporabi morfoloških markerjev ne pripisuje večjega pomena zaradi njihove variabilnosti, ki je odvisna od zunanjih dejavnikov (abiotični in biotični stres) in, ker je stopnjo hibridnosti potrebno določiti takoj po žetvi semena oziroma pred setvijo (Nikolić in sod., 2008).

Stopnjo hibridnosti je takoj po prekiniti dormance možno določiti z uporabo biokemijskih markerjev (založne beljakovine in izoencimi) in molekulskih markerjev (npr. RFLP, SSR, SNP, EST). Med biokemijskimi markerji je za določanje stopnje hibridnosti posebej znana uporaba izoencimov (npr. fosfoheksoza izomeraza (PHI), fosfogluko dehidrogenaza (PGD), malat dehidrogenaza (MDH), fosfoglukomutaza (PGM)...), med molekulskimi markerji pa zaradi njihove kodominantnosti in visoke polimorfnosti uporaba mikrosatelitov (SSR) (Feng in sod., 2004; Nikolić, 2010). Čeprav postaja uporaba metod, ki temeljijo na dezoksiribonukleinski kislini – DNK, v kmetijstvu že samoumevna, je njihova uporaba pri rutinskem testiranju zaradi visokih stroškov in časovne zamudnosti precej omejena. V primerih, ko gre za rutinsko testiranje, kot je na primer potrjevanje okuženosti z določenim patogenom ali prisotnosti gensko spremenjenih organizmov, je uporaba encimatskih metod primernejša (npr. encimskoimunski test – ELISA) (Isozyme..., 2012). Tudi pri testiranju kombinacijske sposobnosti starševskih komponent se zaradi velikega števila hibridnih kombinacij izraža potreba po metodi, ki je primerna za rutinsko testiranje in, ki je dovolj natančna. V primeru razvoja hibridnih sort navadne pšenice te zahteve izpolnjuje uporaba izoencimov, kot sta termično občutljiva L-malat dehidrogenaza (MDH) in na vodni stres občutljiva glutation reduktaza (GR) (Gepts, 1993).

Beseda izoencim označuje različne molekulske oblike encima s specifičnostjo do enakega substrata (Markert in Moller, 1959). Za različne molekulske oblike enega encima velja, da

izražajo različne neto naboje in jih je zato možno detektirati z uporabo poliakrilamidne gelske elektroforeze (PAGE). Pri uporabi poliakrilamidne gelske elektroforeze gre za ločevanje proteinov ozioroma izoencimov s pomočjo električnega polja v poliakrilamidnih gelih. Ločevanje izoencimov v poliakrilamidnem gelu z uporabo električnega polja lahko poteka ob enoznačnem pH (nativna PAGE) ali ob linearinem pH gradientu (izoelektrično fokusiranje). Pri nativni poliakrilamidni gelski elektroforezi molekule z večjim nabojem potujejo hitreje kot tiste z manjšim. Resolucija metode se povečuje z daljšanjem gela. Pri izoelektričnem fokusiraju pa protein ozioroma izoencim potuje toliko časa, dokler ne prispe v področje gela, kjer je pH natančno enak vrednosti njegove izoelektrične točke (pI). Takrat postane število pozitivnih nabojev, ki jih nosi, enako številu negativnih nabojev in izoencim postane navzven električno nevtralen. Sila električnega polja nanj ne deluje več, zato v gelu obmiruje – se fokusira (Henzel in sod., 1993).

V primerjavi z izoencimi uporaba molekulskih markerjev (npr. RFLP, EST-SSR, SNP mtDNA...) zagotavlja višjo stopnjo polimorfnosti (Guadagnuolo in sod., 2001; Schoenenberger in sod., 2005). Zato je v primerih, ko gre za zelo natančne oblike genotipizacije in profiliranja, uporaba molekulskih markerjev uporabnejša od uporabe izoencimov. Pri določanju stopnje hibridnosti je že dalj časa uveljavljena uporaba mikrosatelitnih ali SSR markerjev (2-6 baznih parov dolga, tandemsko ponovljiva nukleotidna zaporedja). Glavna prednost mikrosatelitnih markerjev pred ostalimi markerskimi sistemi je njihova multialelična narava, ponovljivost, hipervariabilnost, kodominantno dedovanje, informativnost in dobra pokrivnost celotnega genoma. Slaba stran njihove uporabe pa je zahteven razvoj novih mikrosatelitnih markerjev (Isozyme..., 2012). Razvoj novih mikrosatelitov zahteva izdelavo genomske knjižnice, ki je pri zelo velikem genomu, kot ga ima na primer navadna pšenica (16 000 Mb), časovno potraten, zahteven in drag postopek. Po začetnem rezanju genomske DNK z restriktionskimi encimi (npr. *AcsI*) in kloniraju z vektorji na osnovi bakteriofaga λ sledi dodatno rezanje z restriktionskimi encimi (npr. *PstI*, *MboI*) in oblikovanje plazmidnih vektorjev, primernih za sekvensiranje. Po določitvi mikrosatelitnih lokusov sledi izdelava lokusno specifičnih začetnih oligonukleotidov in umestitev mikrosatelitnih markerjev v fizične genske karte in genetske genske karte (GENOPLANTE, 2012).

Pri navadni pšenici je do danes znanih približno 2800 genomskeh mikrosatelitnih lokusov, od tega jih je v genskih kartah umeščenih približno 1320. Poleg genomskeh mikrosatelitnih markerjev (angl. gSSR) je do danes znanih tudi približno 275 EST-SSR mikrosatelitnih markerjev, ki so hkrati tudi zajeti na fizični genski karti (Gupta in sod., 2008). Glavni problem pri genskem kartirjanju pšeničnega genoma predstavljajo velike razlike v pogostosti pojavljanja rekombinacij med različnimi deli posameznega kromosoma. Posledica tega je, da razdalje na fizičnih genskih kartah in genetskih genskih kartah ne sovpadajo (Gupta in sod., 2008). Poleg tega je potrebno upoštevati še, da uporabo mikrosatelitnih markerjev pri določanju stopnje hibridnosti omejujejo velike genetske

razlike med posameznimi starševskimi komponentami, ki so predmet testiranja kombinacijske sposobnosti. To pomeni, da je potrebno testirati delovanje večjega števila lokusno specifičnih začetnih oligonukleotidov, oziroma dobljene rezultate še dodatno preveriti z uporabo izoencimov.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VPLIV DERIVATOV OKSANILNE KISLINE NA INDUKCIJO MOŠKE STERILNOSTI PRI NAVADNI PŠENICI

3.1.1 Učinkovitost sintetiziranih derivatov oksanilne kisline v primerjavi s komercialnim sredstvom za kemično hibridizacijo CROISOR® 100

Derivati oksanilne kisline, ki so predmet naše študije, so bili določeni na osnovi predhodnih študij Chakrabortya in Devakumarja (2005a, 2005b, 2006a, 2006b). Trije etilni estri oksanilne kisline (etyl 4-bromooksanilat, etil 4-cianooksanilat in etil 4-fluorooksanilat), ki so glede na rezultate navedenih avtorjev pri navadni pšenici (*Triticum aestivum*) inducirali visok odstotek moške sterilnosti (> 98 %) so bili na Odseku za organsko in fizikalno kemijo Instituta "Jožef Stefan" modificirani v vodo topno stanje v obliki treh kislin (4-bromooksanilna kislina, 4-cianooksanilna kislina in 4-fluorooksanilna kislina) in treh soli (tetrametilamonijev 4-bromooksanilat, tetrametilamonijev 4-cianooksanilat, tetrametilamonijev 4-fluorooksanilat). Vsi potrebni reaktanti in organska topila za sintezo navedenih aktivnih snovi so bili pridobljeni od komercialnih virov in uporabljeni v prvotnem stanju. Točke taljenja so bile določene z Büchijevou napravo, NMR spektri so bili zabeleženi z Varian INOVA 300 spektrometrom, določanje masnih spektrov je potekalo na Q TOF Premierju po ESI metodi, FT-IR spektri pa so bili zabeleženi s Perkin Elmer 400 spektrometrom. Metode za pripravo škropilne suspenzije iz sintetiziranih derivatov oksanilne kisline, aplikacija ter določanje njihove učinkovitosti in fitotoksičnosti v primerjavi s komercialnim sredstvom za kemično hibridizacijo CROISOR® 100 so opisani v nadaljevanju.

Učinkovitost sintetiziranih derivatov oksanilne kisline (estri, kisline, soli) je bila določena v primerjavi s komercialnim sredstvom za kemično hibridizacijo CROISOR® 100 na osnovi poljskega poskusa, ki je bil zasnovan v sezонаh 2009/10 in 2010/11 na dveh lokacijah (Jablje pri Trzinu (v nadaljevanju osrednja regija): zemljepisna širina 46° 8'39,57"N, zemljepisna dolžina 14°34'17,55"E; Krog pri Murski Soboti (v nadaljevanju severovzhodna regija): zemljepisna širina 46°37'22,58"N, zemljepisna dolžina 16° 7'44,10"E). Sredstvo CROISOR® 100 (dobavitelj SAATEN-UNION Recherche s.a.s.) je bilo v našo študijo vključeno zaradi njegove dolgoletne uporabe pri pridelavi hibridnega semena navadne pšenice in njegove aktivne snovi (sintofen), ki spada v drugo kemijsko skupino kot sintetizirani derivati oksanilne kisline. Aktivna snov sintofen spada v kemijsko skupino substituiranih kinolinov (po IUPAC-u: 1-(4-klorofenil)-1,4-dihidro-5-(2-metoksietoksi)-4-oksokinolin-3-karboksilna kislina) (Sintofen, 2012; Wong in sod., 1995).

Preizkušanje devetih sintetiziranih derivatov oksanilne kisline in komercialnega sredstva za kemično hibridizacijo je potekalo v poljskem poskusu, ki je bil zasnovan v obliki

desetih pasov dolžine 30 m in širine 1 m (Slika 7). Zaradi kontrole (brez aplikacije aktivne snovi) je bil upoštevan še enajsti pas. Poleg glavnega faktorja aktivna snov (okrajšano AS) sta bila v poljskem poskusu preučevana še vpliva fenofaze (okrajšano F) in porabe aktivne snovi (okrajšano D). Faktor fenofaza predstavlja dolžino socvetja na glavnem poganjku, ko se je opravila aplikacija testiranih aktivnih snovi (F1: 5–10 mm, F2: 10–15 mm, F3: 15–20 mm), faktor poraba aktivne snovi pa predstavlja pet različnih količin, v katerih so se aplicirale testirane aktivne snovi (D1 – 700, D2 – 1400, D3 – 2100, D4 – 2800, D5 – 3500 g ha⁻¹). Faktor fenofaza in poraba aktivne snovi sta bila znotraj vseh pasov (razen kontrole) zajeta s petnajstimi obravnavanji velikosti 2 m² (1 × 2 m).



Slika 7: Preizkušanje devetih sintetiziranih derivatov oksanilne kisline in komercialnega sredstva za kemično hibridizacijo CROISOR® 100 v severovzhodni regiji – sezona 2009/10

Figure 7: Testing of nine synthesized oxanilic acid derivatives in compare with commercial chemical hybridizing agent CROISOR® 100 in the northeast region – season 2009/10

V obeh sezonah in na obeh lokacijah je bila aplikacija testiranih aktivnih snovi izvedena na kultivarju navadne pšenice Guarni (vzdrževalec Florimond Desprez, Francija), ki je znan po enakomernem razvoju vseh poganjkov in hitri ekstruziji prašnic. Gostota setve je znašala 450 kalivih zrn m⁻², medvrstna razdalja je bila 12,5 cm. Zaradi neposredne primerjave podatkov pri statistični analizi, je bila oskrba posevka v obeh sezonah in na

obeh lokacijah izvedena na enak način. To pomeni, predsetveni dodatek 100 kg ha⁻¹ P₂O₅, 150 kg ha⁻¹ K₂O, tri dognojevanja z mineralnim dušikom v obliki 27 % kalcij amonijevega nitrata – KAN (EC 13/25, 70–90 kg ha⁻¹ N; EC 31/32, 50–70 kg ha⁻¹ N; EC 47/49, 70–90 kg ha⁻¹ N), tretiranje s herbicidom na osnovi sulfonil sečnine (EC 13/37), dvakratno tretiranje s fungicidom (EC 29/37 fungicid na osnovi strobilurina, EC 51/69 fungicid na osnovi azola) in uporaba insekticida na osnovi deltametrina.

Aplikacija testiranih aktivnih snovi je bila izvedena v dopoldanskem času, ko je relativna zračna vlaga presegala 50 % z uporabo standardnih šob (tip šobe: Lechler 110-04; delovni pritisk 2 bar; poraba vode na enoto površine: 700 L/ha). Vse obravnavane aktivne snovi so bile aplicirane kot 0,1 % suspenzija pri čemer je bila posamezna aktivna snov pripravljena po naslednjem protokolu:

ESTRI:

- Etil 4-bromooksanilat (emulzija pripravljena iz 3 g estra / 7,5 g UD-50 / 24 ml dimetil sulfoksida)
- Etil 4-cianooksanilat (emulzija pripravljena iz 3 g estra / 7,5 g UD-50 / 120 ml dimetil sulfoksida)
- Etil 4-fluorooksanilat (emulzija pripravljena iz 3 g estra / 7,5 g UD-50 / 135 ml dimetil sulfoksida)

KISLINE

- 4-bromooksanilna kislina (suspenzija 3 g kisline v 12 g Spartan)
- 4-cianooksanilna kislina (suspenzija 3 g kisline v 12 g Spartan)
- 4-fluorooksanilna kislina (suspenzija 3 g kisline v 12 g Spartan)

TETRAMETILAMONIJEVE SOLI

- Tetrametilamonijeva sol 4-bromooksanilne kisline (raztopina 3 g soli v 200 ml vode; 2,144 g kisline in 2,120 g Me₄NOH×5H₂O)
- Tetrametilamonijeva sol 4-cianooksanilne kisline (raztopina 3g soli v 200ml vode; 2,308 g kisline in 1,713 g Me₄NOH×5H₂O)
- Tetrametilamonijeva sol 4-fluorooksanilne kisline (raztopina 3 g soli v 200ml vode; 2,167 g kisline in 2,064 g Me₄NOH×5H₂O)

Absorpcijski potencial za aktivno snov je bil ocenjen z *in situ* merjenjem matričnega potenciala vode v tleh in določanjem indeksa listne površine. Tenzija vode oziroma njen matrični potencial je bil določen s pomočjo tenziometra STEPS 40033, indeks listne površine pa je bil določen z aparatom Li-Cor LAI 2000 Plant Canopy Analyser.

3.1.2 Selektivnost in fitotoksičnost 4-bromooksanilne kisline v primerjavi s komercialnim sredstvom za kemično hibridizacijo CROISOR® 100

V prvi sezoni preizkušanja učinkovitosti sintetiziranih derivatov oksanilne kisline je bil izbran derivat, ki je dosegel statistično značilno najvišji odstotek moške sterilnosti, da bi se z dodatno študijo preverilo še njegovo selektivnost delovanja. Statistična analiza opravljena po žetvi leta 2010 je pokazala, da se je učinkovitosti komercialnega sredstva za kemično hibridizacijo CROISOR® 100 najbolj približal derivat 4-bromooksanilna kislina. Za navedeni derivat je bila nato v sezoni 2010/11 skupaj s sredstvom CROISOR® 100 določena selektivnost delovanja, kar pomeni, da je bil določen vpliv genotipa na indukcijo moške sterilnosti. Poleg tega je bila na osnovi redukcije višine rasti in števila klaskov za obe kemikaliji določena tudi fitotoksičnost delovanja.

Oba parametra, selektivnost delovanja in fitotoksičnost, sta bila preverjena s poljskim poskusom, ki je bil zasnovan na lokaciji v osrednji regiji (Jablje pri Trzinu: zemljepisna širina $46^{\circ} 8'39,57''$ N, zemljepisna dolžina $14^{\circ}34'17,55''$ E). Poljski poskus je vključeval poleg faktorja aktivna snov (okrajšano AS) še faktor genotip (okrajšano G), ki je predstavljal šest različnih linijskih sort navadne pšenice (cv. Ficko (vzdrževalec Poljoprivredni institute Osijek), cv. Guarni (vzdrževalec Florimond Desprez), cv. Sana (vzdrževalec Bc institut), cv. Marija (vzdrževalec Bc institut), cv. Inoui (vzdrževalec C.C. Benoist), cv. Bologna (vzdrževalec C.C. Benoist)) in faktor fenofaza (okrajšano F), ki je predstavljal čas, ko je bila opravljena aplikacija obeh aktivnih snovi. Aplikacija obeh aktivnih snovi (4-bromooksanilna kislina in sintofen) je bila opravljena, ko je socvetje na glavnem poganjku doseglo dolžino 5–10 mm (F1) in 15–20 mm (F2).

Zaradi izvedbe poljskega poskusa je bil posamezen genotip oziroma linijska sorta sejan v obliki petih zaporednih parcelic z osmimi vrsticami dolžine 7,5 m, pri čemer je medvrstna razdalja znašala 12,5 cm (površina posamezne parcelice je znašala $7,5 \text{ m}^2$). Pri vsakem genotipu je peta zaporedna parcelica predstavljala kontrolo (brez tretiranja). Aplikacija obeh aktivnih snovi je bila opravljena pod priporočenimi pogoji, ki so navedeni za uporabo komercialnega sredstva za kemično hibridizacijo CROISOR® 100. To pomeni, da je znašala poraba aktivne snovi 1400 g ha^{-1} , da je bila minimalna zračna temperatura v času aplikacije 12°C in, da je bila aplikacija opravljena v dopoldanskem času, ko je minimalna relativna zračna vlaga presegala 50 %. Tehnična izvedba aplikacije aktivne snovi, protokol za pripravo 0,1 % škropilne suspenzije in agrotehnični ukrepi se niso razlikovali od testiranja učinkovitosti devetih derivatov oksanilne kisline v primerjavi s komercialnim sredstvom za kemično hibridizacijo.

3.1.3 Določanje učinkovitosti in fitotoksičnosti sintetiziranih derivatov oksanilne kisline in komercialnega sredstva za kemično hibridizacijo CROISOR® 100

Učinkovitost sintetiziranih derivatov oksanilne kisline je bila v primerjavi s komercialnim sredstvom za kemično hibridizacijo CROISOR® 100 določena na dva načina:

- test pelodnih zrn rastlin tretiranih z acetokarminom,
- izračun moške sterilnosti na osnovi določanja števila zrn v klasih tretiranih rastlin.

Za izvedbo acetokarminskega testa so bile v sezoni 2009/10 v obravnavanjih, ki so vključevala najvišjo porabo aktivne snovi (3500 g ha^{-1}), izolirane prašnice iz cvetov petih naključno izbranih klasov. Iz najmanj desetih zelenkasto-rumenkasto obarvanih prašnic je bil nato s pomočjo dveh pincet na objektivnem stekelcu izoliran cvetni prah, kateremu se je dodalo 1 % raztopino acetokarmina. Sledilo je fiksiranje cvetnega prahu s krovnim stekelcem in mikroskopiranje s svetlobnim mikroskopom pri 100 kratni povečavi. Po končanem mikroskopiranju je bil zabeležen podatek o obarvanosti vsebine in obliki površine pelodnih zrn.

Za izračun odstotka moške sterilnosti na osnovi števila zrn v klasih tretiranih rastlin je bilo v vsakem obravnavanju po končani klasitvi (EC 58/59) z belo papirnato vrečko izoliranih deset klasov. Z belo papirnato vrečko je bilo v vsaki sezoni in na vsaki lokaciji izoliranih tudi trikrat po deset klasov kontrolnih rastlin. Po končanem štetju zrn v klasih tretiranih in netretiranih rastlin je nato sledil izračun odstotka moške sterilnosti po naslednji formuli:

$$\% \text{ moške sterilnosti} = (S_C - S_T) / S_C \times 100$$

S_T – Število zrn v izoliranih klasih tretiranih rastlin.

S_C – Število zrn v izoliranih klasih netretiranih rastlin (kontrola).

Zaradi določanja fitotoksičnosti testiranih aktivnih snovi je bil vzporedno z določanjem števila zrn za vsako posamezno rastlino v obeh poskusih (3.1.1 in 3.1.2) zabeležen tudi podatek o višini rastline (od tal do vrha zadnjega klaska) in številu klaskov na klas.

Ko so bili zbrani vsi potrebni podatki za določanje učinkovitosti in fitotoksičnosti preučevanih aktivnih snovi je sledila statistična obdelava podatkov s statističnim paketom STATGRAPHICS® Centurion XVI (STATGRAPHICS ..., 2012). Z analizo homogenosti varianc so bile preverjene statistično značilne razlike med sezonomi, lokacijami, aktivnimi snovmi, fenofazami in porabami aktivne snovi.

3.2 TESTIRANJE KOMBINACIJSKE SPOSOBNOSTI LINIJSKIH SORT NAVADNE PŠENICE IN KVANTITATIVNA ANALIZA HETEROZE V SKUPINI HEKSAPLOIDNIH PŠENIC Z GENOMSKO STRUKTURO AABBDD

3.2.1 Testiranje kombinacijske sposobnosti linijskih sort navadne pšenice francoskih žlahtniteljskih hiš in Poljoprivrednog instituta Osijek

Potencial za vzgojo hibridnih sort navadne pšenice je bil določen pri dveh tipih dednine oziroma množicah starševskih komponent, ki sta v Republiki Sloveniji najbolj zastopani. Za ta namen so bila izvedena križanja za testiranje kombinacijske sposobnosti (v nadaljevanju KS) po modelu Linija × Tester (v nadaljevanju L × T). Starševske komponente, ki so bile vključene v testiranje KS, so bile določene na osnovi pregleda pridelave semena kmetijskih rastlin med leti 2009 in 2011. Iz tega pregleda je razvidno, da v Republiki Sloveniji glede na sortno strukturo prevladujejo linijske sorte francoskih in hrvaških žlahtniteljskih hiš (Rezultati ..., 2012). Vsi žlahtniteljski materiali, ki so bili v naši študiji vključeni v analizo aditivne in ne-aditivne komponente kombinacijske sposobnosti (splošna in specifična kombinacijska sposobnost), so bili določeni na osnovi rezultatov posebnega, uradnega in preliminarnega preizkušanja sort navadne ozimne pšenice, ki ga izvaja Kmetijski inštitut Slovenije, ali pa na osnovi osebnega razgovora z žlahtiteljem. Osnova za oblikovanje seznama materinih komponent (linije) in opraševalcev (testerji) so bili podatki o višini rastline, datumu začetka klasenja (fenofaza EC 51), datumu začetka cvetenja (fenofaza EC 61) in zdravstvenem stanju (občutljivost na pepelasto plesen (*Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*), rjavenje pšeničnih plev (*Septoria nodorum* (Berk.) Berk.) in pšenično listno pegavost (*Mycosphaerella graminicola* (sinonim *Septoria tritici*)).

Testiranje KS linijskih sort navadne pšenice francoskih žlahtniteljskih hiš je potekalo v sezonah 2010/11 in 2011/12 na Selekcijsko poskusnem centru Ptuj (zemljepisna širina: 46°24'45,84"S, zemljepisna dolžina: 15°52'23,67)V). V statistično analizo so bili vključeni podatki za štirinajst linijskih sort (6 linij × 8 testerjev) in 42 F₁ hibridov (preglednica 1 in 2). F₁ hibridi so bili vzgojeni s klasično emaskulacijo in testirani skupaj s starševskimi komponentami v poskusu po metodi slučajnega bloka s štirimi ponovitvami. V posamezni ponovitvi so bili za tri rastline zbrani naslednji podatki:

- število klasov na rastlino (celotno število klasov na posamezno rastlino),
- najdaljši klas (največja razdalja med bazo prvega klaska in vrhom zadnjega klaska),
- višina rastline izmerjena od tal do vrha najdaljšega klasa,
- dolžina zadnjega internodija merjena pri najdaljšem klasu,
- skupni pridelek zrnja na posamezno rastlino,
- skupno število zrn na posamezno rastlino.

Preglednica 1: Seznam linijskih sort
Table 1: The list of line varieties

<u>Linijske sorte francoskih žlahniteljskih hiš</u>		
Oznaka linijske sorte	Poreklo	Vzdrževalec
♀	C _T 19	Magellan × Charger
	C _T 1	ND2710 × Apache
	C _T 6	Axial × NRPB-84-4233
	C _T 15	ND2710 × Apache
	C _T 16	Sisley × 91B623
	C _T 3	Tremie × Guadalupe
♂	C _T 14	Frelom × Tremie
	C _T 17	Isengrain × (Nirvana × Kalango)
	C _T 21	Corvus × Bandit
	C _T 22	Tambor × Flair × Drifter
	C _T 24	(Malacca × Charger) × Xi19
	C _T 25	FD14579 × FD92041
	C _T 26	CWW-4462-64 × Rendezvous
	C _T 30	Arminda × Festival
\$	Garcia	Magellan × Charger
<u>Linijske sorte Poljoprivrednog instituta Osijek</u>		
Oznaka linijske sorte	Poreklo	Vzdrževalec
♀	C _T 13	Osk.4.50/1 [*] Zg.2696
	C _T 50	Ana × Osk 4.48/1-91
	C _T 48	Srpanjka × Demetra
	C _T 28	Osk.5.140/22-91 × Sana
	C _T 46	Žitarka/Osk 7.5/4-82/KBg 160-86
	C _T 38	Srpanjka × Barbara
	C _T 72	Divana × Srpanjka
	C _T 42	Srpanjka × Divana
	C _T 73	/
	C _T 71	/
♂	C _T 51	/
	C _T 52	/
\$	Hystar F ₁	P96QH529 × Apache
		SAATEN-UNION ⁶

[§] Standardni kultivar

¹SECOBRA Recherches, Centre de Bois-Henry 78580 MAULE, France

²Limagrain, Rue Limagrain, 63720 Chappes, France

³Syngenta Seeds SAS, 12 chemin de l'Hobit BP 27, 31790 Saint-Sauveur, France

⁴Florimond Desprez Veuve et Fils, 59242 Capelle en Pévèle, France

⁵Poljoprivredni institut Osijek, Južno predgrađe 17, Osijek, Hrvatska

⁶SAATEN-UNION Recherche s.a.s, 163Ter avenue de Flandre, BP 6, 60190 Estrées-Saint-Denis, France

Preglednica 2: Seznam F₁ križancev
Table 2: The list of F₁ hybrids

♀/♂	C _T 14 ^{Fr}	C _T 17 ^{Fr}	C _T 21 ^{Fr}	C _T 22 ^{Fr}	C _T 24 ^{Fr}	C _T 25 ^{Fr}	C _T 26 ^{Fr}	C _T 30 ^{Fr}	C _T 51 ^{Hr}	C _T 52 ^{Hr}
C _T 19 ^{Fr}	×	×	×	×	×	×	×		×	
C _T 1 ^{Fr}	×	×	×	×	×	×	×		×	
C _T 6 ^{Fr}	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
C _T 15 ^{Fr}	×	×	×		×	×	×		×	
C _T 16 ^{Fr}	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
C _T 3 ^{Fr}	×	×	×		×	×	×		×	
C _T 13 ^{Hr}								×	CHA	CHA
C _T 50 ^{Hr}								×	CHA	CHA
C _T 48 ^{Hr}								×	CHA	CHA
C _T 28 ^{Hr}								×	CHA	CHA
C _T 46 ^{Hr}								×	CHA	CHA
C _T 38 ^{Hr}								×	CHA	CHA
C _T 72 ^{Hr}								×	CHA	CHA
C _T 42 ^{Hr}								×	CHA	CHA
C _T 73 ^{Hr}								×	CHA	CHA
C _T 71 ^{Hr}								×	CHA	CHA
C _T 51 ^{Hr}								×	CHA	CHA
C _T 52 ^{Hr}								×	CHA	CHA

F₁ križanci na osnovi linijskih sort francoskih žlahtniteljskih hiš (X_T ♀ / ♂^{Fr})

X_T 16/24^{Fr}, X_T 3/30^{Fr}, X_T 3/24^{Fr}, X_T 6/24^{Fr}, X_T 19/24^{Fr}, X_T 15/14^{Fr}, X_T 19/17^{Fr}, X_T 1/24^{Fr}, X_T 6/30^{Fr}, X_T 19/22^{Fr}, X_T 16/30^{Fr}, X_T 3/21^{Fr}, X_T 19/14^{Fr}, X_T 3/17^{Fr}, X_T 6/26^{Fr}, X_T 16/22^{Fr}, X_T 15/17^{Fr}, X_T 15/21^{Fr}, X_T 16/21^{Fr}, X_T 6/14^{Fr}, X_T 19/30^{Fr}, X_T 6/21^{Fr}, X_T 6/22^{Fr}, X_T 16/17^{Fr}, X_T 16/14^{Fr}, X_T 19/21^{Fr}, X_T 1/22^{Fr}, X_T 1/25^{Fr}, X_T 19/25^{Fr}, X_T 6/17^{Fr}, X_T 1/17^{Fr}, X_T 3/14^{Fr}, X_T 6/25^{Fr}, X_T 15/25^{Fr}, X_T 16/25^{Fr}, X_T 16/26^{Fr}, X_T 3/25^{Fr}, X_T 1/21^{Fr}, X_T 15/24^{Fr}, X_T 1/30^{Fr}, X_T 15/30^{Fr}, X_T 1/14^{Fr}

F₁ križanci na osnovi linijskih sort Poljoprivrednog instituta Osijek (X_T ♀ / ♂^{Hr})

X_T 13/51^{Hr}, X_T 50/51^{Hr}, X_T 48/51^{Hr}, X_T 28/51^{Hr}, X_T 46/51^{Hr}, X_T 38/51^{Hr}, X_T 72/51^{Hr}, X_T 42/51^{Hr}, X_T 73/51^{Hr}, X_T 71/51^{Hr}, X_T 13/52^{Hr}, X_T 50/52^{Hr}, X_T 48/52^{Hr}, X_T 28/52^{Hr}, X_T 46/52^{Hr}, X_T 38/52^{Hr}, X_T 72/52^{Hr}, X_T 42/52^{Hr}, X_T 73/52^{Hr}, X_T 71/52^{Hr}

×^{CHA} križanje temelji na uporabi sredstva CROISOR® 100

Testiranje KS linijskih sort navadne pšenice Poljoprivrednog instituta Osijek je temeljilo na pridelavi hibridnega semena z uporabo sredstva CROISOR® 100. Postopek za pridelavo hibridnega semena navadne pšenice, ki temelji na kemični indukciji moške sterilnosti je bil predhodno preverjen s poskusno pridelavo hibridnega semena v sezoni 2009/10.

Ob upoštevanju stopnje hibridnosti, ki je bila dosežena v poskusni pridelavi hibridnega semena navadne pšenice, je bil za testiranje KS linijskih sort Poljoprivrednog instituta Osijek v sezoni 2010/11 nastavljen poskus za pridelavo hibridnega semena 20 F₁ hibridnih kombinacij (10 linij × 2 testerja). Poskus je bil lociran na dveh lokacijah (Krog pri Murski Soboti (zemljepisna širina: 46°38'49,62"S, zemljepisna dolžina: 16°9'41,50"V) in Osijek (zemljepisna širina: 45°32'14,44"S, zemljepisna dolžina: 18°44'38,12"V)).

