

PRVI REZULTATI OPLEMENJIVANJA STABLASTIH VRBA SAMOOPLODNJOM, POVRATNIM KRIŽANJEM I TRANSGRESIJOM

FIRST RESULTS OF ARBORESCENT WILLOW IMPROVEMENT BY SELFING, BACK CROSS AND TRANSGRESSION

Ante KRSTINIĆ i Davorin KAJBA*

SAŽETAK: Za potrebe proizvodnje biomase u kratkim ophodnjama bijela vrba (*Salix alba* L.) križana je s kineskom vrbom (*S. matsudana* Koidz.). Po prvi puta korištene su metode oplemenjivanja samooplođnjom, povratnim križanjem i transgresijom.

Križanjem kineske, tortuozne vrbe (*S. matsudana* f. *tortuosa* Koidz.) s autoktonom bijelom vrbom, proizvedeni su međuvrski hibridi, koji su u većem postotku bili monoecični. Iz samooplođnje ovako proizvedenih hibrida uzgojeno je 25 biljaka. Zbog njihove slabe vitalnosti jedina preživjela biljka bila je muškog spola, od koje je korišten polen za hibridizaciju.

Povratna križanja hibrida F_1 generacije provedena su na kinesku vrbu, dok su za proizvodnju hibrida F_2 generacije korišteni hibridi *S. matsudana* x *S. alba*, koji su bili genetski divergentni (Novi Zeland, Hrvatska).

Oplemenjivanje hibridizacijom, putem samooplođnje, povratnim križanjem i transgresijom, pokazalo je da se na osnovi transgresije mogu proizvesti plus varijante s obzirom na biomasu. Spomenutim metodama oplemenjivanja u potomstvu se također izdiferencirao i veliki broj minus varijanti. One osim patuljastog rasta fenotipski pokazuju svojstva, koja su nastala kao rezultat ispoljavanja atavizama (npr. mali uski listovi, debalce i grančice prekrivene peridermom itd.), pa su podesni za izučavanje evolucije stablastih vrba.

Kloniranjem plus varijanata u proizvedenim familijama moguće je selekcionirati nove genotipove stablastih vrba, koji će biti podesni za proizvodnju biomase u kratkim ophodnjama. Morfološki aberantne minus varijante moguće je koristiti u hortikulturi.

Ključne riječi: stablaste vrbe, biomasa, oplemenjivanje samooplođnjom, povratnim križanjem i transgresijom.

UVOD — INTRODUCTION

Radovi na oplemenjivanju biljaka mogu se definirati i kao radovi na dobivanju genotipova, koji će biti od velike koristi čovjeku. Proces oplemenjivanja je dugoročan, ciklički proces. Dužina trajanja jednog ciklusa prvenstveno ovisi o vrsti i primijenjenoj metodi ople-

menjivanja. Proces oplemenjivanja poljoprivrednog bilja mnogo je brži u komparaciji sa šumskim drvećem, iz razloga što šumsko drveće sporije pridolazi u generativnu fazu u odnosu na poljoprivredno bilje. Selekciju za pojedina specifična svojstva kod šumskog drveća moguće je izvršiti samo u adultnoj fazi razvoja organizma, koja se pojavljuje nakon nekoliko godina ili još i kasnije. Kod šumskog drveća oplemenjivanje selekcijom je prvenstveno bazirano na prirodnom varija-

* Prof. dr. sc. Ante Krstinić, mr. sc. Davorin Kajba, Šumarski fakultet, Svetošimunska 25, Zagreb.

