

NOVE TEHNOLOGIJE U OPLEMENJIVANJU POLJOPRIVREDNOG BILJA

NEW TECHNOLOGIES IN BREEDING AGRICULTURAL CROPS

V. Kozumplik i I. Pejić

SAŽETAK

Razvoj novog kultivara poljoprivrednog bilja klasičnim oplemenjivačkim postupkom je dugotrajan, skup i često neizvjestan. Postupak se sastoji najčešće u razvoju početne oplemenjivačke populacije, izboru superiornih genotipova i ispitivanju njihovih svojstava u polju i laboratoriju. Zahvaljujući razvoju molekularne genetike i kulture tkiva i stanica razvijene su tehnologije koje se mogu integrirati u klasično oplemenjivanje. Dosadašnji rezultati upućuju na mogućnost primjene somaklonske varijabilnosti, fuzije protoplasta i transfera gena za razvoj genetske varijabilnosti, a tehnike haploida za skraćivanje klasičnog postupka postizanja homozigotnosti. Molekularni markeri pružaju mogućnost ustanovljenja genetske osnove svojstva na nivou DNK nezavisno od genetskih i okolinskih interakcija. S obzirom na opsežna istraživanja u području molekularne biologije za očekivati je razvoj jednostavnijih i jeftinijih tehnologija koje će integrirane u klasično oplemenjivanje doprinijeti većoj efikasnosti i smanjenju troškova kod razvoja novih kultivara.

Ključne riječi: oplemenjivanje bilja, somaklonska varijabilnost, fuzija protoplasta, transfer gena, gen marker

Key words: plant breeding, somacinal variability, protoplast fusion, gene transfer, gene marker

UVOD

Razvoju oplemenjivanja bilja kao znanstvene discipline prethodio je razvoj nekih drugih znanstvenih disciplina među kojima je za oplemenjivanje bilja bio posebno važan razvoj genetike. Bolje razumijevanje nasljeđivanja svojstava omogućilo je razvoj pojedinih oplemenjivačkih metoda za poboljšanje ekonomski

važnih svojstava. Uspjeh u oplemenjivanju ovisi o genetskoj varijabilnosti početne populacije za svojstvo koje se želi poboljšati, o metodi izbora i načinu ispitivanja odabranih genotipova u poljskim pokusima. Bez obzira koja se od klasičnih oplemenjivačkih metoda primjenjuje za razvoj novog kultivara, postupak je dugotrajan a uspjeh neizvjestan. Nove spoznaje iz područja kulture tkiva i stanica, te molekularne genetike omogućuju razvoj genetske varijabilnosti i tamo gdje to prirodnom hibridizacijom nije moguće, vremensko skraćivanje oplemenjivačkog postupka razvoja novog kultivara i pouzdaniju identifikaciju genotipova sa željenom genetskom osnovom za svojstvo od interesa. Svrha ovog rada je prikazati mogućnost integriranja novih spoznaja iz područja molekularne genetike i drugih znanstvenih disciplina u postojeće metode oplemenjivanja bilja u cilju bržeg, efikasnijeg i ekonomičnijeg razvoja novih kultivara visokog i stabilnog prinosa proizvoda željene kvalitete.

1. RAZVOJ GENETSKE VARIJABILNOSTI

Prisutnost genetske varijabilnosti u oplemenjivačkoj populaciji za svojstvo koje se želi poboljšati osnovna je pretpostavka za uspjeh u oplemenjivanju. Najčešći način razvoja genetske varijabilnosti je hibridizacija dva ili više genetski divergentnih roditelja.

1.1. *Induciranje mutacija*

Zbog nemogućnosti nalaženja izvora genetske osnove za željeno svojstvo u prirodi prišlo se razvoju genetske varijabilnosti induciranjem mutacija (Fehr, 1987). Mutacija može biti promjena u nukleotidima molekula DNK, promjena u strukturi kromosoma, i promjena u broju kromosoma. Može se dogoditi u nasljednoj osnovi jezgre i organelama citoplazme. Među brojnim mutantima obično je mali broj sa željenim svojstvima, pa je potrebno raditi s velikim populacijama što u poljskim uvjetima predstavlja opsežan i često neuspješan posao.