Osnovna enota poskusa za pridelavo hibridnega semena 20 F₁ hibridnih kombinacij so bile štiri zaporedne parcelice (1 m × 7,5 m) posejane z materino komponento, ki so bile z obeh strani obdane z oprševalcem ozziroma testerjem. Zaradi dveh različnih testerjev je bilo deset linijskih sort, ki so predstavljale materine komponente združenih v eno enoto in ločeno od druge enote ali skupine z deset metrov širokim pasom ječmena (Slika 8). Nenadzorovana opršitev s cvetnim prahom neznanega izvora je bila preprečena z upoštevanjem minimalne oddaljenosti, ki velja pri pridelavi semenskega materiala žit (Zakon ..., 2005).

Sredstvo CROISOR® 100 je bilo aplicirano v fazi kolenčenja, ko je dolžina socvetja na glavnem poganjku materinih komponent znašala 15–20 mm. Aplikacija je potekala v štirih zaporedno naraščajočih koncentracijah (20 ml L⁻¹ (priporočen odmerek), 25 ml L⁻¹, 30 ml L⁻¹ in 35 ml L⁻¹), pri čemer je bil zaradi boljše absorbcije aktivne snovi dodan še surfaktant Spartan v 0,1 % koncentraciji. Pred spravilom s parcelnim kombajnom (model Wintersteiger Classic) je bil v klasih, ki so bili v fenofazi EC 58/59 izolirani z belo papirnatno vrečko preverjen nastavek zrn. Za namen testiranja KS so bile nato požete le tiste parcelice materinih komponent, pri katerih v izoliranih klasih ni bilo možno najti zrn.

Testiranje KS 20 F₁ hibridnih kombinacij je potekalo v naslednji sezoni (2011/12). V ta namen je bilo 20 F₁ hibridnih kombinacij skupaj s starševskimi komponentami in standardnim kultivarjem (hibridna sorta Hystar F₁) posejanih v poskusu po metodi slučajnega bloka s štirimi ponovitvami na lokacijah Jablje pri Trzinu (zemljepisna širina: 46° 8'31,40"S, zemljepisna dolžina: 14°33'30,10"V) in Osijek (zemljepisna širina: 45°32'14,44"S, zemljepisna dolžina: 18°44'38,12"V). Za statistično obdelavo podatkov so bili zbrani podatki o pridelku zrnja na enoto površine in absolutni masi zrnja.



Slika 8: Poskus za pridelavo hibridnega semena navadne pšenice z uporabo sredstva za kemično hibridizacijo CROISOR® 100 (Krog pri Murski Soboti, 2010/11)

Figure 8: Field experiment for the hybrid wheat seed production with the use of chemical hybridizing agent CROISOR® 100 (Krog near Murska Sobota, 2010/11)

3.2.2 Preverjanje stopnje hibridnosti pri poskusni pridelavi hibridnega semena navadne pšenice

Zaradi visoke polimorfnosti, ki jo omogoča uporaba SSR markerjev je bila stopnja hibridnosti pri poskusni pridelavi hibridnega semena navadne pšenice preverjena z namnoževanjem mikrosatelitnih lokusov specifičnih za navedeno rastlinsko vrsto.

3.2.2.1 Rastlinski material za izolacijo DNK

Rastlinski material za izolacijo DNK je bil pridobljen na osnovi poskusne pridelave hibridnega semena navadne pšenice z uporabo sredstva CROISOR® 100. V ta namen je bil na lokaciji Krog pri Murski Soboti oktobra 2009 posejan poskus, ki je obsegal dva pasova materine komponente (linijska sorta Inoui, vzdrževalec C.C. Benoist), ki sta bila z vseh strani obdana s pasovi oprševalca (linijska sorta Ludwig, vzdrževalec Probstdorfer Saatzucht). Vsi pasovi so bili dolgi 300 m, pri čemer so bili pasovi materine komponente

široki 5 metrov, pasovi oprševalca pa 2,5 m. Obe starševski komponenti sta bili določeni na osnovi morfoloških lastnosti (višina primarnega poganjka, dolžina zadnjega internodija, položaj zastavičarja) in dolžine vegetacije (datum začetka klasenja, datum začetka cvetenja) ter sta tvorili poskusno hibridno kombinacijo $X_T 6/21$. Sredstvo CROISOR® 100 je bilo aplicirano po navodilih podjetja SAATEN-UNION Recherche s.a.s (odmerek 14 L ha^{-1} , minimalna temperatura zraka $> 12^{\circ}C$, minimalna relativna zračna vlaga $> 50\%$), ko je dolžina socvetja na glavnem poganjku materine komponente znašala 15–20 mm.

Med žetvijo posevka za poskusno pridelavo hibridnega semena navadne pšenice je bilo v posameznem pasu v katerem je bila izvedena aplikacija sredstva CROISOR® 100 odvzetih po pet kilogramov semena. Oba vzorca sta bila nato združena in za en mesec shranjena na temperaturi $10^{\circ}C$. Po preteku enega meseca je bil celoten vzorec razkužen s pripravkom Lamardor FS 400. V laboratoriju za analize semenskega materiala na Kmetijskem inštitutu Slovenije je sledila setev 200 semen posamezne starševske komponente (cv. Inoui in cv. Ludwig) in semena poskusne kombinacije (oznaka $X_T 6/21$). Rastlinski material za izolacijo DNK je bil odvzet v fenofazi EC 12 (razgrnjena dva lista) na stotih rastlinah posameznega starševskega genotipa in poskusne kombinacije.

3.2.2.2 Izolacija DNK z metodo KingFisher

Celokupno DNK navadne pšenice (*Triticum aestivum*) smo iz predhodno pripravljenega rastlinskega materiala izolirali z aparaturo KingFisher® in mlinom Retsch. Pri izolaciji DNK z metodo KingFisher je bilo potrebno upoštevati naslednji protokol:

1. Zatehtamo rastlinski material za izolacijo DNK (60–100 mg) v 2 ml sterilne epice.
2. Dodamo 300 μl RTL lysis pufra in epico položimo v adapter mlina Retsch. Sledi inkubiranje (10 minut pri $65^{\circ}C$).
3. Epice centrifugiramo deset minut pri 12.000 rcf.
4. Pripravimo plato s stripi in pravilno vložimo pripravljen strip. Pričnemo s pipetiranjem:
 - a. 1. luknjica: 200 μl vzorca lysate faza + 200 μl izopropanola + 20 μl magnetne suspenzije (predhodno jo centrifugiramo tri do pet minut),
 - b. 2. luknjica: 500 μl RPV wash pufra (priložen kot koncentrat v kitu),
 - c. 3. luknjica: 500 μl EtOH 96 %,
 - d. 4. luknjica: 500 μl EtOH 96 %,
 - e. 5. luknjica: 200 μl AE pufra (v kitu).
5. Vključimo aparaturo in s puščicami izberemo program za izolacijo rastlinske DNK – BS 15-DNA-Plant-v020 in pritisnemo tipko START. Prične se izolacija, ki traja približno petnajst minut.

3.2.2.3 Določanje koncentracije DNK

Pred namnoževanjem DNK s polimerazno verižno reakcijo so bili posamezni vzorci razredčeni na enotno koncentracijo $20 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$. Predhodno je bila koncentracija DNK posameznega vzorca določena s pomočjo fluorimetra TKA 100. Pred začetkom merjenja je bil fluorimeter kalibriran z DNK telečjega timusa (1 mg ml^{-1} DNK v 10 mM Tris-HCl ; 50 mM EDTA ; pH raztopine: 8,0). Delovna raztopina je bila sestavljena iz $0,1 \text{ M NaCl}$, 10 mM Tris-HCl , 1 mM EDTA in barvila benzimidazol $0,1 \mu\text{l ml}^{-1}$ (pH raztopine: 7,4).

3.2.2.4 Namnoževanje mikrosatelitnih lokusov s polimerazno verižno reakcijo – PCR

Določanje stopnje hibridnosti pri poskusni pridelavi hibridnega semena navadne pšenice je temeljilo na polimerazni verižni reakciji s šestimi začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za mikrosatelitne lokuse, ki so opisani v preglednici 3. Mikrosatelitni lokusi, na katerih je temeljila analiza dedovanja pri navadni pšenici so bili določeni na osnovi študije Röder-ja in sod. (2002).

Preglednica 3: Opis mikrosatelitnih markerjev uporabljenih pri določanju stopnje hibridnosti v poskusni pridelavi hibridnega semena navadne pšenice (Röder in sod., 2002)

Lokus	Ponavljaljoča sekvenca	Velikost namnoženega fragmenta	Kromosom	Št. alelov (redki aleli)
Xgwm18	(CA) ₁₇ GA(TA) ₄	nič, 178–194	1B	10 (3)
Xgwm46	(GA) ₂ GC(GA) ₃₃	nič, 145–183	7B	16 (7)
Xgwm95	(CA) ₁₆	115–134	2A	9 (2)
Xgwm389	(CT) ₁₄ (GT) ₁₆	nič, 116–150	3B	15 (6)
Xgwm437	(CT) ₂₄	nič, 91–130	7D	15 (4)
Xgwm577	(CA) ₁₄ (TA) ₆	nič, 126–214	7B	22 (10)

Reakcijska mešanica (končni volumen $25 \mu\text{l}$) je vsebovala vzorčno DNK navadne pšenice v koncentraciji $20 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$, $1 \times$ PCR pufer (Boehringer-Manheim), 2 mM MgCl_2 (Sigma), $200 \mu\text{M}$ vsakega deoksinukleotid trifosfata (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), $0,2 \mu\text{M}$ vsakega začetnega oligonukleotida, $0,5$ enote polimeraze *Taq* (Boehringer-Manheim) in destilirano vodo. Zaradi fluorescenčnega označevanja, ki je poenostavilo celotno analizo določanja stopnje hibridnosti je bil reakcijski mešanici dodan oligonukleotid TAIL, ki je bil odvisno od mikrosatelitnega lokusa na 5' koncu označen s 6FAM, VIC, NED ali PET fluorescentno molekulo. Namnoževanje DNK fragmentov je potekalo v cikličnem termostatu Applied Biosystems / Veriti® (Veriti®, ..., 2012) z začetno štiriminutno denaturacijo pri 95°C kateri je sledilo 40 zaporednih ciklusov z naslednjimi stopnjami:

- denaturacija (94 °C, 30 s),
- prileganje začetnega oligonukleotida (38 °C, 30 s),
- podaljševanje komplementarne verige DNK (72 °C, 1 min 45 s),
- zaključno podaljševanje verige (72 °C, 8 minut) in
- ohlajanje na 4 °C.

Pred začetkom polimerazne verižne reakcije je bila delovna mešanica prelita z mineralnim oljem, da bi tako preprečili nenadzorovano izhlapevanje med namnoževanjem DNK fragmentov.

3.2.2.5. Analiza namnoženih fragmentov DNK in analiza dedovanja

DNK fragmenti, ki so bili rezultat PCR namnoževanja in, ki so bili označeni z različnimi fluorescenčnimi barvili so bili združeni in pripravljeni za nanos na kapilarno elektroforezo (POST–PCR multiplexing). To pomeni, da so bili od vsake PCR reakcije, ki je temeljila na enakem genotipu od vseh obravnavanih mikrosatelitnih lokusov odvzeti vzorci po 4 µl in združeni glede na fluorescenčno barvilo, ki se je moralo razlikovati. Sledilo je centrifugiranje in odvzem skupnega vzorca velikosti 1 µl, ki je bil prenesen na ploščo s 96 luknjicami katera je bila kompatibilna z avtomatskim sekvenatorjem ABI 3130XL. Preden so bili vzorci odposlani na Oddelek za zootehniko, ki opravlja z navedeno napravo sta bila k skupnemu vzorcu dodana še marker LIZ 600 in 10,6 µl formamida.

Sistem ABI 3130XL omogoča detekcijo sekvenc na podlagi fluerescence, ki je inducirana z laserjem. Rezultati analize so elektroferogramske datoteke, ki jih je bilo potrebno za nadaljnjo analizo prenesti v programski paket GeneMapper® Software Version 4.0, ki pridobljene podatke pretvori v dolžine alelov in jakost fluorescentnega signala. Analiza dedovanja oziroma določanje stopnje hibridnosti je nato temeljilo na primerjavi dolžine alelov obravnavanih mikrosatelitnih lokusov. Heterozigotno stanje oziroma F₁ hibrid smo potrdili v primeru, da sta bila na obravnavanem mikrosatelitnem lokusu detektirani vsaj dve različni alelni dolžini. Po končani analizi vseh rastlinskih vzorcev smo nato izračunali delež F₁ hibridov v poskusni kombinaciji X_T 6/21.

3.2.3 Statistična obdelava podatkov pri testiranju splošne in specifične kombinacijske sposobnosti linijskih sort navadne pšenice

Analiza podatkov pridobljenih na osnovi preizkušanja kombinacijske sposobnosti trinajstih francoskih linijskih sort in dvanajstih linijskih sort Poljoprivrednog instituta Osijek je bila opravljena v dveh delih s pomočjo programa AGROBASE Generation II® (AGROBASE..., 2012). Prvi del je predstavljal analizo variance za parametre na osnovi katerih temelji preizkušanje kombinacijske sposobnosti po modelu Linija × Tester. V drugem delu pa je

bila izračunana splošna in specifična kombinacijska sposobnost za posamezne starševske komponente oziroma kombinacije.

1. Analiza variance

a. Izračun skupne vsote kvadratov, vsote kvadratov za ponovitve in obravnavanja:

Pred analizo variance so bili zbrani podatki ob upoštevanju navedb Warghese in sod. (1976) razvrščeni v obliki spodnje preglednice.

Preglednica 4: Primer zbranih podatkov za križance in starševske komponente (Warghese in sod., 1976)

Genotip	P_1	P_2	P_3	...	P_i	...	P_k	\sum
1^L	X ₁₁	X ₂₁	X ₃₁	...	X _{i1}	...	X _{k1}	$\sum_{i=1}^k X_{ij}$
2^L	X ₁₂	X ₂₂	X ₃₂	...	X _{i2}	...	X _{k2}	=
3^L	X ₁₃	X ₂₃	X ₃₃	...	X _{i3}	...	X _{k3}	=
4^L	X ₁₄	X ₂₄	X ₃₄	...	X _{i4}	...	X _{k4}	=
5^T	X ₁₅	X ₂₅	X ₃₅	...	X _{i5}	...	X _{k5}	=
6^T	X ₁₆	X ₂₆	X ₃₆	...	X _{i6}	...	X _{k6}	=
7^T	X ₁₇	X ₂₇	X ₃₇	...	X _{i7}	...	X _{k7}	=
1 x 5
1 x 6
1 x 7
2 x 5
2 x 6
2 x 7
3 x 5
3 x 6
3 x 7
4 x 5
4 x 6
4 x 7	X _{1ni}	X _{2ni}	X _{3ni}	...	X _{ini}	...	X _{kni}	.
\sum	$\sum_{j=1}^{ni} X_{ij}$	=	=	...	=	...	=	$\Sigma\Sigma$

^LLinija, ^TTester, P – ponovitev

S simbolom X_{ij} je označen j -ti element v i -tem vzorcu oziroma stolpcu. Pri statistični analizi je potrebno upoštevati, da pri metodi Linija \times Tester število obravnavanj predstavlja vsoto števila križancev in števila starševskih komponent. Po razvrstitvi podatkov je sledil izračun korekcijskega faktorja in vsote kvadratov (Warghese in sod., 1976).

$$\text{Korekcijski faktor (K.F.)} = (\sum\Sigma)^2 / (\text{št. ponovitev} \times \text{št. vseh obravnavanj}) \quad \dots (1)$$

$$\text{Skupna vsota kvadratov} = (X_{11})^2 + (X_{12})^2 + \dots + (X_{kn})^2 - K.F. \quad \dots (2)$$

$$\begin{aligned} \text{Vsota kvadratov za ponovitve} &= (((X_{11}) + (X_{12}) + \dots + (X_{1ni}))^2 + \dots \\ &+ ((X_{k1}) + (X_{k2}) + \dots + (X_{kni}))^2) / (\text{št. obravnavanj}) - K.F. \end{aligned} \quad \dots (3)$$

$$\begin{aligned} \text{Vsota kvadratov za obravnavanja} &= (((X_{11}) + (X_{21}) + \dots + (X_{k1}))^2 + \dots \\ &+ ((X_{1ni}) + (X_{2ni}) + \dots + (X_{kni}))^2) / (\text{št. ponovitev}) - K.F. \end{aligned} \quad \dots (4)$$

$$\begin{aligned} \text{Napaka pri izračunu vsote kvadratov} &= \text{skupna vsota kvadratov} - \\ &\text{vsota kvadratov za ponovitve} - \text{vsota kvadratov za obravnavanja} \end{aligned} \quad \dots (5)$$

- b. Izračun vsote kvadratov za križance, starševske komponente in križance skupaj s starševskimi komponentami:

Za določitev statistično značilnih razlik med starševskimi komponentami, križanci in starševskimi komponentami skupaj s križanci je potrebno iz prvotne preglednice izločiti naslednje podatke in jih urediti v obliki preglednice 5 (Waghese in sod., 1976):

Preglednica 5: Primer s štirimi ponovitvami, štirimi linijami in tremi testerji (Waghese in sod., 1976)

Linije	Testerji			Σ
	5	6	7	
1	X_{11}	X_{21}	X_{31}	$X_{11} + X_{21} + X_{31}$
2	X_{12}	X_{22}	X_{32}	$X_{12} + X_{22} + X_{32}$
3	X_{13}	X_{23}	X_{33}	$X_{13} + X_{23} + X_{33}$
4	X_{14}	X_{24}	X_{34}	$X_{14} + X_{24} + X_{34}$
Σ	$X_{11} + X_{12} + X_{13} + X_{14}$	$X_{21} + X_{22} + X_{23} + X_{24}$	$X_{31} + X_{32} + X_{33} + X_{34}$	$\Sigma\Sigma$

Sledil je izračun vsote kvadratov za križance, starševske komponente, starševske komponente skupaj s križanci in pripadajoče korekcijske faktorje. Ob upoštevanju navedb Waghese in sod. (1976) so enačbe za izračun vsote kvadratov naslednje:

$$\begin{aligned} \text{Vsota kvadratov za križance} &= (((X_{11})^2 + X_{21})^2 + \dots + (X_{34})^2) / \\ &(\text{št. ponovitev}) - K.F. \text{ (križanci)} \end{aligned} \quad \dots (6)$$

$$\text{Korekcijski faktor (križanci)} = (\Sigma\Sigma)^2 / (\text{št. križancev} \times \text{št. ponovitev}) \quad \dots (7)$$

$$\text{Vsota kvadratov za starševske komponente (sledi iz preglednice 3)} = ((X_{11})^2 + (X_{21})^2 + \dots + (X_{k7})^2) / (\text{št. ponovitev}) - K.F. \text{ (starševske komponente)} \quad \dots (8)$$

$$\text{Korekcijski faktor (starševske komponente)} = ((X_{11} + X_{21} + \dots + X_{k7})^2) / (\text{št. starševskih komponent} \times \text{št. ponovitev}) \quad \dots (9)$$

$$\begin{aligned} \text{Vsota kvadratov za starševske komponente skupaj s križanci} &= \\ \text{vsota kvadratov za obravnavanja} - \text{vsota kvadratov za križance} - \\ \text{vsota kvadratov za starševske komponente} &\dots (10) \end{aligned}$$

c. Izračun vsote kvadratov za linije, testerje in linije skupaj s testerji

Pred določitvijo splošne in specifične kombinacijske sposobnosti za posamezno starševsko komponento oziroma kombinacijo je potrebno z analizo variance potrditi, da obstajajo med linijami, testerji in linijami skupaj s testerji statistično značilne razlike. V ta namen je potrebno ob upoštevanju navedb Warghese-ja in sod. (1976) opraviti še naslednje izračune:

$$\begin{aligned} \text{Vsota kvadratov za linije} &= (((X_{11} + X_{21} + X_{31})^2 + (X_{12} + X_{22} + X_{32})^2 + \\ (X_{13} + X_{23} + X_{33})^2 + (X_{14} + X_{24} + X_{34})^2) / (\text{št. ponovitev} \times \text{št. testerjev})) - \\ \text{K.F. (križanci)} &\dots (11) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Vsota kvadratov za testerje} &= (((X_{11} + X_{12} + X_{13} + X_{14})^2 + \\ (X_{21} + X_{22} + X_{23} + X_{24})^2 + (X_{31} + X_{32} + X_{33} + X_{34})^2) / \\ (\text{št. ponovitev} \times \text{št. linij})) - \text{K.F. (križanci)} &\dots (12) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Vsota kvadratov za linije skupaj s testerji} &= \text{vsota kvadratov za križance} - \\ \text{vsota kvadratov za linije} - \text{vsota kvadratov za testerje} &\dots (13) \end{aligned}$$

d. Določitev prostostnih stopenj in izračun F vrednosti

Po izračunu vsote kvadratov je za analizo variance potrebno določiti še število prostostnih stopenj (Warghese in sod., 1976). Prostostne stopnje so naslednje:

$$\begin{aligned} \text{Prostostna stopnja skupne vsote kvadratov} &= \text{Prostostna stopnja za ponovitve} + \\ \text{prostostna stopnja za obravnavanja} + \text{prostostna stopnja za napako} &\dots (14) \end{aligned}$$

$$\text{Prostostna stopnja za ponovitve} = \text{Št. ponovitev} - 1 \quad \dots (15)$$

$$\text{Prostostna stopnja za obravnavanja} = \text{Št. obravnavanj} - 1 \quad \dots (16)$$

$$\text{Prostostna stopnja za križance} = \text{Št. križancev} - 1 \quad \dots (17)$$

$$\text{Prostostna stopnja za starševske komponente} = \text{Št. starš. komponent} - 1 \quad \dots (18)$$

$$\begin{aligned} \text{Prostostna stopnja za starševske komponente skupaj s križanci} = \\ \text{prostostna stopnja za obravnavanja} - \text{prostostna stopnja za križance} - \\ \text{prostostna stopnja za starševske komponente} \end{aligned} \quad \dots (19)$$

$$\text{Prostostna stopnja za linije} = \text{Št. linij} - 1 \quad \dots (20)$$

$$\text{Prostostna stopnja za testerje} = \text{Št. testerjev} - 1 \quad \dots (21)$$

$$\begin{aligned} \text{Prostostna stopnja za linije skupaj s testerji} = \text{Prostostna stopnja za linije} \times \\ \text{prostostna stopnja za testerje} \end{aligned} \quad \dots (22)$$

$$\begin{aligned} \text{Prostostna stopnja napake} = \text{Prostostna stopnja za ponovitve} \times \\ \text{prostostna stopnja za obravnavanja} \end{aligned} \quad \dots (23)$$

Po izračunani varianci se izračuna F vrednost za vse parametre razen skupne vsote kvadratov in napako. F vrednost predstavlja količnik med varianco za posamezen parameter (npr. ponovitve, obravnavanja, križanci...) in varianco za napako. Po izračunani F vrednosti lahko ničelno hipotezo, ki pravi, da so aritmetične sredine posameznih skupin oziroma parametrov enake, sprejmemo le, če je izračunana F vrednost manjša od tabelirane vrednosti F porazdelitve pri izbrani stopnji tveganja (Nemec, 2009).

2. Določitev splošne in specifične kombinacijske sposobnosti za testirane linijske sorte in hibridne kombinacije

Ob upoštevanju danega primera (preglednica 4) sta bili splošna in specifična kombinacijska sposobnost za posamezno starševsko komponento oziroma kombinacijo izračunani z naslednjimi enačbami (Warghese in sod., 1976):

$$\begin{aligned} \text{Splošna kombinacijska sposobnost linije 1} = ((X_{11} + X_{21} + X_{31}) / (\text{št. testerjev} \times \\ \text{št. ponovitev})) - (\sum \sum / (\text{št. linij} \times \text{št. testerjev} \times \text{št. ponovitev})) \end{aligned} \quad \dots (24)$$

$$\begin{aligned} \text{Splošna kombinacijska sposobnost testerja 1} = ((X_{11} + X_{12} + X_{13} + X_{14}) / \\ (\text{št. linij} \times \text{št. ponovitev})) - (\sum \sum / (\text{št. linij} \times \text{št. testerjev} \times \\ \text{št. ponovitev})) \end{aligned} \quad \dots (25)$$

$$\begin{aligned} \text{Specifična kombinacijska sposobnost za križanec med linijo 1 in testerjem 5} = \\ (X_{11} / \text{št. ponovitev}) - ((X_{11} + X_{21} + X_{31}) / (\text{št. testerjev} \times \text{št. ponovitev})) - \\ ((X_{11} + X_{12} + X_{13} + X_{14}) / (\text{št. linij} \times \text{št. ponovitev})) + (\sum \sum / (\text{št. linij} \times \\ \text{št. testerjev} \times \text{št. ponovitev})) \end{aligned} \quad \dots (26)$$

3.2.4 Kvantitativna analiza heteroze v skupini heksaploidnih pšenic z genomsko strukturo AABBDD

Poleg testiranja splošne in specifične kombinacijske sposobnosti linijskih sort francoskih žlahtiteljskih hiš in Poljoprivrednog instituta Osijek je bila preverjena tudi raven heteroze, ki jo je možno doseči pri križanju navadne pšenice z navadno pšenico in pri križanju navadne pšenice z njenimi sorodniki, ki imajo podobno genomsko strukturo.

Analiza heteroze, ki jo je možno izkoristiti pri F_1 hibridih, ki temeljijo na križanju navadne pšenice z navadno pšenico ($T. aestivum \times T. aestivum$) je bila opravljena vzporedno z analizo splošne in specifične kombinacijske sposobnosti. Za hibridne kombinacije, ki so temeljile na linijskih sortah francoskih žlahtiteljskih hiš je bila za parametre pridelek zrnja na posamezno rastlino, število zrn na rastlino, število klasov na rastlino in višino rastline določena povprečna starševska heteroza, heterobeltiozis, standardna heteroza in aritmetična sredina obeh starševskih komponent. Pri testiranju splošne in specifične kombinacijske sposobnosti dvanajstih linijskih sort Poljoprivrednog instituta Osijek so bile vrednosti za povprečno starševsko heterozo, heterobeltiozis, standardno heterozo in aritmetično sredino obeh starševskih komponent določene za parametra pridelek zrnja na enoto površine in absolutno maso zrnja. Pri tem je potrebno poudariti, da študija štirinajstih linijskih sort francoskih žlahtiteljskih hiš in dvanajstih linijskih sort Poljoprivrednog instituta Osijek vključuje tudi dva standardna kultivarja (cv. Garcia (vzdrževalec SECOBRA) in cv. Hystar F_1 (vzdrževalec SAATEN-UNION Recherche s.a.s)). S pomočjo standardnih kultivarjev je bilo mogoče oceniti perspektivnost razvoja hibridnih sort navadne pšenice na območju Republike Slovenije in Republike Hrvaške.

Poleg križanj $T. aestivum \times T. aestivum$ je bil v naši študiji preverjen tudi vpliv znotrajvrstnih križanj med navadno pšenico in njenimi ožjimi sorodniki na raven heteroze. V ta namen so bila v sezoni 2010/11 opravljena znotrajvrstna križanja med navadno pšenico in njenimi sorodniki z genomsko strukturo AABBDD. Zaradi zahtevne emaskulacije pri nekaterih sorodnikih navadne pšenice, kot je na primer *Triticum macha* (zbito socvetje, lomljivo klasno vreteno) je bila navadna pšenica vedno uporabljena kot materina komponenta oziroma kot akceptor cvetnega prahu. Od prvotnih 43 F_1 znotrajvrstnih križancev (križanci: $T. aestivum$ subsp. *vulgare* \times $T. aestivum$ subsp. *spelta*, $T. aestivum$ subsp. *vulgare* \times $T. aestivum$ subsp. *compactum*, $T. aestivum$ subsp. *vulgare* \times $T. aestivum$ subsp. *sphaerococcum*, $T. aestivum$ subsp. *vulgare* \times $T. aestivum$ subsp. *petropavlovskyi*, $T. aestivum$ subsp. *vulgare* \times $T. aestivum$ subsp. *macha*, $T. aestivum$ subsp. *vulgare* \times *Triticum aestivum* subsp. *vavilovii*, $T. aestivum$ subsp. *vulgare* \times $T. aestivum$ subsp. *petropavlovskyi*) jih je bilo zaradi hibridne nekroze pri križanju $T. aestivum$ subsp. *vulgare* \times $T. aestivum$ subsp. *petropavlovskyi* v statistično analizo vključenih le 39. Vse starševske komponente in njihovi znotrajvrstni F_1 križanci so zbrani v preglednicah 6 in 7. Znotrajvrstni F_1 križanci so bili skupaj s starševskimi komponentami

testirani v poskusu po metodi slučajnega bloka s tremi ponovitvami na Selekcjsko-poskusnem centru Ptuj (sezona 2011/12). V posamezni ponovitvi so bili za tri naključno izbrane rastline zbrani podatki o številu klasov na rastlino, višini rastline in skupnem pridelku zrnja na rastlino.