biljetu dane vrste i sadržaju povoljnih svojstava u danj populaciji. Primjena specifičnih metoda oplemenjivanja hibridizacijom, kao što je npr. oplemenjivanje samooplođnjom, moguće je jedino kod monoecičnih vrsta. Kod oplemenjivanja stablastih vrba, koje su diecične vrste, primjena ove metode je jedino moguća transformacijom spolnosti kod pojedinih primjeraka, tj. kroz "indukciju" monoecije. Kada monoecične biljke cvatu, potrebno je uzgojiti potomstvo iz samooplođnje. Jedinke uzgojene iz samooplođnje, u fazi cvatnje, mogu se koristiti u oplemenjivanju hibridizacijom. Oplemenjivanje križanjem u srodstvu, povratnim križanjem i transgresijom su metode oplemenjivanja biljaka, kojima su kod oplemenjivanja poljoprivrednog bilja polučeni najbolji rezultati. Primjena ovih metoda kod šumskog drveća je otežana, prvenstveno dugim vremenskim ciklusom, budući da zahtijeva proizvodnju najmanje dvije generacije hibrida. Kada se naprimjer radi o transgresiji, potrebno je proizvesti pripadnike F_1 generacije, te izvršiti križanje pripadnika F_1 generacije, divergentnih genetskih konstitucija tj. pripadnika iz različitih hibridnih familija. Kada se radi o oplemenjivanju povratnim križanjem, potrebno je pripadnike F_1 generacije povratno križati sa željenim roditeljem.

Oplemenjivanje križanjem u srodstvu još je dodatno otežano činjenicom, što biljke proizvedene križanjem u srodstvu još sporije pridolaze u generativnu fazu u komparaciji s međuvrtnim hibridima (Vidaković 1963, Vidaković 1966). Zbog spomenutog, korištenje navedenih metoda u oplemenjivanju šumskog drveća je općenito vrlo rijetko, a kada se radi o oplemenjivanju stablastih vrba samooplođnjom, smatramo i raritetnim ne samo kod nas, već i u svijetu. Zbog svega navedenog u oplemenjivanju šumskog drveća za sada se najčešće koriste tradicionalne metode oplemenjivanja koje uključuju masovnu selekciju i testove potomstava (Vidaković & Krstinić 1985, Zsuffa et al. 1987).

Smatramo, da je kod brzorastućih listača moguće bitno unaprijediti intenzivnu proizvodnju, a posebno za potrebe proizvodnje biomase u kratkim ophodnjama, ukoliko se u radovima na oplemenjivanju ovih vrsta uključe i metode kojima su postignuti zavidni rezultati u oplemenjivanju poljoprivrednog bilja: recipročna opeotovana selekcija, povratno križanje, inbriding, samooplođnja, uz kloniranje jedinki u svakoj pojedinoj fazi oplemenjivanja.

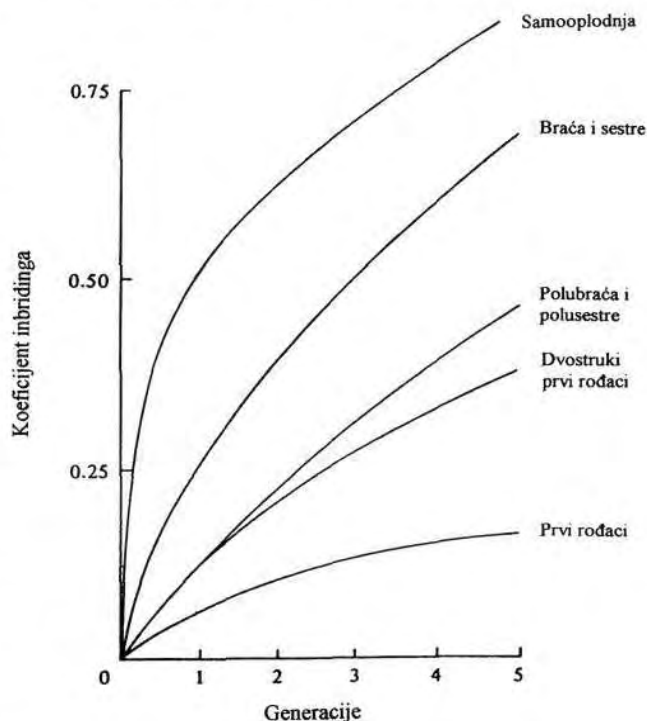
MATERIJAL I METODE RADA — MATERIAL AND WORKING METHODS

Za oplemenjivanje samooplođnjom, povratnim križanjem i transgresijom koristili smo se pomoću dvije vrste stablastih vrba, odnosno njihovim hibridima: bijelom vrbom (*Salix alba* L.) i kineskom vrbom (*Salix matsudana* Koidz.).