1.2. *Somaklonska varijabilnost*

Od sedamdesetih godina ovog stoljeća u poljoprivredi se primjenjuje kultura tkiva i stanica. Najjednostavnija *in vitro* metoda je razmnožavanje iz pojedinih biljnih dijelova. Kod ovakvog postupka pojavljuje se i nova genetska varijabilnost poznata kao somaklonska (Larkin i Scowcroft, 1981). Razlozi ovih promjena nisu potpuno jasni. Moguće je da se kao posljedica *in vitro* stresa aktiviraju mehanizmi koji reorganiziraju genom (McClintock 1950, prema Kuckuck i sur., 1991). Ima

mišljenja da osnova za mutacije postoji već u tkivu, odnosno stanici prije uzgoja u *in vitro* uvjetima (Kasperbauer i sur., 1981). Mutacije koje se pojavljuju u kulturi tkiva i stanica najčešće su aneuploidi i poliploidi, ne osobito zanimljivi u oplemenjivanju bilja. Među somaklonovima nađena je, međutim, i genetska varijabilnost za otpornost na bolesti, npr. na *Phytophthora infestans* kod krumpira (Behnke, 1979). Nađena je i somaklonska varijabilnost za otpornost na herbicide, primjerice kod duhana (Chaleff i Ray, 1984). Pokazalo se da se ovakva svojstva, inducirana *in vitro*, nasljeđuju mendelovski (Kuckuck i sur., 1991). Više mutacija se, izgleda, događa u kulturi stanica nego u kulturi tkiva. Isto tako je uočeno da je frekvencija mutacija koje se događaju u uvjetima *in vitro* tim veća što je kalusna faza kultiviranja *in vitro* duža.

Prednost kulture tkiva i stanica pred radom s biljkama u polju je mogućnost rada s velikim brojem genotipova na maloj površini. Osim toga, masovni izbor genotipova otpornih na određenu bolest, ili herbicid u kulturi tkiva i stanica moguće je na bazi prisutnosti toksina iste bolesti, ili herbicida u hranidbenoj podlozi. Ipak, do sada je somaklonska varijabilnost dala malo za poljoprivredu interesantnih mutacija. Problem uz ostalo predstavlja i nestabilno izražavanje novog svojstva u proizvodnim uvjetima, kao i nepoznat način nasljeđivanja svojstva u daljnjim generacijama (Ahloowalia, 1986, prema Borojević, 1990).

1.3. Fuzija protoplasta

Često u prirodi postoji izvor željenog svojstva, ali je nemoguća spolna hibridizacija između genetski udaljenih vrsta čija se svojstva žele kombinirati u hibridu. Fuzijom protoplasta, poznatom i kao somatska hibridizacija, moguće je dodati nasljedne osnove dvaju genotipova (Vasil, 1976, prema Kuckuck, 1991).

Djelovanjem enzima pektinaze na tkivo lista, vegetativnog vrha, i druga, mogu se izdvojiti stanice, a djelovanjem celulaze mogu se rastvoriti stanične membrane i osloboditi protoplasti (Cocking, 1960). Kultiviranjem protoplasta u hipertoničnoj tekućoj hranidbenoj podlozi dolazi do razvoja kalusa iz kojeg se mogu regenerirati funkcionalne biljke. Za vrijeme razgradnje stanične membrane i izdvajanja protoplasta može spontano doći i do fuzije protoplasta. Ovo se može inducirati kemijski, a može se izvesti i elektrofuzija. Najprije dolazi do fuzije membrane, a zatim unutar membrane do fuzije citoplazme i jezgre (Gleba i Sytnik, 1984, prema Kuckuck, 1991). Prva uspješna fuzija protoplasta izvedena je između vrsta *Nicotiana glauca* i *N. langsdorfii* (Carlson i sur., 1972, prema Borojević, 1990).

Somatska hibridizacija nalazi primjenu i u oplemenjivanju unutar iste vrste za kombiniranje raznih svojstava (Deimling i sur. 1988). Kod tetraploidnog krumpira,

Solanum tuberosum, razviju se najprije partenogenezom diploidi, a zatim monoploidi kulturom polena. Izdvoje se monoploidi s raznim svojstvima, npr. otpornošću na virus X (TMx), virus Y (TMY), plamenjaču (*Phytophthora infestans*) i nematode, i udvostruči im se broj kromosoma, najčešće spontano. Slijedi križanje između dihaploidiziranih monoploida, a zatim se fuzijom protoplasta tako dobivenih hibrida proizvedu tetraploidi sa sva četiri željena svojstva.

Somatska hibridizacija može biti simetrična, i asimetrična kada dolazi do fuzije samo dijela genoma jednog s genomom drugog genotipa. Ovako se može dobiti nova biljka sa samo nekoliko dodatnih svojstava. Nastoji se razviti metoda kojom bi se mogao izdvojiti željeni dio genoma, odnosno inaktivirati preostali dio genetske osnove, npr. zračenjem. Asimetričnom fuzijom protoplasta unešena je otpornost na herbicid atrazin iz mutanta *Solanum nigrum* u *S. tuberosum*.