Preglednica 6: Sorodniki navadne pšenice, ki so bili vključeni v znotrajvrstna križanja
Table 6: Relatives of common wheat which are involved in the intra-specific crosses

Ime akcesije in številka	Podvrsta	Izvor
Epeautre Nain (01C0106129)	<i>Triticum spelta</i>	PPRC
Schwabenspelz (01C0106267)	<i>Triticum spelta</i>	PPRC
Steiners tiroler dinkel (01C0100730)	<i>Triticum spelta</i>	PPRC
Ostar (01C0106321)	<i>Triticum spelta</i>	PPRC
Zeiners weisser dinkel (01C0100744)	<i>Triticum spelta</i>	PPRC
Rouquin (01C0104432)	<i>Triticum spelta</i>	PPRC
Desyanthum-Tabor (01C0106105)	<i>Triticum spelta</i>	PPRC
Blauer kolbendinkel (01C0100922)	<i>Triticum spelta</i>	PPRC
Tmava (01C0100921)	<i>Triticum spelta</i>	PPRC
Gentile-Tabor (01C0106107)	<i>Triticum spelta</i>	PPRC
Redoute (01C0105692)	<i>Triticum spelta</i>	PPRC
Baettig-Niederwill (01C0105446)	<i>Triticum spelta</i>	PPRC
Harrisson barbee (01C0200657)	<i>Triticum compactum</i>	PPRC
Tiroler frueher binkel (01C0201147)	<i>Triticum compactum</i>	PPRC
Blauroter binkel (01C0105447)	<i>Triticum compactum</i>	PPRC
Little club (01C0201011)	<i>Triticum compactum</i>	PPRC
Shloucena (01C0200978)	<i>Triticum compactum</i>	PPRC
T. sphaerococcum (01C0201227)	<i>Triticum sphaerococcum</i>	PPRC
Ruzyne (01C0200979)	<i>Triticum sphaerococcum</i>	PPRC
Kolandi (01C0201097)	<i>Triticum sphaerococcum</i>	PPRC
Triticum petropavlov. (01C0204140)	<i>Triticum petropavlovskiyi</i>	PPRC
T. macha (01C0101087)	<i>Triticum macha</i>	PPRC
T. macha (01C0105518)	<i>Triticum macha</i>	PPRC
T. vavilovii (01C0105083)	<i>Triticum vavilovii</i>	PPRC

PPRC – Plant Production Research Center, Bratislavská cesta 122, 921 68 Piešťany, Slovakia

Preglednica 7: Seznam znotrajvrstnih F_1 križancev
Table 7: The list of intra-specific F_1 hybrids

Znotrajvrstni F_1 križanci
$C_T 19 \times KM\ 93\text{-}2000$, $C_T 19 \times Epeautre\ Nain$, $C_T 19 \times Schwabenspelz$, $C_T 6 \times Steiners\ tiroler\ dinkel$, $C_T 6 \times Epeautre\ Nain$, $C_T 6 \times Ostar$, $C_T 6 \times Zeiners\ weisser\ dinkel$, $C_T 16 \times Rouquin$, $C_T 16 \times Desyanthum\text{-}Tabor$, $C_T 16 \times Blauer\ kolbendinkel$, $C_T 15 \times Tmava$, $C_T 15 \times Gentile\text{-}tabor$, $C_T 15 \times Redoute$, $C_T 15 \times Rouquin$, $C_T 3 \times Baettig\text{-}Niederwill$, $C_T 3 \times Ostar$, $C_T 19 \times Harrisson\ barbee$, $C_T 19 \times Tiroler\ frueher\ binkel$, $C_T 1 \times Blauroter\ binkel$, $C_T 1 \times Little\ club$, $C_T 1 \times Harrisson\ barbee$, $C_T 6 \times Tiroler\ frueher\ binkel$, $C_T 6 \times Blauroter\ binkel$, $C_T 16 \times Shloucena$, $C_T 15 \times Blauroter\ binkel$, $C_T 15 \times Harrisson\ barbee$, $C_T 3 \times Tiroler\ frueher\ binkel$, $C_T 19 \times T. sphaerococcum$ (acc. num. (01C0201227), $C_T 19 \times Ruzyne$, $C_T 6 \times T. sphaerococcum$ (acc. num. (01C0201227), $C_T 6 \times Ruzyne$, $C_T 3 \times Kolandi$, $C_T 3 \times Ruzyne$, $C_T 1 \times T. macha$ (acc. num. 01C0101087), $C_T 16 \times T. macha$ (acc. num. 01C0101087), $C_T 15 \times T. macha$ (acc. num. 01C0101087), $C_T 15 \times T. macha$ (acc. num. 01C0105518), $C_T 1 \times T. vavilovii$, $C_T 6 \times T. vavilovii$, $C_T 19 \times Triticum\ petropavlovskyi$, $C_T 1 \times Triticum\ petropavlovskyi$, $C_T 16 \times Triticum\ petropavlovskyi$, $C_T 3 \times Triticum\ petropavlovskyi$

Učinek heteroze je bil za posamezni parameter izračunan s splošno uveljavljenimi enačbami za računanje učinka heteroze (Borojević, 1992).

$$MPH \text{ (povprečna starševska heteroza)} = F_1 / (MP / 100) - 100 \quad \dots (27)$$

$$BPH \text{ (heterobeltiozis)} = F_1 / (BP / 100) - 100 \quad \dots (28)$$

$$SH \text{ (standardna heteroza)} = F_1 / (S / 100) - 100 \quad \dots (29)$$

MPH – heteroza glede na povprečje obeh staršev,

BPH – heteroza glede na produktivnejšega starša,

SH – heteroza glede na standarden kultivar,

MP – upoštevana je vrednost za povprečje obeh starševskih komponent,

BP – upoštevana je vrednost za produktivnejšo starševsko komponento,

S – upoštevana je vrednost za standardni kultivar.

Na osnovi izvedenih križanj predložena doktorska disertacija posega tudi na področje komercialnega izkoriščanja heteroze pri navadni pšenici in s tem predstavlja pomemben prispevek k sodobnemu žlahtnjenuju navadne pšenice v širši regiji.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 VPLIV DERIVATOV OKSANILNE KISLINE NA INDUKCIJO MOŠKE STERILNOSTI PRI NAVADNI PŠENICI

4.1.1 Sinteza derivatov oksanilne kisline in njihova modifikacija v vodotopno stanje ter priprava škropilne suspenzije za aplikacijo na polju

Osnovo naše študije predstavljajo trije estri oksanilne kisline (etil 4-bromooksanilat, etil 4-cianooksanilat, etil 4-fluoroooksanilat), ki so bili modificirani v vodotopno stanje v obliki kislin in soli (slika 9). Navedene etil estre smo prvotno poskušali sintetizirati po klasičnem postopku z dodatkom odgovarjajočega substituiranega anilina (4-bromoanilin, 4-cianoanilin, 4-fluoroanilin) in dietilosalata v vrelo tekočino toluena. Rezultat sinteze so bili vsi trije ciljni etil estri s primesmi diestrov kot posledica nadaljne esterifikacije. V reakciji nastali diestri so slabo topni in jih je možno odstraniti le z zahtevnim postopkom kristalizacije, ki pa bistveno ne vpliva na izboljšanje izplena ciljnega produkta – etil estra. Zaradi nastajanja diestrov, ki so nezaželeni stranski produkt, je bila prvotna reakcija še enkrat izvedena z dodatkom borove kisline kot katalizatorja pri reducirani reakcijski temperaturi in skrajšanjem reakcijskem času. Modifikacija prvotne reakcije je privedla do težav z ravnotežjem med konverzijo reaktantov in selektivnostjo reakcije. V našem prizadevanju pridobiti čisti produkt brez primesi diestrov smo prešli na reakcijo, ki je vodena v pogojih brez uporabe organskih topil. Na ta način je bila izvedena sinteza prvega ciljnega estra (etil 4-bromooksanilat), tako da je bilo pri 100 °C k 4-bromoanilinu dodanih pet ekvivalentov dietilosalata. Precipitat (oborina) etil 4-bromooksanilata se je začel tvoriti po dvanajstih urah, ko smo začeli pod znižanim pritiskom odstranjevati presežek 4-bromoanilina. Suspenzija je bila nato ohlajena na sobno temperaturo in trden produkt je bil odfiltriran. Po izpiranju trdnega produkta s heksanom in sušenju je bil pridobljen čisti etil 4-bromooksanilat, ki ni zahteval nadaljne purifikacije. Pri nadaljnem delu je bila optimizirana selektivnost reakcije, tako da je bil izplen ciljnega produkta maksimiziran. Po enakem postopku, vendar z dodatkom 4-fluoroanilina, je bila izvedena tudi sinteza etil 4-fluoroooksanilata. Zaradi neaktivnosti 4-cianoanilina je bil pri sintezi etil 4-cianooksanilata potreben dodatek monoestra oksalil klorida. Poleg tega je bilo pri sintezi etil 4-cianooksanilata selektivnost reakcije možno zagotoviti le z dodatkom organskega topila – EtOAc (etil acetat).

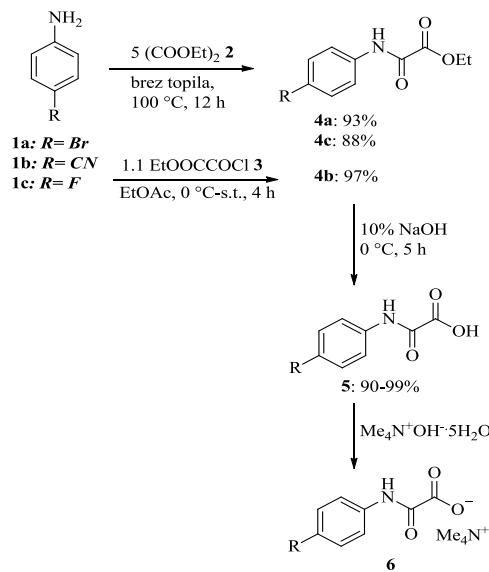
Po končani sintezi izbranih etilnih estrov je sledila njihova modifikacija v vodotopno stanje v obliki kislin in soli. Modifikacija netopnih etilnih estrov v vodotopno stanje ima predvsem dva pozitivna vpliva:

- zmanjšanje uporabe okolju škodljivih organskih topil pri sintezi in aplikaciji na polju,
- izboljšanje topnosti v vodi omogoča aplikacijo aktivne snovi v visokih koncentracijah, kar zviša učinkovitost v poljskih razmerah.

Modifikacija etilnih estrov v vodotopno stanje v obliki kislin je bila dosežena s hidrolizo z 10 % raztopino NaOH pri 0 °C. Predhodno so bili etilni estri zmleti v prah in navlaženi z manjšo količino MeCN (acetonitril). Po končani selektivni reakciji v okolju brez uporabe organskih topil, nevtralizaciji in filtraciji so bile izolirane čiste kisline (4-bromooksanilna kislina, 4-cianooksanilna kislina, 4-fluorooksanilna kislina).

Sinteza soli oksanilne kisline, drugo obliko vodotopnega stanja derivatov oksanilne kisline, ki je bila vključena v našo raziskavo, je temeljila na povezavi med tetrametilamonijevim kationom in oksalatnim anionom. To pomeni, da so bile tetrametilamonijeve soli oksanilne kisline pripravljene z nevtralizacijsko reakcijo med odgovarjajočo kislino in tetrametilamonijevim hidroksidom kot bazo (npr. 4-bromooksanilna kislina + tetrametilamonijev hidroksid → tetrametilamonijev 4-bromooksanilat).

Po končani sintezi sta bila delež nezaželenjenih stranskih produktov in molekularna struktura vseh sintetiziranih aktivnih snovi (etilni estri, kisline, soli) preverjena z uporabo nuklearne magnetne resonance in masne spektrometrije.



Slika 9: Sinteza derivatov oksanilne kisline
Figure 9: Synthesis of derivatives of oxanilic acid

Pred aplikacijo na polju so bile vse testirane aktivne snovi pripravljene v obliki 0,1 % emulzije. Pri pripravi stabilne emulzije iz estrov uporaba emulgatorja ni dala zadovoljivih rezultatov, ker se je ester že čez nekaj časa v obliki usedline nabral na dnu posode. Na koncu se je kot najboljša rešitev izkazala priprava raztopine estra v zmesi dimetilsulfoksida (DMSO) kot organskega topila in UD-50 kot neionskega surfaktanta. Zaradi nestabilnosti je bilo potrebno emulzije z estri pripraviti tik pred aplikacijo oziroma jo hraniti na -5 °C, če je bila pripravljena več kot en dan pred aplikacijo. V primeru kislin se je emulzija tvorila že z dodatkom neionskega surfaktanta Spartan (alkilamin etoksilat propoksilat). 4-fluorooksanilna kislina je bila v vodi topna celo brez dodatka neionskega surfaktanta vendar je bil naveden pripravek zaradi primerljivosti rezultatov vseeno dodan. Pri aplikaciji na polju se je kot negativna lastnost izkazala visoka viskoznost pripravka Spartan, ki je zelo otežila pripravo emulzije. Tetrametilamonijeve soli so bile v vodi neposredno topne brez dodatka emulgatorja oziroma neionskega surfaktanta. Zaradi neposredne topnosti v vodi so se tetrametilamonijeve soli uporabljale kot koncentrati (raztopine z destilirano vodo), iz katerih se je emulzijo pripravilo tik pred aplikacijo na polju.

4.1.2 Učinkovitost sintetiziranih derivatov oksanilne kisline v primerjavi s komercialnim sredstvom za kemično hibridizacijo CROISOR® 100

Rezultati preizkušanja devetih derivatov oksanilne kisline v primerjavi s komercialnim sredstvom za kemično hibridizacijo CROISOR® 100 so pokazali, da se škropilne suspenzije oziroma emulzije pripravljene na osnovi derivatov oksanilne kisline (etil estri, kisline in soli) med sabo statistično značilno razlikujejo (preglednica 8). V predhodni študiji Chakrabortyja in Devakumarja (2006a) se je izkazalo, da etilni estri oksanilne kisline ali oksanilati v fenofazi, ko je pri navadni pšenici socvetje na glavnem poganjku dolgo od 6 do 9 mm inducirajo visok odstotek moške sterilnosti (> 98 %). V navedeni študiji je po svoji učinkovitosti izstopal etil 4-fluorooksanilat, ki je presegel 98 % moške sterilnosti, sledila sta mu etil 4-bromooksanilat in etil 4-cianooksanilat. Navedeni etilni estri so bili zajeti tudi v naši študiji in glede na inducirani odstotek moške sterilnosti pri navadni pšenici (cv. Guarni, vzdrževalec Florimond Desprez) so se razvrstili v enakem vrstnem redu ($F > Br > CN$). Pomembna razlika v primerjavi s predhodno študijo je bila, da so izbrani etilni estri dosegli najvišjo učinkovitost, ko je bilo socvetje na glavnem poganjku daljše od 9 mm.

Razmerje $F > Br > CN$ se je pri preizkušanju emulzij pripravljenih na osnovi kislinskih analogov izbranih etilnih estrov (4-bromooksanilna kislina, 4-cianooksanilna kislina, 4-fluorooksanilna kislina) spremenilo. Modifikacija etil 4-bromooksanilata v njegov kislinski analog (4-bromooksanilna kislina) je rezultirala z oblikovanjem emulzije, ki je v poljskem preizkušanju dosegla statistično značilno najvišji odstotek moške sterilnosti med vsemi preizkušanimi škropilnimi suspenzijami.

Škropilne suspenzije pripravljene na osnovi tetrametilamonijevih soli so v naši študiji dosegle statistično značilno najnižjo učinkovitost (preglednica 8). Neposreden vpliv modifikacije izbranih etilnih estrov v vodotopno stanje v obliki kislin in soli statistično ni možno ovrednotiti, ker so med navedenimi skupinami (estri, kisline, soli) bili za pripravo škropilnih emulzij izbrani različni neionski surfaktanti oziroma postopki za njihovo pripravo.

Na učinkovitost sredstva za kemično hibridizacijo vplivajo vremenski pogoji med aplikacijo aktivne snovi in fiziološko stanje tretiranih rastlin (Wong in sod., 1995). Vremenski pogoji v času aplikacije derivatov oksanilne kisline in standardnega sredstva za kemično hibridizacijo so se razlikovali med sezonomi in lokacijami. V sezoni 2009/10 je temperatura zraka med prvim in tretjim tretiranjem znašala od 10,2 °C do 21,1 °C, v sezoni 2010/11 pa od 9,6 °C do 13,8 °C. V obeh sezona je minimalna relativna zračna vlaga presegla 50 % pri čemer so bile višje vrednosti dosežene v sezoni 2010/11 (2009/10 – 58 %, 2010/11 – 88,6 %). Matrični potencial vode v tleh, parameter, ki neposredno vpliva na fiziološko stanje tretiranih rastlin je v sezoni 2009/10 v obdobju aplikacije testiranih aktivnih snovi znašal med 62 in 71 kPa (1,79–1,85 pF), v naslednji sezoni pa med 23 in 30 kPa (1,36–1,47 pF). Vsi opazovani parametri imajo neposreden vpliv na absorbcoj aktivne snovi in njeni translokaciji do mesta delovanja (floralni apeks). Študija Bucholtza (1988), ki je temeljila na sredstvu za kemično hibridizacijo HYBREX® (1-(p-klorofenil)-1,4-dihidro-6-metil-4-oksopiridazin-3-karboksilat) je pokazala, da ima največji vpliv na absorbcoj in translokacijo aktivne snovi do floralnega apeksa navadne pšenice temperatura zraka. Z znižanjem zračne temperature iz 24 °C na 4 °C se je v odvisnosti od surfaktanta in relativne zračne vlage absorbcoj aktivne snovi znižala tudi za več kot 300 %. V naši študiji se je tudi izkazalo, da ima med vsemi opazovanimi parametri na indukcijo moške sterilnosti pri navadni pšenici največji vpliv temperatura zraka. Kljub višjemu matričnemu potencialu vode v tleh in višji relativni zračni vlagi v sezoni 2010/11 je bil v sezoni 2009/10 namreč dosežen statistično značilno višji odstotek moške sterilnosti (preglednica 8).

Odločilen vpliv na absorbcoj aktivne snovi ima tudi potencialna absorbcijska površina, ki predstavlja površino listnih rež na adaksialni in abaksialni listni strani (Herbicide ..., 2012). Skupna površina listnih rež je odvisna od koncentracije atmosferskega CO₂ (Driscoll in sod., 2005). V primeru, da upoštevamo še pozitivno povezavo med indeksom listne površine (LAI) in dodano količino vode pridemo do zaključka, da vpliva na absorbcoj in translokacijo aktivne snovi do mesta delovanja (floralni apex) tudi fiziološko stanje rastline pred tretiranjem (Lein, 2012). Pri preizkušanju učinkovitosti devetih derivatov oksanilne kisline in komercialnega sredstva za kemično hibridizacijo je bila potencialna absorbcijska površina tretiranih rastlin ocenjena na osnovi količine padavin od datuma, ko je povprečna dnevna temperatura presegla 5 °C do 1. tretiranja, indeksa listne površine in matričnega potenciala vode v tleh.

Večja količina padavin v obdobju, ko je povprečna dnevna temperatura presegla 5 °C do 1. tretiranja je bila v obeh letih dosežena v osrednji regiji (osrednja regija 2010: 97,6 mm; severovzhodna regija 2010: 70,5 mm; osrednja regija 2011: 110,5 mm; severovzhodna regija 2011: 52 mm). Kljub višji količini padavin v osrednji regiji je bil matrični potencial vode v tleh v primerjavi s severovzhodno regijo tu vedno nižji zaradi luhkih tal (severovzhodna regija – rjava tla; osrednja regija – rjava, plitva, prodnata tla). Podobno kot matrični potencial vode v tleh so bile tudi vrednosti za indeks listne površine vedno višje v severovzhodni regiji (severovzhodna regija: 1. tretiranje – LAI 2,55, 3. tretiranje – LAI 2,80; osrednja regija: 1. tretiranje – LAI 2,10, 3. tretiranje – LAI 2,55). Na osnovi višjega matričnega potenciala vode v tleh in višjih vrednosti indeksa listne površine v severovzhodni regiji ocenujemo, da je v navedeni regiji obstajal v času aplikacije testiranih aktivnih snovi višji absorpcijski potencial za aktivno snov v primerjavi z osrednjo regijo. Preglednica 8 potrjuje pozitivni vpliv višjega absorpcijskega potenciala na učinek aktivne snovi, ker je bil višji odstotek moške sterilnosti dosežen v severovzhodni regiji.

Preglednica 8: Vpliv derivatov oksanilne kisline in standardnega sredstva za kemično hibridizacijo na moško sterilnost, višino rastline in število klaskov

Table 8: The impact of derivatives of oxanilic acid and standard CHA on the male sterility, plant height and spikelet number

	Moška sterilnost [%]	Višina rastline [cm]	Število klaskov [n]
Sezona (S)	**	**	**
Lokacija (L)	**	**	**
Aktivna snov (AS)	**	**	**
Fenofaza (F)	**	**	**
Poraba aktivne snovi (D)	**	**	**
Statistično značilne interakcije	S × L **, S × AS **, L × AS **, L × F **, L × D **, AS × F **, AS × D **, D **, AS × F **, AS × D **, F × D **, L × AS × F **, AS × F **, L × AS × D **, AS × F × D **, L × F × D **, AS × F × D **, AS × F × D **, L × AS × F × D **, AS × F × D **	S × L **, L × AS **, L × F **, L × D **, AS × F **, AS × D **, F × D **, L × AS × F **, L × AS × D **, L × F × D **, AS × F × D **, AS × F × D **, L × AS × F × D **	L × AS **, L × F **, AS × F **, AS × D **, F × D **, L × AS × F **, F **, L × AS × D **, L × F × D **, AS × F × D **, AS × F × D **, L × AS × F × D **
Sezona			
2009/10	64,53 ± 0,3290 ^a	64,45 ± 0,1147 ^a	17,64 ± 0,0298 ^a
2010/11	56,92 ± 0,3290 ^b	59,95 ± 0,1147 ^b	16,64 ± 0,0298 ^b
Lokacija			
Severovzhodna regija	66,07 ± 0,3290 ^a	61,18 ± 0,1147 ^b	16,38 ± 0,0298 ^b
Osrednja regija	55,38 ± 0,3290 ^b	63,22 ± 0,1147 ^a	17,91 ± 0,0298 ^a
Aktivna snov			
etil 4-bromooksanilat	71,71 ± 0,7358 ^d	60,12 ± 0,2565 ^f	17,80 ± 0,0666 ^a
etil 4-cianooksanilat	42,00 ± 0,7358 ^{fg}	66,25 ± 0,2565 ^b	17,76 ± 0,0666 ^a
etil 4-fluoroooksanilat	75,00 ± 0,7358 ^c	61,69 ± 0,2565 ^e	17,78 ± 0,0666 ^a
4-bromooksanilna kislina	80,58 ± 0,7358 ^b	57,63 ± 0,2565 ^g	16,79 ± 0,0666 ^d
4-cianooksanilna kislina	46,67 ± 0,7358 ^e	68,36 ± 0,2565 ^a	17,32 ± 0,0666 ^b
4-fluoroooksanilna kislina	69,96 ± 0,7358 ^d	62,48 ± 0,2565 ^d	17,02 ± 0,0666 ^c
tetrametilamonijev 4-bromooksanilat	43,31 ± 0,7358 ^f	64,27 ± 0,2565 ^c	16,82 ± 0,0666 ^{cd}
tetrametilamonijev 4-cianooksanilat	40,45 ± 0,7358 ^g	68,78 ± 0,2565 ^a	17,02 ± 0,0666 ^c
tetrametilamonijev 4-fluoroooksanilat	41,11 ± 0,7358 ^g	68,08 ± 0,2565 ^a	17,68 ± 0,0666 ^a
CROISOR® 100	96,46 ± 0,7358 ^a	44,33 ± 0,2565 ^h	15,45 ± 0,0666 ^e
Fenofaza			
F1	55,42 ± 0,4030 ^c	63,38 ± 0,1405 ^a	17,25 ± 0,0365 ^a
F2	60,84 ± 0,4030 ^b	62,07 ± 0,1405 ^b	17,05 ± 0,0365 ^b
F3	65,91 ± 0,4030 ^a	61,15 ± 0,1405 ^c	17,13 ± 0,0365 ^{ab}
Poraba aktivne snovi			
D1	55,27 ± 0,5203 ^e	66,09 ± 0,1814 ^a	17,35 ± 0,0471 ^a
D2	58,46 ± 0,5203 ^d	63,10 ± 0,1814 ^b	17,29 ± 0,0471 ^{ab}
D3	61,39 ± 0,5203 ^c	61,67 ± 0,1814 ^c	17,13 ± 0,0471 ^c
D4	63,39 ± 0,5203 ^b	60,81 ± 0,1814 ^d	17,18 ± 0,0471 ^{bc}
D5	65,12 ± 0,5203 ^a	59,33 ± 0,1814 ^e	16,77 ± 0,0471 ^d

^{ns} ni statistično značilnih razlik pri $p \geq 0,05$, ^{*} statistična značilnost definirana pri $p < 0,05$ in ^{**} pri $p \leq 0,01$

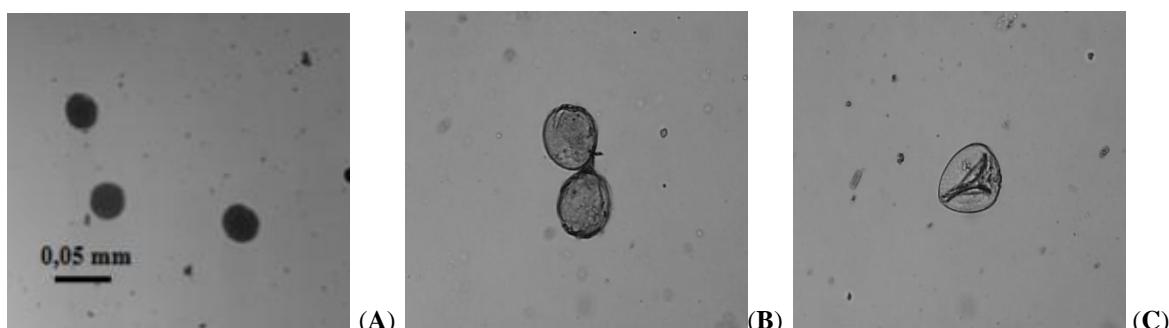
± standardna napaka

^{abc}aritmetične sredine označene z enakimi črkami se statistično značilno ne razlikujejo pri 95 % stopnji zaupanja (Duncan-ov test)

V generaciji sredstev za kemično hibridizacijo, ki inhibirajo mikrosporogenezo je visoko komercialno vrednost dosegla aktivna snov sintofen v uporabi kot pripravek CROISOR® 100 (Chakraborty in Devakumar, 2006a). Za delovanje substituiranih kinolinov je

značilno, da imajo pelodna zrna tretiranih rastlin nagubano površino in degenerirano citoplazmo (Wong in sod., 1995). Podobno morfologijo imajo tudi pelodna zrna tretiranih rastlin z etiloksanilati (slika 10). Zaradi široke uporabe sredstva CROISOR® 100 pri pridelavi hibridnega semena navadne pšenice, je bilo navedeno sredstvo vključeno tudi v našo študijo. Poleg tega aktivna snov sintofen in testirani derivati oksanilne kisline inducirajo moško sterilnost na podoben način (inhibicija mikrosporogeneze), kar omogoča neposredno primerjavo med vsemi testiranimi aktivnimi snovmi.

Pri preizkušanju devetih derivatov oksanilne kisline in standardnega sredstva za kemično hibridizacijo se je izkazalo, da sredstvo CROISOR® 100 v primerjavi z ostalimi aktivnimi snovmi izraža izrazito fitotoksičnost. Že pri priporočeni fenofazi za aplikacijo navedenega sredstva, ko znaša dolžina klasa na glavnem poganjku 14–18 mm, priporočeni porabi aktivne snovi 1400 g ha^{-1} in ob upoštevanju priporočenih pogojev za aplikacijo (minimalna temperatura zraka 10°C , minimalna relativna zračna vlaga 50 %) je redukcija višine tretiranih rastlin v primerjavi s kontrolo znašala več kot 30 %. Pri kemični hibridizaciji vetrocvetnih hermafroditnih rastlinskih vrst, kot je to na primer navadna pšenica je redukcija višine materine komponente sicer zaželjena, ker omogoča boljšo oprasitev sredine pasov pri pridelavi hibridnega semena, vendar je pa hkrati povezana z negativnim vplivom na žensko fertilnost tretiranih rastlin (Wong in sod., 1995).