Za oplemenjivanje samooplođnjom koristili smo jedan klon, koji je predstavljao biljku dobivenu iz samooplođnje, hibrida tortuozne kineske vrbe (*Salix matsudana* f. *tortuosa*) i domaće bijele vrbe (*Salix alba*). Proizvedeni hibridi iz ove udaljene hibridizacije bili su većinom monoecični (Krstinić 1971, Krstinić & Trinajstić 1992). Nakon izvršene samooplođnje kod monoecičnog potomstva proizvedeno je 25 biljaka, od kojih je samo jedna preživjela, dok su ostale zbog slabe vitalnosti uginule. Nakon cvatnje utvrđeno je da je spomenuta biljka muškog spola.

Oplemenjivanje samooplođnjom temelji se na činjenici, što je putem samooplođnje moguće proizvesti organizme, koji će u većem postotku sadržavati lokuse s homozigotnim genima u odnosu na biljke proizvedene iz križanja u srodstvu (Graf. 1). Križanjem homozigota, divergentne genetske konstitucije, moguće je polučiti maksimalnu heterozigotnost u potomstvu, koja rezultira povećanom bujnosti rasta. Kloniranjem plus varijantata u proizvedenom potomstvu, (koje u genetskom pogledu nije homogeno, budući su roditelji još uvijek za najmanje 50% lokusa heterozigotni!), moguće je selekcionirati nove genotipove—klonove stablastih vrba, koji se odlikuju bujnim rastom u najranijoj mla-

Graf. 1. Povećanje homozignosti putem križanja u srodstvu i samooplođnje (nadopunjeno prema Keiding 1991)



dosti. Ovakvi genotipovi su od posebnog interesa u proizvodnji biomase u vrlo kratkim ophodnjama. Za pov-

ratna i transgresijska križanja koristili smo međuvrsne hibride *S. matsudana* x *S. alba* divergentne genetske konstitucije, koji su proizvedeni kod nas i na Novom Zelandu (introducirani su dobrotom Dr. A. Wilkinso-
na).

Hibridizacija je izvršena u proljeće 1993. godine u vrtu Katedre za šumarsku genetiku i dendrologiju, Šumarskog fakulteta u Zagrebu. Hibridi su uzgojeni iste godine u salonitnim sanducima na permanentno vlaže-

nom supstratu kao što je opisano u radu Krstinić (1976) i pikirani na gredice od 15. do 21. lipnja iste godine. Izmjere i obrada podataka izvršena je u jesen 1994. godine, kod starosti biljaka od dvije godine. Potomstva uzgojena iz međuvrsne hibridizacije komparirana su s unutarvrstnim hibridima bijele vrbe (*Salix alba* x *Salix alba*). Valorizacija uspijevanja proizvedenih međuvrstnih hibrida izvršena je s obzirom na totalne visine potomaka (ukupne dužine dvogodišnjih izbojaka).