Kod somatske hibridizacije dolazi i do fuzije citoplazme s jezgrom, razviju se cibridi, koji također mogu biti simetrični i asimetrični (Kuckuck i sur., 1991). Cibridi mogu biti interesantni za prijenos citoplazmatske muške sterilnosti važne u proizvodnji hibridnog sjemena. Kod kombiniranja citoplazme i organela jedne vrste s jezgrom druge vrste naišlo se kod fuzije protoplasta na poteškoće, kao npr. nemogućnost regeneracije biljčica iz takvog cibrida (Collins i sur., 1984, prema Borojević, 1990). S novim spoznajama o fuziji protoplasta vjerojatno će se ova tehnika primjenjivati u oplemenjivanju bilja više nego što je to bilo do sada.

1.4. Transfer gena

Osim navedenim metodama, novu genetsku varijabilnost moguće je postići i transferom gena, tj. unošenjem gena iz jednog organizma u drugi. Razvijene su metode kojima je moguće identificirati i izolirati (ili sintetizirati) gen i unijeti ga u novu karioplazmu gdje će biti funkcionalan. Ova je mogućnost u oplemenjivanju interesantna jer se često želi poboljšati samo jedno ili mali broj svojstava bez promjene ostalih. Ovo se želi postići u što kraćem razdoblju.

Pojam gen ima različito značenje u poljoprivredi od značenja u molekularnoj genetici (Kuckuck i sur., 1991). U poljoprivredi se pod genima podrazumijeva cijepanje svojstava u raznim postocima "crossingover-a" kao posljedica razne udaljenosti od drugih gena na kromosomu. Stoga je gen u poljoprivredi matematički izraz. U molekularnoj genetici gen se promatra kao niz nukleotida vezanih DNK molekulama. Strukturalni gen sastoji se od kraćeg ili duljeg linearnog niza nukleotida, kao dijelova velike DNK molekule dvostrukog lanca.

Postupak transfera gena sastoji se u izboru donora željenog gena, izboru vektora ili tehnike prijenosa gena u stanicu recipijenta, i izbor recipijenta u kojemu će gen normalno funkcionirati (Borojević, 1990). Izdvajanje gena iz lanca DNK obavlja

se restrikcijским enzimima. Izvor gena mogu biti prokariotske i eukariotske stanice. Unošenje gena u stanicu recipijenta može se izvesti mikroinjekcijom, elektroporacijom i vektorima. Za transfer gena najčešće se primjenjuju vektori, posebno Ti plazmid izoliran iz bakterije *Agrobacterium tumefaciens*. Plazmidi su prstenaste molekule DNK, a ponašaju se kao minikromosomi (Borojević, 1990). Osnovni princip unošenja gena Ti plazmidom je izdvajanje plazmida iz bakterije, isjecanje dijela plazmida iz prstena restrikcijским enzimom, ugrađivanje na isto mjesto željenog gena djelovanjem određenih enzima, i vraćanje himernog plazmida u bakteriju. Ova zatim, unosi gen u željenu biljnu stanicu. Uspješan se transfer potvrđuje izražavanjem svojstva koje gen uvjetuje kod regenerirane biljke. Primjenom Ti plazmida unesen je npr. gen za otpornost na herbicid glifosfat u petuniju (Kuckuck i sur., 1991). Primjenom transfera gena i rekombinirane DNK najviše uspjeha je postignuto i glede otpornosti na herbicide. Najvažniji razlog za ovo je što je biokemijski proces otpornosti na herbicide uglavnom jednostavan i poznat. Najčešće se osniva na djelovanju samo jednog ili nekoliko enzima.

Znanje o biokemijskim mehanizmima otpornosti na bolesti je ograničeno, pa je i primjena tehnike transfera gena za razvoj otpornosti na bolesti bilo manje uspješno. Spoznaja, da prisutnost proteinskog omotača virusa u biljci onemogućuje zarazu biljke istim virusom rezultirala je idejom unošenja gena za razvoj omotača mozaik virusa (TMV) u biljku duhana. Nakon ovoga duhan je pokazao otpornost na TMV. Slično, unošenjem duhan gena iz *Bacillus thuringiensis*, za razvoj toksičnog proteina, duhanska biljka je sintetizirala protein (toksin), antagonist za insekte (Kuckuck i sur. 1991.). Osim u duhan ovaj gen je unesen i u neke druge biljne vrste.