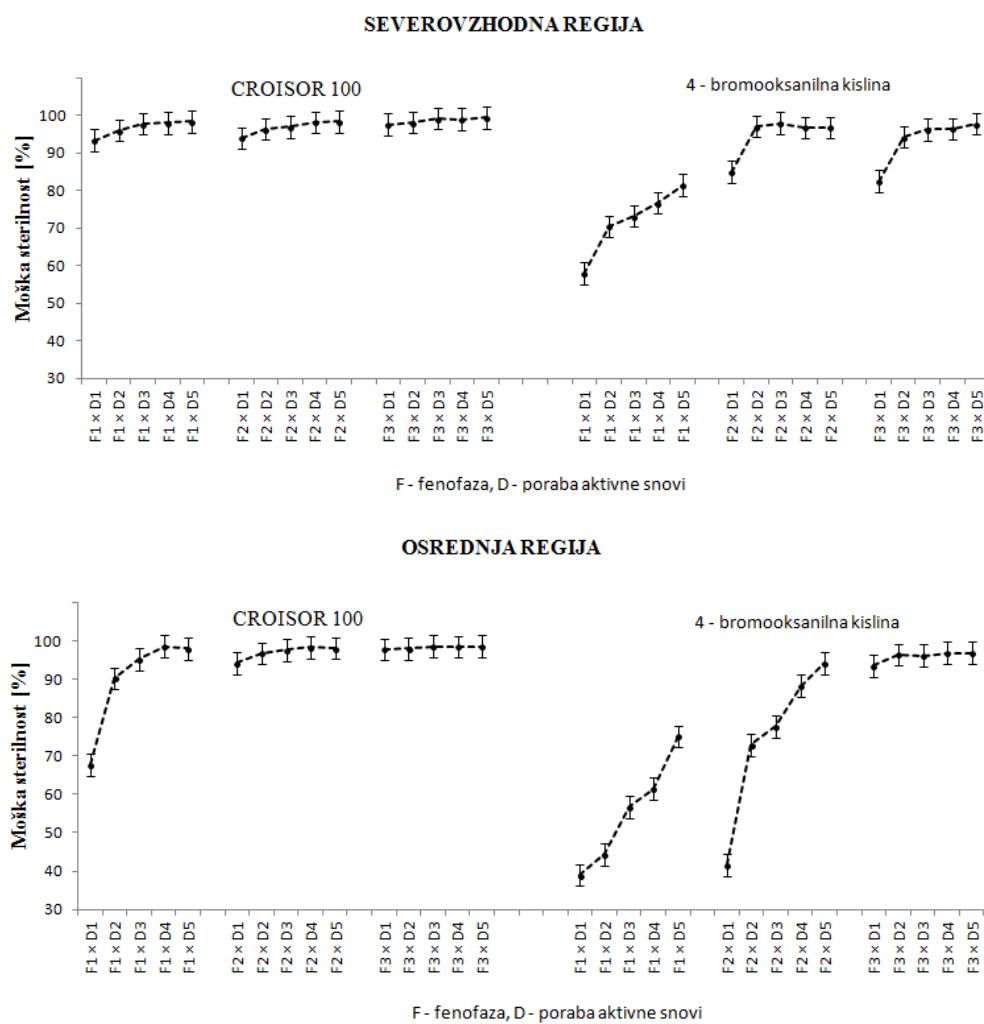


Slika 10: Pelodna zrna navadne pšenice (*Triticum aestivum*) obarvana z acetokarminom (1 % raztopina) pri 100 kratni povečavi: (A) fertilna pelodna zrna z normalno razvito citoplazmo netretiranih rastlin (kontrola); (B) sterilna pelodna zrna rastlin, ki so bila tretirana z 4-bromooksanilno kislino; (C) sterilna pelodna zrna rastlin, ki so bila tretirana s komercialnim sredstvom za kemično hibridizacijo – CROISOR® 100

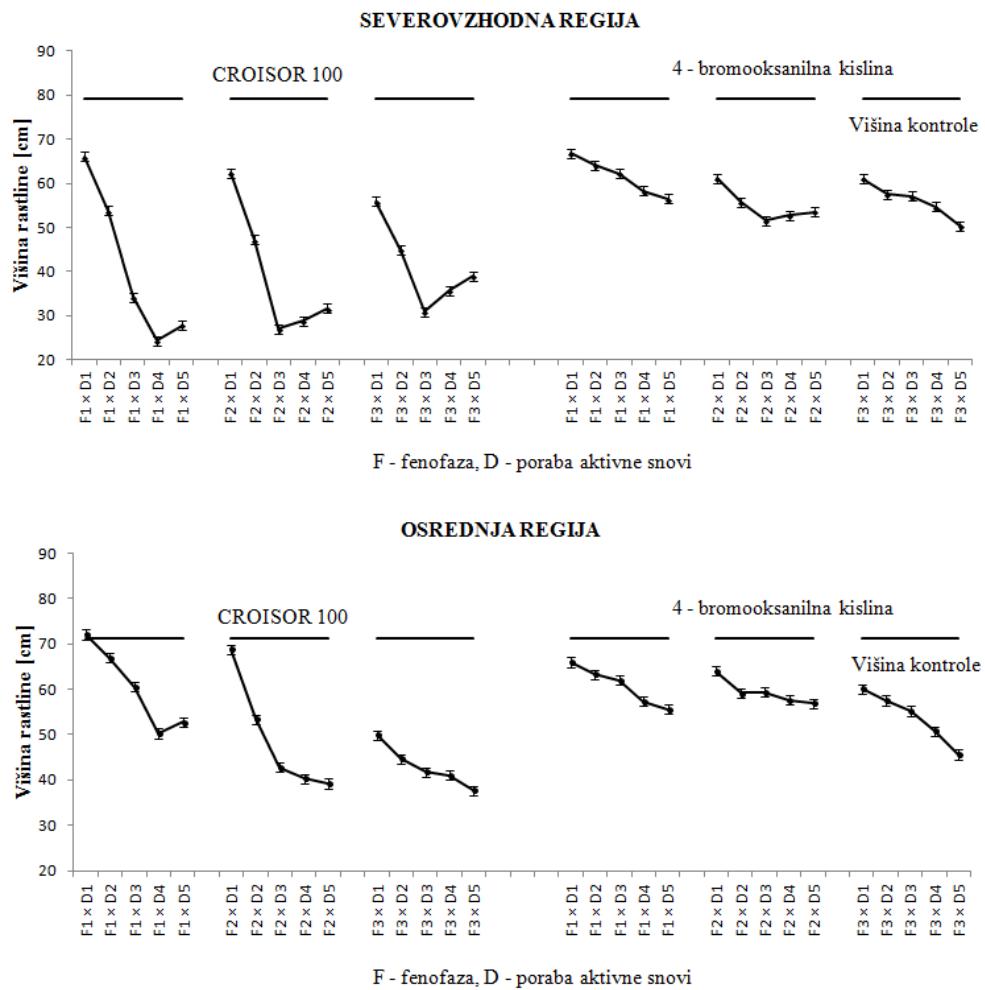
Figure 10: Pollen grains of common wheat (*Triticum aestivum*) due to treatment with acetocarmine staining solution (1 %) at the 100 fold magnification: (A) fertile pollen grains with fully developed cytoplasm of untreated plants (control); (B) sterile pollen grains of plants treated with 4-bromooxanilic acid; (C) sterile pollen grains of plants treated with chemical hybridizing agent – CROISOR® 100

Iz slike 11 je razvidno, da se pri tretji porabi aktivne snovi (2100 g ha^{-1}) in v tretji fenofazi, ko je dolžina klasa na glavnem poganjku znašala 15 mm, učinkovitost 4-bromooksanilne kisline in komercialnega sredstva za kemično hibridizacijo v smislu indukcije moške

sterilnosti pri navadni pšenici statistično značilno ne razlikuje. Iz rezultatov je tudi razvidno, da učinkovitost 4-bromooksanilne kisline v smislu indukcije moške sterilnosti pri navadni pšenici z daljšanjem klasa na glavnem poganjku narašča hitreje v primerjavi s standardom. Kljub temu, da je aktivna snov sintofen doseglja visok odstotek moške sterilnosti ($> 98\%$) že pri prvem tretiranju, lahko na osnovi vpliva interakcije lokacija \times aktivna snov \times fenofaza \times doza na moško sterilnost in višino rastline (slika 11 in slika 12) trdimo, da je 4-bromooksanilna kislina doseglja ugodnejše razmerje med učinkovitostjo in fitotoksičnostjo kakor sredstvo CROISOR® 100.



Slika 11: Vpliv interakcije lokacija \times aktivna snov \times fenofaza \times poraba aktivne snovi na moško sterilnost
Figure 11: The impact of interaction location \times active substance \times phenophase \times dose on induction of male sterility



Slika 12: Vpliv interakcije lokacija × aktivna snov × fenofaza × poraba aktivne snovi na višino rastline

Figure 12: The impact of interaction location × active substance × phenophase × dose on the plant height

Analiza rezultatov kaže tudi, da obstaja med odstotkom moške sterilnosti in višino rastline negativna korelacija ($r_{xy} = -0,61$), kar pomeni, da se z višanjem odstotka moške sterilnosti znižuje višina rastline. "Moteč" vpliv na navedeno korelacijo je imela konstantna koncentracija delovne suspenzije oz. emulzije (0,1 %), zaradi česar je pri najvišjih porabah aktivne snovi prihajalo do učinka izpiranja.

4.1.3 Selektivnost in fitotoksičnost 4-bromooksanilne kisline v primerjavi s komercialnim sredstvom za kemično hibridizacijo CROISOR® 100

Preizkušanje 4-bromooksanilne kisline, derivata oksanilne kisline, ki je v sezoni 2009/10 dosegel statistično značilno najvišji odstotek moške sterilnosti in komercialnega sredstva za kemično hibridizacijo CROISOR® 100 na šestih različnih genotipih je pokazalo, da substituiran kinolin sintofen dosega nizko selektivnost v smislu indukcije moške sterilnosti pri navadni pšenici. V primerjavi s 4-bromooksanilno kislino je aktivna snov sintofen pri šestih različnih genotipih dosegla statistično značilno višji odstotek moške sterilnosti vendar je iz preglednice 9 hkrati razviden izrazit negativen vpliv na višino tretiranih rastlin in število klaskov. Ob upoštevanju, da je bil pri obeh aktivnih snoveh uporabljen enak neionski surfaktant (Spartan) in da se pri pridelavi hibridnega semena navadne pšenice uporablja višja koncentracija pripravka CROISOR® 100 od 0,1 % (približno 0,44 %) lahko predvidevamo, da aktivna snov sintofen pod običajnimi pogoji uporabe dosega še nižjo selektivnost kot pri izvedenem poljskem poskusu.

Preglednica 9: Selektivnost 4-bromooksanilne kisline in komercialnega sredstva za kemično hibridizacijo
Table 9: Selectivity of 4-bromooxanilic acid and commercial chemical hybridizing agent

	Moška sterilnost [%]	Višina rastline [cm]	Število klaskov [n]
Aktivna snov (AS)	**	**	**
Fenofaza (F)	**	**	**
Genotip (G)	**	**	**
Statistično značilne interakcije	AS × F**, AS × G**, F × G**, AS × F × G**	AS × F**, AS × G**, F × G**	AS × F*, F × G**, AS × F × G**
Aktivna snov			
4-bromooksanilna kislina	80,53 ± 0,4274 ^b	77,98 ± 0,2167 ^a	17,05 ± 0,0929 ^a
Standard	88,99 ± 0,4274 ^a	69,75 ± 0,2167 ^b	15,18 ± 0,0929 ^b
Fenofaza			
F1	79,54 ± 0,4274 ^b	75,34 ± 0,2167 ^a	16,28 ± 0,0929 ^a
F2	89,98 ± 0,4274 ^a	72,39 ± 0,2167 ^b	15,94 ± 0,0929 ^b
Genotip			
Ficko - C _T 35	62,15 ± 0,7404 ^d	72,65 ± 0,3753 ^d	15,55 ± 0,1608 ^b
Guarni - C _T 3	94,30 ± 0,7404 ^a	69,35 ± 0,3753 ^e	15,70 ± 0,1608 ^b
Sana - C _T 11	88,20 ± 0,7404 ^b	77,60 ± 0,3753 ^b	17,05 ± 0,1608 ^a
Inoui - C _T 6	89,10 ± 0,7404 ^b	69,30 ± 0,3753 ^e	15,75 ± 0,1608 ^b
Marija - C _T 37	90,58 ± 0,7404 ^b	80,08 ± 0,3753 ^a	17,05 ± 0,1608 ^a
Bologna - C _T 16	84,23 ± 0,7404 ^c	74,23 ± 0,3753 ^c	15,58 ± 0,1608 ^b

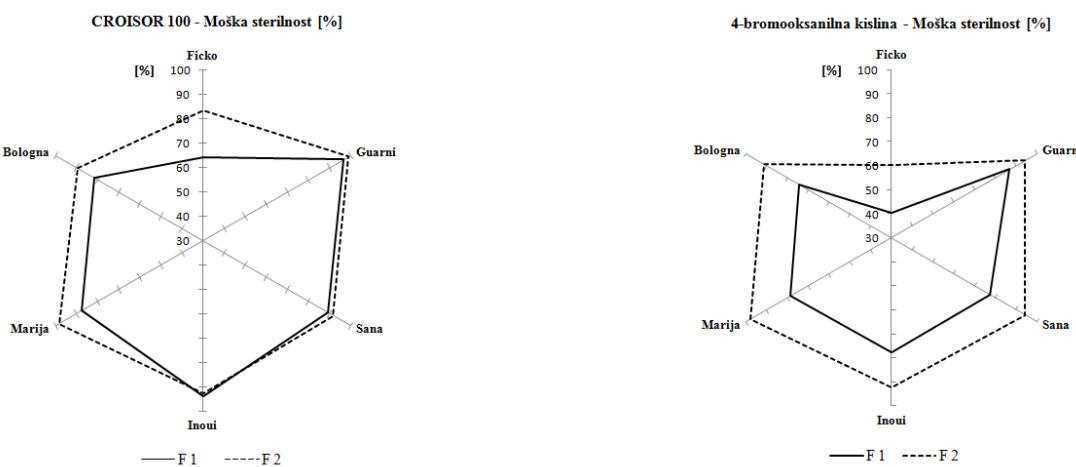
^{ns} ni statistično značilnih razlik pri $p \geq 0,05$, ^{*} statistična značilnost definirana pri $p < 0,05$ in ^{**} pri $p \leq 0,01$
± standardna napaka

^{abc}aritmetične sredine označene z enakimi črkami se statistično značilno ne razlikujejo pri 95 % stopnji zaupanja (Duncan-ov test)

Razvoj sodobnih sredstev za kemično hibridizacijo se nadaljuje predvsem v smeri doseganja selektivnejšega delovanja, ki v povezavi z odpornostjo na herbicid (npr.

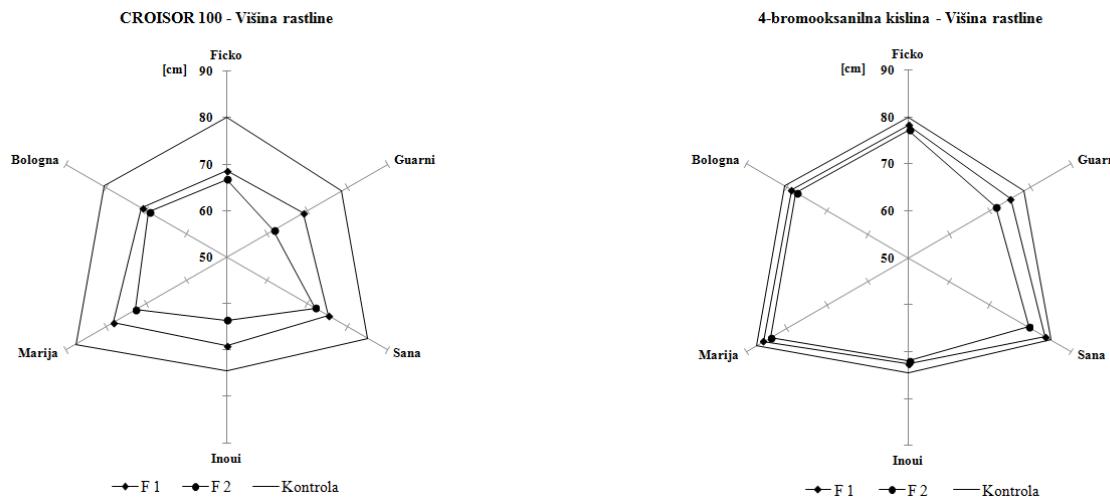
fosfinometil-glicin, imidazolinoni, sulfonilsečnine) pri pridelavi hibridnega semena omogoča setev obeh starševskih komponent v obliki zmesi (Angus, 2012). Podatki iz slik 13 in 14 potrjujejo, da je delovanje 4-bromooksanilne kisline selektivnejše od sredstva CROISOR® 100. Selektivno delovanje 4-bromooksanilne kisline pomeni, da se za razliko od aktivne snovi sintofen učinkovitost v smislu indukcije moške sterilnosti stopnjuje z daljšanjem socvetja na glavnem poganjku. Aktivna snov sintofen je namreč inducirala visok odstotek moške sterilnosti že, ko je znašala dolžina socvetja na glavnem poganjku 5–10 mm. Hkrati je bilo delovanje sintofena izrazito fitotoksično kar je razvidno iz višine tretiranih rastlin, ki je statistično značilno nižja v primerjavi s 4-bromooksanilno kislino (preglednica 9). V primerjavi s kontrolo, je najvišja redukcija višine tretiranih rastlin ob uporabi aktivne snovi sintofen znašala 21,4 % (cv. Guarni), ob uporabi 4-bromooksanilne kisline pa 8,9 % (cv. Guarni).

Indukcija visokega odstotka moške sterilnosti v zgodnji fazi organogeneze in izrazito fitotoksično delovanje onemogočata setev obeh starševskih komponent v obliki zmesi (Titan in sod., 2012). Pri setvi v obliki zmesi je potrebno namreč upoštevati, da mora opaševalce oz. očetovska komponenta zamujati v razvoju v primerjavi z materino komponento (synchronizacija cvetenja). Cvetovi materine komponente se namreč odprejo oz. kulminirajo (predpleva in krovna pleva se odpreta pod kotom $> 20\text{--}30^\circ$) zaradi delovanja sredstva za kemično hibridizacijo nekoliko pozneje kot običajno. V primeru, da sredstvo za kemično hibridizacijo začne učinkovito delovati že v zgodnjih fenofazah pa to pomeni, da je visok odstotek moške sterilnosti dosežen tudi pri opaševalcu, ki posledično več ne tvori zadovoljive količine cvetnega prahu.



Slika 13:
Figure 13:

Vpliv interakcije aktivna snov \times fenofaza \times genotip na indukcijo moške sterilnosti
The impact of interaction active substance \times phenophase \times genotype on the induction of male sterility



Slika 14: Vpliv interakcije aktivna snov × fenofaza × genotip na višino rastline

Figure 14: The impact of interaction active substance × phenophase × genotype on the plant height

Etil oksanilati, ki so poznani po gametocidnem delovanju (inhibitorji mikrosporogeneze) so bili modificirani v vodotopno stanje v obliki kislin in soli. Modifikacija etil 4-bromooksanilata v 4-bromooksanilno kislino je rezultirala z oblikovanjem aktivne snovi s podobno učinkovitostjo kot komercialno sredstvo za kemično hibridizacijo, vendar z bistveno nižjim negativnim stranskim delovanjem (fitotoksičnost). Poleg tega se je na šestih različnih genotipi izkazalo, da je delovanje 4-bromooksanilne kisline selektivnejše od delovanja komercialnega sredstva za kemično hibridizacijo. Na osnovi naših rezultatov predpostavljamo, da kemična indukcija moške sterilnosti v primerjavi z genetsko in transgeno indukcijo moške sterilnosti še vedno predstavlja perspektivni pristop za izkoriščanje heteroze pri navadni pšenici.

4.2 TESTIRANJE KOMBINACIJSKE SPOSOBNOSTI LINIJSKIH SORT NAVADNE PŠENICE IN KVANTITATIVNA ANALIZA HETEROZE V SKUPINI HEKSAPLOIDNIH PŠENIC Z GENOMSKO STRUKTURO AABBDD

4.2.1 Vrednosti kombinacijske sposobnosti v povezavi z učinkom heteroze za linijske sorte navadne pšenice francoskih žlahtniteljskih hiš

Glavni cilj pri razvoju hibridnih sort navadne pšenice je identifikacija starševskih komponent, ki rezultirajo z visoko specifično kombinacijsko sposobnostjo (Krystkowiak in sod., 2009). Iz stališča nadaljnega razvoja dednine, ki predstavlja osnovo za izkoriščanje heteroze pa je še zlasti pomembno poznavanje razmerja med aditivnim in ne-aditivnim učinkom genov, ki se izražata kot splošna kombinacijska sposobnost (v nadaljevanju SKS) in specifična kombinacijska sposobnost (v nadaljevanju PKS). Poznavanje navedenega razmerja pomaga pri identifikaciji heterotičnih skupin, ki pri medsebojnem križanju rezultirajo z visoko ravnijo heteroze (Longin in sod., 2012).

Pri testiranju kombinacijske sposobnosti (v nadaljevanju KS) linijskih sort navadne pšenice francoskih žlahtniteljskih hiš je statistična analiza pokazala, da je v obeh sezонаh (2010/11 in 2011/12) obstajal statistično značilen vpliv SKS in PKS na obravnavane parametre (število klasov na rastlino, višina rastline, pridelek zrnja na rastlino, število zrn na rastlino) (preglednica 10). Vrednosti varianc za SKS so bile večinoma višje od vrednosti varianc za PKS. Največja razlika med vrednostmi varianc za SKS in PKS je bila v obeh sezонаh izražena za parameter pridelek zrnja na rastlino. V tem primeru je bil aditivni učinek genov tudi za več kot dvajsetkrat višji od ne-aditivnega učinka genov. O podobno visoki razliki med aditivnim in ne-aditivnim učinkom genov, ko gre za parametre povezane s pridelkom zrnja, ki so določeni za posamezno rastlino je poročalo že več različnih avtorjev (Corbellini in sod., 2002; Krystkowiak in sod., 2009).

Visoka razlika med aditivnim in ne-aditivnim učinkom genov je pogosto rezultat, ko gre za križanje dveh heterotičnih skupin, ki imata potencial za razvoj visoko produktivnih hibridnih kombinacij (Fischer in sod., 2008; Fischer in sod., 2010; Longin in sod., 2012). Poleg tega pa je prednost prevladujočega vpliva SKS nad PKS hiter seleksijski napredek in enostavna selekcija visoko produktivnih hibridnih kombinacij, ker obstaja močna povezava med produktivnostjo posamezne starševske komponente in produktivnostjo hibridne generacije (Krystkowiak in sod., 2009). Konkreten primer je povezava med vrednostmi za SKS linijske sorte Garcia in njenim hibridnim potomstvom. Iz preglednice 11 je razvidno, da je linijska sorta Garcia dosegla statistično značilno najvišje vrednosti za SKS pri parametrih število klasov na rastlino, višina rastline, pridelek zrnja na rastlino in število zrn na rastlino. Hkrati pa je iz preglednice 12 razvidno, da se tudi F₁ hibridi, ki temeljijo na

linijski sorti Garcia uvrščajo v skupine s statistično značilno najvišjimi vrednostmi za vse opazovane parametre.

Preglednica 10: Analiza variance za parametre, ki so bili obravnavani pri testiranju kombinacijske sposobnosti linijskih sort francoskih žlahtniteljskih hiš

Table 10: Analysis of variance for the parameters that were considered by the testing of combining ability of line varieties of the french breeding houses

Izvor variance	SP	Vrednosti variance			
		Število klasov na rastlino	Višina rastline	Pridelek zrnja na rastlino	Število zrn na rastlino
2010/11					
Ponovitve	3	0,78 ns	8,46 ns	1,51 ns	775,02 ns
Križanci	41	7,44 **	100,73 **	45,84 **	2130,53 **
Starši	13	2,94 **	377,46 **	20,46 **	8766,56 **
Starši : križanci	1	137,61 **	2140,47 **	802,84 **	431152,06 **
SKS linije	5	29,52 **	324,84 **	264,49 **	116341,71 **
SKS testerji	7	5,87 **	56,59 **	22,62 **	8916,30 **
PKS	29	4,01 **	73,21 **	13,85 **	8039,80 **
Ostanek	165	0,77	3,61	1,83	1067,24 **
2011/12					
Ponovitve	3	0,93 ns	4,01 ns	1,16 ns	682,42 ns
Križanci	41	5,83 **	85,54 **	34,38 **	16190,40 **
Starši	13	4,80 **	322,57 **	22,81 **	10246,97 **
Starši : križanci	1	78,06 **	1712,96 **	361,92 **	230757,56 **
SKS linije	5	24,78 **	293,87 **	214,46 **	93181,55 **
SKS testerji	7	4,55 **	41,10 **	18,52 **	8352,80 **
PKS	29	3,21 **	62,40 **	10,19 **	6239,60 **
Ostanek	165	0,08	3,37	1,60	870,45 **

^{ns} ni statistično značilnih razlik pri $p \geq 0,05$, ^{*} statistična značilnost definirana pri $p < 0,05$ in ^{**} pri $p \leq 0,01$

Preglednica 11:

Table 11:

Vrednosti SKS pri statistični analizi linijskih sort francoskih žlahtniteljskih hiš
GCA values in the statistical analysis of line varieties of the french breeding
houses

Splošna kombinacijska sposobnost – 2010/11	Število klasov na rastlino	Višina rastline	Pridelek zrnja na rastlino	Število zrn na rastlino
Linije (♀)				
Alixan – C _T 1	-0,7556 ^d	-1,5460 ^d	-2,3915 ^e	-47,1108 ^e
Guarni – C _T 3	-0,0802 ^c	-0,2607 ^c	0,1777 ^c	2,6023 ^c
Inoui – C _T 6	0,6204 ^b	4,4469 ^a	2,4204 ^b	48,4149 ^b
Azimut – C _T 15	-1,1981 ^e	-4,2749 ^f	-4,0852 ^f	-93,3069 ^f
Bologna – C _T 16	-0,3318 ^{cd}	-2,7768 ^e	-1,0549 ^d	-15,2095 ^d
Garcia – C _T 19	1,7026 ^a	4,1837 ^{ab}	4,3832 ^a	90,2483 ^a
Testerji (♂)				
Aldric – C _T 14	0,1734 ^{bc}	0,2888 ^c	-0,3700 ^{cd}	-2,2023 ^c
FD05152 – C _T 17	-0,6095 ^d	-2,0787 ^{de}	-1,1525 ^e	-19,5902 ^{de}
Racine – C _T 21	0,5838 ^{ab}	1,1334 ^{ab}	1,4358 ^a	20,9585 ^{ab}
Sailor – C _T 22	0,1448 ^c	0,5624 ^{bc}	-0,0745 ^c	-7,3153 ^d
Incisif – C _T 24	-0,1166 ^{cd}	-1,9679 ^d	-0,5879 ^d	-3,4723 ^{cd}
Euclide – C _T 25	-0,8041 ^{de}	1,5046 ^a	-1,2342 ^{ef}	-34,3469 ^f
Illico – C _T 26	0,8796 ^a	-3,2090 ^e	1,2059 ^{ab}	25,7634 ^a
Orvantis – C _T 30	0,1955 ^b	1,0180 ^b	0,8446 ^b	18,0002 ^b
Splošna kombinacijska sposobnost – 2011/12				
Linije (♀)	Število klasov na rastlino	Višina rastline	Pridelek zrnja na rastlino	Število zrn na rastlino
Alixan – C _T 1	-0,6514 ^d	-1,3200 ^d	-2,0909 ^e	-39,7929 ^e
Guarni – C _T 3	-0,1470 ^c	-0,2624 ^c	0,1097 ^c	-1,8580 ^c
Inoui – C _T 6	0,5858 ^b	3,4267 ^b	2,1963 ^b	44,6064 ^b
Azimut – C _T 15	-1,0241 ^e	-3,6721 ^f	-3,3567 ^f	-74,6134 ^f
Bologna – C _T 16	-0,2486 ^{cd}	-2,5458 ^e	-0,8971 ^d	-12,6296 ^d
Garcia – C _T 19	1,5701 ^a	4,0429 ^a	4,0262 ^a	83,8375 ^a
Testerji (♂)				
Aldric – C _T 14	0,1087 ^{bc}	0,5203 ^{bc}	-0,2768 ^{cd}	-0,8337 ^c
FD05152 – C _T 17	-0,5475 ^d	-1,8372 ^e	-1,0039 ^e	-16,5629 ^{de}
Racine – C _T 21	0,5441 ^a	1,1816 ^{ab}	1,2828 ^a	19,8246 ^{ab}
Sailor – C _T 22	0,0539 ^c	-0,0584 ^c	-0,2395 ^c	-12,2069 ^d
Incisif – C _T 24	-0,0850 ^{cd}	-1,6022 ^{de}	-0,4502 ^d	-2,0566 ^{cd}
Euclide – C _T 25	-0,6829 ^{de}	1,5124 ^a	-1,0527 ^{ef}	-29,8616 ^e
Illico – C _T 26	0,5231 ^{ab}	-1,2933 ^d	1,0424 ^{ab}	26,0166 ^a
Orvantis – C _T 30	0,2441 ^b	0,9866 ^b	0,7678 ^b	17,2288 ^b

^{abc}aritmetične sredine označene z enakimi črkami se statistično značilno ne razlikujejo pri 95 % stopnji zaupanja (Duncan-ov test)

Preglednica 12: Rangiranje skupin F_1 hibridov za vrednosti povprečne starševske heteroze
Table 12: Ranking of F_1 hybrid groups according to mid-parent heterosis values

F_1 hibridi – skupine	Število klasov na rastlino	Višina rastline	Pridelek zrnja na rastlino	Število zrn na rastlino
	0,0428*	0,0001**	0,0197*	0,0282*
	0,0489*	0,0000**	0,0145*	0,0247*
2010/11				
Alixan – F_1 hibridi	32,14 ± 6,65 ^a	6,93± 2,11 ^b	32,04 ± 6,34 ^a	32,49± 6,39 ^a
Guarni – F_1 hibridi	20,58 ± 7,18 ^{ab}	12,24± 2,28 ^{abc}	33,17 ± 6,85 ^a	32,55± 6,91 ^a
Inoui – F_1 hibridi	24,92 ± 6,22 ^a	13,09± 1,98 ^{ab}	28,93 ± 5,93 ^a	28,08± 5,98 ^{ab}
Azimut – F_1 hibridi	5,63 ± 7,18 ^b	0,02± 2,28 ^c	9,46 ± 6,85 ^b	9,89± 6,90 ^b
Bologna – F_1 hibridi	21,68 ± 6,22 ^{ab}	7,48± 1,98 ^{bc}	36,38 ± 5,93 ^a	34,71± 5,98 ^a
Garcia – F_1 hibridi	36,93 ± 6,65 ^a	17,32± 2,11 ^a	44,57 ± 6,34 ^a	44,14± 6,39 ^a
2011/12				
Alixan – F_1 hibridi	32,04 ± 6,77 ^a	6,71± 2,09 ^c	30,69 ± 6,17 ^a	33,29± 6,47 ^a
Guarni – F_1 hibridi	21,97 ± 7,31 ^{ab}	12,40± 2,26 ^{abc}	33,23 ± 6,67 ^a	32,85± 6,99 ^a
Inoui – F_1 hibridi	23,66 ± 6,33 ^{ab}	12,66± 1,96 ^{ab}	27,12 ± 5,77 ^a	28,23± 6,05 ^{ab}
Azimut – F_1 hibridi	5,39 ± 7,31 ^b	-0,35± 2,26 ^d	8,263 ± 6,67 ^b	10,07± 6,99 ^b
Bologna – F_1 hibridi	21,79 ± 6,33 ^{ab}	7,41± 1,96 ^{bc}	35,89 ± 5,77 ^a	37,57± 6,05 ^a
Garcia – F_1 hibridi	37,09 ± 6,77 ^a	17,25± 2,09 ^a	43,70 ± 6,17 ^a	44,34± 6,47 ^a

ns ni statistično značilnih razlik pri $p \geq 0,05$, * statistična značilnost definirana pri $p < 0,05$ in ** pri $p \leq 0,01$

± standardna napaka

abc aritmetične sredine označene z enakimi črkami se statistično značilno ne razlikujejo pri 95 % stopnji zaupanja (Duncan-ov test)

V preteklosti je več študij poskušalo najti povezavo med genetsko raznolikostjo starševskih komponent ocenjeno na osnovi njihovega rodovnika (angl. pedigree), uporabe molekulskih markerjev in izoencimov ter produktivnostjo prve filialne generacije (Ferreira in sod., 2010). Do danes se je večinoma izkazalo, da uporaba molekulskih markerjev za merjenje sorodstvenih odnosov in genetske variabilnosti med starševskimi komponentami vodi pogosto le do šibkih povezav s produktivnostjo hibridne generacije. V študiji Corbellini in sod. (2002), ki je temeljila na merjenju sorodstvenih odnosov med štiridesetimi kultivarji navadne pšenice z 338 RFLP markerji in 200 AFLP markerji se je izkazalo, da sicer obstajajo statistično značilne povezave med genetsko variabilnostjo starševskih komponent in splošno ter specifično kombinacijsko sposobnostjo, vendar pa, da so te povezave tako šibke, da z njimi ni možno predvideti ravni heteroze za komponente povezane s pridelkom zrnja in njegovo kakovostjo. Do podobnih ugotovitev so prišli tudi Reif in sod. (2003) ter Balestre in sod. (2009) v študijah, ki so temeljile na SSR markerjih. Alternativno uporabi molekulskih markerjev predstavlja uporaba linearnih modelov kot je na primer BLUP metoda (angl. best linear unbiased predictor), ki poskuša napovedati raven heteroze v še neizvedenih križanjih (Gowda in sod., 2012a, 2012b). Velika pomankljivost linearnih modelov je potreba po genotipizaciji preučevanih starševskih komponent in asociacija uporabljenih molekulskih markerjev s QTL regijami za preučevano lastnost oziroma parameter npr. pridelek zrnja (Ferreira in sod., 2010).