REZULTATI ISTRAŽIVANJA I DISKUSIJA — RESULTS AND DISCUSSION

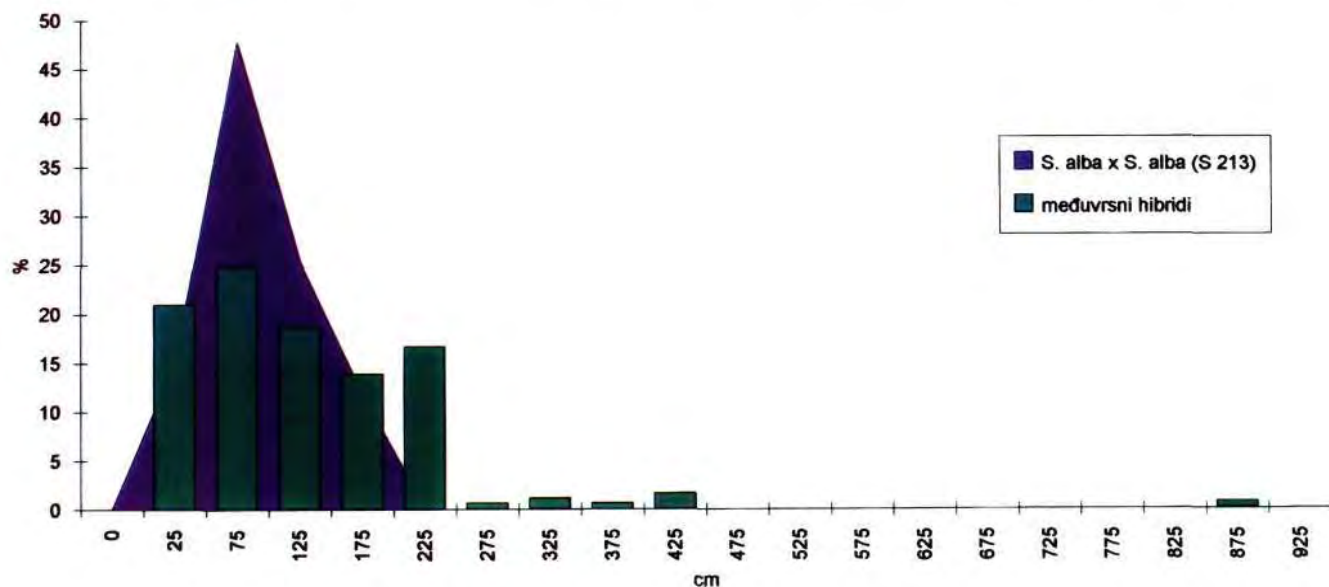
Podaci o dobivenim križancima iz hibridizacije samooplođnjom, povratnim križanjem i transgresijom dani su u tablici 1. Iz spomenute tablice vidljivo je da je od ukupno 9 kombinacija križanja proizvedeno 282 biljke. Broj biljaka po hibridnoj familiji varira od 2 do 88 (kontrola). Mali broj biljaka u pojedinim kombinacijama križanja (uzgojen zbog malog broja resa na majčinskim stablima), u odnosu na kontrolu, ne omogućuje optimalnu valorizaciju proizvedenih hibrida sa stajališta transgresijske varijabilnosti za svaku pojedinu kombinaciju križanja. No budući se radi u svim slučajevima o križanju heterozigota, to je u svakoj pojedinoj kombinaciji križanja moguće promatrati učestalost plus varijanata u smislu transgresije, a isto tako i grupiranjem sličnih kombinacija križanja (Graf. 2). Treba također naglasiti da se u svim kombinacijama križanja izdiferencirao i relativno velik broj minus varijanata, koje su nastale kumulacijom homozigotnih lokusa s recesivnim genima. Ovakve individue imaju u pravilu i promijenjene morfološke karakteristike u odnosu na ishodne roditeljske vrste, kao npr. patuljasti rast, vrlo

uske i male listove, formiranu peridermu na izbojcima i debalcu itd. Učešće najmanjih, minus varijanata, u ovom slučaju je maskirano velikom širinom klase (50 cm), tako da biljke manje od 25 cm nisu iskazane pojedinačno na grafikonu 2. Učešće plus varijanata je jasno uočljivo.