Nakon rekombinacije DNK novi genotip treba ispitati u uvjetima proizvodnje, kako bi se potvrdilo očekivano izražavanje svojstva. Transfer jednog ili nekoliko gena iz jednog u drugi organizam je stoga samo dio oplemenjivačkog procesa rekombinacije kompletne genetske osnove više svojstava (Borojević, 1990).

U usporedbi s kvalitativnim svojstvima daleko veći problem predstavljaju kvantitativna svojstva čije izražavanje ovisi o velikom broju gena. Kao primjer može se uzeti prinos, obično najvažnije svojstvo u oplemenjivanju bilja. Do danas još nije riješen problem identifikacije svih, ili barem svih značajnih gena za to svojstvo, njihove izolacije, i ponovne ugradnje u genom recipijenta na efikasan način za fenotip svojstva.

2. MOGUĆNOST SKRAĆIVANJA POSTUPKA OPLEMENJIVANJA

Kod većine samooplodnih poljoprivrednih vrsta u proizvodnji upotrebljavaju se linijski kultivari (čista sorta), a kod mnogih stranooplodnih, hibridni kultivari (F1 hibridi). I kod jednog i kod drugog tipa kultivara treba oplemenjivanjem razviti homozigotne genotipove za što samooplodnjom treba obično najmanje pet generacija. Skraćivanje ovog postupka kod klasičnog oplemenjivanja moguće je primjenom različitih metoda dobivanja haploida, čijom dihaploidizacijom stvaramo potpuno homozigotne linije (Pavlina i Martinić-Jerčić, 1990).

2.1. Haploidi

Haploidi su organizmi koji imaju u jezgri polovičan broj kromosoma (genoma) od normalnog somatskog broja. Udvostručenjem broja kromosoma kod haploida dobiju se dihaploidi, biljke s normalnim somatskim brojem kromosoma, a uz to potpuno homozigotne. U prirodi se haploidi pojavljuju kao posljedica partenogeneze razvojem iz majčinske ili očinske gamete (Fehr, 1987). Kod ovih haploida može doći do spontanog udvostručenja broja kromosoma, dihaploidizacije. Pojava haploida i spontanih dihaploida u prirodi se događa u malom postotku i do sada nije razvijena zadovoljavajuća metoda identifikacije i primjene ovakvih haploida i dihaploida za oplemenjivačke svrhe.

Za umjetni razvoj haploida najviše se upotrebljava kultura polena i metoda eliminacije kromosoma. Prvi rad o haploidima razvijenim *in vitro* iz polena kod kultivirane biljne vrste objavili su Bourgin i Nitsch (1967), a haploidi su bili proizvedeni iz polena duhana. Nakon stavljanja polena na hranidbenu podlogu, najprije se formira kalus, a daljnjim *in vitro* postupcima potiče se diferencijacija i organogeneza u biljku. Razne biljne vrste imaju razne zahtjeve glede *in vitro* uvjeta za uspješnu regeneraciju haploida iz polena (Sunderland, 1974, prema Fehr, 1987). U oplemenjivačkom programu za dobivanje raznih genotipova u populaciji haploida, kao izvor polena služe heterozigotne biljke, što mogu biti F1 biljke, biljke iz cjepajuće F2 populacije, ili iz neke stranooplodne populacije. Mora se voditi računa o stadiju razvoja cvijeta i polena da bi se postigao dobar razvoj kalusa i haploida, što ovisi o vrsti. Ključnu ulogu za uspjeh razvoja haploida iz polena ima hranidbena podloga, svjetlo i temperatura, kao i genotip. Induciraju li se embrioidi u kalusu oni se obično dalje razvijaju u biljke bez kromosomskih abnormalnosti. Dihaploidizacija haploidnih biljčica može se dogoditi spontano ili induciranjem, obično kolhicinom. Danas je androgeneza (npr. kod duhana) rutinski postupak za razvoj haploida.

Kultura polena želi se iskoristiti i u oplemenjivačkom razvoju hibrida kukuruza

(Petolino, 1992). Do danas je uspjeh razvoja dihaploida kod kukuruza androgenozom postignut samo s određenim genotipovima. Dobiveni su slični prinosi s hibridima proizvedenim od linija dihaploida u usporedbi s hibridima čije su inbred linije proizvedene klasičnim oplemenjivačkim metodama.

