



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Mateja GORŠE

**MOŽNOSTI PRIDOBIVANJA HIBRIDNEGA
SEMENA PRI SAMOPRAŠNIH IN TUJEPRAŠNIH
KMETIJSKIH RASTLINAH**

DIPLOMSKI PROJEKT

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Mateja GORŠE

**MOŽNOSTI PRIDOBIVANJA HIBRIDNEGA SEMENA PRI
SAMOPRAŠNIH IN TUJEPRAŠNIH KMETIJSKIH RASTLINAH**

DIPLOMSKI PROJEKT
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**THE POSSIBILITY OF OBTAINING HYBRID SEED IN SELF- AND
CROSSPOLLINATED CROPS**

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2012

Diplomski projekt je zaključek Univerzitetnega študija Kmetijstvo – agronomija – 1. stopnja. Delo je bilo opravljeno na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Ludvika ROZMANA.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Borut BOHANEČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Ludvik ROZMAN
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Članica: prof. dr. Zlata LUTHAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Datum zagovora:

Diplomski projekt je rezultat lastnega dela. Podpisana Mateja Gorše se strinjam z objavo svojega diplomskega projekta na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Mateja GORŠE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 631.526.325:631.53.01 (043.2)
- KG žlahtnjenje rastlin/samoprašne rastline/tujeprašne rastline/hibridi/semce/hibridno seme/pridelava
- AV GORŠE, Mateja
- SA ROZMAN, Ludvik (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- LI 2012
- IN MOŽNOSTI PRIDOBIVANJA HIBRIDNEGA SEMENA PRI SAMOPRAŠNIH IN TUJEPRAŠNIH KMETIJSKIH RASTLINAH
- TD Diplomski projekt (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
- OP IV, 20 str., 2 pregl., 1 sl., 18 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Odkritje pojava heteroze ter njenega izkoriščanja pri žlahtnjenju hibridnih sort je omogočilo pomembne napredke pri pridelavi semenskega materiala. Pridelava hibridnega semena je zaradi izkoriščanja heterotičnega učinka v F1 generaciji najbolj razširjena med tujeprašnicami, v zadnjem času pa se vse bolj uveljavlja tudi pri samoprašnicah. Pri slednjih je pridelava težja, saj je pogoj pridelave transformacija iz samoprašnosti v tujeprašnost. Odkritih je bilo več različnih sistemov, ki pospešujejo in olajšujejo pridobivanje hibridnega semena. Gre za sisteme, s katerimi se odstrani ali pa onesposobi fertilni pelod na rastlinah, ki bodo v procesu križanja predstavljale matrne rastline, na katerih nastane hibridno seme. Odstranitev fertilnega peloda z maternih rastlin je pri pridobivanju hibridnega semena bistvenega pomena, saj s tem preprečimo, da bi se materna komponenta samooprašila in samooplodila. Pri tem se lahko poslužujemo časovno najbolj zahtevne ročne emaskulacije fertilnega peloda ali sistemov, ki postopek pridobivanja hibridnega semena pospešijo, kot je npr. uporaba moške sterilnosti, uporaba sredstev za kemično hibridizacijo ter, pri nekaterih tujeprašnih kmetijskih rastlinah, tudi izkoriščanje naravno prisotne avtoinkompatibilnosti. Namen diplomskega dela je proučiti kaj je hibridno seme, kakšne so njegove prednosti in kako v praksi poteka pridelava hibridnega semena pri samoprašnih in tujeprašnih kmetijskih rastlinah ter kakšne so razlike med enimi in drugimi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 631.526.325:631.53.01 (043.2)
- CX plant breeding/selfpollinated crops/crosspollinated crops/hybrids/seeds/hybrid seeds/production
- AU GORŠE, Mateja
- AA ROZMAN, Ludvik (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
- PY 2012
- TY THE POSSIBILITY OF OBTAINING HYBRID SEED IN SELF- AND CROSSPOLLINATED CROPS
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO IV, 20 p., 2 tab., 1 fig., 18 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB The discovery of the occurrence of heterosis and its use in breeding hybrid varieties has enabled important advances in the production of seed material. Production of hybrid seed, which is taking advantage because of the heterosis effect in the F1 generation, is most prevalent among cross-pollinated crops, but recently it is gaining ground also in self-pollinated crops. For the latter, the production is more difficult as the condition of production is transformation from self-pollinating into cross-pollinating. A number of different systems that accelerate and facilitate the production of hybrid seed have been discovered. This includes systems that remove or disable the fertile pollen on plants, which in the process of crossing represent female plants, giving rise to the hybrid seed. Removal of fertile pollen from female plants in obtaining hybrid seed is essential, as this can prevent self-pollination and self-fertilization of the female component. In doing so, we can use the most time demanding manual emasculation of fertile pollen, or systems, that accelerate the process of obtaining hybrid seed, such are the use of male sterility, use of chemical hybridization agents and, in some cross-pollinated crops, the use of naturally occurring autoincompatibility. Purpose of this study is to examine what hybrid seed is, what are its benefits and how in practice hybrid seed production takes place in self-pollinated and cross-pollinated crops and what are the differences between them.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VI
1 UVOD	1
2 DELITEV KMETIJSKIH RASTLIN GLEDE NA NAČIN OPLODNJE	1
3 DEFINICIJA SORTE OZIROMA KULTIVARJA	4
3.1 HIBRIDNA SORTA	5
3.1.1 Hibridno seme	6
4 PRIDELAVA HIBRIDNEGA SEMENA	6
4.1 HETEROZA ALI HIBRIDNI VIGOR	7
4.2 ODSTRANITEV FERTILNEGA PELODA Z MATERNE KOMPONENTE	8
4.2.1 Ročna emaskulacija	8
4.2.2 Moška sterilnost	8
4.2.3 Pridelava hibridnega semena z uporabo sredstev za kemično hibridizacijo	9
4.2.4 Pridelava hibridnega semena s pomočjo avtoinkompatibilnosti	10
4.3 PRENOS PELODA Z OČETNE NA MATERNO RASTLINO	11
4.4 NEKATERI PRIMERI PRIDELAVE HIBRIDNEGA SEMENA V PRAKSI	12
4.4.1 Pridelava hibridnega semena pri koruzi (<i>Zea mays</i> L.)	12
4.4.2 Pridelava hibridnega semena pri pšenici (<i>Triticum aestivum</i> L.)	13
4.4.3 Pridelava hibridnega semena pri rižu (<i>Oryza sativa</i> L.)	14
4.4.4 Pridelava hibridnega semena pri repi (<i>Brassica rapa</i> L.) in ogrščici (<i>Brassica napus</i> L.)	15
4.4.5 Pridelava hibridnega semena pri paradižniku (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	16
4.4.6 Pridelava hibridnega semena rži (<i>Secale cereale</i> L.) s pomočjo avtoinkompatibilnosti	17
5 ZANESLJIVOST IN EKONOMIČNOST PRIDELAVE HIBRIDNEGA SEMENA	18
6 SKLEP	19
7 VIRI	20

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Nekatere pomembnejše samoprašne in tujeprašne rastlinske vrste (Ivančič, 2002: 17-761; Stoskopf, 1993: 28)	3
Preglednica 2: Vpliv samoprašnosti in tujeprašnosti na rastlinski izvor in lastnosti (Stoskopf, 1993: 29)	4

KAZALO SLIK

Slika 1: Postopek pridobivanja hibridnega semena z uporabo genske moške sterilnosti po načinu druge sheme (Banga in Banga, 1998: 418)	16
--	----

1 UVOD

Delitev kmetijskih rastlin na samoprašne in tujeprašne oziroma avtogamne in alogamne rastlinske vrste je za žlahtnitelje in genetike zelo pomembna in uporabna. Korektno žlahtnjenje rastlin, vključujoč žlahtnjenje novih hibridnih sort, ni možno brez določenega znanja o opráševanju in oplojevanju oziroma brez razlikovanja med samoprašnicami in tujeprašnicami ter poznavanja narave obnašanja rastlin pri enih in drugih.

Pridelava hibridnega semena je zaradi izkoriščanja heterotičnega učinka v F1 generaciji najbolj razširjena med tujeprašnicami, v zadnjem času pa se vse bolj uveljavlja tudi pri samoprašnicah. Začetek pridelave hibridnega semena predstavlja pomemben napredek v zgodovini žlahtnjenja rastlin. Žlahtnitelji koruze so prvi odkrili potencial heterotičnega učinka pri povečanju pridelka koruze v F1 generaciji po križanju dveh samooplodnih linij koruze. Shull (1908, cit. po Stoskopf, 1993) je bil prvi, ki je predlagal, da bi se pri pridelavi koruze uporabljali hibridi. V njegovem delu s samooplodnimi linijami je odkril številne principe izbiranja samooplodnih linij kot starševskih komponent pri pridobivanju hibridov. Po več letih izkušenj s koruzo so bile odkrite mnoge novosti, rešitve in praktične tehnike za pridobivanje hibridnega semena, brez katerega ne bi bilo mogoče ustvarjati hibridnih sort.

Namen diplomskega dela je bil proučiti možnosti pridobivanja hibridnega semena, ter predstaviti razlike med samoprašnimi in tujeprašnimi kmetijskimi rastlinami, različne sisteme pridobivanja hibridnega semena pri enih in drugih ter jih podkrepiti s praktičnimi primeri ter pojasniti kaj hibridno seme je in kakšen je njegov pomen.