Zaradi šibkih povezav med genetsko variabilnostjo starševskih komponent in produktivnostjo prve filialne generacije ter nekonsistentnih podatkov pridobljenih z

uporabo linearnih modelov, razvoj novih F_1 hibridov oziroma hibridnih sort še vedno temelji predvsem na analizi produktivnosti starševskih komponent (Ferreira in sod., 2010). V naši študiji smo vpliv produktivnosti starševskih komponent na raven heteroze v F_1 generaciji preučili s korelacijo med PKS in heterozo, izraženo kot povprečna starševa heteraza (okrajšano MPH) in heterobeltiozis (okrajšano BPH) (PKS : MPH; PKS : BPH) ter korelacijo med povprečno vrednostjo obeh starševskih komponent (\bar{x}) in heterozo izraženo z MPH in BPH vrednostjo (\bar{x} : MPH; \bar{x} : BPH). Pri analizi linearne regresije za linijske sorte navadne pšenice francoskih žlahtniteljskih hiš in njihove F_1 generacije, se je v obeh sezонаh izkazalo, da ima PKS statistično značilen vpliv ($P < 0,01$) na MPH in BPH za vse opazovane parametre, \bar{x} vrednost pa samo za parameter višina rastlin. Najmočnejše povezave so bile izračunane pri korelaciji med PKS in MPH (PKS : MPH) ter PKS in BPH (PKS : BPH) za parametre število klasov na rastlino, pridelek zrnja na rastlino in število zrn na rastlino (preglednica 13).

Preglednica 13: Analiza linearne regresije za linijske sorte francoskih žlahtniteljskih hiš

Table 13: Analysis of linear regression for the line varieties of the french breeding houses

Linearna regresija	Število klasov na rastlino ¹	Višina rastline ²	Pridelek zrnja na rastlino ³	Število zrn na rastlino ⁴
2010/11				
\bar{x} :	MPH -0,6376 ns	-0,6376 **	0,1693 ns	0,1526 ns
	BPH -0,1334 ns	-0,6114 **	0,2048 ns	0,1885 ns
SCA :	MPH 0,6830 **	0,5573 **	0,7056 **	0,7288 **
	BPH 0,7481 **	0,5616 **	0,6786 **	0,7052 **
2011/12				
\bar{x} :	MPH -0,1507 ns	-0,6554 **	0,1562 ns	0,1141 ns
	BPH -0,1555 ns	-0,6136 **	0,2172 ns	0,1490 ns
SCA :	MPH 0,7136 **	0,5827 **	0,7249 **	0,7574 **
	BPH 0,7769 **	0,5156 **	0,7175 **	0,7517 **
2010/11				
MPH ¹		0,94**	0,28 ^{ns}	0,17 ^{ns}
BPH ¹	0,94**		0,21 ^{ns}	0,08 ^{ns}
MPH ²	0,28 ^{ns}	0,21 ^{ns}		0,91**
BPH ²	0,17 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,14**	
MPH ³	0,79**	0,76**	0,29 ^{ns}	0,14 ^{ns}
BPH ³	0,68**	0,66**	0,26 ^{ns}	0,08 ^{ns}
MPH ⁴	0,79**	0,75**	0,07 ^{ns}	0,14 ^{ns}
BPH ⁴	0,68**	0,66**	0,29 ^{ns}	0,10 ^{ns}
2011/12				
MPH ¹		0,94**	0,30 ^{ns}	0,18 ^{ns}
BPH ¹	0,94**		0,20 ^{ns}	0,78**
MPH ²	0,30 ^{ns}	0,20 ^{ns}		0,75**
BPH ²	0,18 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,90**	
MPH ³	0,78**	0,75**	0,29 ^{ns}	0,14 ^{ns}
BPH ³	0,68**	0,65**	0,27 ^{ns}	0,09 ^{ns}
MPH ⁴	0,77**	0,75**	0,09 ^{ns}	0,15 ^{ns}
BPH ⁴	0,67**	0,66**	0,27 ^{ns}	0,11 ^{ns}

^{ns} ni statistično značilnih razlik pri $p \geq 0,05$, ^{*} statistična značilnost definirana pri $p < 0,05$ in ^{**} pri $p \leq 0,01$

Preglednica 14: Vrednosti PKS in učinek heteroze v F₁ generaciji za vse analizirane parametre – sezona 2010/11

Preglednica 14: SCA values and heterosis effect in the F₁ generation for all analyzed parameters – season 2010/11

<i>T. aestivum × T. aestivum –</i> 2010/11	Število klasov na rastlino	MPH	BPH
	xF₁	Ȑx	SCA
X _T 1 × 14 ^{Fr}	7,7	5,2	0,17
X _T 1 × 17 ^{Fr}	6,7	5,9	-0,50
X _T 1 × 21 ^{Fr}	7,2	5,9	-0,70
X _T 1 × 22 ^{Fr}	7,3	5,7	-0,18
X _T 1 × 24 ^{Fr}	7,9	5,3	0,71
X _T 1 × 25 ^{Fr}	6,4	5,4	-0,11
X _T 1 × 30 ^{Fr}	7,8	5,5	0,31
X _T 3 × 14 ^{Fr}	7,7	6,3	-0,51
X _T 3 × 17 ^{Fr}	8,3	7,0	0,86
X _T 3 × 21 ^{Fr}	8,6	7,0	0,00
X _T 3 × 24 ^{Fr}	9,3	6,3	1,36
X _T 3 × 25 ^{Fr}	8,0	6,5	0,84
X _T 3 × 30 ^{Fr}	5,9	6,6	-2,32
X _T 6 × 14 ^{Fr}	7,3	6,7	-1,59
X _T 6 × 17 ^{Fr}	9,0	7,4	0,95
X _T 6 × 21 ^{Fr}	10,1	7,4	0,84
X _T 6 × 22 ^{Fr}	8,1	7,2	-0,72
X _T 6 × 24 ^{Fr}	8,9	6,8	0,29
X _T 6 × 25 ^{Fr}	8,3	6,9	0,43
X _T 6 × 26 ^{Fr}	8,4	6,5	-1,21
X _T 6 × 30 ^{Fr}	9,5	7,0	0,56
X _T 15 × 14 ^{Fr}	9,3	6,2	2,19
X _T 15 × 17 ^{Fr}	5,3	6,9	-0,94
X _T 15 × 21 ^{Fr}	7,3	6,9	-0,18
X _T 15 × 24 ^{Fr}	6,0	6,2	-0,81
X _T 15 × 25 ^{Fr}	5,7	6,4	-0,41
X _T 15 × 30 ^{Fr}	7,5	6,5	0,38
X _T 16 × 14 ^{Fr}	7,5	6,1	-0,47
X _T 16 × 17 ^{Fr}	6,2	6,8	-0,93
X _T 16 × 21 ^{Fr}	8,0	6,8	-0,38
X _T 16 × 22 ^{Fr}	8,7	6,6	0,77
X _T 16 × 24 ^{Fr}	6,7	6,2	-0,92
X _T 16 × 25 ^{Fr}	7,0	6,3	0,01
X _T 16 × 26 ^{Fr}	9,7	5,9	1,04
X _T 16 × 30 ^{Fr}	8,4	6,5	0,43
X _T 19 × 14 ^{Fr}	10,2	6,8	0,25
X _T 19 × 17 ^{Fr}	9,3	7,5	0,16
X _T 19 × 21 ^{Fr}	10,8	7,5	0,46
X _T 19 × 22 ^{Fr}	9,8	7,2	-0,10
X _T 19 × 24 ^{Fr}	9,1	6,8	-0,58
X _T 19 × 25 ^{Fr}	8,3	7,0	-0,73
X _T 19 × 30 ^{Fr}	10,7	7,1	0,69

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

0,0002**

0,0000**

0,9998^{ns}

0,0527^{ns}

0,3765^{ns}

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

Preglednica 14: Vrednosti PKS in učinek heteroze v F₁ generaciji za vse analizirane parametre – sezona 2010/11

<i>T. aestivum × T. aestivum –</i> 2010/11		Višina rastline			
	xF1	Ȑx	SCA	MPH	BPH
X _T 1 × 14 ^{Fr}	91,6	87,4	0,91	4,8	-6,7
X _T 1 × 17 ^{Fr}	88,7	85,9	0,36	3,3	-6,6
X _T 1 × 21 ^{Fr}	92,6	87,2	1,00	6,1	-5,3
X _T 1 × 22 ^{Fr}	89,5	84,2	-1,45	6,4	-2,3
X _T 1 × 24 ^{Fr}	90,5	83,2	2,00	8,8	0,9
X _T 1 × 25 ^{Fr}	89,9	82,2	-2,06	9,3	2,4
X _T 1 × 30 ^{Fr}	91,3	83,2	-0,15	9,8	1,9
X _T 3 × 14 ^{Fr}	94,9	84,4	2,91	12,4	-3,3
X _T 3 × 17 ^{Fr}	89,0	82,8	-0,60	7,5	-6,3
X _T 3 × 21 ^{Fr}	96,4	84,2	3,57	14,5	-1,3
X _T 3 × 24 ^{Fr}	82,8	80,2	-7,00	3,3	-7,7
X _T 3 × 25 ^{Fr}	97,0	79,2	3,74	22,4	10,5
X _T 3 × 30 ^{Fr}	90,8	80,2	-1,90	13,3	1,4
X _T 6 × 14 ^{Fr}	92,2	87,4	-3,50	5,5	-6,1
X _T 6 × 17 ^{Fr}	98,5	85,8	5,11	14,8	3,6
X _T 6 × 21 ^{Fr}	96,2	87,2	-0,39	10,4	-1,6
X _T 6 × 22 ^{Fr}	93,1	84,1	-2,90	10,7	1,6
X _T 6 × 24 ^{Fr}	98,0	83,1	4,50	17,1	9,3
X _T 6 × 25 ^{Fr}	95,3	82,2	-1,63	16,0	8,6
X _T 6 × 26 ^{Fr}	98,2	82,1	6,00	19,7	12,1
X _T 6 × 30 ^{Fr}	92,0	83,1	-4,44	10,7	2,7
X _T 15 × 14 ^{Fr}	91,7	90,5	3,68	1,3	-6,6
X _T 15 × 17 ^{Fr}	74,0	88,9	-11,60	-16,7	-22,1
X _T 15 × 21 ^{Fr}	80,4	90,3	-0,42	-2,0	-9,5
X _T 15 × 24 ^{Fr}	89,3	86,2	3,52	3,5	-0,4
X _T 15 × 25 ^{Fr}	89,0	85,3	-0,21	4,4	1,4
X _T 15 × 30 ^{Fr}	94,5	86,2	5,78	9,6	5,4
X _T 16 × 14 ^{Fr}	89,3	86,0	-0,24	3,7	-9,1
X _T 16 × 17 ^{Fr}	91,0	84,5	3,84	7,7	-4,3
X _T 16 × 21 ^{Fr}	88,3	85,8	-2,08	2,8	-9,7
X _T 16 × 22 ^{Fr}	92,0	82,8	2,24	11,2	0,4
X _T 16 × 24 ^{Fr}	86,8	81,8	-0,40	6,2	-3,1
X _T 16 × 25 ^{Fr}	91,3	80,8	0,63	13,0	4,1
X _T 16 × 26 ^{Fr}	80,5	80,8	-5,49	-0,3	-8,1
X _T 16 × 30 ^{Fr}	94,5	81,8	4,24	15,5	5,4
X _T 19 × 14 ^{Fr}	93,9	84,8	-2,53	10,7	-4,3
X _T 19 × 17 ^{Fr}	98,2	83,3	4,13	18,0	3,4
X _T 19 × 21 ^{Fr}	96,8	84,6	-0,46	14,5	-0,9
X _T 19 × 22 ^{Fr}	99,1	81,6	2,40	21,5	8,2
X _T 19 × 24 ^{Fr}	92,8	80,6	-1,40	15,2	3,5
X _T 19 × 25 ^{Fr}	98,4	79,6	0,75	23,6	12,2
X _T 19 × 30 ^{Fr}	94,9	80,6	-2,30	17,8	5,9

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

0,0011**

0,0002**

1,0000^{ns}

0,0001**

0,0525^{ns}

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

Preglednica 14: Vrednosti PKS in učinek heteroze v F₁ generaciji za vse analizirane parametre – sezona 2010/11

<i>T. aestivum × T. aestivum –</i> 2010/11	Pridelek zrnja na rastlino	MPH	BPH
	xF1	Ȑ	SCA
X _T 1 × 14 ^{Fr}	14,0	9,7	1,11
X _T 1 × 17 ^{Fr}	12,8	9,5	0,70
X _T 1 × 21 ^{Fr}	13,8	10,9	-0,92
X _T 1 × 22 ^{Fr}	12,8	10,0	-0,33
X _T 1 × 24 ^{Fr}	12,8	9,6	0,13
X _T 1 × 25 ^{Fr}	11,4	10,1	-0,58
X _T 1 × 30 ^{Fr}	14,7	10,1	0,64
X _T 3 × 14 ^{Fr}	15,1	11,6	-0,31
X _T 3 × 17 ^{Fr}	16,9	11,4	2,63
X _T 3 × 21 ^{Fr}	16,4	12,8	-0,86
X _T 3 × 24 ^{Fr}	16,6	11,5	1,35
X _T 3 × 25 ^{Fr}	17,1	11,9	2,48
X _T 3 × 30 ^{Fr}	12,5	12,0	-4,16
X _T 6 × 14 ^{Fr}	16,8	13,9	-0,90
X _T 6 × 17 ^{Fr}	19,0	13,7	2,12
X _T 6 × 21 ^{Fr}	21,5	15,1	2,05
X _T 6 × 22 ^{Fr}	17,2	14,1	-0,80
X _T 6 × 24 ^{Fr}	18,1	13,8	0,65
X _T 6 × 25 ^{Fr}	16,6	14,2	-0,17
X _T 6 × 26 ^{Fr}	16,2	12,9	-3,04
X _T 6 × 30 ^{Fr}	18,9	14,3	0,02
X _T 15 × 14 ^{Fr}	12,3	10,2	1,15
X _T 15 × 17 ^{Fr}	8,7	10,0	-1,71
X _T 15 × 21 ^{Fr}	12,4	11,4	-0,57
X _T 15 × 24 ^{Fr}	14,4	10,1	0,48
X _T 15 × 25 ^{Fr}	9,6	10,5	-0,67
X _T 15 × 30 ^{Fr}	14,5	10,8	2,08
X _T 16 × 14 ^{Fr}	13,6	10,6	-0,62
X _T 16 × 17 ^{Fr}	12,3	10,4	-1,11
X _T 16 × 21 ^{Fr}	15,7	11,8	-0,34
X _T 16 × 22 ^{Fr}	15,6	10,9	1,10
X _T 16 × 24 ^{Fr}	12,0	10,5	-1,99
X _T 16 × 25 ^{Fr}	14,6	10,9	1,26
X _T 16 × 26 ^{Fr}	18,7	9,7	2,88
X _T 16 × 30 ^{Fr}	14,2	11,0	-1,25
X _T 19 × 14 ^{Fr}	19,8	13,5	0,12
X _T 19 × 17 ^{Fr}	17,2	13,3	-1,70
X _T 19 × 21 ^{Fr}	22,6	14,7	1,19
X _T 19 × 22 ^{Fr}	19,7	13,8	-0,26
X _T 19 × 24 ^{Fr}	19,4	13,4	-0,07
X _T 19 × 25 ^{Fr}	17,0	13,8	-1,77
X _T 19 × 30 ^{Fr}	24,1	13,9	3,23

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ 0,0000** 0,0000** 0,9999^{ns} 0,8386^{ns} 0,0052**

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

Preglednica 14: Vrednosti PKS in učinek heteroze v F₁ generaciji za vse analizirane parametre – sezona 2010/11

<i>T. aestivum × T. aestivum –</i> 2010/11	Število zrn na rastlino	MPH	BPH		
	Število zrn na rastlino	MPH	BPH		
X _T 1 × 14 ^{Fr}	349,5	241,7	28,70	44,6	22,1
X _T 1 × 17 ^{Fr}	321,1	236,0	17,80	36,1	16,9
X _T 1 × 21 ^{Fr}	326,5	259,0	-17,40	26,0	1,7
X _T 1 × 22 ^{Fr}	305,2	237,6	-10,40	28,5	9,8
X _T 1 × 24 ^{Fr}	318,7	242,0	-0,80	31,7	11,1
X _T 1 × 25 ^{Fr}	271,4	239,0	-17,20	13,6	-3,4
X _T 1 × 30 ^{Fr}	359,4	244,4	18,50	47,1	23,2
X _T 3 × 14 ^{Fr}	360,0	279,1	-10,50	29,0	25,7
X _T 3 × 17 ^{Fr}	402,3	273,4	49,30	47,2	46,4
X _T 3 × 21 ^{Fr}	379,8	296,5	-13,80	28,1	18,3
X _T 3 × 24 ^{Fr}	403,5	279,5	34,40	44,4	40,6
X _T 3 × 25 ^{Fr}	396,9	276,4	58,60	43,6	41,3
X _T 3 × 30 ^{Fr}	290,4	281,8	-100,20	3,1	-0,4
X _T 6 × 14 ^{Fr}	399,2	329,3	-17,10	21,2	7,2
X _T 6 × 17 ^{Fr}	453,4	323,6	54,50	40,1	21,8
X _T 6 × 21 ^{Fr}	489,0	346,7	49,60	41,1	31,3
X _T 6 × 22 ^{Fr}	390,0	325,2	-21,10	19,9	4,7
X _T 6 × 24 ^{Fr}	431,2	329,7	16,20	30,8	15,8
X _T 6 × 25 ^{Fr}	377,7	326,6	-6,50	15,6	1,4
X _T 6 × 26 ^{Fr}	368,1	297,8	-76,10	23,6	-1,1
X _T 6 × 30 ^{Fr}	439,2	332,0	2,70	32,3	17,9
X _T 15 × 14 ^{Fr}	300,0	249,1	25,50	20,4	4,8
X _T 15 × 17 ^{Fr}	219,4	243,3	-37,80	-9,9	-20,2
X _T 15 × 21 ^{Fr}	288,5	266,4	-9,20	8,3	-10,1
X _T 15 × 24 ^{Fr}	278,3	249,4	5,00	11,6	-3,0
X _T 15 × 25 ^{Fr}	224,6	246,4	-17,80	-8,8	-20,0
X _T 15 × 30 ^{Fr}	346,8	251,8	52,10	37,8	18,9
X _T 16 × 14 ^{Fr}	340,1	268,2	-12,60	26,8	18,8
X _T 16 × 17 ^{Fr}	308,0	262,5	-27,20	17,4	12,1
X _T 16 × 21 ^{Fr}	348,1	285,6	-27,70	21,9	8,5
X _T 16 × 22 ^{Fr}	380,0	264,1	32,40	43,9	36,6
X _T 16 × 24 ^{Fr}	307,4	268,6	-44,00	14,5	7,1
X _T 16 × 25 ^{Fr}	356,0	265,5	35,60	34,1	26,8
X _T 16 × 26 ^{Fr}	454,0	236,7	73,40	91,9	81,5
X _T 16 × 30 ^{Fr}	345,1	270,9	-27,70	27,4	18,3
X _T 19 × 14 ^{Fr}	458,4	317,0	6,30	44,6	31,9
X _T 19 × 17 ^{Fr}	398,5	311,2	-42,20	28,1	14,6
X _T 19 × 21 ^{Fr}	514,2	334,3	32,90	53,8	47,9
X _T 19 × 22 ^{Fr}	446,9	312,9	-6,10	42,8	28,6
X _T 19 × 24 ^{Fr}	460,4	317,3	3,60	45,1	32,4
X _T 19 × 25 ^{Fr}	387,6	314,3	-38,30	23,4	11,5
X _T 19 × 30 ^{Fr}	547,3	319,7	69,00	71,2	57,5

* p < 0,05; ** p < 0,01

0,0000**

0,0000**

1,0000^{ns}

0,9534^{ns}

0,8091^{ns}

\bar{x}_{F1} – povprečna vrednost F₁ generacije, \bar{x} – povprečna vrednost obej starševskih komponent,

SCA – specifična kombinacijska sposobnost, MPH – povprečna starševska heteroza, BPH – heterobeltiozis

Preglednica 15: Vrednosti PKS in učinek heteroze v F₁ generaciji za vse analizirane parametre – sezona 2011/12

Preglednica 15: SCA values and heterosis effect in the F₁ generation for all analyzed parameters – season 2011/12

<i>T. aestivum × T. aestivum –</i>	Število klasov na rastlino				
2011/12	xF₁	Ȑx	SCA	MPH	BPH
X _T 1 × 14 ^{Fr}	6,6	4,6	-0,07	44,8	40,2
X _T 1 × 17 ^{Fr}	6,0	5,2	-0,03	14,6	-0,8
X _T 1 × 21 ^{Fr}	6,5	5,3	-0,64	22,3	6,1
X _T 1 × 22 ^{Fr}	6,6	5,1	-0,07	29,3	24,5
X _T 1 × 24 ^{Fr}	7,1	4,7	0,63	50,6	41,4
X _T 1 × 25 ^{Fr}	5,8	4,8	-0,15	18,9	9,5
X _T 1 × 30 ^{Fr}	7,2	5,0	0,32	43,9	29,7
X _T 3 × 14 ^{Fr}	6,9	5,5	-0,30	25,3	9,7
X _T 3 × 17 ^{Fr}	7,4	6,2	0,90	20,6	18,3
X _T 3 × 21 ^{Fr}	7,7	6,2	0,10	23,9	22,9
X _T 3 × 24 ^{Fr}	8,3	5,7	1,32	47,0	32,4
X _T 3 × 25 ^{Fr}	7,2	5,8	0,84	25,5	15,1
X _T 3 × 30 ^{Fr}	5,3	5,9	-2,04	-10,4	-15,9
X _T 6 × 14 ^{Fr}	6,4	6,0	-1,53	7,6	-10,8
X _T 6 × 17 ^{Fr}	8,1	6,6	0,85	16,1	13,2
X _T 6 × 21 ^{Fr}	9,1	6,7	0,78	36,8	27,4
X _T 6 × 22 ^{Fr}	7,3	6,5	-0,56	13,4	1,9
X _T 6 × 24 ^{Fr}	8,0	6,1	0,25	30,8	11,3
X _T 6 × 25 ^{Fr}	7,5	6,2	0,36	20,7	4,5
X _T 6 × 26 ^{Fr}	7,6	5,8	-0,77	29,8	5,6
X _T 6 × 30 ^{Fr}	8,5	6,3	0,45	34,2	18,6
X _T 15 × 14 ^{Fr}	8,3	5,4	2,01	53,8	36,5
X _T 15 × 17 ^{Fr}	4,6	6,1	-1,09	-24,7	-25,0
X _T 15 × 21 ^{Fr}	6,6	6,1	-0,19	6,8	6,1
X _T 15 × 24 ^{Fr}	5,0	5,6	-1,10	-9,8	-17,6
X _T 15 × 25 ^{Fr}	5,1	5,7	-0,43	-10,1	-16,4
X _T 15 × 30 ^{Fr}	6,8	5,8	0,30	16,3	10,7
X _T 16 × 14 ^{Fr}	6,6	5,4	-0,47	21,8	7,7
X _T 16 × 17 ^{Fr}	5,6	6,1	-0,86	-8,6	-9,4
X _T 16 × 21 ^{Fr}	7,2	6,2	-0,38	15,9	15,6
X _T 16 × 22 ^{Fr}	7,8	5,9	0,74	31,0	26,4
X _T 16 × 24 ^{Fr}	6,3	5,6	-0,65	11,7	1,6
X _T 16 × 25 ^{Fr}	6,3	5,7	-0,01	10,3	2,2
X _T 16 × 26 ^{Fr}	8,7	5,3	1,17	62,9	41,1
X _T 16 × 30 ^{Fr}	7,5	5,8	0,31	29,3	22,6
X _T 19 × 14 ^{Fr}	9,2	6,0	0,26	52,9	26,1
X _T 19 × 17 ^{Fr}	8,4	6,7	0,15	26,1	15,5
X _T 19 × 21 ^{Fr}	9,6	6,7	0,25	42,6	32,0
X _T 19 × 22 ^{Fr}	8,9	6,5	-0,01	36,2	21,7
X _T 19 × 24 ^{Fr}	8,2	6,2	-0,54	32,8	12,4
X _T 19 × 25 ^{Fr}	7,4	6,3	-0,70	18,6	2,1
X _T 19 × 30 ^{Fr}	9,6	6,4	0,58	50,5	32,3

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

0,0001**

0,0000**

0,9986^{ns}

0,0586^{ns}

0,1592^{ns}

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

Preglednica 15: Vrednosti PKS in učinek heteroze v F₁ generaciji za vse analizirane parametre – sezona 2011/12

<i>T. aestivum × T. aestivum –</i> 2011/12		Višina rastline			
	xF1	Ȑx	SCA	MPH	BPH
X _T 1 × 14 ^{Fr}	87,0	83,0	0,70	4,9	-6,5
X _T 1 × 17 ^{Fr}	84,2	81,5	0,26	3,3	-6,6
X _T 1 × 21 ^{Fr}	87,9	82,8	0,92	6,2	-8,6
X _T 1 × 22 ^{Fr}	84,7	79,9	-0,99	6,0	-1,3
X _T 1 × 24 ^{Fr}	85,9	79,3	1,74	8,4	0,3
X _T 1 × 25 ^{Fr}	85,2	78,2	-2,14	8,9	1,9
X _T 1 × 30 ^{Fr}	86,4	79,0	-0,39	9,3	1,5
X _T 3 × 14 ^{Fr}	91,0	80,1	3,68	13,7	-2,2
X _T 3 × 17 ^{Fr}	84,5	78,6	-0,50	7,5	-6,2
X _T 3 × 21 ^{Fr}	91,6	79,8	3,57	14,6	-1,2
X _T 3 × 24 ^{Fr}	79,1	76,4	-6,15	3,6	-7,6
X _T 3 × 25 ^{Fr}	91,7	75,3	3,33	21,7	9,7
X _T 3 × 30 ^{Fr}	86,3	76,1	-1,53	13,4	1,4
X _T 6 × 14 ^{Fr}	87,4	82,9	-3,66	5,5	-6,1
X _T 6 × 17 ^{Fr}	93,4	81,4	4,75	11,2	3,7
X _T 6 × 21 ^{Fr}	91,1	82,7	-0,61	10,2	-1,7
X _T 6 × 22 ^{Fr}	88,0	79,8	-2,52	10,2	1,1
X _T 6 × 24 ^{Fr}	93,1	79,1	4,13	17,6	8,7
X _T 6 × 25 ^{Fr}	90,6	78,1	-1,49	16,0	8,4
X _T 6 × 26 ^{Fr}	93,4	77,9	4,13	19,9	12,3
X _T 6 × 30 ^{Fr}	87,4	78,9	-4,16	10,7	2,6
X _T 15 × 14 ^{Fr}	87,1	85,9	3,13	1,4	-6,5
X _T 15 × 17 ^{Fr}	70,1	84,4	-11,50	-17,0	-22,3
X _T 15 × 21 ^{Fr}	84,0	85,7	-0,62	-2,0	-9,4
X _T 15 × 24 ^{Fr}	84,4	82,1	2,58	2,8	-1,4
X _T 15 × 25 ^{Fr}	84,4	81,1	-0,58	4,0	1,0
X _T 15 × 30 ^{Fr}	89,0	81,9	-4,59	8,7	4,5
X _T 16 × 14 ^{Fr}	84,4	81,5	-0,70	3,5	-9,4
X _T 16 × 17 ^{Fr}	86,3	80,0	3,54	7,8	-4,3
X _T 16 × 21 ^{Fr}	83,6	81,3	-2,11	2,8	-9,8
X _T 16 × 22 ^{Fr}	87,0	78,5	2,51	10,8	0,0
X _T 16 × 24 ^{Fr}	82,4	77,8	-0,57	5,9	-3,8
X _T 16 × 25 ^{Fr}	86,7	76,8	0,59	12,9	3,7
X _T 16 × 26 ^{Fr}	76,4	76,6	-6,86	-0,2	-8,1
X _T 16 × 30 ^{Fr}	89,7	77,6	4,20	15,7	5,4
X _T 19 × 14 ^{Fr}	88,8	80,3	-2,84	10,6	-4,6
X _T 19 × 17 ^{Fr}	93,1	78,8	3,82	18,1	3,3
X _T 19 × 21 ^{Fr}	91,5	80,1	-0,82	14,2	-1,3
X _T 19 × 22 ^{Fr}	94,2	77,3	3,08	21,8	8,2
X _T 19 × 24 ^{Fr}	88,1	76,6	-1,40	15,1	2,9
X _T 19 × 25 ^{Fr}	93,3	75,6	0,62	23,4	11,6
X _T 19 × 30 ^{Fr}	89,8	76,4	-2,38	17,5	5,4

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

0,0019**

0,0001**

0,8837^{ns}

0,00000**

0,0431*

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

Preglednica 15: Vrednosti PKS in učinek heteroze v F₁ generaciji za vse analizirane parametre – sezona 2011/12

<i>T. aestivum × T. aestivum –</i> 2011/12	Pridelek zrnja na rastlino	MPH	BPH
	xF1	Ȑx	SCA
X _T 1 × 14 ^{Fr}	12,6	9,7	1,11
X _T 1 × 17 ^{Fr}	11,5	9,5	0,70
X _T 1 × 21 ^{Fr}	12,3	10,9	-0,92
X _T 1 × 22 ^{Fr}	11,5	10,0	-0,33
X _T 1 × 24 ^{Fr}	11,3	9,6	0,13
X _T 1 × 25 ^{Fr}	10,3	10,1	-0,58
X _T 1 × 30 ^{Fr}	13,0	10,1	0,64
X _T 3 × 14 ^{Fr}	13,6	11,6	-0,31
X _T 3 × 17 ^{Fr}	15,2	11,4	2,63
X _T 3 × 21 ^{Fr}	14,7	12,8	-0,86
X _T 3 × 24 ^{Fr}	15,0	11,5	1,35
X _T 3 × 25 ^{Fr}	15,3	11,9	2,48
X _T 3 × 30 ^{Fr}	11,2	12,0	-4,16
X _T 6 × 14 ^{Fr}	15,1	13,9	-0,90
X _T 6 × 17 ^{Fr}	16,9	13,7	2,12
X _T 6 × 21 ^{Fr}	19,2	15,1	2,05
X _T 6 × 22 ^{Fr}	15,4	14,1	-0,80
X _T 6 × 24 ^{Fr}	16,4	13,8	0,65
X _T 6 × 25 ^{Fr}	15,0	14,2	-0,17
X _T 6 × 26 ^{Fr}	14,5	12,9	-3,04
X _T 6 × 30 ^{Fr}	17,0	14,3	0,02
X _T 15 × 14 ^{Fr}	11,0	10,2	1,15
X _T 15 × 17 ^{Fr}	7,8	10,0	-1,71
X _T 15 × 21 ^{Fr}	11,1	11,4	-0,57
X _T 15 × 24 ^{Fr}	10,2	10,1	0,48
X _T 15 × 25 ^{Fr}	8,6	10,5	-0,67
X _T 15 × 30 ^{Fr}	12,9	10,8	2,08
X _T 16 × 14 ^{Fr}	12,2	10,6	-0,62
X _T 16 × 17 ^{Fr}	11,1	10,4	-1,11
X _T 16 × 21 ^{Fr}	14,1	11,8	-0,34
X _T 16 × 22 ^{Fr}	13,8	10,9	1,10
X _T 16 × 24 ^{Fr}	10,8	10,5	-1,99
X _T 16 × 25 ^{Fr}	13,1	10,9	1,26
X _T 16 × 26 ^{Fr}	16,8	9,7	2,88
X _T 16 × 30 ^{Fr}	12,8	11,0	-1,25
X _T 19 × 14 ^{Fr}	17,7	13,5	0,12
X _T 19 × 17 ^{Fr}	15,4	13,3	-1,70
X _T 19 × 21 ^{Fr}	20,2	14,7	1,19
X _T 19 × 22 ^{Fr}	17,7	13,8	-0,26
X _T 19 × 24 ^{Fr}	17,4	13,4	-0,07
X _T 19 × 25 ^{Fr}	15,3	13,8	-1,77
X _T 19 × 30 ^{Fr}	21,6	13,9	3,23