Plus varijante, u smislu pozitivne transgresije, dobivene su u hibridnim familijama iz povratnog križanja s kineskom vrbom *S. matsudana* (S 218), povratnog križanja s (vjerojatno) bijelom vrbom (S 227), kao i kod hibridnog potomstva iz križanja kineske vrbe *S. matsudana* i biljke, koja je dobivena samooplođnjom međuvrstnog hibrida (*S. matsudana* f. *tortuosa* x *S. alba*) x (*S. matsudana* f. *tortuosa* x *S. alba*). Plus varijante u navedenim slučajevima bolje su od plus varijanata kod kontrole (*S. 213*, *S. alba* x *S. alba*). Selekcijom i kloniranjem plus varijanata iz spomenutih hibridnih familija moguće je uzgojiti nove genotipove, koji će u ranoj fazi ontogeneze imati bujniji rast od postojećih selekcioniranih genotipova čistih vrsta (*S. matsudana*, *S. alba*), kao i njihovih međuvrstnih hibri-

Graf. 2. Učešće plus i minus varijanti u potomstvu međuvrstnih hibrida *S. matsudana* x *S. alba*

Graph 2 Presence of plus and minus variants in the progeny of interspecific hybrids between *S. matsudana* x *S. alba*



da F_1 generacije (Zsuffa et. al., 1987). Križanjem genetski divergentnih međuvrskih hibrida F_1 generacije *S. matsudana* x *S. alba* (S 224) uzgojili smo samo dvije biljke, pa valorizacija pozitivnih efekata transgresije u ovoj kombinaciji križanja nije moguća. Uzgojem novih biljaka iz samooplodnje (S 219), koje su genetski divergentne u odnosu na već korištenu jedinku, omogućiti će nam primjenu novih metoda u oplemenjivanju stablastih vrba, kao npr. proizvodnju linijskih hibrida. Uzgojeno potomstvo iz samooplodnje i u ovom slučaju karakterizira izrazita depresija u rastu i slaba vitalnost. Ovi rezultati nisu u potpunosti sukladni s re-

zultatima dobivenim kod crnih topola, gdje u prvoj generaciji proizvedenih biljaka samooplođnjom nije utvrđena depresija u rastu (Jovanović & Tucović 1964). Međutim prema Bisoffiu (1989) primjenom navedenih metoda oplemenjivanja moguće je bitno unaprijediti proizvodnju i kod topola iz Sekcije *Aigeiros*.

Monoecične biljke dobivene su i kod unutarvrskog križanja *Salix amygdaloides*, *S. exigua* i *S. lucida*, a koje su tijekom ontogeneze prešle u muški spol (Mosseler & Zsuffa 1989). Primijećena odstupanja od uobičajene spolnosti i pojava slučajeva jednodomnosti i dvospolnosti utvrđena je i kod topola (Žufa 1963).

Oplemenjivanje stablastih vrba hibridizacijom (samooplodnja, povratno križanje, transgresija)
Improvement of Arborescent Willows by hybridization (selfing, back cross, transgression)