2 DELITEV KMETIJSKIH RASTLIN GLEDE NA NAČIN OPLODNJE

Glede na naravni način oplodnje delimo rastline na (Rozman, 2009):

- 1) naravno samoprašne/samoprašnice (avtogamne)
- 2) naravno tujeprašne/tujeprašnice (alogamne).

Samoprašnost ali avtogamija v ožjem pomenu označuje oplojevanje znotraj istega cveta, torej združitve moških in ženskih gamet iste rastline, tujeprašnost ali alogamija pa oplojevanje z gametami, ki izvirajo iz cvetov različnih rastlin. Oprášitev in nadaljnja oploditev se zgodi v istem cvetu, med cvetovi na isti rastlini ali med cvetovi na različnih rastlinah. Pojma avtogamija in alogamija vključujeta tako oprášitev kot tudi oploditev. Samooprášitev je predpogoj za samooploditev, oprášitev s tujim pelodom (tujeplodna oprášitev) pa je predpogoj za alogamijo.

V primeru, da pride do oploditve ženskih gamet enega cveta z moškimi gametami drugega cveta iste rastline, govorimo o geitonogamiji. Čeprav je ta način oplojevanja ena od oblik tujeprašnosti, je v genetskem pomenu skoraj popolnoma enak samoprašnosti, saj bo oploditev z gametami, nastalimi na različnih cvetovih iste rastline, v odsotnosti mutacij, teoretsko povzročila genetsko enako potomstvo kot prava samooploditev (oploditev znotraj istega cveta). V praksi se geitonogamija velikokrat uporablja kot nadomestilo za samoprašnost. Mnogokrat ni mogoče proizvesti seme s pravo samooploditvijo in v takšnih primerih je včasih mogoče dobiti seme, če se brazde pestičev oprašijo s pelodom drugih cvetov iste rastline.

Za pravo ali dosledno tujeprašnost se velikokrat uporablja izraz ksenogamija, ki v širšem pomenu besede pomeni opraševanje in oplojevanje med različnimi rastlinami. Ženske gamete v pestiču neke rastline so oplojene z moškimi gametami neke druge rastline. Tudi ta način oplojevanja je v nekaterih specifičnih primerih genetsko enakovreden samooploditvi, npr. v populaciji, v kateri so vse rastline homozigotne ter obenem potomci ene in iste homozigotne rastline (npr. samooplodne linije sirka ali koruze). Da bi bila ksenogamija bolj strogo ločena od samoprašnosti, se v genetiki pojem ksenogamija uporablja le za oplojevanje (genetsko rekombiniranje) med rastlinami različnih genotipov.

Klasifikacija rastlin na samoprašne (avtogamne) in tujeprašne (alogamne) ni enostavna, ker obstajajo velike razlike znotraj vsake skupine (preglednica 1). Razmeroma malo je izrazito samoprašnih in tujeprašnih vrst, saj so med njimi možni prehodi z različno stopnjo samoprašnosti oz. tujeprašnosti. Tako obstajajo vrste, ki so pretežno samoprašne in vrste, ki so pretežno tujeprašne. Delež samoprašnosti se lahko bistveno spreminja glede na klimatske oz. rastne razmere. Tako je paradižnik v Evropi samoprašen, v Peruju pa je zmerno tujeprašen z deležem tujeprašnosti do 25,7%. Prevladujoč način oplodnje je odvisen tudi od prisotnosti cvetnih mehanizmov, ki zagotavljajo tujeprašnost (sistem avtoinkompatibilnosti) ter od spolne izraženosti določene rastline, ki je glede na spolnost in morfologijo cvetov lahko hermafroditna (z dvospolnimi cvetovi), monoecična (z moškimi in ženskimi cvetovi), androecična (z moškimi cvetovi), ginoecična (z ženskimi cvetovi), andromonoecična (z moškimi in hermafroditnimi cvetovi), ginomonoecična (z ženskimi in hermafroditnimi cvetovi) ali trimonoecična (z ženskimi, moškimi in hermafroditnimi cvetovi) (Ivančič, 2002b).

Preglednica 1: Nekatero pomembnejše samoprašne in tujeprašne rastlinske vrste (Ivančič, 2002a: 761; Stoskopf, 1993: 28)

Prevladuje samoprašnost	Prevladuje tujeprašnost
pšenice/ <i>Triticum</i> spp.	koruza/ <i>Zea mays</i>
riž/ <i>Oryza sativa</i>	rž/ <i>Secale cereale</i>
navadni ječmen/ <i>Hordeum vulgare</i>	ajde/ <i>Fagopyrum</i> spp.
oves/ <i>Avena sativa</i>	pomembnejše vrste travniških trav/red <i>Poales</i>
navadno proso/ <i>Panicum miliaceum</i>	črna detelja/ <i>Trifolium pratense</i>
tritkala/ \times <i>Triticosecale</i>	lucerna/ <i>Medicago sativa</i>
sirek/ <i>Sorghum bicolor</i>	hmelj/ <i>Humulus lupulus</i>
navadni lan/ <i>Linum usitatissimum</i>	sončnica/ <i>Helianthus annuus</i>
soja/ <i>Glycine max</i>	čebula/ <i>Allium cepa</i>
grah/ <i>Pisum sativum</i>	vrste rodu <i>Brassica/Brassica</i> spp.
inkarnatka/ <i>Trifolium incarnatum</i>	buče/ <i>Cucurbita</i> spp.
bob/ <i>Vicia faba</i>	kumara/ <i>Cucumis sativus</i>
navadni grahor/ <i>Lathyrus sativus</i>	korenček/ <i>Daucus carota</i>
navadni fižol/ <i>Phaseolus vulgaris</i>	radič/ <i>Cichorium intybus</i>
paradižnik/ <i>Lycopersicon esculentum</i>	lubenica/ <i>Citrullus lanatus</i>
paprika/ <i>Capsicum annuum</i>	pese/ <i>Beta</i> spp.
solata/ <i>Lactuca sativa</i>	melona/ <i>Cucumis melo</i>
krompir/ <i>Solanum tuberosum</i>	jablane/ <i>Malus</i> spp.
breskev/ <i>Prunus persica</i>	hruške/ <i>Pyrus</i> spp.
marelica/ <i>Prunus armeniaca</i>	češnja/ <i>Prunus avium</i>
borovnice/ <i>Vaccinium</i> spp.	slive/ <i>Prunus</i> spp.
večina evropskih vinskih trt/ <i>Vitis vinifera</i>	oljka/ <i>Olea europaea</i>
tobak/ <i>Nicotiana tabacum</i>	navadna leska/ <i>Corylus avellana</i>
bombaževci/ <i>Gossypium</i> spp.	navadni smokvovec/ <i>Ficus carica</i>

S stališča žlahtnjenja in semenarstva so samooplodne rastlinske vrste tiste, pri katerih delež oploditve s tujimi gametami v normalnih razmerah ne presega 5%. Če je ta delež večji, moramo potomstva, različnih generacij ali pa individualne rastline izolirati in s tem preprečiti prihod tujega peloda (Ivančič, 2002b).

Značilnost samoprašnic je hermafroditen (dvospolen) cvet (moški in ženski reproduktivni organi se nahajajo v ali na istem cvetu) ter kleistogamija (opraševanje se odvija v zaprtem cvetu). Popolna kleistogamija je zelo redka. V naravi je največkrat prisotna delna ali nepopolna kleistogamija (npr. pšenica in ječmen), pri katerih se večina cvetov vsaj delno odpre in s tem omogoča določen delež tujeprašnosti (oploditve s tujimi gametami) (Ivančič, 2002b). Mnoge samoprašnice imajo zelo majhne cvetove (npr. pšenica in ječmen), medtem ko imata grah in tobak, ki sta izrazito samoprašni rastlini, vpadljive cvetove, kar je verjetno posledica evlucijskega razvoja. Iz evlucijskega stališča je možno, da je samoprašnost nastala iz tujeprašnih rastlin, saj je več genetske raznovrstnosti pri tujeprašnicah. Ko se pojavi nova kombinacija genov oz. mutacija, se ta prenaša iz ene

na drugo generacijo oz. potomstvo, kar pri samoprašnicah ni možno (Stoskopf, 1993). Samoprašnost ima prednost v tem, da se škodljivi recesivni geni sami izločajo iz populacije zaradi homozigotnosti, nastale po naravni poti (Bohanec, 2009).

Za tujeprašnice je značilno, da poznamo poleg dvospolnih tudi enospolne cvetove. Ti se lahko nahajajo na isti rastlini (monoecičnost ali enodomnost) ali na različnih rastlinah (diecičnost ali dvodomnost). Tipične monoecične kmetijske rastline so npr. koruza, lubenice ter navadne buče, medtem ko diecičnost srečamo pri navadnem belušu, navadni konoplji in hmelju. Pri tujeprašnicah srečamo še neistočasno dozorevanje moških in ženskih spolnih organov, mehanizem inkompatibilnosti, moško sterilnost ter številne morfološke značilnosti cvetov, ki olajšujejo oprашevanje z vetrom ali insekti. Takšne prilagoditve najdemo pri koruzi in krmnih travah. Metlice pri koruzi razvijejo tisoč in več cvetov, vsak cvet pa vsebuje 3 prašnike. V vsakem prašniku nastane okoli 2500 pelodnih zrn, kar pomeni od 30 do 60 milijonov pelodnih zrn na posamezno rastlino (Stoskopf, 1993). Vrste, ki jih oprášujejo insekti, imajo izrazite živo obarvane cvetove. Lahko imajo poseben vonj in vsebujejo nektar, ki privablja insekte ali druge opráševalce (npr. ptice).

