

Agrovoc descriptors: phaseolus, phaseolus coccineus, colletotrichum lindemuthianum, gene banks, collections, biodiversity, genetic resources, natural resources, data collection, disease resistance, drought stress, varieties, plant breeding, genetic markers, genetic variation, plant anatomy, international cooperation

Agris category code: F30

Raznolikost fižola v zbirki Kmetijskega inštituta Slovenije

Jelka ŠUŠTAR-VOZLIČ¹, Marko MARAS², Alenka MUNDA², Tanja ZADRAŽNIK², Vladimir MEGLIČ²

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

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

IZVLEČEK

Zbirka fižola, ki jo v okviru Slovenske rastlinske genske banke hranimo na Kmetijskem inštitutu Slovenije, obsega 1035 genskih virov, ki so bili v zadnjih 25ih letih zbrani na območju Slovenije. V zbirki imamo tudi 61 genskih virov, ki smo jih pridobili v okviru sodelovanja v mednarodnih ekspedicijah v tujini ter 39 virov, ki smo jih za potrebe raziskovalnega dela pridobili iz drugih genskih bank v Evropi in svetu. Večina slovenskih virov predstavlja navadni fižol (*Phaseolus vulgaris* L.), manjši del pa je laškega, turškega fižola (*P. coccineus* L.). Za vse shranjene vzorce imamo na voljo osnovne podatke. Vsako leto določeno število vzorcev razmnožimo in naredimo osnovno karakterizacijo. Del zbirke smo podrobneje ovrednotili z uporabo morfoloških, biokemijskih in molekularskih markerjev. Rezultati so pokazali, da se je v več stoletjih pridelovanja v Sloveniji oblikovala raznolika dednina, ki jo je vredno ohraniti. Obsežneje smo ovrednotili odpornost na glivo *Colletotrichum lindemuthianum*, ki povzroča fižolov ožig. Vzorce, shranjene v genski banki, uporabljamo za različne raziskave, med katerimi prevladujejo raziskave sušnega stresa. Prav tako pa jo uporabljamo v žlahtniteljskem procesu za žlahtnjenje novih sort ter za reintrodukcijo starih sort.

Ključne besede: fižol, genski viri, genska raznolikost, raziskave, žlahtnjenje

ABSTRACT

VARIABILITY OF COMMON BEAN ACCESSIONS IN THE GENE BANK OF AGRICULTURAL INSTITUTE OF SLOVENIA

The gene bank at the Agricultural institute of Slovenia holds a collection of 1035 bean accessions collected from various parts of Slovenia in the last 25 years. In addition, 61 accessions, collected during international expeditions and 39 accessions that were obtained from other gene banks in Europe and abroad for the research purposes are included in the collection. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is the predominant species, whereas runner bean (*Phaseolus coccineus* L.) is represented by a smaller number of accessions. Multicrop passport data are available for all the accessions stored in the gene bank. Every year a certain number of accessions are regenerated and characterized. A part of the collection was evaluated in detail with the use of morphological, biochemical and molecular markers. The results revealed that during the centuries of common bean cultivation in Slovenia a diverse collection was formed that should be preserved for the future. A part of collection was evaluated also for the resistance to bean anthracnose, caused by the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. The accessions that are stored in the gene bank are used for research purposes, where particular emphasis is given to drought stress. The collection is used also in breeding process and in the programme of reintroduction of old varieties.

Key words: common bean, genetic resources, genetic variability, research, breeding

1 UVOD

Navadni fižol (*Phaseolus vulgaris* L.) je zaradi učinkovin v svetovnem merilu daleč velike prehranske vrednosti in zdravilnih najpomembnejša stročnica v vsakodnevni

¹ Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova ulica 17, SI-1000 Ljubljana, e-mail: jelka.vozlic@kis.si

² Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova ulica 17, SI-1000 Ljubljana

prehrani ljudi (Duranti, 2006). Predstavlja bogat vir vlaknin, ogljikovih hidratov in beljakovin, vsebuje pa tudi številne vitamine in minerale, kot so železo, magnezij, kalij, selen in kalcij (Broughton in sod., 2003). Raziskave kažejo tudi na pomembno vsebnost antioksidantov (Madhujith in sod., 2004), ki prispevajo k zmanjšanju tveganja za nastanek bolezni srca in ožilja, določenih vrst raka in drugih kroničnih bolezni (Duranti, 2006). Fižol mora biti pred zaužitjem ustrezno pripravljen, saj v nasprotnem primeru vsebuje tudi nekatere antinutricionistične komponente (npr. fitati, fenoli) (Batista in sod., 2010).