Drugi način razvoja haploida je metoda eliminacije kromosoma. Ovo se obično događa kod međuvrskih hibrida uslijed interakcije gena u jezgri porijeklom od raznih vrsta, ili zbog interakcije genetske osnove u jezgri i citoplazmi (Kasha i Kao, 1970). Ovakav razvoj haploida upotrebljava se u oplemenjivanju ječma duhana i nekih drugih kultura. Kod ječma je ovom tehnikom razvijen npr. kultivar Mingo (Foster, 1987, prema Fehr, 1987). Metoda je poznata i kao *Bulbosum* metoda jer se osniva na hibridizaciji *Hordeum vulgare* s *H. bulbosum* (Kasha i Kao, 1970; Pavlina, 1987). Postupak se sastoji u križanju heterozigotnog roditelja *H. vulgare* s *H. bulbosum*. Nakon oplodnje dolazi do razvoja embrija. Iz nezrelog sjemena embrio se izvadi i nastavi uzgajati na hranidbenoj podlozi. U određenom stadiju razvoja rekultivira se inokulum na novu hranidbenu podlogu i nakon regeneracije nastavlja se uzgojem mladih biljčica. Ove biljčice se u stadiju 2-3 lista tretiraju otopinom kolhicina. Nakon uspješne dihaploidizacije na biljci se razvije normalno diploidno sjeme homozigotne biljke. Biljke sadrže samo kromosome od *H. vulgare*, jer je za vrijeme razvoja embrija došlo do eliminacije kromosoma *H. bulbosum* iz hibrida.

U proizvodnji nema puno kultivara razvijenih tehnikom haploida. Promjenom ove tehnike oplemenjivački postupak razvoja novog kultivara skрати se za najmanje tri godine. Međutim, kod dihaploida je uočeno da daju niži prinos u usporedbi s linijskim kultivarima razvijenim klasičnim oplemenjivanjem (Fehr, 1987).

3. MOGUĆNOST POVEĆANJA EFIKASNOSTI SELEKCIJE GEN MARKERIMA

U oplemenjivanju se osjeća potreba za markerima genetske osnove pojedinih svojstava. U ovu svrhu iskorišteni su morfološki markeri koji su uočljivi tek nakon što se biljka potpuno razvije. Osim toga ovakvih markera ima relativno malo i odnose se uglavnom na major gene, a ponekad njihova prisutnost nije niti poželjna u novom genotipu (Tanksley i sur., 1989). Poželjni su markeri koji bi pokazali prisutnost određene genetske osnove u biljci već u ranom stadiju. Tako bi se na osnovi ovih markera mogao napraviti izbor željenih genotipova najkasnije u stadiju mlade biljčice, što bi s jedne strane povećalo uspjeh u oplemenjivanju, a s druge pojeftinilo cijeli oplemenjivački postupak.

U ovom smislu kao gen markeri služe proteini, izoenzimi i fragmenti DNK.

Ovi su markeri poznati kao molekularni gen markeri. Razvoj tehnika primjene molekularnih gen markera omogućila su saznanja stečena prvenstveno razvojem molekularne biologije.

Primjena proteina i izoenzima kao gen markera sastoji se u elektroforezi ekstrakta rezervne tvari sjemena ili dijelova mladih biljčica. U električnom polju dolazi do razdvajanja kolodnih čestica makro molekula, tj. multiplih molekula enzima. Nakon bojanja histokemijskim metodama enzimi postaju vidljivi. Vežanost izoenzimatske genetske osnove s genom za određeno svojstvo omogućava ustanovljenje prisutnosti tog svojstva na osnovi prisutnosti enzima (Pejić i sur., 1992). Izoenzimi su praktični kao gen markeri i stoga što je ustanovljeno da se njihove glavne forme (aloenzimi) nasljeđuju mendelovski (Wright, 1963, prema Borojević, 1986). Izoenzimi kao gen markeri često su primijenjeni u znanstveno-istraživačkom radu na kukuruzu (Goodman i sur., 1980, Stuber i sur., 1982, Frei i sur., 1986, Smith i Smith, 1989, Pejić, 1992) ali i kod drugih kultura (Bernatzky i Tanksley, 1986, Mittal i sur., 1987). Izoenzima, koji se mogu upotrijebiti kao gen markeri ima, međutim relativno mali broj, nedovoljan da kao markeri budu pokazatelji genetske osnove velikog broja gen-lokusa genoma, a što je kod proučavanja lokusa kvantitativnih svojstava (QTL) važno.