Preglednica 2: Vpliv samoprašnosti in tujeprašnosti na rastlinski izvor in lastnosti (Stoskopf, 1993: 29)

Izvor/lastnost	Samoprašnost	Tujeprašnost
Naravna populacija	homogena	heterogena
Rastline iz naravne populacije	homogene in homozigotne	heterogene in heterozigotne
Individualna rastlina iz naravne populacije	homozigotna	heterozigotna
2n genotip	homozigoten	heterozigoten
Genotip haploidnih gamet	enak	različen
Inbriding depresija	majhna	pričakovana
Avtoinkompatibilnost	se ne pojavlja	se pojavlja

3 DEFINICIJA SORTE OZIROMA KULTIVARJA

O tem kaj je sorta obstaja več definicij. Borojević (1990) je podal splošno definicijo o sorti, ki navaja, da je sorta skupina požlahtnjenih kulturnih rastlin iste vrste, ki se odlikujejo z določenimi genetskimi in morfološkimi lastnostmi in ustrezajo za pridelovanje v določenih agroekoloških razmerah.

Zakon o semenskem materialu kmetijskih rastlin (ZSMKR) (2002) v 3. točki 4. člena navaja, da je sorta skupina rastlin znotraj najnižje botanične razvrstitve, če jo je mogoče:

- določiti z izraženimi lastnostmi, ki izvirajo iz določenega genotipa ali kombinacije genotipov,
- razločiti od katere koli druge skupine rastlin vsaj po eni od izraženih lastnosti in

– obravnavati kot enoto, če se te lastnosti med razmnoževanjem ne spreminjajo.

Kot navaja Rozman (2009) pa najbolj natančno in strokovno najbolj pravilno definicijo navaja Fehr (1987). Po njem se sorta in kultivar smatrata kot ekvivalentna s tem, da se kultivar smatra kot kultivirana (požlahtnjena) sorta (angl. *cultivated variety*). Po Fehru (1987) je kultivar skupina rastlin z značilnimi lastnostmi, ki so razločljive (*distinct*), izenačene (*uniform*) in nespremenljive (*stable*). Razločljiv (*razpoznaven*) pomeni, da se kultivar jasno razlikuje z eno ali več morfoloških, fizioloških in drugih pomembnih značilnosti od vseh drugih poznanih kultivarjev. Izenačen pomeni, če je kultivar ne glede na eventualna maloštevilna odstopanja določenih lastnosti, dovolj izenačen v vseh svojih lastnostih. Nespremenljiv pomeni, da bo kultivar ostal v svojih značilnostih nespremenjen pri nadaljnjem razmnoževanju. Od tod kratica RIN (angl. DUS), ki je po prej omenjenem Zakonu o semenskem materialu (2002), eden od pogojev za vpis novega kultivarja oz. sorte v sortno listo.

3.1 HIBRIDNA SORTA

Tudi hibrid je sorta, vendar je način njenega nastanka in vzdrževalne selekcije drugačen. Hibridne sorte namreč nastanejo tako, da za seme uporabijo le prvo generacijo križanja (označuje jo oznaka F1) materinske in očetovske rastline, ki zanjo prispevata dedni material. Preprosto povedano, hibrid je potomec križanja dveh različnih staršev, največkrat dveh bolj ali manj homozigotnih linij, ki smo ju dobili s predhodno vzgojo v najožjem sorodstvu (običajno s samooplodnjo pri samoprašnicah in prisilno samooplodnjo pri tujeprašnicah). Posledica take vzgoje, ki traja več generacij, so skoraj homozigotne linije, torej genetsko močno izenačene.

Poznamo več različnih tipov hibridnih kultivarjev, ki predstavljajo prvo generacijo (F1) križanja med:

- dvema samooplodnima linijama - enojni ali dvolinijski hibrid (angl. *single cross*), kar označujemo kot $A \times B$;
- dvolinijskim križancem in samooplodno linijo - trolinijski hibrid (angl. *three-way cross*): $(A \times B) \times C$;
- dvema dvolinijskima križancema (križanje F1 potomstev dveh enojnih hibridov) - dvojni ali štirilinijski hibrid (angl. *double cross*): $(A \times B) \times (C \times D)$.

Poleg naštetih osnovnih tipov hibridov poznamo tudi modificirane hibride, kot je npr. enojni modificirani hibrid, ki izhajaja iz križanja $(A^* \times A) \times B$, pri čemer sta A^* in A sestrski liniji. Križanec sestrskih linij ima prednost v tem, da proizvede več semena kakor bi ga proizvedle A^* in A kot posamezni liniji (Fehr, 1987).

Hibridni kultivar lahko nastane tudi s križanjem linije ali enojnega križanca s populacijo ali sintetikom ali s križanjem dveh populacij, ne more pa biti ustvarjen iz semena, nastalega na rastlinah hibridne sorte.

3.1.1 Hibridno seme

Ni zapletena le vzgoja hibridne sorte, zahtevna je tudi pridelava hibridnega semena, katerega uporaba je dandanes zaradi svojih prednosti pri vzgoji hibridov (F1 rastlin, zraslih iz hibridnega semena), razširjena po vsem svetu pri skoraj vseh pomembnih kmetijskih rastlinah. Hibridno seme nastane kot posledica opraitve in oploditve cvetov matrne rastline ene linije s pelodom očetne rastline druge linije, pri čemer se matrna komponenta ne sme opraiti z lastnim pelodom ali morebitnim neželenim pelodom z drugih sorodnih rastlin. F1 hibridno seme nato požanjemo na rastlinah matrne komponente.

Pridelovalci kmetijskih rastlin, torej porabniki semena, se uporabe hibridnega semena poslužujejo zaradi prednosti, ki jih le-to nudi. Prva generacija potomcev je superiornejša od svojih staršev, lahko je tudi za več kot petino boljša in rodovitnejša (izrazi se efekt heteroze ali hibridnega vigorja). Po definiciji je merilo hibridnega vigorja najboljši izmed staršev ali povprečje obeh staršev. Hibridi so genetsko med seboj enaki (vsi so heterozigotni) in zato tudi fenotipsko izenačeni, kar pomeni, da je tudi spravilo (žetev) tako izenačenih rastlin lažja. Prednost hibridov se velikokrat izkaže v težjih pridelovalnih razmerah, saj hibridi zagotavljajo pridelek tudi na slabših tleh (peščena, glinasta tla) in na slabših predelih njiv (depresijah). Hibridi se bolje razraščajo in razvijejo močnejši koreninski sistem z veliko črpalno močjo. Setvena norma pri hibridih je nižja, hibridno seme pa je primerno tudi za direktno setev (minimalna obdelava tal) (Semenarna Ljubljana, 2011).

Za žlahtnitelja pomeni hibridno seme zaščito, saj hibridnih sort ni mogoče nenadzorovano razmnoževati na enostaven način. Ko je na trgu določeno hibridno seme, ni nujno, da sta na voljo tudi starševski liniji, iz katerih je to hibridno seme nastalo (Wehner, 1999). V naslednji (F2) generaciji se začnejo lastnosti zaradi zakonov dedovanja cepiti in na njivi dobimo zelo raznoliko populacijo. Ponovna setev semena koruze, pri kateri so hibridi najbolj znani, v drugi sezoni zato ni več primerna. Na ta način je zaščiten semenski firma, saj je hibridno seme potrebno vsako leto znova kupiti (Bohanec, 2009).

4 PRIDELAVA HIBRIDNEGA SEMENA

Komercialna pridelava hibridnega semena vključuje številne dejavnike, kot npr. (Stoskopf, 1993):

- indukcija moške sterilnosti v ženske starševske rastline,

- vir viabilnega peloda iz očetne rastline, ki oprashi moško-sterilno materno komponento,
- razporeditev zasaditve moških in ženskih rastlin, ki povečuje možnost križanja,
- vektorji prenosa peloda od očetne do matrne komponente (veter in insekti),
- usklajenost cvetenja matrne in očetne komponente,
- obilje peloda moške rastline za zagotovitev boljše oplodnje,
- dobro odpiranje cvetov matrne rastline, tako da lahko pelod pride v kontakt s pestičem,
- popoln in zanesljiv sistem obnove fertilitnosti, da potomstvo ne bi bilo sterilno.

Da je proizvodnja in uporaba hibridnega semena uspešna, morajo biti izpolnjeni naslednji pogoji (Fehr, 1987):

- 1) pri F1 potomstvu križanja dveh staršev se mora izraziti heterozni učinek,
- 2) obstaja možnost odstranitve fertilega peloda z matrne rastline,
- 3) pelod z moških rastlin se uspešno prenese na matrne rastline in
- 4) proizvodnja hibridnega semena je zanesljiva in ekonomsko upravičena.