Tablica — Table 1

Red. br. No.	Oznaka križanja Crossing mark	Kombinacija križanja Crossing combination		Broj potomaka No. of offspring	Visina dvogodišnjih izbojaka Height of 2 years old offshoots			Promjer iznad vrata korijena Diam. above the ground level		
		F	M		\bar{X} (cm)	Širina varijabilnosti Range of variability	C. V. %	\bar{X} (mm)	Širina varijabilnosti Range of variability	C. V. %
1.	S 218	V 311 = <i>S. matsudana</i> - Kina	V 279 = (<i>S. matsudana</i> - Kew Garden x <i>S. alba</i>) I-14/59	29	148,8	15 - 870	112,8	14,2	3 - 74	97,2
2.	S 219	V 294 = (<i>S. matsudana</i> V 311 - Kina x <i>S. alba</i> -Zg)	V 294 = (<i>S. matsudana</i> V 311 - Kina x <i>S. alba</i> -Zg)	9	57,9	15 - 172	94,3	-	-	-
3.	S 221	V 311 = <i>S. matsudana</i> - Kina	S 163 = [(<i>S. matsudana</i> f. <i>tortuosa</i> x <i>S. alba</i> V 95) V 171 x (<i>S. matsudana</i> f. <i>tortuosa</i> x <i>S. alba</i> V 95) V 171]	50	126,4	15 - 400	75,0	10,9	3 - 27	53,2
4.	S 222	V 311 = <i>S. matsudana</i> - Kina	V 294 = (<i>S. matsudana</i> V 311 - Kina x <i>S. alba</i> -Zg)	31	140,9	45 - 230	44,2	11,7	3 - 22	42,5
5.	S 224	V 278 = (<i>S. matsudana</i> - Kew Garden x <i>S. alba</i>) I-14/59	V 294 = (<i>S. matsudana</i> V 311 - Kina x <i>S. alba</i> -Zg)	2	87,5	10 - 165	125,2	7,0	2 - 12	101,0
6.	S 225	V 278 = (<i>S. matsudana</i> - Kew Garden x <i>S. alba</i>) I-14/59	S 163 = [(<i>S. matsudana</i> f. <i>tortuosa</i> x <i>S. alba</i> V 95) V 171 x (<i>S. matsudana</i> f. <i>tortuosa</i> x <i>S. alba</i> V 95) V 171]	16	72,1	20 - 175	67,3	7,4	3 - 19	54,8
7.	S 226	V 278 = (<i>S. matsudana</i> - Kew Garden x <i>S. alba</i>) I-14/59	V 95 = <i>S. alba</i> -Zg	23	67,6	20 - 190	62,9	6,8	3 - 14	39,7
8.	S 227	V 277 = (<i>S. matsudana</i> - Kew Garden x <i>S. alba</i>) I-14/59	nepoznat	34	169,1	40 - 435	46,2	14,1	5 - 26	37,1
9.	S 213	Šp 2 = <i>S. alba</i> - Spačva	V 95 = <i>S. alba</i> - Zg	88	113,9	20 - 255	44,3	-	-	-

ZAKLJUČCI — CONCLUSIONS

1. Prvi rezultati oplemenjivanja stablastih vrba samooplođnjom, povratnim križanjem i transgresijom ohrabruju, jer su polučene plus varijante u potomstvu,

koje su bolje od plus varijanata jedne familije unutarvrskih hibrida bijele vrbe (kontrola).

2. Selekcijom i kloniranjem uzgojenih plus varijanta moguće je dobiti nove genotipove, koji će se uspješno koristiti u namjenskim nasadima za proizvodnju biomase u kratkim ophodnjama.

3. Opisani način oplemenjivanja stablastih vrba hibridizacijom omogućuje, kroz rekombinacije, stvaranje takvih genotipova, koji se mogu koristiti u hortikulturi, te u izučavanju evolucije vrsta roda *Salix* (npr.

pojavom različitih atavizama u potomstvu, a koji se ispoljavaju fenotipski samo u homozigotno recesivnoj kombinaciji gena za određeno svojstvo!)

4. Uzgojene nove biljke stablastih vrba iz samooplodnje, divergentne genetske konstitucije omogućuje nam proizvodnju tzv. linijskih hibrida. Linijski hibridi dali su odlične rezultate u oplemenjivanju poljoprivrednog bilja, posebno kukuruza.