Danas se zato, sve više kao molekularni markeri lokusa kvantitativnih svojstava, među kojima je obično najinteresantniji prinos, upotrebljavaju fragmenti DNK (Tanksley i sur., 1989, Dudley i sur., 1991, Helentjaris, 1991, Melchinger i sur., 1991, Smith i Smith, 1991, Stuber i sur., 1992, Pejić i sur., 1992). Zahvaljujući identificiranju i izdvajanju restriksijskih enzima, i izdvajanju i kloniranju jednostrukih dijelova DNK koji služe kao probe, bilo je moguće razviti tehniku poznatu kao RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism"). Ovim postupkom, i to najčešće metodom poznatom kao "Southern Blots", pronalazi se variranje dužine DNK fragmenata eukariotskih genoma, dobivenih endonukleaznom digestijom DNK. Ovakvi fragmenti, koloidne makromolekule, stave se na agarozni gel i razdijele u električnom polju elektroforezom. Nakon toga slijedi hibridizacija fragmenata sa ^{32}P markiranim probama na određenoj podlozi (danas najčešće najlonska membrana modificiranog naboja) i ispiranje nehibridiziranog dijela fragmenata, te nakon radiografije očitavanje u usporedbi sa standardima. Na osnovi poznavanja vežanosti ("linkage" gen mape) nađenih DNK fragmenata raznog polimorfizma i gena za neko svojstvo, npr. prinos, ustanovi se i zastupljenost genetske osnove za ovo svojstvo tim pouzdanije i potpunije što je genom kroz DNK fragmente detaljnije analiziran. Umjesto ^{32}P danas se sve više upotrebljavaju probe markirane biotinom. Razvoj proba i postupak hibridizacije stalno se usavršavaju. Tanksley i sur. (1989) navode mogućnost primjene DNK fragmenata

- markera ustanovljenih RFLP tehnikom, za: (1) izradu genskih ("linkage") mapa (RFLP markeri na DNK razini ponašaju se kodominantno pa se genotip lokusa može odrediti u biljci iz bilo koje sheme križanja, a isti su slobodni i od epistatičnih interakcija); (2) za otkrivanje major gena vezanih sa RFLP markerima; (3) za rastavljanje kvantitativnih svojstava na jednostavnije genske komponente (što bi omogućilo analizu kvantitativnog kao kvalitativno svojstvo, identifikaciju i transfer najvažnijih gena za svojstva iz donora u recipijenta); (4) za skraćivanja postupka oplemenjivanja (umjesto 5-6 povratnih križanja bilo bi dovoljno svega tri, izborom biljaka sa što manje nepoželjnih gena vezanih uz željeni gen ili gene); (5) za efikasniju primjenu egzotične germplazme u oplemenjivanju (identifikacija, izdvajanje i transfer gena iz homolognog dijela kromosoma udaljene divlje vrste); (6) za ustanovljenje homolognosti genoma između vrsta; i (7) za kloniranje gena na osnovi poznate genske mape.

Kako su u oplemenjivanju ekonomski najvažnija kvantitativna svojstva, posebice prinos, to oplemenjivače zanima mogućnost primjene molekularnih markera za proučavanje i manipulaciju u smislu poboljšanja ovih svojstava. Stuber i sur. (1992) su križali inbred linije kukuruza B73 x Mo17, razvili F2 cijepajuću generaciju i analizirali RFLP tehnikom 76 DNK fragmenata - markera u laboratoriju, i sedam svojstava u polju, među kojima i prinos. Osim tradicionalno korištenog analitičkog pristupa poznatog kao jednostruki marker, gdje je marker za lokus svojstva samo s jedne strane, upotrebljeni su i markeri s obje strane lokusa, intervalno mapiranje. Podaci dobiveni nakon izračunavanja odnosa između laboratorijskih i poljskih rezultata pokazali su da je kod svakog lokusa (QTL) za prinos, heterozigot imao veću fenotipsku vrijednost od homozigota, što je potvrđeno i korelacijom između broja heterozigotnih lokusa i prinosa. S obzirom da je pokus bio izveden u više raznih okolinskih uvjeta, ustanovljena je mala ili nikakva interakcija genotip x okolina na QTL-e. Slični rezultati dobiveni su primjenom jednostrukog markera i intervalnim mapiranjem. Rezultati dobiveni u radovima gdje je proučavana mogućnost korištenja DNK fragmenata za predviđanje heterozisa i proučavanja heterotične komplementarnosti kod kukuruza pokazuju da se RFLP podaci mogu iskoristiti i u ove svrhe. Uspješnost ovisi uglavnom o broju proba, odnosno markera (Dudley i sur., 1991, Melchinger i sur., 1991). Identifikacija kultivara je interesantna sa stanovišta izbora roditelja za razvoj oplemenjivačke varijabilnosti, ali i sa stanovišta zaštite autorskog prava oplemenjivača. Primjenom RFLP tehnike i DNK fragmenata - markera pokazalo se da je moguće ustanoviti neke genotipske razlike između kultivara, odnosno identitet kultivara (Smith i Smith, 1991).