4.1 HETEROZA ALI HIBRIDNI VIGOR

O hibridnem vigorju govorimo, kadar so potomci križanja dveh staršev v F1 generaciji superiornjši od staršev. Raven heteroze se določa kot povprečna starševska heteroza (potomec se primerja s povprečjem obeh staršev), heterobeltiozis (potomec se primerja z boljšim od staršev) in standardna heteroza (potomec se primerja s standardno sorto (Titan in Meglič, 2011)). Proizvodnja hibridnega semena je dražja od razmnoževanja čistih linij ali kultivarjev v prosti oprashitvi, zato mora hibrid v zadostni meri presegati druge tipe kultivarjev, ki so na voljo, da so stroški proizvodnje hibridnega semena upravičeni (Fehr, 1987). Vrednost hibridnega vigorja, ki se jo zahteva pri proizvodnji hibridov pri samoprašnih rastlinah je še vedno negotova. McRae (1985) je predlagal, da bi pridelek pri pšenici moral presegati pridelek najboljšega komercialnega kultivarja za 10-20 %, Carver in Nash (1984) pa sta predlagala minimalno 10 % prednost pridelka nad najbolj produktivnim dostopnim komercialnim kultivarjem (McRae, 1985; Carver in Nash, 1984, cit. po Stoskopf, 1993). V splošnem so takšne prednosti v pridelku mogoče (Stoskopf, 1993).

Genetsko osnovo hibridnega vigorja najpogosteje pojasnjujejo s teorijo dominance ali teorijo naddominance. V prvem in drugem primeru gre za predpostavko, da je heteroza rezultat prisotnosti različnih alelov na lokusih in, da obstaja določena stopnja dominantnosti med aleli. Efekt heteroze je tem večji čim večje je število heterozigotnih lokusov v hibridu. Posledično lahko večji heterozni učinek pričakujemo pri hibridih, katerih starševski liniji sta imeli večjo stopnjo homozigotnosti in sta bili medsebojno različni v večjem številu lokusov. Po teoriji dominance je lahko vrednost heteroze največ

tolikšna, kolikor znaša seštevek vrednosti heterozigotnih lokusov pri polni dominanci. Po teoriji naddominance pa je vrednost heteroze lahko celo večja kot pri polni dominanci, kajti heterozigotni lokusi imajo v primeru naddominance večjo vrednost kot homozigotni dominantni lokusi (Martinčič in Kozumplik, 1996).

4.2 ODSTRANITEV FERTILNEGA PELODA Z MATERNE KOMPONENTE

Z odstranitvijo peloda pripravimo cvetove maternih rastlin na nadaljnje križanje (za oprашitev z moško komponento). Odstranitev peloda z moško fertilelnih maternih rastlin lahko opravimo z ročno emaskulacijo moških rastlin, s pomočjo moške sterilnosti, avtoinkompatibilnosti ali z uporabo gametocidov.

4.2.1 Ročna emaskulacija

Pojem emaskulacija uporabljamo za postopke odstranjevanja moških delov (moških spolnih organov) cveta pri rastlinah z dvospolnimi cvetovi in moških cvetov ali socvetij pri monoecičnih rastlinah (Ivančič, 2002b). Emaskulacija je praviloma vedno povezana z izolacijo, katere glavni namen je zaščita ženskih cvetov ali socvetij pred nekontrolirano tujo oplodnjo. Zaščititi pa je potrebno tudi cvetove moške komponente pred nenadzorovanim mešanjem peloda iz različnih virov (npr. da preprečimo prihod peloda na izbrano moško socvetje koruze iz drugih moških socvetij koruze) (Rozman, 1998). Obstajajo štiri osnovne vrste izolacije:

- morfološko-fiziološka izolacija,
- časovna,
- prostorska in
- izolacija s posebej pripravljenimi zaščitnimi ali izolacijskimi sredstvi (vrečke različnih oblik in materiala, vata, izolacijski zaboji, aluminijasti trakovi ipd.).

Odstranjevanje prašnikov (emaskulacija) se lahko opravi ročno (neposredna ali prava emaskulacija) ali s posebnim tretiranjem prašnikov (zaustavitev mikrosporigeneze s pomočjo reza prašnic, sterilizacija prašnic s pomočjo alkohola, toplotna sterilizacija, sterilizacija prašnic s pomočjo vlage, odstranjevanje peloda iz brazde pestiča in ločitev brazde pestiča od prašnic). Ročno odstranjevanje prašnikov se pri komercialni pridelavi hibridnega semena izvaja le na nekaterih kmetijskih rastlinah (npr. pri koruzi in paradižniku).

4.2.2 Moška sterilnost

Moška sterilnost je pojav, pri katerem enospolne moške in dvospolne rastline (rastline s hermafroditnimi cvetovi in monoecične rastline) ne proizvajajo normalnega, življenjsko sposobnega (viabilnega) peloda (Ivančič, 2002b). Vzrok so lahko genetski, fiziološko-genetski, fiziološki ali okoljski dejavniki. Pri žlahtnjenju je najpomembnejša dedna moška

sterilnost. Ta je lahko kontrolirana z geni celičnega jedra, geni citoplazme ali pa je posledica poliploidije. Glede na dednost obstajajo tri vrste (oblike) moške sterilnosti:

- Genetska (genska ali karioplazmatska),
- Citoplazmatska in
- Citoplazmatsko-genetska (citoplazmatsko-karioplazmatska)

Vir moške sterilnosti je lahko selekcioniran genotip ali pa divja rastlina, ki se uporabi kot donor moško sterilnih genov. Ta vir moško sterilnih genov (jedra in/ali citoplazme) mora žlahntitelj poiskati, potem pa jih vnesti v zeleni genotip. Eden glavnih ciljev uporabe moške sterilnosti je proizvodnja hibridov brez predhodne emaskulacije. Tehnika proizvodnje hibridov na podlagi moške sterilnosti ni vedno enostavna. Odvisna je predvsem od rastlinske vrste in oblike moške sterilnosti. Pri samoprašnih rastlinskih vrstah je, ne glede na prisotnost moške sterilnosti, velikokrat potrebno ročno oprasevanje ali pa odpiranje starševskih cvetov, da lahko oprasevalci nanesejo pelod na brazde pestičev moško sterilnih cvetov. Pri mnogih delno tujeprašnih entomofilnih rastlinskih vrstah je običajno treba le povečati število žuželk oprasevalk. Pri tujeprašnih vrstah je glavni problem v izolaciji starševskih komponent. Vsak starševski par mora biti nekako izoliran od drugih kompatibilnih virov peloda. Način izolacije je odvisen od bioloških lastnosti rastlinske vrste, števila rastlin, klimatskih razmer, oblike terena, zahtevane natančnosti križanja in drugih dejavnikov. Pri križanju majhnega števila rastlin se največkrat uporablja izolacija s pomočjo papirnatih vrečk, manjših komor, ali pa se uporablja prostorsko oddaljenost (prostorsko osamitev) posameznih križanj. Pomembno vlogo ima tudi razmerje med moško sterilnimi in fertilnimi komponentami, ki je odvisno predvsem od količine proizvedenega peloda moške komponente, načina njegovega razširjanja, bioloških značilnosti in aktivnosti vektorjev oprasevanja, oblike terena, klimatskih razmer ter oddaljenosti med starševskimi komponentami (Ivančič, 2002b).

4.2.3 Pridelava hibridnega semena z uporabo sredstev za kemično hibridizacijo

Prvi dokumentirani podatek o vplivu kemične spojine na moško sterilnost rastline izvira iz leta 1953. Takrat so opazili vpliv bakrovega hidrazida na atrofijo pelodnih zrn. Leta 1957 je bil ob predstavitvi dela, ki je demonstriralo uporabo kemikalije FW-450 (α , β -dikloroizobutirat) za vzgojo hibridnih sort bombaža (*Gossypium hirsutum* L.) prvič uporabljen izraz gemetocid, ki naj bi označeval kemikalije, ki selektivno vplivajo na moško sterilnost rastline. Danes se pogosteje od izraza gametocid uporablja izraz sredstvo za kemično hibridizacijo (Titan in Meglič, 2011). Patentiranih je bilo več kot 40 kemičnih sredstev kot potencialnih sredstev za kemično hibridizacijo, od katerih sta najpogosteje uporabljena 'etherel' in hidrazid maleinske kisline (Singh in sod., 2010).

Po Pravilniku o trženju semena žit (2012) so sredstva za kemično hibridizacijo (v nadaljnjem besedilu: CHA) kemikalije, ki ob uporabi v določeni fazi razvoja rastlin ženske

starševske komponente povzročijo prenehanje nastajanja cvetnega prahu ali mu odvzamejo zmožnost oploditve in napravijo ženske rastline sterilne. Tako povzročijo, da samoprašna rastlinska vrsta ni sposobna samooploditve. Glavni namen uporabe CHA je olajšanje proizvodnje hibridnega semena. Starševska komponenta, ki jo izberemo za moško sterilno, je lahko katerakoli linija, pri tem pa prihranimo na času, potrebnem za vključitev moške sterilnosti v materno komponento. Vzdrževanje moške sterilnosti tako ne bi bilo več potrebno. Kadar je seme pridelano z uporabo CHA, mora biti po Pravilniku o trženju semena žit (2012), pri potrjevanju semenskega posevka hibridnih sort pri npr. navadnem ovsu, navadnem ječmenu in navadni pšenici najmanjša sortna pristnost in čistost 99,7%, odstotek moške sterilnosti matrne komponente mora dosegati 98%, najmanjša stopnja hibridizacije pa mora biti 95%. Odkar je bila odkrita kemična hibridizacija v letu 1959, je bil narejen pomemben napredek v smeri oblikovanja idealnega CHA z minimalnim vplivom na okolje. Ključna točka uspešne proizvodnje hibridnega semena s pomočjo CHA je učinkovita kemična emaskulacija, ki zagotavlja čistočo hibridnega semena in pospešitev opravevanja (Banga in Banga, 1998). Kot navaja Stoskopf (1993), so lastnosti, ki opisujejo idealno sredstvo za kemično hibridizacijo: sposobnost induciranja popolne ali skoraj popolne moške sterilnosti brez povzročitve redukcije ženske fertilitnosti, učinkovitost ob uporabi v različnih fazah rasti, na različnih genotipih in v različnih okoliščinah, učinkovitost sterilizacije tako zgodnje kot pozno formiranih cvetov ter takšna oblika CHA, ki omogoča varen nanos na ženske starševske rastline, brez nevarnosti zanašanja na sosednje vrste moških rastlin. Singh in sod. (2010) dodajajo še lastnosti kot so: dosežena sterilnost z enim samim nanosom, zanesljivost delovanja ob mejnih količinah nanosa, prilagojenost časa nanosa na različne vremenske pogoje, praktičnost aplikacije CHA in netoksičnost do okolja, možnost ekonomične sinteze sredstva in CHA brez fitotoksičnih vplivov na tretirane rastline ter brez vpliva na kvaliteto hibridnega semena ali hibridnega vigorja.