LITERATURA — REFERENCES

- Bisoffi, S. 1989: Recent Developments of Poplar Breeding in Italy. Proc. of the IUFRO Meeting Working Party S 2.02.10:18-43, Hann. Münden.
- Jovanović, B. & A. Tucović, 1964: Prva inbriding generacija monoecijskog stabla crne topole (*Populus nigra* L.) u okolini Kosovske Mitrovice. Topola 42-43:13-19, Beograd.
- Keiding, H., 1991: Gene conservation and tree improvement. Lecture Note No. D-9, Danida For. Seed Centre, 18p, Humlebaek.
- Krstinić, A., 1971: Occurrence of monoecia and hermaphroditism in hybrid Willow (*Salix matsudana tortuosa* x *S. alba*). FAO, International Poplar Commission, 7p, Bucarest.
- Krstinić, A., 1976: Varijabilnost bujnosti rasta i pravnosti debla hibrida bijele vrbe (*Salix alba* L.) i krhke vrbe (*Salix fragilis* L.). Glas. za šum. pokuse, Vol. XIX:103-245, Zagreb.
- Krstinić, A. & I. Trinajstić, 1992: Pojava monoecije i hermafroditizma u hibrida *Salix matsudana* Koidz. x *S. alba* L. Šum. list 9-10:389-395, Zagreb.
- Mosseler, A. & L. Zsuffa, 1989: Sex expression and sex ratios in intra and interspecific hybrid families of *Salix* L. *Silvae Genetica* 38:12-17, Frankfurt a. Main.
- Vidaković, M., 1963: Međuvrsto križanje Pančićeve omorike (*Picea omorica* [Pančić] Purkyne) sa sitkanskom smrčom (*Picea sitchensis* [Bong] Carr.). Šumarstvo 10-12:337-342, Beograd.
- Vidaković, M., 1966: The occurrence and meaning of heterosis in hybrids within and between species. Šum. list 90:105-122, Zagreb.
- Vidaković, M. & A. Krstinić, 1985: Genetika i oplemenjivanje šumskog drveća. Liber, 505p, Zagreb.
- Zsuffa, L., 1988: Studies in Genetics and Breeding of North American Willows at the Faculty of Forestry, University of Toronto. Proceedings of the Willow Breeding and Biotechnology Development, 14-22, Bristol.
- Zsuffa, L. & R. L. Gambles, 1992: Improvement of Energy-Dedicated Biomass Production Systems. Biomass and Bioenergy Vol. 2, No. 1-6, 11-15, Pergamon Press.
- Zsuffa, L., Salazar, R. & B. Danick, 1987: Biomass genetics and breeding. Anal. za šumarstvo 13/1-2:25-37, Zagreb.
- Žufa, L., 1963: Novi slučajevi hermafroditizma kod vrsta *Populus nigra* L. i *P. thevestina* Dode i njihovo značenje. Topola 1/2:21-26, Beograd.

SUMMARY: To meet the requirements of biomass production in short rotations, the White Willow (*Salix alba* L.) has been crossed with the Chinese Willow (*Salix matsudana* Koidz.). For the first time the improvement methods of selfing, back cross and transgression have been used.

Crossing of the Chinese, tortuous Willow (*Salix matsudana* f. *tortuosa* Koidz.) with the autochthonous White Willow produced interspecific hybrids which in higher percentage were monoecious. By selfing the hybrids 25 plants have been raised. Due to their poor vitality, the only one survived plant was male and was used to obtain pollen for hybridization.

Back crosses of F_1 generation hybrids were made on the Chinese Willow, while for the production of F_2 generation hybrids, the genetically divergent (New Zealand, Croatia) hybrids *Salix matsudana* x *Salix alba* were used.

Improvement by hybridization using selfing, back cross and transgression proved that on the basis of transgression plus variants can be produced with respect to biomass. Using a mentioned improvement methods, a large number of minus variants also became differentiated in the progeny. Phenotypically, in addition to dwarfness size, they show the characteristics which occurred as the result of the appearance of atavisms (such as small narrow leaves, small stem and branchlets covered with periderm, etc.) thus being suitable for arborescent Willow evolution studies.

Cloning plus variant it was possible, in the produced families, to make selection of new genotypes of Arborescent Willows that will be suitable for biomass production in short rotations. Morphologically aberrant minus variants can be used in horticulture.

Key words: Arborescent Willows, biomass, improvement by selfing, back cross and transgression.