Sve ovo upućuje na široku mogućnost primjene molekularnih markera us-

tanovljenih RFLP tehnikom, u oplemenjivanju bilja. RFLP metoda zahtijeva, međutim, relativno skupu opremu, a još veći problem su skupe kemikalije. U novije vrijeme se radi na primjeni novih tehnika za analizu DNK fragmenata. Danas su najpoznatije PCR ("Polymerase Chain Reaction") tehnike kao RAPD ("Random Amplified Polymorphism of DNA") i analiza mikrosatelita (Heun i Helentjaris, 1993, Morgante i Olivieri, 1993). Ovdje se segment DNK amplificira i identificira bez procesa hibridizacije. Ove metode su jednostavnije, brže i jeftinije od RFLP tehnike, ali širina primjenjivosti je manja (Pejić i sur., 1992, Stuber, osobna informacija, Olivieri, osobna informacija). Za očekivati je s obzirom na opseg istraživačkog rada u području molekularnih markera, da će biti razvijene jednostavnije tehnike za analizu DNK fragmenata sa jednakom primjenjivosti u dobivenim podacima, kao i kod RFLP.

Sve do sada izneseno pokazuje mogućnost integriranja novijih, biotehnoloških metoda, u klasični oplemenjivački postupak u cilju povećanja uspješnosti i smanjenja vremenskog trajanja i troškova razvoja novih kultivara poboljšanih svojstava. Oplemenjivački rezultati dobiveni primjenom novih tehnologija u okviru oplemenjivačkog postupka do sada su relativno malobrojni. Ipak, upućuju na mogućnost daljnjeg poboljšanja ekonomski važnih svojstava, daljnjim razvojem i integriranjem u klasični oplemenjivački postupak. Vjerojatno će biti teško zamisliti oplemenjivača u skoroj budućnosti bez poznavanja biotehnološkog dijela oplemenjivačkog pristupa na što upućuje već sadašnje zanimanje oplemenjivačkih kompanija i znanstvenonastavnih institucija na Zapadu za mlade stručnjake s određenom naobrazbom iz područja biotehnologije (Younquist, University of Nebraska, osobna informacija; Lamkey, Iowa State University, osobna informacija).

SUMMARY

Development of new cultivars of agricultural crops using classical breeding approach is long lasting, expensive and, regarding final success, unpredictable. Usually, it means developing a source breeding population selection of superior genotypes and testing their traits in the field and the laboratory. Due to the development of molecular genetics and tissue and cell culture new technologies have been developed which can be integrated into classical breeding schemes. The results obtained indicate the possibility of using somaclonal variability, protoplast fusion and gene transfer for developing genetic variability, and haploid techniques for reaching homozygosity sooner than by the classical breeding approach. Molecular markers could be means for detecting genes for different traits at the DNA

level independently of ecological and genetic interactions. Because of numerous scientific projects going on in the field of molecular biology one can expect development of even more practical and cheaper new technologies. By integrating these into classical breeding methods, breeding new cultivars should become more successful and cheaper.