4.2.4 Pridelava hibridnega semena s pomočjo avtoinkompatibilnosti

Avtoinkompatibilnost (samoinkompatibilnost) je pojav, pri katerem se normalne moške gamete ne morejo združiti z ženskimi gametami v pestiču istega cveta. V širšem pomenu označuje nezmožnost normalnih moških gamet, da oplodijo ženske gamete kateregakoli cveta iste rastline. Oprašitev brazde pestiča z normalnim pelodom iz istega cveta ali pa iz kateregakoli cveta iste rastline ne povzroči oploditve in oblikovanja zigote (Ivančič, 2002b).

Visoka stopnja avtoinkompatibilnosti lahko omogoča zelo poenostavljeno in cenejše križanje pri proizvodnji semena dvolinijskih hibridov. Emaskulacija prašnikov, vključno z drugimi načini inaktivacije moških spolnih organov dvospolne ženske starševske komponente ni potrebna. Pomembno je le, da so starševske komponente posejane ali posajene na način, ki omogoča najboljše (najpopolnejše) opravevanje. Prednost metode

pred drugimi metodami je v tem, da se pri setvi starševskega semena na polje, lahko izenačena količina semena obeh linij zmeša skupaj (če sta obe liniji avtoinkompatibilni) in vse rastline se lahko na koncu hkrati požanje, kar se seveda razlikuje od postopka, kjer posejemo ločene vrste z nižjo frekvenco oprasha, ki ga moramo na koncu pred žetvijo odstraniti. (Banga in Banga, 1998). Slabost pa je ta, da obstaja možnost samooprašitve, zato je metoda avtoinkompatibilnosti v primerjavi z moško sterilnostjo običajno manj zanesljiva pri preprečevanju samooplojevanja. Pomembno je, da je oprashitev pravočasna. Če z oprashitvijo predolgo odlašamo, lahko inkompatibilni mehanizem oslabi in pride do samooploditve. Avtoinkompatibilnost je zelo uporabna pri križanju rastlinskih vrst z majhnimi dvospolnimi cvetovi predvsem, kadar so združeni v gosta socvetja in če ni na voljo moška sterilnost. Da bi križanje bilo natančno, mora obstajati dovolj močan mehanizem avtoinkompatibilnosti. Ta je značilen npr. za radič, sladki krompir, plazečo deteljo in mnoge *Beta* vrste. Za preverjanje natančnosti običajno uporabljamo označevalne ali marker lastnosti (npr. barva kotiledonov pri pesah) (Ivančič, 2002b). Avtoinkompatibilnost je kontrolirana z enim S lokusom. Za oblikovanje dvolinijskega hibrida moramo na izolirani površini posejati ali posaditi dve avtoinkompatibilni starševski komponenti (običajno sta to dve homozigotni liniji), ki nimata iste alelne oblike S gena, in ju prepustiti naravni oprashitvi (s pomočjo vetra ali žuželk).

Starševski komponenti:	S1S1	×	S2S2
Hibrid:	S1S2		

Za proizvodnjo dvolinijskih hibridov (starševski komponenti sta homozigotni liniji) moramo pripraviti zadostno število rastlin starševskih (homozigotnih) linij. Danes so na voljo tehnike, ki premostijo avtoinkompatibilnost in omogočajo proizvodnjo starševskega semena (Banga in Banga, 1998). Že oblikovane starševske linije se lahko naprej razmnožuje s pomočjo tkivnih kultur. V semenski proizvodnji je velikokrat bolj ustrezen dvojni hibrid, ki je nastal s križanjem dveh enojnih ali dvolinijskih hibridov (hibrid, ki vključuje 4 starše, ang. double cross). Bolj ustrezen je predvsem iz ekonomskega vidika, ker se za starše uporabljajo enojni ali dvolinijski hibridi, ki so produktivnejši (seme takšnega hibrida se razvije in požanje na enojnih hibridih, ki so produktivnejši od linij) (Ivančič, 2002b).

4.3 PRENOS PELODA Z OČETNE NA MATERNO RASTLINO

Proizvodnja hibridnega semena na večjih površinah in v večjih količinah zahteva učinkovitost v prenosu peloda iz očetnih na materno rastline z vetrom ali insekti. Veter je učinkovit prenašalec pri vrstah trav, kot sta koroza ali sirek, prenos z insekti pa pri proizvodnji hibridnega semena sončnice, če so zagotovljeni ukrepi, ki zagotavljajo, da bo na voljo dovolj veliko število vektorjev prenosa. Pri lucerni je oprashivanje z insekti omejujoče, ker se je izkazalo, da imajo insekti raje moško fertilne rastline kot pa tiste z

moško sterilnostjo, kar privede do manjšega nabora semena na moško sterilnih rastlinah (Fehr, 1987). Najdražji način je ročno oprашevanje, ki je izvedljivo samo pri rastlinah, kot je npr. paradižnik, pri katerem povpraševanje po hibridih opravičuje ceno delovne sile, potrebne za proizvodnjo hibridnega semena in se splača le pri tistih kulturah, pri katerih da posamezna rastlina relativno veliko količino semena in kjer je pri sajenju potrebnega relativno malo semena na enoto površine. Za uspešno oprășitev in oploditev je potrebna usklajenost ali sinhronizacija časa cvetenja ženske (materne) komponente z moško (očetno). Če izbrani starševski liniji ne cvetita usklajeno, je čas cvetenja potrebno umetno uskladiti. Za to obstaja več različnih postopkov, kot so spreminjanje časa setve, spreminjanje dolžine dneva, različna gostota setve, odstranjevanje listov ipd.

4.4 NEKATERI PRIMERI PRIDELAVE HIBRIDNEGA SEMENA V PRAKSI

4.4.1 Pridelava hibridnega semena pri koruzi (*Zea mays* L.)

Koruzi je več kot 95 odstotno tujeprašna monoecična vrsta z ločenim moškim (metlica) in ženskim (storž) socvetjem na isti rastlini, ki je prilagojena na oprășevanje s pomočjo vetra (Martinčić in Kozumplik, 1996). Cvetenje moškega socvetja je v normalnih klimatskih razmerah zelo intenzivno. Eno socvetje lahko praši 2-3 dni, v odvisnosti od genotipa in klimatskih dejavnikov pa tudi do več kot en teden. Na ženskem socvetju se v času cvetenja pojavi svila, ki na vrhu socvetja prodre skozi ličje (ovojne liste). Svila, ki se pojavi zunaj socvetja je receptivna za pelod, receptivnost pa se ohrani tudi do 10 dni (Ivančić, 2002a).

Pri koruzi se v proizvodnji velikih količin hibridnega semena materna linija (♀) poseje v 4 vrste, poleg nje očetna linija (♂) v dve vrste in tako naprej izmenično 4 vrste maternih in 2 vrste očetnih rastlin. Možno je tudi razmerje vrst $6♀ : 2♂$. Pri tem je potrebna stroga prostorska izolacija od drugih genotipov, ki bi lahko povzročili neželjeno tujo oprășitev, na razdalji 200 metrov. Ta razdalja je lahko manjša, če obstaja zaščita (npr. posevek visokih rastlin ali pas gozda). Na materni liniji odstranimo metlice (moške organe) takoj, ko se te začnejo pojavljati, obvezno pa jih je potrebno odstraniti še pred cvetenjem oziroma prašenjem cvetnega prahu. Odstranjevanje metlic poteka ročno ali strojno. Pri koruzi ročno odstranjevanje metlic ne predstavlja večjega problema in je tudi ekonomsko sprejemljivo, saj za setev enega hektarja ni potrebne velike količine semena (okrog 20 kg). Ročno odstranjevanje opravijo osebe, ki hodijo po polju med vrstami ali pa se vozijo na traktorski platformi. Slabost postopka je morebitno pomanjkanje primerne delovne sile v nekaterih območjih pridelovanja. Na velikih površinah se ročno odstranjevanje opravlja le, če so polja preveč mokra za mehanično odstranjevanje. Mehanični odstranjevalci imajo vodilo, ki usmerja metlice v prirezovalni sistem, kjer metlice odrežejo rotacijska rezila. Križanje se opravi s pomočjo vetra oz. zračnih tokov. Paziti moramo, da na svilo pade samo pelod očetne komponente. Seme, ki se razvije na storžih matrne rastline je F1 hibridno seme, medtem ko je seme, ki se je razvilo na očetnih rastlinah, seme očetne linije (Borojević, 1990).