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ 0,0000*** 0,0000** 0,9999^{ns} 0,0199* 0,0052**

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

Preglednica 15: Vrednosti PKS in učinek heteroze v F₁ generaciji za vse analizirane parametre – sezona 2011/12

<i>T. aestivum × T. aestivum –</i> 2011/12	Število zrn na rastlino	MPH	BPH
	Število zrn na rastlino	MPH	BPH
X _T 1 × 14 ^{Fr}	314,5	215,9	23,31
X _T 1 × 17 ^{Fr}	288,8	210,6	13,33
X _T 1 × 21 ^{Fr}	293,7	231,4	-18,15
X _T 1 × 22 ^{Fr}	274,5	212,1	-5,37
X _T 1 × 24 ^{Fr}	286,8	216,2	-3,13
X _T 1 × 25 ^{Fr}	244,0	210,6	-18,14
X _T 1 × 30 ^{Fr}	323,0	218,4	13,75
X _T 3 × 14 ^{Fr}	324,0	251,1	-5,18
X _T 3 × 17 ^{Fr}	361,9	245,8	48,50
X _T 3 × 21 ^{Fr}	341,6	266,6	-8,23
X _T 3 × 24 ^{Fr}	362,9	251,4	35,02
X _T 3 × 25 ^{Fr}	357,1	245,1	56,99
X _T 3 × 30 ^{Fr}	261,4	253,6	-85,81
X _T 6 × 14 ^{Fr}	359,1	296,3	-16,49
X _T 6 × 17 ^{Fr}	408,0	290,9	48,18
X _T 6 × 21 ^{Fr}	439,9	311,8	43,65
X _T 6 × 22 ^{Fr}	351,0	292,5	-13,25
X _T 6 × 24 ^{Fr}	387,9	296,6	13,48
X _T 6 × 25 ^{Fr}	339,7	290,9	-6,90
X _T 6 × 26 ^{Fr}	330,9	267,9	-71,57
X _T 6 × 30 ^{Fr}	395,0	298,7	1,35
X _T 15 × 14 ^{Fr}	269,9	224,1	13,48
X _T 15 × 17 ^{Fr}	197,2	218,8	-43,47
X _T 15 × 21 ^{Fr}	259,4	239,6	-17,68
X _T 15 × 24 ^{Fr}	250,2	224,4	-4,96
X _T 15 × 25 ^{Fr}	202,1	218,8	-25,22
X _T 15 × 30 ^{Fr}	312,2	226,6	37,74
X _T 16 × 14 ^{Fr}	306,0	236,8	-12,35
X _T 16 × 17 ^{Fr}	277,0	231,4	-15,63
X _T 16 × 21 ^{Fr}	312,9	252,3	-26,09
X _T 16 × 22 ^{Fr}	341,7	233,0	34,72
X _T 16 × 24 ^{Fr}	276,6	237,1	-40,49
X _T 16 × 25 ^{Fr}	320,2	231,4	30,86
X _T 16 × 26 ^{Fr}	408,5	208,4	63,30
X _T 16 × 30 ^{Fr}	310,6	239,2	-25,87
X _T 19 × 14 ^{Fr}	412,5	285,2	-2,32
X _T 19 × 17 ^{Fr}	358,7	279,8	-40,44
X _T 19 × 21 ^{Fr}	462,4	300,7	26,95
X _T 19 × 22 ^{Fr}	402,2	281,4	-1,26
X _T 19 × 24 ^{Fr}	414,1	285,5	6,53
X _T 19 × 25 ^{Fr}	348,7	279,8	-37,14
X _T 19 × 30 ^{Fr}	492,2	287,6	59,29

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ 0,0000** 0,0000** 0,9937^{ns} 0,0248* 0,0042**

\bar{x}_{F1} – povprečna vrednost F₁ generacije, \bar{x} – povprečna vrednost obeh starševskih komponent,

SCA – specifična kombinacijska sposobnost, MPH – povprečna starševska heteroza, BPH – heterobeltozis

Krystkowiak in sod. (2009) navajajo, da v večini primerov učinek heteroze med posameznimi preučevanimi lastnostmi ni ekvivalenten. To pomeni, da se v večini primerov pozitiven učinek heteroze za neko lastnost ne prenaša še na ostale preučevane lastnosti. Rezultati statistične analize linijskih sort francoskih žlahtniteljskih hiš so potrdili izjemo, ker se je izkazalo, da število klasov na rastlino in število zrn na rastlino statistično značilno vplivata na pridelek zrnja na rastlino. V obeh sezona je namreč učinek heteroze (izražen kot MPH in BPH) za število klasov na rastlino in število zrn na rastlino pozitivno vplival na učinek heteroze za pridelek zrnja na rastlino (preglednica 13). Torej se je z višanjem ravni heteroze za število klasov na rastlino in število zrn na rastlino višala tudi raven heteroze za pridelek zrnja na rastlino, kar je razumljivo, saj ta dva parametra neposredno vplivata na pridelek zrnja na rastlino.

4.2.2 Vrednosti kombinacijske sposobnosti v povezavi z učinkom heteroze za linijske sorte Poljoprivrednog instituta Osijek

V nasprotju z rezultati študije linijskih sort navadne pšenice francoskih žlahtniteljskih hiš in njihovih F_1 hibridnih kombinacij se je pri študiji dvanajstih linijskih sort Poljoprivrednog instituta Osijek in pripadajočih F_1 hibridnih kombinacij izkazalo, da ima vrednost \bar{x} statistično značilen vpliv na raven heteroze za pridelek zrnja. Na obeh lokacijah se je namreč izkazalo, da se z višanjem povprečnega pridelka zrnja obeh starševskih komponent (vrednost \bar{x}) znižuje raven heteroze za pridelek zrnja (preglednica 18). Da je prišlo do negativne povezave med obema opazovanima parametroma je tudi povsem razumljivo iz genetskega in fiziološkega vidika, ker je fiziološki potencial vsake rastlinske vrste povezan z njeno genetsko strukturo.

Pri testiranju KS linijskih sort Poljoprivrednog instituta Osijek se je izkazalo tudi, da ima SKS materinih komponent statistično značilno nižji vpliv na pridelek zrnja od PKS (preglednica 16). V podobni študiji CIMMYT-a, ki je bila opravljena v sezona 1997/98 in 1998/99 se je izkazalo nasprotno, SKS (aditivni učinek genov) je v splošnem prevladovala nad PKS (ne-aditivni učinek genov). Omenjena študija je temeljila na 148 F_1 hibridih navadne pšenice, ki so bili vzgojeni z uporabo sredstva za kemično hibridizacijo GENESIS® in bili testirani skupaj s starševskimi komponentami in standardnimi sortami po metodi slučajnega bloka s parcelicami velikosti $4,8 \text{ m}^2$ (Cukadar in Ginkel, 2001). Razlike v rezultatih med obema študijama lahko pojasnimo z genetsko variabilnostjo obeh dednin oziroma množic starševskih komponent, ki sta bili obravnavani v posamezni študiji. Dednina navadne pšenice mednarodnega centra CIMMYT namreč vključuje kultivarje navadne pšenice iz zelo različnih regij na globalni ravni, medtem ko dednina Poljoprivrednog instituta Osijek temelji na lokalno sprejemljivih domačih in tujih kultivarjih navadne pšenice.

Preglednica 16: Analiza variance za parametre, ki so bili obravnavani pri testiranju kombinacijske sposobnosti linijskih sort Poljoprivrednog instituta Osijek

Table 16: Analysis of variance for the parameters involved in testing of combining ability of line varieties of the Agricultural institute of Osijek

Izvor variance	SP	Vrednosti variance	
		Pridelek zrnja	Absolutna masa zrnja
Osijek			
Ponovitve	3	418731,7 ns	4,7 ns
Križanci	19	2456171,9 **	31,3 **
Starši	11	2529650,9 **	79,8 **
Starši : križanci	1	4729269,5 **	52,4 **
SKS linije	9	692542,0 **	36,8 **
SKS testerji	1	22574672,0 **	64,4 **
PKS	9	1984412,9 **	22,2 **
Ostanek	93	620145,3 **	2,6 **
Jablje pri Trzinu			
Ponovitve	3	22912000,7 ns	4,1 ns
Križanci	19	2042632,0 **	32,3 **
Starši	11	1104538,0 **	64,7 **
Starši : križanci	1	1500064,8 **	223,4 **
SKS linije	9	630865,4 **	38,2 **
SKS testerji	1	21217989,7 **	67,9 **
PKS	9	1323803,4 **	22,6 **
Ostanek	93	171668,4 **	2,7 **

ns ni statistično značilnih razlik pri $p \geq 0,05$, * statistična značilnost definirana pri $p < 0,05$ in ** pri $p \leq 0,01$

Preglednica 17: Vrednosti SKS pri statistični analizi linijskih sort Poljoprivrednog instituta Osijek

Table 17: GCA values in the statistical analysis of line varieties of the Agricultural institute of Osijek

Splošna kombinacijska sposobnost	Osijek		Jablje pri Trzinu	
	Pridelek zrnja	Absolutna masa zrnja	Pridelek zrnja	Absolutna masa zrnja
Linije (♀)				
C _T 13	-54,3 ^d	-1,70 ^d	-116,67 ^d	-1,76 ^{de}
C _T 50	369,9 ^{ab}	-3,16 ^{ef}	416,67 ^{ab}	-3,31 ^{ef}
C _T 48	86,1 ^b	-2,69 ^e	441,67 ^a	-2,68 ^e
C _T 28	556,9 ^a	2,99 ^a	-333,33 ^e	2,82 ^a
C _T 46	-16,0 ^{cd}	-0,37 ^{cd}	58,33 ^{bc}	-0,39 ^{cd}
C _T 38	-395,8 ^{ef}	1,24 ^{bc}	-208,33 ^{de}	1,34 ^{bc}
C _T 72	4,0 ^{bc}	1,05 ^c	-366,67 ^{ef}	1,07 ^c
C _T 42	-367,9 ^e	-1,26 ^d	175,00 ^b	-1,27 ^d
C _T 73	-11,3 ^c	24,03 ^{ab}	0,00 ^c	2,56 ^{ab}
C _T 71	-171,5 ^{de}	1,49 ^b	-66,67 ^{cd}	1,57 ^b
Testerji (♂)				
C _T 51	-531,2 ^b	0,90 ^a	-515,00 ^b	0,92 ^a
C _T 52	531,2 ^a	-0,90 ^b	515,00 ^a	-0,92 ^b

abc aritmetične sredine označene z enakimi črkami se statistično značilno ne razlikujejo pri 95 % stopnji zaupanja (Duncan-ov test)

Visoka razlika med aditivnim (SKS) in ne-aditivnim (PKS) učinkom genov v prid aditivnega učinka genov se je kot dober pokazatelj za uspešnost izkoriščanja heteroze v dani dednini izkazala tudi v tej študiji. Pri linijskih sortah francoskih žlahtniteljskih hiš je raven povprečne starševske heteroze za pridelek zrnja znašala od 30,33 % do 31,30 %, pri linijskih sortah Poljoprivrednog instituta Osijek pa le od -3,56 do 3,82.

Preglednica 18: Analiza linearne regresije za linijske sorte Poljoprivrednog Instituta Osijek

Table 18: Analysis of the linear regression for the line varieties of the Agricultural institute of Osijek

Linearna regresija – r_{xy}		Pridelek zrnja¹	Absolutna masa zrnja¹
Osijek			
\bar{x}	: MPH	-0,6607**	-0,2857ns
	: BPH	-0,6671**	0,4935*
SCA	: MPH	-0,0757ns	0,2920ns
	: BPH	-0,0802 ns	0,3501 ns
Jablje pri Trzinu			
\bar{x}	: MPH	-0,7541**	-0,2125ns
	: BPH	-0,7603**	0,4906*
SCA	: MPH	0,0773ns	0,5052*
	: BPH	0,1362ns	0,3467ns
Osijek			
MPH ¹	MPH ¹	BPH ¹	MPH ²
			BPH ²
MPH ¹		0,95**	-0,42ns
BPH ¹	0,95**		-0,40ns
MPH ²	-0,42ns	-0,40ns	0,69**
BPH ²	-0,51*	-0,40ns	
Jablje pri Trzinu			
MPH ¹		0,98**	-0,63**
BPH ¹	0,98*		-0,56*
MPH ²	-0,63**	-0,56*	0,75**
BPH ²	-0,59**	-0,54*	0,75**

^{ns} ni statistično značilnih razlik pri $p \geq 0,05$, ^{*} statistična značilnost definirana pri $p < 0,05$ in ^{**} pri $p \leq 0,01$

Preglednica 19: Vrednosti PKS in učinek heteroze v F₁ generaciji za vse analizirane parametre – lokacija Osijek

Preglednica 19: SCA values and heterosis effect in the F₁ generation for all analyzed parameters – location Osijek

<i>T. aestivum × T. aestivum – Osijek</i>		Pridelek zrnja			
	\bar{x}_{F1}	\bar{x}	SCA	MPH	BPH
X _T 13/51 ^{hr}	8348,7	8049,1	278,50	3,7	-8,4
X _T 50/51 ^{hr}	8346,9	8816,2	-278,50	-5,3	-8,4
X _T 48/51 ^{hr}	8007,1	8807,3	-147,60	-9,1	-21,1
X _T 28/51 ^{hr}	7623,1	9500,2	147,60	-19,8	-22,9
X _T 46/51 ^{hr}	8802,2	8648,1	-203,60	1,8	-3,4
X _T 38/51 ^{hr}	7843,8	8190,9	203,60	-4,2	-13,9
X _T 72/51 ^{hr}	8679,4	8528,5	-1058,30	1,8	-4,8
X _T 42/51 ^{hr}	7844,1	8566,8	1058,30	-8,4	-13,9
X _T 73/51 ^{hr}	7714,3	9004,7	-693,70	-14,3	-15,4
X _T 71/51 ^{hr}	8036,2	8467,9	693,70	-5,1	-11,8
X _T 13/52 ^{hr}	8854,2	7474,2	115,00	18,5	11,2
X _T 50/52 ^{hr}	9704,4	8241,3	-115,00	17,8	13,9
X _T 48/52 ^{hr}	9476,7	8232,5	550,80	15,1	11,5
X _T 28/52 ^{hr}	10802,2	8925,3	-550,80	21,0	9,3
X _T 46/52 ^{hr}	8477,3	8073,3	87,40	5,0	3,6
X _T 38/52 ^{hr}	8676,2	7615,9	-87,40	13,9	9,0
X _T 72/52 ^{hr}	8640,1	7953,6	-399,00	8,0	8,5
X _T 42/52 ^{hr}	8731,7	7991,9	399,00	9,3	8,9
X _T 73/52 ^{hr}	9574,8	8429,8	-2,50	13,6	7,6
X _T 71/52 ^{hr}	8932,4	7893,0	2,50	13,2	12,2

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

0,0007**

0,0059**

1,0000^{ns}

0,0000**

0,0000**

T. aestivum × T. aestivum –

Absolutna masa zrnja

<i>T. aestivum × T. aestivum – Osijek</i>		Absolutna masa zrnja			
	\bar{x}_{F1}	\bar{x}	SCA	MPH	BPH
X _T 13/51 ^{hr}	45,8	42,6	0,20	7,4	-8,9
X _T 50/51 ^{hr}	43,1	44,5	-0,20	-3,2	-14,1
X _T 48/51 ^{hr}	44,9	46,4	-1,00	-3,3	-10,6
X _T 28/51 ^{hr}	53,5	47,5	1,00	12,7	6,6
X _T 46/51 ^{hr}	46,3	48,3	0,30	-4,1	-7,7
X _T 38/51 ^{hr}	49,3	49,5	-0,30	-0,5	-1,9
X _T 72/51 ^{hr}	47,1	49,1	3,20	-4,1	-6,2
X _T 42/51 ^{hr}	45,2	47,8	-3,20	-5,6	-10,1
X _T 73/51 ^{hr}	51,7	48,1	-0,60	7,5	2,9
X _T 71/51 ^{hr}	46,3	47,7	0,60	-3,1	-7,9
X _T 13/52 ^{hr}	43,7	42,4	0,70	3,0	-12,3
X _T 50/52 ^{hr}	43,4	44,3	-0,70	-2,1	-12,9
X _T 48/52 ^{hr}	42,6	46,2	-1,20	-7,9	-14,5
X _T 28/52 ^{hr}	45,3	47,3	1,20	-4,2	-9,0
X _T 46/52 ^{hr}	45,7	48,1	-0,90	-4,9	-8,1
X _T 38/52 ^{hr}	46,0	49,3	0,90	-6,6	-7,5
X _T 72/52 ^{hr}	47,8	48,9	2,00	-2,2	-4,0
X _T 42/52 ^{hr}	45,1	47,6	-2,00	-5,2	-9,3
X _T 73/52 ^{hr}	46,0	47,9	-2,50	-4,0	-7,7
X _T 71/52 ^{hr}	49,5	47,5	2,50	4,3	-0,5

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

0,1523^{ns}

0,8358^{ns}

1,0000^{ns}

0,1746^{ns}

0,2651^{ns}

\bar{x}_{F1} – povprečna vrednost F₁ generacije, \bar{x} – povprečna vrednost obeh starševskih komponent,

SCA – specifična kombinacijska sposobnost, MPH – povprečna starševska heteroze, BPH – heterobeltiozis

Preglednica 20: Vrednosti PKS in učinek heteroze v F₁ generaciji za vse analizirane parametre – lokacija
Jabljje pri Trzinu

Preglednica 20: SCA values and heterosis effect in the F₁ generation for all analyzed parameters – location
Jabljje near Trzin

<i>T. aestivum × T. aestivum – Jablje pri Trzinu</i>		Pridelek zrnja			
		\bar{x}_{F_1}	\bar{x}	SCA	MPH
X _T 13/51 ^{Hr}	5916,7	7266,7	-226,70	-18,6	-22,5
X _T 50/51 ^{Hr}	6816,7	7400,0	226,70	-7,9	-10,7
X _T 48/51 ^{Hr}	7083,3	7358,3	140,00	-3,7	-7,2
X _T 28/51 ^{Hr}	5083,3	7841,7	-140,00	-35,2	-36,9
X _T 46/51 ^{Hr}	6583,3	7258,3	381,70	-9,3	-13,8
X _T 38/51 ^{Hr}	5966,7	6875,0	-381,70	-13,2	-21,8
X _T 72/51 ^{Hr}	6533,3	7158,3	-843,30	-8,7	-14,4
X _T 42/51 ^{Hr}	6233,3	7191,7	843,30	-13,3	-18,3
X _T 73/51 ^{Hr}	6100,0	7558,3	265,00	-19,3	-20,1
X _T 71/51 ^{Hr}	6283,3	7100,0	-265,00	-11,5	-17,7
X _T 13/52 ^{Hr}	7400,0	6783,3	-85,00	9,1	7,3
X _T 50/52 ^{Hr}	7566,7	6916,7	85,00	9,4	5,6
X _T 48/52 ^{Hr}	7350,0	6875,0	640,00	6,9	3,8
X _T 28/52 ^{Hr}	7800,0	7358,3	-640,00	6,0	-3,1
X _T 46/52 ^{Hr}	7083,3	6775,0	-201,70	4,6	2,9
X _T 38/52 ^{Hr}	7166,7	6391,7	201,70	12,1	7,5
X _T 72/52 ^{Hr}	6283,3	6675,0	-160,00	-5,9	-6,0
X _T 42/52 ^{Hr}	7666,7	6708,3	160,00	14,3	13,6
X _T 73/52 ^{Hr}	7450,0	7075,0	90,00	5,3	-0,5
X _T 71/52 ^{Hr}	7133,3	6616,7	-90,00	7,8	7,0

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ 0,0002** 0,0007** 1,0000^{ns} 0,0000** 0,0000**

<i>T. aestivum × T. aestivum – Jablje pri Trzinu</i>		Absolutna masa zrnja			
		\bar{x}_{F_1}	\bar{x}	SCA	MPH
X _T 13/51 ^{Hr}	48,0	43,6	0,20	10,3	-5,2
X _T 50/51 ^{Hr}	45,3	45,8	-0,20	-1,2	-10,7
X _T 48/51 ^{Hr}	47,3	47,6	-1,00	-0,5	-6,6
X _T 28/51 ^{Hr}	55,5	48,7	1,00	13,8	9,4
X _T 46/51 ^{Hr}	48,6	48,9	0,40	-0,5	-4,0
X _T 38/51 ^{Hr}	51,7	49,4	-0,40	4,6	2,0
X _T 72/51 ^{Hr}	49,4	47,7	3,00	3,5	-2,6
X _T 42/51 ^{Hr}	47,4	48,8	-3,00	-2,8	-6,4
X _T 73/51 ^{Hr}	54,2	49,7	-0,60	9,0	7,0
X _T 71/51 ^{Hr}	48,5	48,3	0,60	0,4	-4,3
X _T 13/52 ^{Hr}	45,8	43,4	0,80	5,4	-9,2
X _T 50/52 ^{Hr}	45,5	45,7	-0,80	-0,5	-9,8
X _T 48/52 ^{Hr}	44,7	47,5	-1,30	-5,9	-11,4
X _T 28/52 ^{Hr}	47,5	48,6	1,30	-2,2	-5,8
X _T 46/52 ^{Hr}	47,9	48,7	-0,90	-1,7	-5,0
X _T 38/52 ^{Hr}	48,3	49,3	0,90	-2,0	-4,2
X _T 72/52 ^{Hr}	50,2	47,6	2,10	5,4	-0,5
X _T 42/52 ^{Hr}	47,4	48,7	-2,10	-2,7	-6,1
X _T 73/52 ^{Hr}	48,3	49,6	-2,70	-2,8	-4,4
X _T 71/52 ^{Hr}	52,0	48,2	2,70	7,9	3,1

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ 0,1551^{ns} 0,8874^{ns} 1,0000^{ns} 0,1354^{ns} 0,2060^{ns}

\bar{x}_{F_1} – povprečna vrednost F₁ generacije, \bar{x} – povprečna vrednost obeh starševskih komponent,

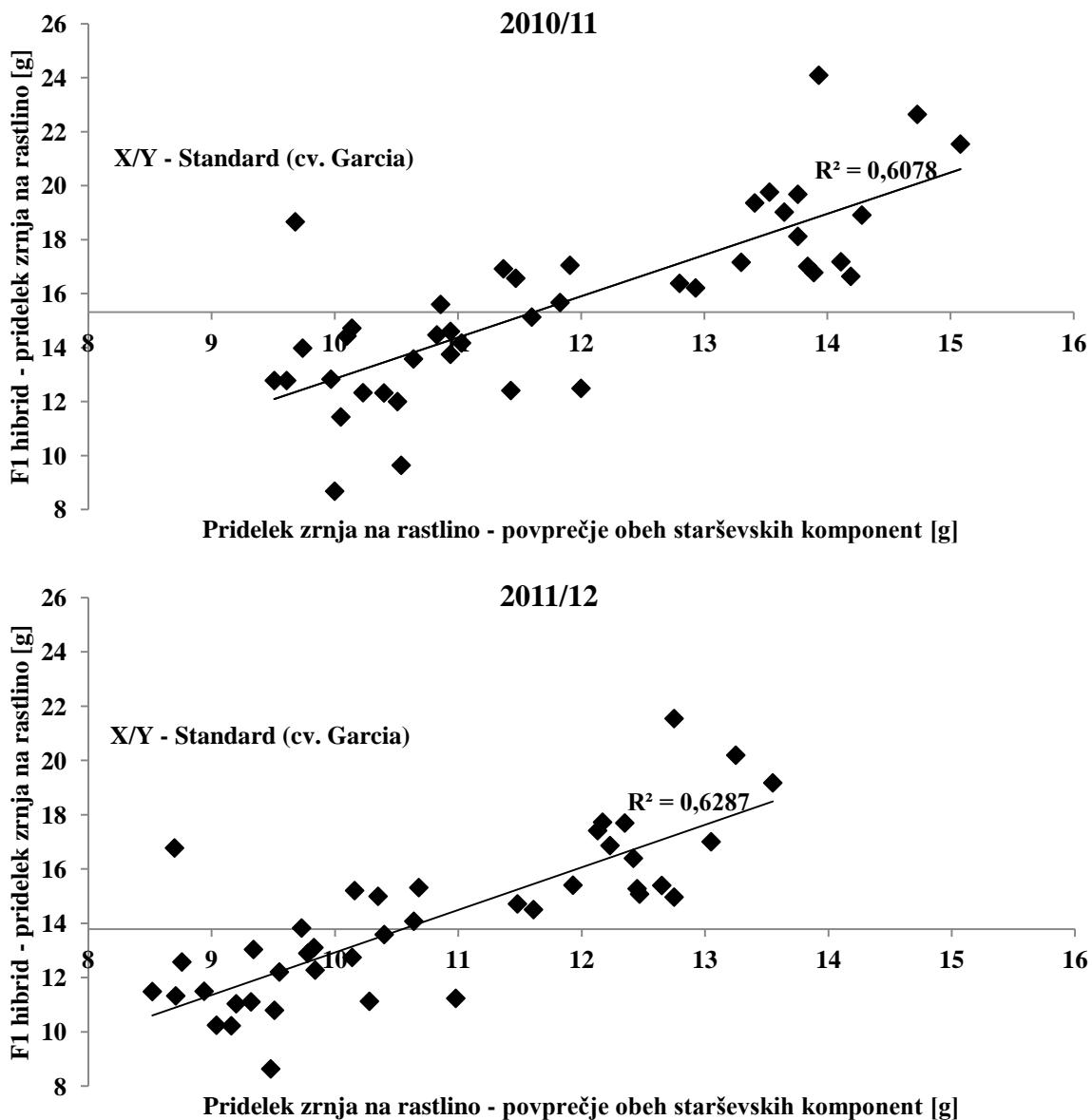
SCA – specifična kombinacijska sposobnost, MPH – povprečna starševska heteroze, BPH – heterobeltiozis

Testiranje KS linijskih sort navadne pšenice Poljoprivrednog instituta Osijek je temeljilo na kemični indukciji moške sterilnosti z uporabo sredstva CROISOR® 100. Uporaba navedenega sredstva je bila v sezoni 2009/10 predhodno preizkušena pri pridelavi hibridnega semena navadne pšenice poskusne kombinacije X_T 6/21 (cv. Inoui × cv. Ludwig). Stopnja hibridnosti semena poskusne kombinacije X_T 6/21 ob upoštevanju navodil podjetja SAATEN-UNION Rercherche s.a.s ni dosegla zakonsko določene meje (min. 95 %). Za testiranje KS linijskih sort navadne pšenice Poljoprivrednog instituta Osijek je bil zato postopek za kemično indukcijo moške sterilnosti izveden pri višjih porabah aktivne snovi na enoto površine. Kljub temu so bila med obema lokacijama za pridelavo hibridnega semena (Krog pri Murski Soboti in Osijek) opazne razlike v učinkovitosti komercialnega sredstva za kemično hibridizacijo. Zaradi tega bo postopek za kemično hibridizacijo navadne pšenice v naslednjih letih še dodatno modificiran z uporabo učinkovitejšega surfaktanta.

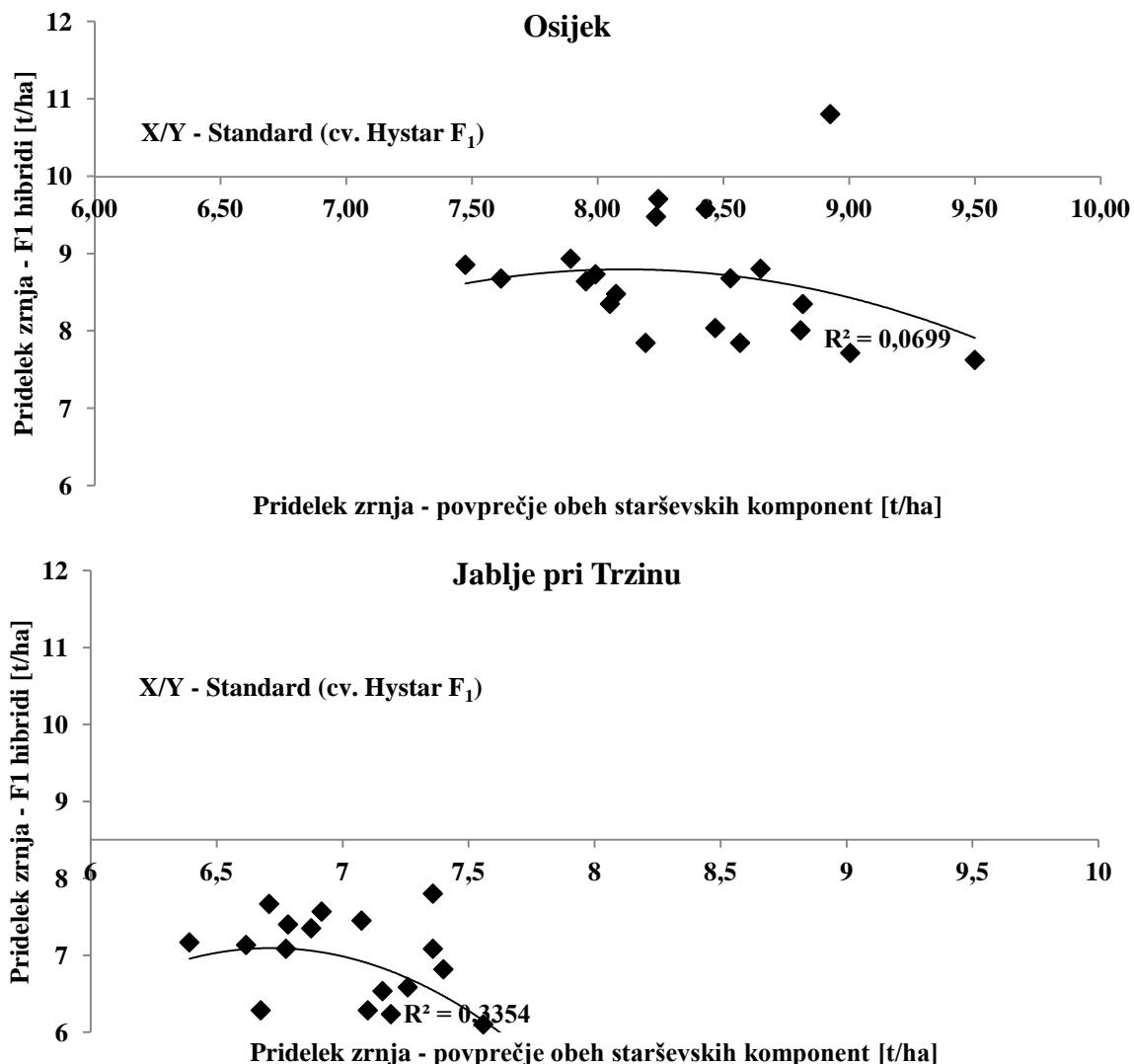
4.2.3 Kvantitativna analiza heteroze v skupini heksaploidnih pšenic z genomsko strukturo AABBDD

Za pridelek zrnja na enoto površine oziroma pridelek zrnja na rastlino, kot najpomembnejši preučevani parameter v naši študiji, je najvišja raven povprečne starševske heteroze pri linijskih sortah francoških žlahtniteljskih hiš znašala od 92,85 % (sezona 2010/11) do 95,96 % (sezona 2011/12), pri linijskih sortah Poljoprivrednog instituta Osijek pa od 14,29 % (Jablje pri Trzinu) do 21,03 % (Osijek). Najvišja vrednost za heterobeltiozis je pri linijskih sortah francoških žlahtniteljskih hiš znašala od 89,71 % (sezona 2010/11) do 91,58 % (sezona 2011/12), pri linijskih sortah Poljoprivrednog instituta Osijek pa od 13,58 % (Jablje pri Trzinu) do 13,91 % (Osijek) (preglednice 14, 15, 19, 20). Navedene vrednosti ne odstopajo od rezultatov podobnih študij. Pickett (1993) navaja, da lahko vrednosti za heterobeltiozis pri navadni pšenici, ko so meritve opravljene na posamezni rastlini znašajo tudi do 160,4 %, ob upoštevanju gostote setve, ki se približuje setveni gostoti standardnih sort, pa da te vrednosti sežejo do 40,7 %.