LITERATURA

- Behnke, M.** (1979): Selection of potato callus for resistance to culture filtrate of *Phytophthora infestans* and regeneration of resistant plants. *Theor. Appl. Genet.* 55: 69-71.
- Bernatsky, R. and S.D. Tanksley** (1986): Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences. *Genetics* 112:887-898.
- Borojević, Katarina** (1986): Geni i populacija. *Forum.* Novi Sad.
- Borojević, S.** (1990): Genetic engineering. In *Principles and methods of plant breeding.* Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo. p.p. 295-318.
- Bourgin, J.P. and J.P. Nitsch** (1967): Obtention de *Nicotiana* haploides a partir d'etamines cultivees in vitro. *Ann. Physiol. Veg.* 9: 377-382.
- Chaleff, R. S. and T. B. Ray,** (1984): Herbicide resistant mutants from tobacco cell cultures. *Science*, 223: 1148-1151.
- Cocking, E. C.** (1960): A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*, 187: 972-929.
- Deimling, S., J. Zitzlspurger, and G. Wenzel,** (1988): Somatic fusion for breeding potatoes. *Plant Breed.* 101:181-189.
- Dudley, J.W., M.A. Saghai Maroof, G.K. Rufener** (1991): Molecular markers and grouping of parents in maize breeding programs. *Crop Sci.* 31: 718-723.
- Fehr, W.R.** (1987): Mutation breeding. In *Principles of cultivar development, Volume 1.* Macmillan Publishing Co., London, p.p. 287-303.
- Frei, O.M., C.W. Stuber, and M.M. Goodman** (1986): Yield manipulation from selection on allozyme genotypes in a composite of elite corn lines. *Crop Sci.* 26: 917-921.
- Goodman, M.M., C.W. Stuber, K. Newton and H.M. Weissinger** (1980): Linkage relationships of 19 enzyme loci in maize. *Genetics* 96: 697-710.
- Helentjaris, T.** (1991): RFLP analysis for manipulating agronomic traits in plants. In *Proceedings of the symposium on plant breeding in the 1990's*, Raleigh, N.C., March 199, p.p. 357-372.
- Heun, M. and T. Heletjaris** (1993): Inheritance of RAPDs in F1 hybrids of corn. *Theor. Appl. Genet.* 85: 961-968.
- Kasha, K.J. and K.N. Kao** (1970): High frequency haploid production barley (*H. vulgare* L.). *Nature*, 225: 874-876.
- Kasperbauer, M.J., T.J. Sutton, P.A. Andersson and C.L. Gubton,** (1981): Tissue culture of plants from a chimeral mutation of tobacco. *Crop Sci.* 21:213-217.
- Kuckuck, H., G. Kobabe, G. Wenzel** (1991): *Fundamentals of plant breeding.* Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York, Paris, Tokyo, Hongkong, Barcelona, Budapest.
- Larkin, P.J. and N.R. Scowcroft,** (1981): Somaclonal variation - A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197-214.

- Melchinger, A.E., M.M. Messmer, M. Lee, W.L. Woodman, K.R. Lamkey** (1991): Diversity and relationships among US maize inbreds revealed by restriction fragment length polymorphisms. *Crop Sci.* 31: 669-678.
- Mittal, R.K., M. Singh and N. Maherchandani** (1987): Isoenzymic diversity index of vigna parents in relation to heterosis for seed yield in green gram (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Euphytica* 36: 61-68.
- Morgante, M. and A.M. Olivieri** (1993): PCR - amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* (in press).
- Pavlina, Renata** (1987): Bulbosum metoda kao nova oplemenjivačka tehnika. *Sjemenarstvo*, br. 4-6: 276-282.
- Pavlina, Renata i Z. Martinić-Jerčić** (1990): Mogućnosti i perspektive biotehnologije u oplemenjivanju ratarskog bilja. *Polj. znan. smotra*, Vol. 55: 485-494.
- Pejić, I.** (1992): Heterotična komplementarnost i genetska varijabilnost domaće germplazme kukuruza. *Polj. znan. smotra*, Vol. 57:335-354.
- Pejić, I., V. Kozumplik, Leonella Crnobrnja i Zdenka Dogan** (1992): Mogućnost primjene molekularnih gen markera u oplemenjivanju i sjemenarstvu kukuruza. *Sjemenarstvo* 9 (6): 319- 330.
- Petolino, J.F.** (1992): The use of androgenesis in maize breeding. In: Y. Datte, C. Dumas, A. Gallais (Eds.) *Reproductive Biology and Plant Breeding*. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg. New York, Paris, Tokio, Hongkong, Barcelona, Budapest.
- Smith, J.S.C. and O.S. Smith** (1989): The description and assesment of distances between inbred lines of maize: II The utility of morphological, biochemical and genetic descriptors and a scheme for the testing of distinctions between inbred lines. *Maydica* 34: 151-161.
- Smith, J.S.C. and O.S. Smith** (1991): Restriction fragment length polymorphism can differentiate among U.S. maize hybrids. *Crop Sci.* 31: 893-899.
- Stuber, C.W., M.M. Goodman., R.H. Moll** (1982): Improvement of yield and ear number from selection at allozyme loci in maize population. *Crop Sci.* 22: 737-740.
- Stuber, C.W., E.S. Lincoln, D.W. Wolf, T. Heleñtjaris, E.S. Lander** (1992): Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics* 132: 823-839.
- Tankley, S.D., N.D. Young, A.H. Paterson, M.V. Bonierbale** (1989): RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. *Biotechnologie* 7: 257-264.

Adresa autora - Author's address:

Primljeno: 20. 11. 1992.

Prof. dr. Vinko Kozumplik

Mr. Ivan Pejić, znanstveni asistent

Agronomski fakultet Sveučilište u Zagrebu

Zavod za oplemenjivanje bilja, genetiku i metodiku istraživanja

41000 Zagreb, Svetošimunska 25