4.4.2 Pridelava hibridnega semena pri pšenici (*Triticum aestivum* L.)

Zaradi počasnega naraščanja višine povprečnega pridelka zrnja navadne pšenice na svetovni in državni ravni, je uporaba hibridov pri tej gospodarsko pomembni poljščini vedno bolj pomembna. Socvetje pšenice je po zgradbi sestavljen klas, cvet pšenice pa je dvospolen ali hermafroditen. Pšenica je samoprašna kmetijska rastlina, odstotek tujeprašnosti je praviloma nizek (1-4%) (Ivančič, 2002a). Pogoj za pridelavo hibridnega semena je tujeprašnost, ki jo pri pšenici lahko dosežemo z indukcijo moške sterilnosti v materni komponenti. Da lahko pride do nastanka hibridnega semena so poleg indukcije moške sterilnosti pomembne še lastnosti cveta in klaska starševskih komponent, saj se lahko zgodi, da se po učinkoviti indukciji moške sterilnosti v materni komponenti krovna pleva in predpleva ne razpreta pod večjim kotom kot pri naravnem cvetenju in opraševanju in posledično ne more priti do prave tujeprašnosti in nastanka hibridnega semena (Titan in Meglič, 2011).

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 citoplazmatsko-genetske moške sterilnosti (CMS sistem). Od navedenih pristopov je najbolj proučen sistem citoplazmatsko-genetske sterilnosti, ki je bil pri pšenici odkrit v petdesetih letih prejšnjega stoletja. O stabilni obliki citoplazmatsko-genetske moške sterilnosti so prvič poročali leta 1962 na osnovi križanja navadne pšenice s timofejevo pšenico (*Triticum timopheevi* Zhuk.), nakar so istega leta poročali tudi o genih za obnovo fertilitnosti v F1 generaciji (*Rf* geni), ki so jih prav tako odkrili v timofejevi pšenici (Titan in Meglič, 2011).

Za citoplazmatsko-genetsko moško sterilnost, ki temelji na genih, ki se nahajajo v citoplazmi, je torej značilno, da obstajata dva osnovna plazmotipa: normalen ali fertilen, označen z (N) ali (F), ter sterilen, označen s (S), ki je v interakciji z recesivnim alelom (ali več aleli) moške sterilnosti *rf* in dominantnim alelom (ali aleli) obnavljanja (restavracije) fertilitnosti *Rf*. Moško sterilni osebki imajo citoplazmatsko-genetsko strukturo (S, *rf rf*), sterilno citoplazmo in recesivne alele *rf*. Moško fertilen osebki imajo lahko pet različnih citoplazmatsko-genetskih struktur: (S, *Rf Rf*), (S, *Rf rf*), (N, *Rf Rf*), (N, *Rf rf*), (N, *rf rf*).

Citoplazmatsko-genetski sistem (CMS sistem) je trilinijski sistem in vključuje proizvodnjo treh tipov semena: seme A-, B- in R linije. V linijo A (genetska struktura: (S, *rf rf*)), ki je materna komponenta, je potrebno vnesti citoplazmatsko-genetsko moško sterilnost (Stoskopf, 1993). Pri navadni pšenici se kot vir citoplazmatske moške sterilnosti uporablja timofejeva pšenica (*Triticum timopheevi* Zhuk.). Poleg omenjene vrste predstavljajo zanimiv vir citoplazmatsko-genetske moške sterilnosti za navadno pšenico tudi nekateri predstavniki rodu *Aegilops* L. (Titan in Meglič, 2011). S tem je linija A moško sterilna, kar pomeni, da je proizvodnja peloda blokirana in ne bo mogla proizvajati semena, dokler je ne

križamo. Za ohranitev genotipa linije A se uporablja vzdrževalna linija B (maintainer), ki je v bistvu fertilni analog (moško fertilna izolinija), s katero oprašimo linijo A. Linija B (N, *rf rf*) je torej v genetskem smislu enaka liniji A, le da ji manjka moška sterilnost. Moška starševska komponenta mora nositi gene, ki v F1 hibridu povrnejo fertilnost, zato sledi vnos *Rf* genov v opraševalno linijo R. Z 'R' jo označujemo zaradi prisotnosti genov, odgovornih za restavrator oz. povrnitev fertilnosti (restorer geni). Ker je ta linija v večini primerov homozigotna, je njena genetska struktura (S, *Rf Rf*) ali pa (N, *Rf Rf*). Hibridno seme pridelamo s križanjem linij A in R. V križanjih se plazmotip deduje po materni komponenti, plazmotip linije R zato običajno ni pomemben (Ivančič, 2002b). Maksimalen pridelek je možen ob razmerju vrst moško sterilne matrne komponente (♀) in opraševalne očetne komponente (♂) 1♀ : 1♂ oz. 2♀ : 1♂ ali 3♀ : 1♂ (Singh in sod., 2010).

Pristopi na genetski osnovi so se v praksi izkazali za preveč kompleksne. CMS sistem na primer zahteva od pet do šest povratnih križanj za vnos moško sterilne citoplazme vrste *Triticum timopheevi* Zhuk. v materno komponento hibridne sorte, poleg tega pa povzroča probleme z obnovo fertilnosti v F1 generaciji. Danes so za pridelavo hibridnega semena navadne pšenice največ v uporabi sredstva za kemično hibridizacijo, ki omogočajo indukcijo moške sterilnosti v enem koraku, vendar pa je delovanje aktivne snovi odvisno od številnih dejavnikov, na katere ni mogoče vplivati, zato je bilo v zadnjih letih predlaganih nekaj transgenih pristopov za indukcijo moške sterilnosti (Titan in Meglič, 2011).

4.4.3 Pridelava hibridnega semena pri rižu (*Oryza sativa* L.)

Riž je samoprašna vrsta. Delež tujeprašnosti je v večini primerov manjši od 1 % in je odvisen predvsem od genetskih lastnosti rastline (povezanih s povečano odprtostjo cvetenja) in klimatskih razmer (Ivančič, 2002a). Za riž so značilna latasta socvetja in hermafroditni cvetovi. Okoli 15 milijonov hektarjev (50 %) vsega riža na Kitajskem je hibridnega in njegov pridelek je 27 % višji od najrodovitnejših samooplodnih sort (Virmani in sod., 2002).

Ker je riž samoprašnica, temelji proizvodnja hibridnega semena na sistemu moške sterilizacije. Ta je lahko CMS ali EGMS (okoljsko-občutljiva moška sterilnost), katera je lahko bodisi termo-občutljiva genska (TGMS) bodisi foto-občutljiva genska moška sterilnost (PGMS). Večina proizvodnje na Kitajskem temelji na CMS sistemu, čeprav postaja uporaba drugih dveh sistemov čedalje pogostejša. Proizvodnja hibridnega semena, ki vključuje te sisteme sterilnosti, je kompleksna in delovno intenzivna, zato je ekonomsko upravičena le na Kitajskem in v tistih državah, kjer je na voljo številna in poceni delovna sila (Virmani in sod., 2002).

Sistem EGMS vključuje starša z okoljsko-občutljivo moško sterilnostjo oz. S linijo. Sistem ne potrebuje niti mainteinerja (vzdrževalne B linije) niti restorerke (R) linije. Rastlino z EGMS-jem razmnožujemo kot katerokoli drugo konvencionalno samooplodno linijo, ki je posajena v okolju, ki inducira plodnost, če pa je posajena v okolju, ki inducira sterilnost, potem lahko služi kot starševska linija pri proizvodnji F1 hibridnega semena. K sterilnosti v tem okolju pripomore ali določena temperatura (TGMS) ali določena količina svetlobe (PGMS). Katerakoli linija, za katero je bilo ugotovljeno, da v kombinaciji s specifično S linijo daje potomce s heteroznim učinkom, se lahko uporabi kot oprasovalna starševska komponenta, ki donira pelod pri proizvodnji hibridnega semena. Ker sistem vključuje dve liniji (TGMS ali PGMS in oprasovalno linijo), je znan tudi pod imenom dvolinijski sistem (Virmani in sod., 2002).

4.4.4 Pridelava hibridnega semena pri repi (*Brassica rapa* L.) in ogrščici (*Brassica napus* L.)

Za vrste rodu *Brassica* so značilna grozdasta socvetja s svetlorumenimi dvospolnimi cvetovi. Glavni oprasovalci so žuželke in veter. Repa in ogrščica sta tujeprašni vrsti. Samooploditev preprečuje močan mehanizem avtoinkompatibilnosti (Ivančič, 2002a).