Cisar in Cooper (2002) sta mnenja, da tipična distribucija standardne heteroze (vrednost SH) za pridelek zrnja F₁ hibridnih kombinacij zavzema obliko normalne porazdelitve. V naši študiji pri nobeni preučevani dednini (linijske sorte francoških žlahtniteljskih hiš in Poljoprivrednog instituta Osijek) vrednosti za razliko med pridelkom zrnja F₁ križancev in standardnim kultivarjem niso zavzemale oblike normalne porazdelitve. Z integriranjem funkcij, katerih premice oziroma krivulje so prikazane v slikah 15 in 16 namreč nikoli nismo dobili enakih vrednosti za ploščine nad in pod abscisno osjo (upošteve so le najvišje r_{xy} vrednosti). Predvidevamo, da je glavni razlog za to, da vrednosti ne zavzemajo obliko normalne porazdelitve v majhnem številu preučevanih F₁ hibridnih kombinacij in predselekciji starševskih komponent.



Slika 15: Distribucija heteroze za pridelek zrnja pri študiju linijskih sort francoskih žlahntiteljskih hiš
Figure 15: Heterosis distribution for the grain yield in the study of line varieties of the french breeding houses



Slika 16: Distribucija heteroze za pridelek zrnja pri študiju linijskih sort Poljoprivrednog instituta Osijek

Figure 16: Heterosis distribution for the grain yield in the study of line varieties of the Agricultural institute of Osijek

Kvantitativna analiza heteroze v dveh različnih dedninah navadne pšenice je pokazala, da obstaja potencial za izkoriščanje heteroze v smislu razvoja hibridnih sort, vendar je iz komercialnega vidika nujno dvigniti raven standardne heteroze. Raven standardne heteroze je možno dvigniti s povečanjem števila testiranih F₁ hibridnih kombinacij in z zvišanjem genetske raznolikosti v dani dednini. Število testiranih F₁ hibridnih kombinacij zavisi od tehničnih zmogljivosti in velikosti dednine, genetsko raznolikost starševskih komponent pa je možno zvišati na dva načina (Longin in sod., 2012; Morten, 2012):

- z recipročnimi križanjji med jarimi in ozimnimi akcesijami navadne pšenice,
- z med-vrstnimi in znotrajvrstnimi križanjji,
- z oblikovanjem heterotičnih avto in aloploidov (angl. synthetic wheat).

Longin in sod. (2012) navajajo, da je križanje med ozimnimi in jarimi formami navadne pšenice sicer perspektivno za zvišanje ravni povprečne starševske heteroze in heterobeltiozisa za pridelek zrnja, vendar pa to pogosto vodi do težav z odpornostjo na nizke temperature, spremenijo se zahteve glede vernalizacije in lahko pride do nezaželenih fotoperiodičnih reakcij. Zaradi tega smo v naši študiji raje preverili vpliv sorodnikov navadne pšenice z genomsko strukturo AABBDD na raven heteroze za pridelek zrnja na rastlino, število klasov na rastlino in višino rastline.

Statistična analiza, ki je obsegala 39 znotrajvrstnih F_1 križancev (od prvotnih 43 znotrajvrstnih F_1 križancev so širje križanci *T. aestivum* subsp. *vulgare* \times *T. aestivum* subsp. *petropavlovskyi* zaradi hibridne nekroze propadli), pri tem ni potrdila višjih vrednosti za povprečno starševsko heterozo in heterobeltiozis za pridelek zrnja v primerjavi s predhodnima študijama, opravljenima na linijskih sortah francoskih žlahtiteljskih hiš in Poljoprivrednog instituta Osijek. Povprečna starševska heteroze za pridelek zrnja na rastlino je za vse analizirane znotrajvrstne F_1 križance znašala le 2,52 %, heterobeltiozis je pa pod enakimi pogoji dosegel celo negativno vrednost -17,69 % (preglednica 21).

Z našimi rezultati ne moremo potrditi, da akcesije pire (*Triticum spelta*) predstavljajo heterotično skupino, s katero je možno izboljšati raven heteroze v dednini navadne pšenice kot to navajajo Qixin in sod. (1997) ter Winzeler in sod. (1994). Kljub temu pa lahko trdimo, da sorodniki navadne pšenice, ki imajo podobno genomsko strukturo kot navadna pšenica (genom BAD) tudi omogočajo doseganje visoke ravni heteroze za pridelek zrnja. Konkreten primer je znotrajvrstni F_1 križanec Garcia \times *T. sphaerococcum* (številka akcesije 01C0201227), ki glede na vrednost povprečne starševske heteroze za pridelek zrnja (upoštevana je posamezna rastlina) presega večino F_1 križancev, zajetih v študiji linijskih sort francoskih žlahtiteljskih hiš, poleg tega pa pri istoimenskem parametru dosega tudi pozitivno vrednost za heterobeltiozis.

Preglednica 21: Učinek heteroze 39 znotrajvrstnih F₁ križancev
Table 21: Heterosis effect of 39 intra-specific F₁ hybrids

Znotrajvrstni F ₁ križanci	Število klasov na rastlino			Višina rastline			Pridelek zrnja na rastlino		
	\bar{x}	MPH	BPH	\bar{x}	MPH	BPH	\bar{x}	MPH	BPH
C _T 19 × KM 93-2000	6,8	-11,4	-17,1	90,4	8,0	-8,8	13,5	28,4	-10,4
C _T 19 × Epeautre Nain	8,1	-2,5	-14,7	92,3	9,0	-8,6	13,9	19,5	-7,8
C _T 19 × Schwabenspelz	9,7	7,5	-11,0	98,4	3,6	-19,1	12,1	4,3	-19,7
C _T 6 × Steiners tiroler dinkel	7,1	-12,6	-21,0	101,7	5,5	-15,2	9,6	-9,2	-35,3
C _T 6 × Epeautre Nain	8,0	-4,2	-16,1	95,6	9,9	-5,4	10,1	-12,8	-32,4
C _T 6 × Ostar	10,0	-0,3	-22,6	102,4	-1,3	-23,9	11,3	-5,7	-24,1
C _T 6 × Zeiners weisser dinkel	7,4	-12,8	-24,5	81,2	-1,3	-11,4	8,7	-16,3	-41,9
C _T 16 × Rouquin	10,1	12,3	-15,2	93,2	3,5	-14,9	12,2	15,8	15,3
C _T 16 × Desyanthum-Tabor	8,6	18,9	2,4	92,7	1,4	-17,4	8,0	-11,8	-23,7
C _T 16 × Blauer kolbendinkel	10,3	21,2	-5,8	103,2	11,3	-10,1	10,8	6,0	3,0
C _T 15 × Tmava	8,7	3,2	-14,2	96,6	10,3	1,4	11,4	18,2	16,9
C _T 15 × Gentile-tabor	9,8	8,8	-13,4	99,9	11,4	0,4	12,1	23,4	23,2
C _T 15 × Redoute	7,6	0,1	-10,2	101,9	2,5	-14,4	8,1	2,4	-17,5
C _T 15 × Rouquin	11,4	22,5	-4,2	95,4	0,8	-12,9	10,9	7,3	3,3
C _T 3 × Baettig-Niederwill	11,0	4,2	-25,1	98,2	15,4	-1,8	13,3	20,9	15,5
C _T 3 × Ostar	7,2	-25,5	-44,3	99,1	-3,1	-26,3	8,9	-8,8	-15,0
C _T 19 × Harrisson barbee	5,4	-6,6	-23,9	80,2	8,0	0,1	8,9	-13,6	-41,3
C _T 19 × Tiroler frueher binkel	6,0	-9,8	-15,9	84,6	8,4	-3,5	9,1	-17,1	-39,9
C _T 1 × Blauroter binkel	8,5	56,3	25,4	94,4	10,7	-3,3	14,3	43,4	36,1
C _T 1 × Little club	6,1	39,6	31,9	75,2	0,5	-1,9	11,4	15,3	10,4
C _T 1 × Harrisson barbee	4,3	0,7	-3,8	79,0	3,1	-1,5	7,7	3,7	-18,5
C _T 6 × Tiroler frueher binkel	7,7	15,9	7,8	85,3	6,2	-2,7	10,2	-5,7	-31,3
C _T 6 × Blauroter binkel	7,6	8,5	5,6	90,3	5,9	-7,5	16,5	29,6	10,6
C _T 16 × Shloucena	5,2	9,1	-14,0	88,4	1,8	-14,3	6,9	-9,5	-34,4
C _T 15 × Blauroter binkel	7,7	14,7	14,0	96,9	9,2	-0,8	12,8	26,0	21,6
C _T 15 × Harrisson barbee	5,9	4,5	-12,7	83,9	4,9	4,7	8,5	11,5	-13,5
C _T 3 × Tiroler frueher binkel	5,6	-11,9	-13,7	80,2	1,6	-8,5	8,1	-6,0	-22,6
C _T 19 × T. sphaerococcum...	12,3	36,7	13,2	90,0	10,4	-4,9	17,1	60,5	13,2
C _T 19 × Ruzyne	10,1	7,0	-14,1	95,8	12,1	-6,6	11,0	9,7	-27,0
C _T 6 × T. sphaerococcum...	11,7	29,9	7,7	91,0	8,6	-3,9	16,5	56,2	10,6
C _T 6 × Ruzyne	9,9	4,6	-15,9	92,6	5,5	-9,7	9,4	-5,2	-36,7
C _T 3 × Kolandi	7,6	-9,8	-27,1	89,8	7,2	-7,8	6,8	-14,5	-35,4
C _T 3 × Ruzyne	8,8	-3,6	-25,5	92,7	7,4	-9,6	7,1	-7,4	-31,7
C _T 1 × T. macha..(IPK)	6,2	2,0	-23,2	107,3	14,9	-5,7	5,9	-7,9	-38,0
C _T 16 × T. macha..(IPK)	8,4	19,1	4,2	103,3	12,1	-9,2	5,1	-25,4	-51,0
C _T 15 × T. macha..(IPK)	7,9	7,2	-2,1	106,6	10,2	-6,2	6,2	-5,3	-36,8
C _T 15 × T. macha..(St Peter.)	8,7	-3,0	-22,4	100,7	7,2	-6,7	4,9	-25,6	-49,6
C _T 1 × T. vavilovii (Lenin.)	6,6	-17,4	-44,3	111,1	9,2	-14,8	3,5	-44,7	-63,3
C _T 6 × T. vavilovii..(Leningrad)	9,3	-2,0	-21,1	109,3	7,5	-16,2	4,4	-51,4	-70,7

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

0,2^{ns} 0,0** 0,0** 0,0** 0,6^{ns} 0,3^{ns} 0,0** 0,0** 0,0**

\bar{x} – povprečna vrednost obeh starševskih komponent, MPH – povprečna starševska heteroze,

BPH – heterobeltiozis

5 SKLEPI

- Analiza morfologije pelodnih zrn rastlin, ki so bile tretirane z derivatom oksanilne kisline, ki je dosegel statistično značilno najvišji odstotek moške sterilnosti pri navadni pšenici (4-bromoooksanilna kislina) in sredstvom za kemično hibridizacijo CROISOR® 100 je pokazala visoko stopnjo podobnosti. To dodatno potrjuje navedbe tujih avtorjev, da derivati oksanilne kisline in substituirani kinolini, kot je na primer aktivna snov sintofen, inducirajo moško sterilnost pri navadni pšenici (*Triticum aestivum*) na podoben način (inhibicija mikrosporogeneze).
- Najučinkovitejši derivati oksanilne kisline (npr. 4-bromoooksanilna kislina) se približajo, oziroma dosežejo podobno visok odstotek moške sterilnosti pri navadni pšenici kot sredstvo za kemično hibridizacijo CROISOR® 100 samo pri poznejši aplikaciji in pri višji porabi aktivne snovi.
- Delovanje sredstva CROISOR® 100 je v primerjavi z derivatom oksanilne kisline, ki je dosegel statistično značilno najvišji odstotek moške sterilnosti pri navadni pšenici (4-bromoooksanilna kislina) manj selektivno. Pri preizkušanju navedenih kemikalij na šestih različnih kultivarjih navadne pšenice se je ob upoštevanju navodil za aplikacijo sredstva CROISOR® 100 izkazalo, da derivat 4-bromoooksanilna kislina deluje na tretirane rastline manj fitotoksično, kar pomeni manjša redukcija višine rastline in števila klaskov.
- Na podlagi učinkovitosti derivatov oksanilne kisline v smislu indukcije moške sterilnosti pri navadni pšenici in njihove selektivnosti lahko sklepamo, da v tej skupini kemikalij obstaja potencial za razvoj sodobnih sredstev za kemično hibridizacijo.
- Statistična analiza kombinacijske sposobnosti in učinka heteroze za pridelek zrnja je pri obeh preučevanih dedninah navadne pšenice pokazala, da ima višanje produktivnosti obeh starševskih komponent (vrednost \bar{x}) prej negativni kot pozitivni vpliv na učinek heteroze za pridelek zrnja, izražen z MPH in BPH vrednostjo.
- Doseženi rezultati pri statistični analizi kombinacijske sposobnosti in učinka heteroze za pridelek zrnja dodatno potrjujejo že znano dejstvo, da je predpogoj za učinkovito izkoriščanje heteroze v dani dednini navadne pšenice doseganje visokih vrednosti za specifično kombinacijsko sposobnost.

- Prevladajoč vpliv aditivnega učinka genov (splošna kombinacijska sposobnost) nad ne-aditivnim učinkom genov (specifična kombinacijska sposobnost) je dober pokazatelj za učinkovito izkoriščanje heteroze v dani dednini navadne pšenice.
- Oblikovanje F_1 križancev med navadno pšenico in njenimi sorodniki s podobnim genomom, kot ga ima navadna pšenica (genom BAD), lahko rezultira s potencialom za pridelek zrnja na posamezno rastlino, ki je višji od potenciala najprodukтивnejših F_1 križancev *T. aestivum* subsp. *vulgare* \times *T. aestivum*. subsp. *vulgare*.
- Statistična analiza kombinacijske sposobnosti in kvantitativna analiza heteroze v obeh preučevanih dedninah navadne pšenice potrjujeta potencial za komercialni razvoj hibridnih sort, vendar pa je za večjo konkurenčnost potrebno povečati število testiranih F_1 hibridnih kombinacij.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Rast svetovnega prebivalstva močno vpliva na dogajanje povezano s pridelavo pšenice (*Triticum* spp.). Ob upoštevanju, da se površine namenjene pridelavi pšenice na globalni ravni v zadnjih dvajsetih letih stalno znižujejo, svetovni trend porabe pšenice pa kaže stalno rast, predstavlja edino rešitev pred pomanjkanjem te vrste žita hitrejša rast pridelkov na lokalni, regionalni, državni in svetovni ravni (Grain ..., 2012). Danes se na območju Osrednje Evrope letni prispevek žlahtnjenja k rasti povprečnega pridelka zrnja navadne pšenice (*Triticum aestivum L.*) praktično ne pozna, kar pomeni, da bo potrebno v bližnji prihodnosti preiti na učinkovitejše pristope za razvoj novih sort navadne pšenice. To pomeni, da bo potrebno najti alternativo linijskim sortam navadne pšenice na katerih danes skoraj v celoti temelji pridelava pšenice. Zaradi genetske strukture sort, ki je možna pri samoprašnih vrstah žit se po večletnem zatonu ponovno v ospredje postavlja razvoj hibridnih sort navadne pšenice, ki omogočajo izkoriščanje genetskega fenomena heteroze (Longin in sod., 2012).

Komercialno izkoriščanje heteroze (genetski fenomen, ki se ga najpogosteje povezuje s superiornim stanjem heterozigotnega potomstva prve filialne generacije nad homozigotno starševsko generacijo) je najdlje znano pri tujeprašnih rastlinskih vrstah, kot sta koruza (*Zea mays L.*) in rž (*Secale cereale L.*). Pri izrazito samoprašnih rastlinskih vrstah, kot je na primer navadna pšenica, so se v preteklosti številni poskusi za izkoriščanje tega genetskega fenomena končali neuspešno, oziroma so dosegli omejen uspeh. Glavni razlog za to predstavljajo zahtevni postopki indukcije moške sterilnosti, ki pri samoprašnih rastlinskih vrstah omogočajo tujeprašnost (osnovni pogoj za pridelavo hibridnega semena). Za indukcijo moške sterilnosti pri navadni pšenici so bili v preteklosti predlagani različni pristopi na genetski, kemični in transgeni ravni. Danes razvoj hibridnih sort navadne pšenice najpogosteje temelji na uporabi sredstev za kemično hibridizacijo (Longin in sod., 2012).

Na območju Evropske Skupnosti ima danes dovoljenje za uporabo izdano le sredstvo za kemično hibridizacijo CROISOR® 100 (aktivna snov sintofen). To dovoljenje je zaenkrat omejeno le na območje Francije, potekajo pa postopki za razširitev tega dovoljenja na ostale članice Evropske skupnosti (Lein, 2012). Glavna pomanjkljivost sredstva CROISOR® 100 je ozek interval za aplikacijo, ko lahko aktivna snov sintofen inducira zadovoljivo stopnjo moške sterilnosti (> 98 %). Na osnovi predhodne študije Chakraborty-ja in Devakumar-ja (2006), ki obravnava podobno tematiko smo se odločili, da preverimo učinkovitost in selektivnost delovanja derivatov oksanilne kisline v smislu indukcije moške sterilnosti pri navadni pšenici v primerjavi z že uveljavljenim sredstvom CROISOR® 100. V ta namen smo devet derivatov oksanilne kisline, ki so bili sintetizirani in modificirani v

vodotopno stanje na Odseku za organsko in fizikalno kemijo, Instituta "Jožef Stefan" (etil 4-bromooksanilat, etil 4-cianooksanilat, etil 4-fluorooksanilat in njihovi analogi v obliki kislin in soli) preizkušali skupaj s sredstvom CROISOR® 100 dve sezoni (2009/10 in 2010/11) na dveh lokacijah (Jablje pri Trzinu in Krog pri Murski Soboti). Poljski poskus je pri tem poleg faktorja aktivna snov vključeval še faktorja fenofaza in porabo aktivne snovi.

Rezultati statistične analize so pokazali, da najučinkovitejši derivat oksanilne kislina (4-bromooksanilna kislina) dosega učinkovitost sredstva CROISOR® 100 vendar pa samo pri višji porabi aktivne snovi in v poznejši fazи organogeneze. Sredstvo CROISOR® 100 se je zadovoljivemu odstotku moške sterilnosti, ki mora biti dosežen pri pridelavi hibridnega semena navadne pšenice ($> 98\%$) približalo oz. ga je preseglo večinoma že pri drugi porabi aktivne snovi (1400 g ha^{-1}) in to pri vseh fenofazah. Na drugi strani je 4-bromooksanilna kislina zaželeno učinkovitost dosegla pri višjih porabah aktivne snovi (od 2100 g ha^{-1} naprej) in to takrat, ko je bilo socvetje navadne pšenice večinoma daljše od 15 mm.

Razvoj sodobnih sredstev za kemično hibridizacijo se nadaljuje predvsem v smeri doseganja boljše selektivnosti gametocidnega delovanja ter manjšega vpliva na okolje. Analiza pelodnih zrn rastlin tretiranih z derivatom oksanilne kislina, ki je induciral najvišji odstotek moške sterilnosti (4-bromooksanilna kislina) in sredstvom CROISOR® 100 je pokazala številne podobnosti glede morfologije. To dodatno potrjuje navedbe tujih avtorjev, da derivati oksanilne kislina in substituirani kinolini (npr. aktivna snov sintofen) inducirajo moško sterilnost pri navadni pšenici na podoben način (inhibicija mikrosporogeneze). Temelječ na učinkovitem delovanju 4-bromooksanilne kislina in njeni podobnosti s sredstvom CROISOR® 100 kar se tiče načina delovanja smo v sezoni 2010/11 na lokaciji Jablje pri Trzinu preverili še selektivnost obeh aktivnih snovi (4-bromooksanilne kislina in sintofen). V tem poskusu, ki je poleg faktorja aktivna snov obsegal še faktor genotip (šest različnih kultivarjev navadne pšenice) in faktor fenofaza se je izkazalo, da je delovanje sredstva CROISOR® 100 manj selektivno v primerjavi s 4-bromooksanilno kislino. Aktivna snov sintofen je sicer dosegla statistično značilno višji odstotek moške sterilnosti, vendar pa je za njeno delovanje bila značilna izrazita fitotoksičnost. V primerjavi s kontrolo (brez tretiranja) je najvišja redukcija višine tretiranih rastlin pri uporabi sredstva CROISOR® 100 znašala 21,4 %, pri uporabi 4-bromooksanilne kislina pa le 8,9 %.

Poleg učinkovitega sistema za indukcijo moške sterilnosti predstavlja pogoj za uspešno izkoriščanje heteroze pri navadni pšenici tudi dednina na kateri temelji razvoj hibridnih sort. V naši raziskavi smo potencial za razvoj hibridnih sort navadne pšenice določili pri dveh dedninah, ki sta na območju Republike Slovenije najširše zastopani (linijske sorte francoskih žlahniteljskih hiš in linijske sorte Poljoprivrednog instituta Osijek). Za štirinajst linijskih sort francoskih žlahniteljskih hiš in dvanaejst linijskih sort

Poljoprivrednog instituta Osijek je bil potencial za razvoj hibridnih sort ocenjen s testiranjem kombinacijske sposobnosti in določitvijo ravni heteroze, ki so jo dosegli testirani F₁ hibridi.

Testiranje kombinacijske sposobnosti je pri obeh dedninah temeljilo na modelu Linija × Tester. V statistično analizo kombinacijske sposobnosti linijskih sort francoskih žlahtniteljskih hiš je bilo vključenih 42 F₁ križancev (6 linij × 8 testerjev), katerih seme je bilo pridobljeno s pomočjo klasične emaskulacije. Hibridno seme je bilo v sezонаh 2010/11 in 2011/12 na Seleksijskem centru Ptuj posejano skupaj s pripadajočimi starševskimi komponentami in standardnim kultivarjem po metodi slučajnega bloka s štirimi ponovitvami. Za namen testiranja kombinacijske sposobnosti dvanajstih linijskih sort Poljoprivrednog instituta Osijek je bilo s pomočjo sredstva CROISOR® 100 v sezoni 2010/11 na lokacijah Osijek in Krog pri Murski Soboti pridelano seme 20 F₁ križancev (10 linij × 2 testerja). Ti križanci so bili v sezoni 2011/12 skupaj s pripadajočimi starševskimi komponentami in standardnim kultivarjem posejani po metodi slučajnega bloka s štirimi ponovitvami na lokacijah Osijek in Jablje pri Trzinu. Dimenzije posamezne parcelice so znašale 7,5 m × 1 m. Pri tem je potrebno poudariti, da je bil postopek za pridelavo hibridnega semena s pomočjo kemične hibridizacije preverjen v sezoni 2009/10 na lokaciji Krog pri Murski Soboti.

Statistična analiza kombinacijske sposobnosti je bila pri obeh dedninah opravljena s pomočjo programa AGROBASE Generation II® (AGROBASE ..., 2012) in je temeljila na določitvi aditivnega učinka genov (splošna kombinacijska sposobnost) in ne-aditivnega učinka genov (specifična kombinacijska sposobnost). Rezultati statistične analize so pokazali, da je bil vpliv aditivnega in ne-aditivnega učinka genov v obeh sezona oziroma na obeh lokacijah statistično značilen za vse obravnavane parametre. Pri tem se je tudi v naši raziskavi izkazalo, da je velika razlika med aditivnim in neaditivnim učinkom genov v prid aditivnega učinka genov dober pokazatelj za uspešno izkoriščanje heteroze v dani dednini.

Kvantitativna analiza heteroze je v obeh dedninah navadne pšenice, ki sta najširše zastopani na območju Republike Slovenije potrdila, da obstaja potencial za razvoj hibridnih sort. Najvišja raven povprečne starševske heteroze za pridelek zrnja kot najpomembnejši preučevani parameter je pri F₁ križancih, ki so temeljili na linijskih sortah francoskih žlahtniteljskih hiš znašala 95,96 %, pri linijskih sortah Poljoprivrednog instituta Osijek pa 14,29 %. Da bi preverili možnost za dodatno zvišanje ravni heteroze v dani dednini navadne pšenice smo v sezoni 2010/11 na Seleksijskem centru Ptuj opravili znotrajvrstna (angl. intra-specific) križanja med navadno pšenico in njenimi sorodniki s podobnim genom (genom BAD). V statistični analizi je bilo zajetih 39 znotrajvrstnih F₁ križancev, ki so bili v sezoni 2011/12 posejani skupaj s pripadajočimi starševskimi komponentami na Seleksijskem centru Ptuj (slučajni blok s tremi ponovitvami). Rezultati

analize so pokazali, da lahko oblikovanje znotrajvrstnih F₁ križancev rezultira z visokim heterotičnim učinkom. Konkreten primer je znotrajvrstni F₁ križanec Garcia × T. sphaerococcum (številka akcesije 01C0201227), ki glede na vrednost povprečne starševske heteroze za pridelek zrnja (upoštevana je posamezna rastlina) presega večino F₁ križancev, ki temeljijo na linijskih sortah francoskih žlahniteljskih hiš.

Ob upoštevanju vsega napisanega lahko zaključimo, da opravljena študija vseskozi temelji na bazičnih raziskavah, ki poskušajo skozi oblikovanje F₁ križancev doseči aplikativno uporabno vrednost.

6.2 SUMMARY

The human population growth has an important impact on the activities related to the production and cultivation of wheat (*Triticum* spp.). Considering that within the last twenty years areas intended for wheat production have been constantly shrinking on a global level and the global wheat consumption trend indicates a steady increase, the only solution against the shortage of this cereal species seems to be a faster growth of yield on a local, regional, national and global level (Grain ..., 2012). In the Central Europe, the annual contribution of breeding work to the growth of an average grain yield of common wheat (*Triticum aestivum* L.) practically isn't evident. This means that in the near future it will be necessary to find an alternatives for inbred varieties which now prevailing in the wheat production. According to several authors the alternative to inbred varieties represent the development of hybrid varieties which allow the exploitation of genetic phenomenon heterosis (Longin in sod., 2012).

Commercial exploitation of heterosis (genetic phenomenon, which is most commonly associated with the superiority of first filial generation over the homozygous parental generation) has for a long time been known in open-pollinated plant species, such as maize (*Zea mays* L.) and rye (*Secale cereale* L.). In markedly self-pollinated plant species, such as common wheat, for example, past numerous attempts to exploit this genetic phenomenon either failed ingloriously or have achieved limited success. The main reason for this can be found in challenging procedures for the induction of male sterility, which in case of self-pollinated plant varieties enable open-pollination – the primary condition for the hybrid seed production. As regards the induction of male sterility in common wheat, various approaches on genetic, chemical and transgenic level have been proposed in the past. Nowadays the development of hybrid varieties of common wheat is most frequently based on the application of chemical hybridizing agents (Longin in sod., 2012).

Presently, in the European Union only a chemical hybridizing agent CROISOR® 100 (active substance sintofen) has been granted license for use. This license is currently limited only to the territory of France, however, procedures for extending this licence to

other members of the European Union are underway (Lein, 2012). The main deficiency of CROISOR® 100 is a narrow application interval in which the active substance sintofen can induce a satisfactory level of male sterility (> 98%). On the basis of a preliminary study conducted by Chakraborty and Devakumar (2006), which discusses a similar subject matter, we have decided to test the efficiency and selectivity of oxanilic acid derivatives in terms of potential chemical hybridizing agents for common wheat. For this purpose, nine oxanilic acid derivatives, which were synthesized and modified to a water-soluble state at the Laboratory of Organic and Bioorganic Chemistry at the Institute "Jožef Stefan" (ethyl 4-bromo oxanilate, ethyl 4-cyano oxanilate, ethyl 4-fluoro oxanilate and their analogues in the form of acids and salts), have been undergoing tests together with CROISOR® 100 for two seasons (2009/10 and 2010/11) on two locations (Jablje near Trzin and Krog near Murska Sobota). In addition to the active substance factor, the field trial also included factors phenophase and dose.

The results of the statistical analysis showed that the most effective oxanilic acid derivative (4-bromo oxanilic acid) achieved the efficiency of the agent CROISOR® 100, but in the higher doses and in the subsequent phenophase. CROISOR® 100 got closer to the satisfactory percentage of male sterility, which should be reached in the hybrid seed production of the common wheat (> 98%), or exceeded this percentage in most cases as early as in the second dose (1400 g ha^{-1}) in all studied phenophases. On the other hand, 4-bromo oxanilic acid, in most cases, achieved the desired efficiency in higher consumption of the active substance (from $2,100\text{ g ha}^{-1}$ onwards) and namely when the inflorescence of common wheat was longer than 15mm.