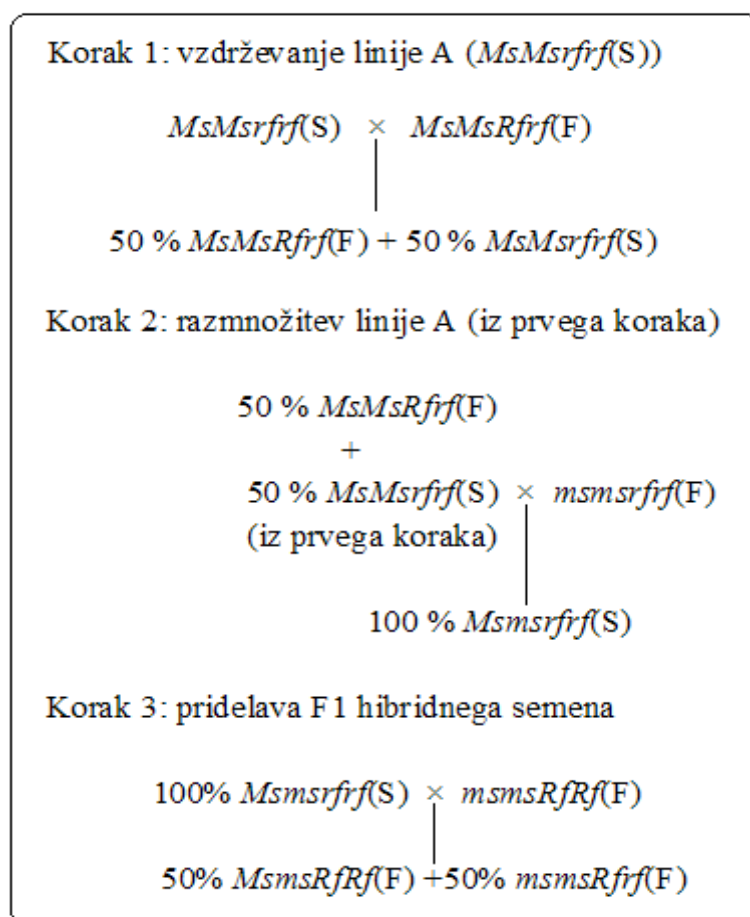
Pri proizvodnji hibridnega semena je pomemben mehanizem genske moške sterilnosti. V splošnem obstajata dva tipa genske moške sterilnosti, in sicer recesiven in dominanten (Banga in Banga, 1998). Genetska moška sterilnost prihaja do izraza na različne načine. Največkrat zakrnijo oz. degenerirajo prašniki ali pelodna zrna v raznih stadijih razvoja. Normalen razvoj preprečujejo geni jedra (nuklearni geni). Njihovo delovanje ni izraženo na isti način pri vseh rastlinskih vrstah, zato je lahko posledica bodisi popolna, bodisi delna moška sterilnost. Za genetsko moško sterilnost velja, da obstaja le en plazmotip (S), ki je v interakciji z recesivnim alelom (ali več aleli) moške sterilnosti *ms* in dominantnim alelom (ali aleli) obnavljanja (restavracije) fertilitnosti *Ms*. V največjem številu primerov je genetska moška sterilnost kontrolirana z enim samim parom alelov (*Ms* in *ms*) ali pa manjšim številom alelov. Če je moška sterilnost recesivna in kontrolirana z enim parom alelov, imajo moško sterilni osebki genetsko strukturo *msms*, genotipi moško fertilitnih osebkov pa so *MsMs* in *Msms*. Genetska rekombinacija moško sterilne matere ali ženske rastline (*msms*) s homozigotno moško fertilitnim oprasovalcem (*MsMs*) ima za posledico izenačeno (uniformno) moško fertilitno potomstvo (*Msms*). Pri križanju moško sterilne matere rastline (*msms*) s heterozigotno moško fertilitno rastlino (*Msms*) je polovica potomstva moško fertilitna (*Msms*) in polovica moško sterilna (*msms*) (Ivančič, 2002b).

Pri proizvodnji enojnega hibrida morajo obstajati trije genotipi:

- materna (ženska) moško sterilna linija A (*msms*),
- moško fertilitna oblika (izolinija ali analog) matere linije, imenovana linija B (*Msms*), ki je potrebna za vzdrževanje moško sterilne matere linije in

- druga starševska komponenta enojnega hibrida ali opraševalec v proizvodnji hibrida, imenovana linija C (M_sM_s).

Pri proizvodnji hibridnega semena repe in ogrščice se lahko uporabita dve shemi. Prva je proizvodnja enojnega križanca, pri čemer se recesivna GMS linija s 50 % fertlnih rastlin poseje z restavracijsko linijo. Slabost te sheme pri proizvodnji hibridnega semena je ta, da se mora 50 % fertlnih rastlin odstraniti pred cvetenjem, da ne bi oprašile moško sterilnih rastlin. Ta sistem je tako možno uporabiti le, če je na voljo poceni delovna sila. Pri drugi shemi imamo opraviti z GMS sistemom, ki ga kontrolirata dva dominantna gena, pri čemer je odstotek moško sterilnih maternih rastlin 100 % (Banga in Banga, 1998).



Slika 1: Postopek pridobivanja hibridnega semena z uporabo genske moške sterilnosti po načinu druge sheme (Banga in Banga, 1998: 418)

4.4.5 Pridelava hibridnega semena pri paradižniku (*Lycopersicon esculentum* Mill.)

Paradižnik je pretežno samooplodna vrsta. Delež tujeprašnosti se v normalnih razmerah zmernega pasu giblje od 1 do 5 % in je odvisen od genetske strukture (avtoinkompatibilni in moško sterilni genotipi) ter okolja (na nekaterih tropskih območjih je delež tujeprašnosti lahko precej velik). Cvetovi paradižnika so dvospolni, limonastorumeni barve in združeni v socvetja. Do oprašitve pride tekom rasti vrata pestiča in prodiranjem brazde skozi

prašnično cev. Brazda pestiča postane receptivna za pelod najpogosteje en dan pred začetkom cvetenja (odpiranjem cveta) (Ivančič, 2002a).

Skoraj vso hibridno seme pri paradižniku se v komercialni proizvodnji pridobiva z ročno emaskulacijo, zbiranjem peloda in prenosom peloda na materne rastline. Zato je proizvodnja draga in delovno intenzivna. Materna komponenta se posadi v sistemu kolov in žic, kar omogoča ročno delo (Banga in Banga, 1998). Za emaskulacijo je potrebno odbrati cvetove, ki so dobro razviti in so v stadiju pred odpiranjem. Cvetove, ki so že odprti ali pa ne dovolj razviti, je potrebno odstraniti. S cvetovi, ki se že začenjajo odpirati je potrebno ravnati zelo previdno, ker lahko pride do sprostitve peloda in samooprašitve. Emaskulacija je enostavna. S pomočjo pincete je pri velikem številu genotipov mogoče istočasno izpuliti prašnike in venec. Če to ni mogoče, je potrebno najprej razpreti venec, potem pa populiti prašnice v skupinah po dve ali tri skupaj. V primerih, ko se križanja opravljajo v gostih nasadih, če je močno izraženo gibanje zraka in če je veliko žuželk, je potrebno emaskuliran cvet izolirati (najpogosteje z vato) (Ivančič, 2002a). 16-24 ur po emaskulaciji se opravi še oprашitev, pogosto s prašnicami očetne rastline v stadiju prašitve, ko imajo dovolj peloda. Cvetove očetne komponente je potrebno nabrati, ko so v stanju neposredno pred prašitvijo ali pa so že začeli prašiti. Nato po potrebi cvetove še posušijo. Za pridobivanje večje količine peloda obstajajo posebni aparati, ki delujejo na osnovi vibracije. Pelod se zbere v posebne stekleničke. Najboljši način za nanos peloda na brazde pestičev je uporaba steklene cevke z majhno luknjico na enem koncu, ki jo napolnijo s pelodom (Banga in Banga, 1998).

4.4.6 Pridelava hibridnega semena rži (*Secale cereale* L.) s pomočjo avtoinkompatibilnosti

Rž je tujeprašna vrsta, ki se v naravnih okoliščinah oprashuje s pomočjo vetra. Socvetje rži je sestavljen klas, cvetovi pa hermafroditni. Cvetenje je zelo intenzivno, mnogo bolj kot pri pšenici in ječmenu. Samooprašitev pri rži je naravno preprečena z mehanizmom gametofitske avtoinkompatibilnosti, ki se deduje z dvema lokusoma (S in Z). Zaradi te posebnosti je v določenih primerih mogoče izvesti križanje tako, da neemaskulirane klase dveh genotipov postavimo v neposredno bližino, ki omogoča prehajanje peloda iz enega genotipa na drugi, ali pa jih še dodatno izoliramo s skupno izolacijsko vrečko. Večkratno potresanje klasov pospešuje oprashavanje in s tem križanje. Pri uporabi te metode moramo računati na določen odstotek samooploditve. Za razlikovanje potomcev samooploditve od križancev, je dobro uporabiti enostavno kontrolirane dominantno-recesivne označevalne ali marker lastnosti, kjer je materna komponenta recesivna, očetna pa dominantna. Zaželeni so markerji, ki jih lahko prepoznamo (opazimo) v zgodnjem stadiju razvoja rastline. Na ta način je možno odstraniti potomce samooplodnje pred cvetenjem. Tukaj moramo omeniti, da pri rži ni vedno lahko prepoznati križancev. Največji problem je prevladujoča heterozigotnost rastlin (Ivančič, 2002b).

5 ZANESLJIVOST IN EKONOMIČNOST PRIDELAVE HIBRIDNEGA SEMENA

Proizvodnja hibridnega semena je dražja kot proizvodnja linijskih ali tujeprašnih kultivarjev, zato mora biti pridelek hibrida toliko višji, da opraviči stroške proizvodnje hibridnega semena. Količina hibridnega semena, pridelanega na enem hektarju in količina porabljenega semena na hektar (količina semena starševskih linij) sta glavna dejavnika, ki potrjujeta ekonomičnost pridelave. Pridelek in kvaliteta semena ženske komponente sta pomembni zahtevi pri proizvodnji hibridnega semena. V prvih letih proizvodnje koruze je bil pridelek samooplodnih linij premajhen, da bi lahko govorili o zanesljivosti in ekonomičnosti. Za komercialno proizvodnjo so uporabljali trilinijske in štirilinijske hibride, ker je bila v tem primeru materna komponenta rodovitnejši enojni hibrid. Danes so v uporabi enojni hibridi, saj so žlahtnitelji močno izboljšali pridelek samooplodnih linij (Fehr, 1987).

Da je proizvodnja F1 hibridnega semena tudi zanesljiva, je odločilna izbira staršev, saj pri križanju združujemo v potomstvu (hibridu) njihove lastnosti. Za pravilno izbiro staršev je potrebno dobro poznati izhodni material, predhodno natančno analizirati lastnosti staršev ter pridelati dovolj semena (Rozman, 2009). Na splošno ni praktično pridelovati velikih količin starševskega semena s pomočjo katerekoli oblike ročnega oprasovanja, temveč se jih vzgaja v sorodstvu ali samooprasuje v prosti oprasitvi. Pri tem je pomembno, da se žlahtnitelj odloči do katere stopnje homozigotnosti bo šel pri razvoju linij, da ne bi cena semena zaradi nizke rodnosti starševskih samooplodnih linij postala omejitveni dejavnik proizvodnje hibridov, saj lahko povečanje stopnje homozigotnosti pri tujeprašnicah vodi do premočne inbriding depresije, katera je tem večja čim večja je stopnja homozigotnosti (Martinčić in Kozumplik, 1996). Po določenem obdobju samooplojevanja (6 generacij) je potrebno samooplodne linije testirati na splošno in specifično kombinacijsko sposobnost s ciljem, ugotoviti kateri dve liniji dajeta s križanjem najboljše potomce, ki izrazijo v F1 generaciji hibridni vigor.

Osnovna zahteva pri proizvodnji starševskih linij je, da dosežemo čim bolj kvalitetno seme z visoko stopnjo genetske čistosti. Vzdrževanje genetske čistosti pri tujeprašnicah vključuje izolacijo pred viri neželenega peloda, prav tako je pomembno odstranjevanje mutiranih, netipičnih osebkov. Posebno je treba paziti, da se starševsko seme ne zmeša s tujim semenom med pridelovalnimi in predelovalnimi postopki, kot so žetev, transport, dodelava in pakiranje (Fehr, 1987). Pridelava starševskega semena ima dve fazi: vzdrževanje majhnih količin čistega semena in priprava večjih količin semena, ki ga sejemo na polje, kjer bo potekala pridelava hibridnega semena.

6 SKLEP

Hibridno seme se uporablja predvsem zaradi izkoriščanja heteroznega učinka v F1 generaciji. Ponovna setev hibridnega semena v naslednji sezoni ni več primerna, saj se heterozni učinek prepolovi. S tem je zaščiten semenarska firma, saj morajo kmetje vsako leto kupovati novo hibridno seme, žlahtnitelj pa je zavarovan pred zlorabo (odtujitvijo) osnovnega starševskega materiala. Čeprav je v tem pogledu porabnik hibridnega semena na slabšem, se mu vsakoletni nakup novega semena ekonomsko splača zaradi boljšega pridelka z izraženim hibridnim vigorjem.

Za pravilno uporabo sistemov pri proizvodnji hibridnega semena moramo pri rastlinah, ki jih med seboj križamo, poznati sestavo cveta ter biologijo (način in čas cvetenja). Pri tem so pomembne predvsem razlike med samoprašnicami in tujeprašnicami ter dvospolnimi in enospolnimi cvetovi. Za pridelavo hibridnega semena je potrebna tujeprašnost in ločenost moških in ženskih socvetij, tako da je na enostaven način možno doseči nadzorovano križanje dveh genetsko različnih staršev. Pri tujeprašnih rastlinah to zlahka dosežemo, zlasti pri monoecičnih vrstah (koruza) in pri genotipih z izraženo avtoinkompatibilnostjo, ki je opisana kot alternativa moške sterilnosti. Pri samoprašnicah je postopek veliko težji, ker so cvetovi majhni in vsebujejo tako ženske kot tudi moške spolne organe. Glavna bariera pri samoprašnih rastlinah je transformacija iz samoprašnosti v tujeprašnost. Pri njih je nadzorovano križanje dveh genetsko različnih staršev možno doseči z različnimi načini indukcije moške sterilnosti v materni komponenti, s čimer dosežemo, da pelod ni viabilen in posledično se rastlina ni sposobna samooploditi. Najbolj znani načini indukcije moške sterilnosti so uporaba CMS sistema (najbolj razširjen sistem), GMS sistema ter uporaba kemičnih sredstev (CHA). Ročna emaskulacija in opráševanje sta nepraktični na velikih površinah pri komercialni proizvodnji hibridnega semena. Izjemoma je tak način ekonomičen pri tistih rastlinskih vrstah, pri katerih je na voljo številčna in poceni delovna sila ter pri visoko-kakovostnih kmetijskih rastlinah, pri katerih se pričakuje veliko semena na enoto površine, medtem ko se za zasaditev starševskih rastlin, na katerih se pridelala hibridno seme, potrebuje malo semena.

Pri proizvodnji hibridnega semena je bistvenega pomena odbira ustreznega starševskega materiala oziroma linij. Hibridni sistem tako v osnovi vsebuje žensko komponento (semenska linija) z izmeničnimi vrstami moške komponente (opraševalna linija). Materne rastline morajo biti ustrezno izolirane od virov neželenega peloda. Hibridno seme, ki nastane na materni komponenti, je potrebno požeti ločeno od semena na očetnih rastlinah in mora biti fertilno v F1 populaciji.

7 VIRI

- Banga S.S., Banga S.K. 1998. Hybrid cultivar development. Ludhiana, Narosa Publishing House: 536 str.
- Borojević S. 1990. Principles and methods of plant breeding. Amsterdam, Elsevier Sc. Publ.: 368 str.
- Bohanec B. 2009. Žlahtnjenje rastlin. Študijsko gradivo za predavanja za študente univ. študija agronomije BF v Ljubljani. Ljubljana, Biotehniška fakulteta (interno gradivo)
- Fehr W.R. 1987. Principles of cultivar development. Theory and technique. New York, Macmillan Publishing Company: 536 str.
- Fehr R.W., Hadley H.H. 1980. Hybridization of crop plants. Madison, Wisconsin, USA, American Society of Agronomy and Crop Science Society of America: 766 str.
- Ivančič A. 2002a. Hibridizacija pomembnejših rastlinskih vrst. Maribor, Fakulteta za kmetijstvo: 776 str.
- Ivančič A. 2002b. Osnove rastlinske hibridizacije. Maribor, Fakulteta za kmetijstvo: 672 str.
- Martinčič J., Kozumplik V. 1996. Oplemenjivanje bilja. Zagreb, Poljoprivredni fakultet Osijek, Agronomski fakultet Zagreb: 420 str.
- Pravilnik o trženju semena žit. 2012. Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. http://www.fu.gov.si/fileadmin/fu.gov.si/pageuploads/ZAKONODAJA_IN_DOKUMENTI/VeljavniPredpisi/Sorte_rastlin_in_semenarstvo/SI_predpisi/PR_seme_zit_NPB3-april2012.pdf
- Rozman L. 1998. Genska banka koruze. Sodobno kmetijstvo 31, 2: 71-73
- Rozman L. 2009. Osnove žlahtnjenja rastlin. Študijsko gradivo za vaje za študente univ. študija agronomije BF v Ljubljani. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 79 str.
- Semenarna Ljubljana. 2011. Hibridna ozimna žita: pšenica, ječmen, rž. www.semenarna.si/tl_files/KAZALO/katalogi/2011/Hibridi%20Ozimna%20zita%2012-www.pdf
- Singh S.K., Chatrath R., Mishra B. 2010. Perspective of hybrid wheat research : A review. Indian Journal of Agricultural Sciences, 80, 12: 1013-27

- Stoskopf N.C. 1993. Plant breeding. Theory and practice. USA, Westview Press: 531 str.
- Titan P., Meglič V. 2011. Nekateri pristopi za izkoriščanje heteroze pri navadni pšenici (*Triticum aestivum* L.). Acta agriculturae Slovenica, 97, 2: 137-144
- Virmani S.S., Mao C.X., Toledo R.S., Hossain M., Janaiah A. 2002. Hybrid rice seed production technology and its impact on seed industries and rural employment opportunities in Asia. Technical Bulletin – Food and Fertilizer Technology Center, 56. Taipei, Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region: 13 str.
- Wehner T.C. 1999. Heterosis in vegetable crops V: The genetics and exploitation of heterosis in crops. Coors J.G., Shivaji Pandey (eds.). Madison, American Society of Agronomy: 387-397
- Zakon o semenskem materialu kmetijskih rastlin. 2002. Ur. l. RS št. 58/02

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Ludviku Rozmanu za vso pomoč in nasvete, fantu Urošu za spodbude, sestri Maji in prijatelju Gregi za računalniško pomoč, staršem za podporo in razumevanje ter bratu Blažu za motivacijo med pisanjem diplomske naloge.