The development of contemporary chemical hybridizing agents is moving towards achieving better selectivity of gametocidal activity and less harmful environmental impact, in particular. The analysis of pollen grains of plants treated with the oxanilic acid derivative, which has induced the highest percentage of male sterility (4-bromo oxanilic acid) and CROISOR® 100, showed numerous similarities as regards their morphology. This further confirms statements of several authors that oxanilic acid derivatives and substituted quinolines (such as the active substance sintofen) induce male sterility in common wheat in a similar manner (microsporogenesis inhibition). Based on effective activity of 4-bromo oxanilic acid and its similarity to CROISOR® 100 as regards the manner of activity, we also examined the selectivity of both active substances (4-bromo oxanilic acid and sintofen) in the season 2010/11 on the location Jablje near Trzin. This field trial which in addition to the factor active substance also comprised the factor genotype (six different cultivars of common wheat) and the factor phenophase showed that the activity of CROISOR® 100 was less selective in comparison to 4-bromo oxanilic acid. The active substance sintofen otherwise achieved a statistically significant higher percentage of male sterility, but in comparison to the control (without treatment), the

highest reduction in the plant height amounted to 21.4 %, and only 8.9 % in the case of 4-bromo oxanilic acid.

In addition to the efficient system for the induction of male sterility, one of the conditions for a successful exploitation of heterosis in common wheat is also germplasm, which is the basis for the development of hybrid varieties. In our research, the potential for the development of hybrid varieties of common wheat was determined in two germplasms, which are most common in the territory of the Republic of Slovenia. For fourteen line varieties of the French breeding institutions and twelve line varieties from the Agricultural Institute Osijek the potential for the development of hybrid varieties were assessed by the testing of combining ability and determining the level of heterosis which was achieved with tested F₁ hybrids.

The testing of combining ability in both germplasms was based on the Line × Tester model. The statistical analysis of combining ability for thirteen line varieties of the French breeding institutions included 42 F₁ hybrids (6 lines × 8 testers), the seed of which was obtained by the use of classical hand emasculation. In the seasons 2010/11 and 2011/12, the hybrid seed was sown together with the corresponding parental components and standard cultivar on the Selection Centre Ptuj. The experiment was based on a randomized block design with four replicates. For the purpose of testing the combining ability of twelve line varieties from the Agricultural Institute Osijek, in the season 2010/11, the seed of twenty F₁ hybrids (10 lines × 2 testers) was produced by the use of the agent CROISOR® 100. The hybrid seed production took place on the location Osijek and Krog near Murska Sobota. In the season 2011/12 these hybrids were sown together with the corresponding parental components and standard cultivar on location Osijek and Jablje near Trzin. The experiment was based on a randomized block design with four replicates (plot dimensions: 7,5 m × 1 m). It should be noted that the procedure for the production of hybrid wheat seed by the use of the chemical hybridization was checked in the season 2009/10 on the location Krog near Murska Sobota.

The statistical analysis of the combining ability in both germplasms was conducted with the statistical package AGROBASE Generation II® (AGROBASE ..., 2012) and was based on determining the additive genetic effect (general combining ability) and non-additive genetic effect (specific combining ability). The statistical analysis showed that the impact of additive and non-additive genetic effect in both seasons and in both locations was statistically significant for all parameters. Our study also showed that a high discrepancy between the additive and non-additive genetic effect in favour of the additive genetic effect, was a clear indicator for successful exploitation of the heterosis in a given germplasm.

The quantitative analysis of heterosis in both germplasms of common wheat, which are most common in the territory of the Republic of Slovenia showed that there was a commercial potential for the development of hybrid varieties. The highest level for the midparent heterosis value for the grain yield as the most important studied parameter amounted to 95,96 % in the line varieties of the French breeding institutions and 14,29 % in the line varieties from the Agricultural Institute Osijek. In order to examine the possibility for the additional increase of the level of heterosis in the given germplasm of common wheat, we performed in the season 2010/11 at the Selection centre Ptuj intra-specific crosses between common wheat and its relatives with a similar genome (BAD genome). The statistical analysis of 39 intra-specific F₁ hybrids, which were sown together with corresponding parental components (randomized block design with three replicates) at the Selection Centre Ptuj in the season 2011/12, showed that the formation of intra-specific F₁ hybrids could result in a relatively high heterotic effect. A good example is an intra-specific F₁ hybrid Garcia × *T. sphaerococcum* (accession number: 01C0201227), which exceeded the majority of F₁ hybrids based on the line varieties of the French breeding institutions.

Considering the above facts, we can conclude that the study has been based on fundamental research work, which attempt to achieve the application value by forming of the F₁ hybrids.

7 VIRI

- Abe K., Osakabe K., Nakayama S., Endo M., Tagiri A., Todoriki S., Ichikawa H., Toki S. 2005. Arabidopsis RAD51C gene is important for homologous recombination in meiosis and mitosis. *Plant Physiology*, 139: 896–908
- AGROBASE Generation II®. 2012. Winnipeg Manitoba, Agronomix Software Inc. <http://www.agronomix.com/about.aspx> (3. mar. 2012)
- Albertsen M., Huffman G. 2002. Biotin binding compounds for induction of sterility in plants. US patent application US 2002/0129399 A1: 19 str.
- Andorf S., Selbig J., Altmann T., Poos K., Witucka-Wall H., Repsilber D. 2010. Enriched partial correlations in genome-wide gene expression profiles of hybrids (*A. thaliana*): a systems biological approach towards the molecular basis of heterosis. *Theoretical and Applied Genetics*, 120: 249–259
- Angus J.W. 1997. Hybrid wheat—a dream or reality? *Aspects of Applied Biology*, 50: 15–22
- Angus W. 2012. Agrii field days. London Stansted, Agrii (osebni vir, avgust, 2012)
- Armstrong D.J. 1994. Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. V: *Cytokinin, Chemistry, Activity and Function*. 1st ed. Mok D.W.S., Mok. 1. Boca raton, CRC Press: 139–154
- Balestre M., Von Pinho R.G., Souza J.C., Oliveira R.L. 2009. Potential use of molecular markers for prediction of genotypic values in hybrid maize performance. *Genetics and Molecular Research*, 8: 1292–1306
- Birchler J.A., Auger D.L., Riddle N.C. 2003. In search of the molecular basis of heterosis. *Plant Cell*, 15, 10: 2236–2239
- Birchler J.A., Yao H., Chudalayandi S. 2006. Unraveling the genetic basis of hybrid vigor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 35: 12957–12958
- Blouet A., Streiff K., Guckert A. 1999. Possibilities for hybrid seed production in wheat. V: *Heterosis and hybrid seed production in agronomic crops*. Amarjit B. (ed.). Binghamton, Food Products Press®: 81–108
- Borojević K. 1991. Geni i populacija. 1. izd. Novi Sad, Prirodno-matematički fakultet: 541 str.
- Borojević S. 1992. Principi i metodi oplemenjivanja bilja. 2. dopunjeno izdanje. Beograd, Naučna knjiga: 385 str.
- Briggle L.W. 1963. Heterosis in wheat: a review. *Crop Science*, 3: 407–412
- Bruce A.B. 1910. The Mendelian theory of heredity and the augmentation of vigor. *Science*, 32: 627–628
- Bruns R., Peterson C.J. 1998. Yield and stability factors associated with hybrid wheat. *Euphytica*, 100: 1–5

- Bucholtz D.L. 1988. Effect of environment and formulation on the absorption and translocation of fenridazon in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Growth Regulation, 7: 65–73
- Chakraborty K., Devakumar C. 2005a. Quantitative structure activity relationship analysis as a tool to evaluate the mode of action of chemical hybridizing agents for wheat (*Triticum aestivum* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 9: 3468–3475
- Chakraborty K., Devakumar C. 2005b. N acylanilines, herbicide CHA chimera, and amino acid analogues as novel chemical hybridizing agents for wheat (*Triticum aestivum* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 20: 7899–7907
- Chakraborty K., Devakumar C., 2006a. Evaluation of chemical compounds for induction of male sterility in wheat (*Triticum aestivum* L.). Euphytica, 147: 329–335
- Chakraborty K., Devakumar C., 2006b. Chemical hybridizing agents for chickpea (*Cicer arietinum* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 1868–1873
- Chen Z.J. 2010. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. Cell Press, 15, 2: 57–71
- Cheney V.B., Wright J.B., Hall C.M., Johnson H.G. 1978. Structure-activity correlations for a series of antiallergy agents. Oxanilic, quinaldic and benzopyran-2-carboxylic acids. Journal of Medicinal Chemistry, 21: 936–940
- Ciha A.J., Ruminski P.G. 1991. Specificity of pyridinemonocarboxylates and benzoic acid analogs as chemical hybridizing agents in wheat. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39: 2072–2076
- Cisar G., Cooper D.B. 2002. Hybrid wheat. V: Bread wheat. Curtis B.C., Rajaram S., Gómez Macpherson H. (eds.). Rome, FAO Plant Production and Protection Series: [1–11] <http://www.fao.org/docrep/006/Y4011E/y4011e0c.htm> (12.okt. 2012)
- Clofencet. 2012. London, Compendium of pesticide common names. <http://www.alanwood.net/pesticides/clofencet.html> (11. maj 2012)
- Cochran W.G. 1951. Improvement by means of selection. V: Proceedings 2nd Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability. Neyman J. (ed.). Berkeley, University of California Press: 449–470
- Corbellini M., Perenzin M., Accerbi M., Vaccino P., Borghi B. 2002. Genetic diversity in bread wheat, as revealed by coefficient of parentage and molecular markers, and its relationship to hybrid performance. Euphytica, 123: 273–285
- Cukadar B., Ginkel M. 2001. Yield potential of bread wheat hybrids produced by Genesis®. V: Proceedings of the Warren E. Kronstad. Reeves J., McNab A., Rajaram S. (eds.). Ciudad Obregon, CIMMYT: 99–101
- Dotlacil L., Apltauerova M. 1978. Pollen sterility induced by ethrel and its utilization in hybridization of wheat. Euphytica, 27: 353–360
- Drezner G. 2012. Tradicijsko održavanje dana polja pšenice i ječma. Osijek, Poljoprivredni institut Osijek (osebni vir, junij 2012)
- Driscoll C.J. 1972. XYZ system of producing hybrid wheat. Crop Science, 12: 516–517

- Driscoll S.P., Prins A., Olmos E., Kunert K.J., Foyer C.H. 2005. Specification of adaxial and abaxial stomata, epidermal structure and photosynthesis to CO₂ enrichment in maize leaves. *Journal of Experimental Botany*, 57, 2: 381–390
- Dubcovsky J., Dvorak J. 2007. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science*, 316: 1862–1866
- East E.M. 1936. Heterosis. *Genetics*, 21: 375–397
- embryo-specific parent-of-origin effects in hybrid maize. *Plant Cell*, 19, 8: 2391–2402
- Feng Z., Jin-Kuil G., Ying-Lil Y., Wen-Liang H., Li-Xin Z. 2004. Changes in the pattern of antioxidant enzymes in wheat exposed to water deficit and rewatering. *Acta Physiologia Plantarum*, 26, 3: 345–352
- Fenridazon. 2012. London, Compendium of pesticide common names.
<http://www.alanwood.net/pesticides/fenridazon.html> (11. maj 2012)
- Ferreira D.V., Von Pinho R.G., Balestre M., Oliveira R.L. 2010. Prediction of maize hybrid performance using similarity in state and similarity by descent information. *Genetics and Molecular Research*, 9, 4: 2381–2394
- Fischer S., Maurer H.P., Wurschum T., Möhring J., Piepho H.P., Schön C.C., Thiemt E.M., Dhillon B.S., Dhillon B.S., Weissmann E.A., Melchinger A.E., Reif J.C. 2010. Development of heterotic groups in triticale. *Crop Science*, 50: 584–590
- Fischer S., Möhring J., Schön C.C., Piepho H.P., Klein D., Schipprack W., Utz H.F., Melchinger A.E., Reif J.C. 2008. Trends in genetic variance components during 30 years of hybrid maize breeding at the University of Hohenheim. *Plant Breeding*, 127: 446–451
- GENOPLANTE. 2012. Paris Cedex, INRA Science & Impact.
[http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/SSRclub/Genetic Physical/](http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/SSRclub/Genetic%20Physical/) (7. apr. 2012)
- Gepts P. 1993. The use of molecular and biochemical markers in crop evolution studies. *Evolutionary Biology*, 27: 51–94
- Gils M., Marillonnet S., Werner S., Grützner R., Giritch A., Engler C., Schachschneider R., Klimyuk V., Gleba Y. 2008. A novel hybrid seed system for plants. *Plant Biotechnology Journal*, 6: 226–235
- Gowda M., Longin C.F.H., Lein V., Reif J.C. 2012b. Relevance of specific versus general combining ability effects in wheat. *Crop Science*, 52: 2494–2500
- Gowda M., Zhao Y., Maurer H.P., Weissmann E.A., Wurschum T., Reif J.C. 2012a. Best linear unbiased prediction of triticale hybrid performance. *Euphytica*: [1–8] DOI: 10.1007/s10681-012-0784-z
- Grain market report. 2012. London, International Grains Council.
<http://www.igc.int/en/publications/default.aspx> (3. dec. 2012)
- Guadagnuolo R., Savova-Bianchi D., Felber F. 2001. Gene flow from wheat (*Triticum aestivum* L.) to jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica* Host.), as revealed by RAPD and microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 1–8
- Guo M., Rupe M.A., Yang X., Crasta O., Zinselmeier C., Smith O.S., Bowen B. 2006. Genome-wide transcript analysis of maize hybrids: allelic additive gene expression and yield heterosis. *Theoretical and Applied Genetics*, 113, 5: 831–845

- Gupta P.K., Balyan H.S., Goyal A., Mohan A., Kumar S. 2008. An integrated physical map of 2072 SSRs loci (gSSR and ESTSSRs) in bread wheat. V: 11th International Wheat Genetics Symposium. Appels R., Eastwood R., Lagudah E., Landridge P., Mackay M., McIntyre L., Sharp P. (eds.). Sydney, Sydney University Press: 333–335
- Hale C.R., Coombe B.G., Hawker J.S. 1970. Effects of ethylene and 2-chloroethylphosphonic acid on the ripening of grapes. *Plant Physiology*, 45, 5: 620–623
- Havey M.J. 2004. The use of cytoplasmic male sterility for hybrid seed production. V: Molecular biology and biotechnology of plant organelles. Daniell H., Chase C. (eds.). Dordrecht, Springer: 623–635
- Henzel W.J., Billeci T.M., Stults J.T., Wong S.C. 1993. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 5011–5015
- Herbicide Uptake by Leaves and Cells. 2012. Davis, Plant and Soil Sciences eLibrary.
<http://plantandsoil.unl.edu/pages/index2col.php?category=croptechology> (11. nov. 2012)
- Hinze L.L., Lamkey K.R. 2003. Absence of epistasis for grain yield in elite maize hybrids. *Crop Science*, 43: 46–56
- Hollick J.B., Chandler V.L. 1998. Epigenetic allelic states of a maize transcriptional regulatory locus exhibit overdominant gene action. *Genetics*, 150, 2: 891–897
- Huang S., Crossland L.D., Cheikh N., Morris R.O. 2007. Reversible male sterility in transgenic plants by expression of cytokinin oxidase. US patent application US 7,230,168 B2: 32 str.
- Isozyme Purity Testing. 2012. Aurora, Biogenetic Services.
<http://www.biogeneticservices.com/isozymepurity.htm> (4. apr. 2012)
- Ivančič A. 2002. Hibridizacija pomembnejših rastlinskih vrst. 1. izd. Maribor, Fakulteta za kmetijstvo: 776 str.
- Jordan J.P. 1996. Heterosis. V: Increasing yield potential in wheat: breaking the barriers. Reynolds M.P. (ed.). Mexico City, CIMMYT: 66–75
- Kapoor S., Takatsuji H. 2006. Silencing of an anther-specific zinc-finger gene, *MEZ1*, causes aberrant meiosis and pollen abortion in petunia. *Plant Molecular Biology*, 61: 415–430
- Koemel J.E., Guenzi A.C., Carver B.F., Payton M.E., Morgan G.H., Smith E.L. 2004. Hybrid and pure line hard winter wheat yield and stability. *Crop Science*, 44: 107–113
- Kokemoer F.P., van Eeden E., Bonjean A.P. 2011. An overview of hybrid wheat production in South Africa and review of current worldwide wheat hybrid developments. V: The world wheat book—a history of wheat breeding. Bonjean A.P., Angus W.J. (eds.). Paris, Lavoisier Publishing: 907–950
- Krystkowiak K., Adamski T., Surma M., Kaczmarek Z. 2009. Relationship between phenotypic and genetic diversity of parental genotypes and the specific combining ability and heterosis effects in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica*, 165: 419–434

- Kunej T. 2010. RNA-interferenca (RNAi) v temeljnih raziskavah in biomedicini. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 31 str. http://www.uni.lj.si/files/ULJ/userfiles/ulj/studij_na_univerzi/podiplomski_studij/biomedicina/Urniki1011/2010_RNA%20interferenca_Genetski%20koncepti_16.11.pdf (5. maj 2012)
- Kusterer B., Muminovič J., Utz H.F., Piepho H.P., Barth S., Heckenberger M., Meyer R.C., Altmann T., Melchinger A.E. 2007. Analysis of a triple testcross design with recombinant inbred lines reveals a significant role of epistasis in heterosis for biomass-related traits in *Arabidopsis*. *Genetics*, 175, 4: 2009–2017
- Law J., Stoskopf N.C. 1973. Further observations on Ethephon (Ethrel) as a tool for developing hybrid cereals. *Canadian Journal of Plant Science*, 53: 765–766
- Lein V. 2012. Quel blé en 2025 ?. Estrées-Saint-Denis, SAATEN-UNION Recherche s.a.s. (osebni vir, junij, 2012)
- Li Z.K. 2001. Overdominant epistatic loci are the primary genetic basis of inbreeding depression and heterosis in rice. I. Biomass and grain yield. *Genetics*, 158: 1737–1753
- Lodish H., Berk A., Lawrence Z., Matsudaira P., Baltimore D. 1999. Synthesis and targeting of mitochondrial and chloroplast proteins. V: *Molecular Cell Biology*. Darnell J. (ed.). New York, W. H. Freeman: 136 str.
- Longin C.F.H., Mühleisen J., Maurer H.P., Zhang H., Gowda M., Reif J.C. 2012. Hybrid breeding in autogamous cereals. *Theoretical and Applied Genetics*, 125: 1087–1096
- Mahajan V., Nagarajan S. 1998. Opportunities in hybrid wheat. *Pinsa*, 64: 51–58
- Mansor S., Amin I., Hussain M., Zafar Y., Briddon R.W. 2006. Engineering of novel traits in plants through RNA interference. *Trends in Plant Science*, 11: 559–565
- Mariani C., Gossele V., De Beuckeleer M., De Block R.B., Goldberg W., De Greef W., Leemans J. 1992. A chimaeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature*, 357: 384–387
- Mariani C., De Beuckeleer M., Truettner J., Leemans J., Goldberg R.B. 1990. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature*, 347: 737–741
- Market C.L., Moller F. 1959. Multiple form of enzymes: tissue ontogenetic and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 45: 753–758
- Martin J.M., Talbert L.E., Lanning S.P., Blake N.K. 1995. Hybrid performance in wheat as related to parental diversity. *Crop Science*, 35: 104–108
- McRae D.H. 1985. Advances in chemical hybridization. *Plant Breeding Review*, 3: 169–191
- Melchinger A.E. 1993. Use of RFLP markers for analysis of genetic relationship among breeding materials and prediction of hybrid performance. V: *International crop science*. Buxton D.R., Shibles R., Forsberg R.A., Blad B.L., Asay K.H., Paulson G.M., Wilson R.F. (eds.). Madison, Crop Science Society of America, Wisconsin, USA: 621–628

- Melchinger A.E. 1999. Genetic diversity and heterosis. V: The genetics and exploitation of heterosis in crops. Coors J.G., Pandey S. (eds.). Madison, Crop Science Society of America, Wisconsin, USA: 99–117
- Melchinger A.E., Gumber R.K. 1998. Overview of heterosis and heterotic groups in agronomic crops. V: Concepts and breeding of heterosis in crop plants. Lamkey K.R., Staub J.E. (eds.). Madison, Crop Science Society of America, Wisconsin, USA: 29–43
- Mohr S., Schulte-Kappert E., Odenbach W., Oettler G., Kück U. 1993. Mitochondrial DNA of cytoplasmic male-sterile *Triticum timopheevi*: rearrangement of upstream sequences of the *atp6* and *orf25* genes. Theoretical and Applied Genetics, 86: 259–268
- Morten L. 2012. Synthetic wheat: an underutilized genetic resource in Nordic wheat breeding. Alnarp, NordGen: 15 str.
http://www.nordgen.org/ngdoc/plants/prebreeding/Session4_Morten_Lillemo.pdf (10. okt. 2012)
- Nawaz-ul-Rehman M.S. 2007. RNAi-mediated male sterility of tobacco by silencing *TA29*. Molecular Biotechnology, 36: 159–165
- Nemec J. 2009. Statistika. 2. izd. Maribor, Fakulteta za kmetijstvo: 156 str.
- Ng W.K.D., Lu J., Chen Z.J. 2012. Big roles for small RNAs in polyploidy, hybrid vigor and hybrid incompatibility. Current Opinion in Plant Biology, 15: 154–161
- Ni Z., Kim E.D., Ha M., Lackey E., Liu J., Zhang Y., Sun Q. 2009. Altered circadian rhythms regulate growth vigour in hybrids and allopolyploids. Nature, 457: 327–333
- Nikolić Z. 2010. Application of genetic markers in seed testing and plant breeding. Field and Vegetable Crops Research, 47, 2: 409–416
- Nikolić Z., Vujaković M., Jevitić A. 2008. Genetic purity of sunflower hybrids determined on the basis of isozymes and seed storage proteins. Helia, 31, 48: 47–54
- Oettler G., Tams S.H., Utz H.F., Bauer E., Melchinger A.E. 2005. Prospects for hybrid breeding in winter triticale: I. Heterosis and combining ability for agronomic traits in european elite germplasm. Crop Science, 45: 1476–1482
- Ogihara Y., Kurihara Y., Futami K., Tsuji K., Murai K. 1999. Photoperiod-sensitive cytoplasmic male sterility in wheat: nuclear-mitochondrial incompatibility results in differential processing of the mitochondrial *orf25* gene. Current Genetics, 36: 354–362
- Pallavi H.M., Bhanuprakash K., Vishwanath K., Shadakshari Y.G. 2010. Evaluation and confirmation of hybridity on the basis of seed proteins and isozymes in sunflower hybrids. Research Journal of Agricultural Sciences, 1, 3: 189–192
- Pesticides registration review. 2012. Washington, DC, Unites States Environmental Protection Agency.
http://www.epa.gov/opprrd1/registration_review/clofencet/index.html (12. dec. 2011)
- Pickett A.A. 1993. Hybrid wheat: results and problems. Advanced Plant Breeding, 15: 1–259
- Plant variety database. 2012. Geneva, International Union for the Protection of New Varieties of Plants. <http://www.upov.int/pluto/en/> (12. jun. 2012)

- Porter K.B., Foster J.P., Peterson G.A., Worrall W.D. 1985. Evaluation of chemical hybridizing agent SD 84811 in winter wheat. V: Information about the international annual meetings of the american society of agronomy. Hoffer R.M., Johannsen C.J. (eds.). Chicago, American Society of Agronomy: 63–67
- Pravilnik o trženju semena žit. Ur.l. RS, št. 91/2003
- Quixin S., Zhongfu N., Zhiyong L., Jianwei G., Tiecheng H. 1997. Use of RAPD markers to identify divergent heterotic groups and improve the heterosis of hybrid wheat. V: The Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops. Listman M. (ed.). Mexico City, CIMMYT: 68–69
- Reif J.C., Gumpert F., Fischer S., Melchinger A.E. 2007. Impact of genetic divergence on additive and dominance variance in hybrid populations. *Genetics*, 176: 1931–1934
- Rezultati sortnih poskusov. 2012. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije.
<http://www.kis.si/pls/kis/?kis.web?m=84&j=SI#nav>
- Roberston F.W., Reeve E.C. 1952. Heterozygosity, environmental variation and heterosis. *Nature*, 170, 4320: 286–286
- Röder M.S., Wendehake K., Korzun V., Bredemeijer G., Laborie D., Bertrand L., Isaac P., Rendell S., Jackson J., Cooke R.J., Vosman B., Ganal M.W. 2002. Construction and analysis of a microsatellite-based database of european wheat varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 67–73
- Rowell P.L., Miller D.G. 1974. Effect of 2-chloro-ethylphosphonic acid (ethephon) on female fertility of two wheat varieties. *Crop Science*, 14: 31–34
- Schnable P.S., Swanson-Wagner R.A. 2009. Heterosis. V: *Handbook of maize: Its biology*. Bennetzen J.L., Hake S.C. (eds.). New York, Springer Science, Business Media, LLC: 457–467
- Schoenenberger N., Felber F., Savova-Bianchi D., Guadagnuolo R. 2005. Introgression of wheat DNA markers from A, B and D genomes in early generation progeny of *Aegilops cylindrica* Host × *Triticum aestivum* L. hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*, 125: 1087–1096
- Schull G.H. 1908. The composition of field of maize. *American Breeding Association*, 4: 296–301
- Schull G.H. 1909. A pure line method of corn breeding. *American Breeding Association*, 5: 51–59
- Schultz P.J., Cross J.W., Almeida E. 1993. Chemical agents that inhibit pollen development: Effects of the phenylcinnoline carboxylates SC-1058 and SC-1271 on the ultrastructure of developing wheat anthers (*Triticum aestivum* L. var. Yecora raja). *Sexual Plant Reproduction*, 6: 108–121
- Sellstedt J.H., Guinossos C.J., Begany A.J., Bell S.C., Rosenthal M., 1975. Oxanilic acids, a new series of orally active antiallergic agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 18: 926–933
- Semel Y. 2006. Overdominant quantitative trait loci for yield and fitness in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103: 12981–12986

- Shoran J., Kant L., Singh R.P. 2003. Winter and spring wheat: An analysis of combining ability. Cereal Research Communications, 31: 347–354
- Sintofen. 2012. London, Compendium of pesticide common names.
<http://www.alanwood.net/pesticides/sintofen.html> (11. maj 2012)
- Skupni katalog sort poljščin. 2012. Ljubljana, Fitosanitarna uprava Republike Slovenije.
<http://www.furs.si/svn/seme/EUsortnaLista.asp> (12. jun. 2012)
- Small I. 2007. RNAi for revealing and engineering plant gene functions. Current Opinion in Biotechnology, 18: 148–153
- Springer N.M., Stupar R.M. 2007. Allele-specific expression patterns reveal biases and embryo-specific parent-of-spring effects in hybrid maize. Plant Cell, 19, 8: 2391–2402
- STATGRAPHICS® Centurion XVI. 2012. Warrenton, STATGRAPHICS®.
<http://www.statgraphics.com/contactus.htm> (12. feb. 2012)
- Stupar R.M., Springer N.M. 2006. *Cis* transcriptional variation in maize inbred lines B73 and Mo17 leads to additive expression patterns in the F1 hybrid. Genetics, 173, 4: 2199–2210
- Swanson-Wagner R.A. 2006. All possible modes of gene action are observed in a global comparison of gene expression in a maize F1 hybrid and its inbred parents. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103: 6805–6810
- Titan P., Iskra J., Meglič V. 2012. Kemična hibridizacija hermafroditnih rastlinskih vrst z lahkotopnimi derivati oksanilne kisline. Ljubljana, Urad Republike Slovenije za intelektualno lastnino, P-201200130: 23 str.
- Tschabold E.E., Heim D.R., Beck J.R., Wright F.L., Rainey D.P., Terando N.H., Schwer J.F. 1988. LY195259, new chemical hybridizing agent for wheat. Crop Science, 28: 583–588
- Veriti® Thermal Cycler. 2012. Carlsbad, Applied Biosystems.
<http://www.lifetechnologies.com/global/en/website-overview/ab-welcome.html> (12.nov. 2012)
- Virmani S.S., Sun Z.X., Mou T.M., Jahuar A.A., Mao C.X. 2003. Male sterility systems in rice. V: Two-line hybrid rice breeding manual. Hardy B. (ed.). International Rice Research Institute Los Baños: 5–14
- Wang X., Singer S.D., Liu Z. 2011. Silencing of meiosis-critical genes for engineering male sterility in plants. Plant Cell Replication, 31, 4: 747–756
- Waghese T.M., Singh R.K., Choudhary B.D. 1976. Biometrical techniques in genetics and breeding. 1. izd. Hissar, International Bioscience Publishers: 248 str.
- Wheat taxonomy. 2012. Manhattan, Wheat Genetic and Genomic Resources Center.
<http://www.k-state.edu/wgrc/Taxonomy/comptri.html> (11. sep. 2012)
- Winzeler H., Schmid J.E., Winzeler M. 1994. Analysis of the yield potential and yield components of F₁ and F₂ hybrids of crosses between wheat (*Triticum aestivum* L.) and spelt (*Triticum spelta* L.). Euphytica, 74: 211–218
- Wong M., Blouet A., Guckert A. 1995. Effectiveness of SC2053 as a chemical hybridizing agent for winter wheat. Plant Growth Regulation, 16: 243–248

Zakon o semenskem materialu kmetijskih rastlin. Ur.l. RS, št. 25/2005

ZAHVALA

Doktorska disertacija je rezultat sodelovanja med naslednjimi podjetji in inštituti: SEMENARNA Ljubljana, d.d., Kmetijski inštitut Slovenije, Institut "Jožef Stefan" in Poljoprivredni institut Osijek. Znanstveno in strokovno delo je bilo koordinirano z mentorstvom izr. prof. dr. Vladimirja Megliča za kar se mu iskreno zahvaljujem. Iskrena zahvala gre tudi ekipi, ki je omogočila natančno tehnično izvedbo vseh poljskih poskusov, ki so del te naloge. Na tem mestu bi se zahvalil predvsem Branko Lukaču, Darko Verniku in Andreju Zemljiču. Poleg tega gre zahvala tudi dr. Katarini Rudolf Pilih, ki je izvedla večji del laboratorijskega dela povezanega z določanjem stopnje hibridnosti.

Izredna zahvala gre doc. dr. Jerneju Iskri iz Odseka za organsko in fizikalno kemijo Instituta "Jožef Stefan", ki je omogočil sintezo in modifikacijo vseh aktivnih snovi, ki dajejo doktorski disertaciji širši pomen od nacionalne ravni.

Del doktorske disertacije, ki se nanaša na testiranje kombinacijske sposobnosti je bil oblikovan v sodelovanju s Poljoprivrednim institutom Osijek. Zato se na tem mestu iskreno zahvaljujem prof. dr. Georgu Dreznerju, prof. dr. Alojziju Laliću in dr. Krešimirju Dvojkoviću. Na tem mestu se moram zahvaliti tudi doc. dr. Ludviku Rozmanu, ki je omogočil zahtevno statistično analizo podatkov pri testiranju kombinacijske sposobnosti.

Pomemben prispevek k doktorski disertaciji predstavljajo tudi znanstveni nasveti prof. dr. Antona Ivančiča in prof. dr. Boruta Bohanca, zato gre iskrena zahvala tudi njima.