Navadni fižol, tako kot ostale vrste iz rodu *Phaseolus*, izvira iz ameriškega kontinenta. Vse vrste imajo skupnega divjega prednika, enoletno ovijalko, ki jo lahko še danes najdemo na obsežnem področju med Argentino in Mehiko (Gepts in sod., 1986). Primarni center genske raznolikosti divjega fižola se nahaja na področju Ekvadorja in severnega Peruja, od koder se je potem širil na sever in jug (Broughton in sod., 2003). Domestifikacija fižola je potekala v dveh, že ločenih centrih variabilnosti, srednjeameriškem, ki se razprostira od severne Mehike do Kolumbije, in andskem, ki se razteza od Peruja do severozahodne Argentine (Gepts in sod., 1986; Koenig in Gepts, 1989; 1990; Freyre in sod., 1996). Izmed skupno 50 do 60 vrst, ki jih vsebuje rod *Phaseolus*, je kultiviranih pet vrst in sicer: *P. vulgaris* (navadni fižol), *P. coccineus* L. (turški fižol), *P. lunatus* L. (limski fižol), *P. polyanthus* Greenm. in *P. acutifolius* A. Gray.

Po odkritju Amerike se je fižol v 16. stoletju razširil na ostale kontinente, v Evropo je prišel okrog leta 1500 (Zeven, 1997). Prvotni fižol v Evropi je najverjetneje izhajal iz srednje ameriškega centra variabilnosti (Rodino in sod., 2003), po Pizzarovem odkritju Peruja leta 1528 pa so se v Evropo razširili tudi andski genotipi. Fižol se je po Evropi širil z Iberskega polotoka (Zeven, 1997), natančneje poti

znotraj kontinenta še niso raziskane. Na osnovi raziskav posameznih zbirk fižola v Evropi z biokemičnimi in molekulskimi markerji so ugotovili, da je večina evropske dednine fižola danes andskega izvora (Gepts in Bliss, 1988). Andski genotipi so se bolje prilagodili hladnim in kratkim poletjem Zahodne Evrope kot srednje ameriški genotipi, verjetno pa so bili zaradi oblike zrn, ki so večji kot srednjeameriški, tudi bolj atraktivni. Poleg teh dveh tipov najdemo danes v Evropi tudi genotipe, ki so nastali s križanjem med njima. Seleksijski pritisk okolja za toleranco na dolg dan, odpornost na bolezni in škodljivce, stres ter seleksijski pritisk človeka za obliko rastline, obliko in barvo zrn ter odpornost so botrovali tudi razvoju številnih lokalnih sort, ki jih po Evropi poleg novo požlahtnjenih sort pridelujejo še danes (Zeven, 1997; Negri in Tosti, 2002).

V Sloveniji smo fižol spoznali kmalu za zahodnoevropskimi narodi, že Valvasor je v Slavi vojvodine Kranjske (17. stoletje) zapisal, da je pridelava fižola razširjena po vsej deželi. Čeprav letnica prihoda fižola ni točno znana, lahko na osnovi zgodovinskih dokumentov, kot so srednjeveški urbarji, kuharske knjige in zgodovinopisje vsaj v grobem rekonstruiramo distribucijske poti fižola v slovenskem prostoru v preteklih stoletjih (Maras, 2007). Najverjetneje je fižol k nam prišel iz Italije preko Benetk. Skozi stoletja kontinuirane pridelave so se ob različnih klimatskih in talnih razmerah, veliki pestrosti krajine, izoliranosti ter zaradi različnega načina pridelave in uporabe v Sloveniji razvile številne avtohtone populacije in sorte fižola (Šuštar-Vozlič in sod., 2000). Le-te se ločijo glede na namen pridelave (za zrnje, stročje ali kombinirano, kot krma za zeleno maso, za zeleno gnojenje in zaščito tal ali kot okrasna rastlina), tip rasti, višino stebela, obliko zrna, barvo zrna, dolžino vegetacije, odpornost na posamezne bolezni, prilagojenost na določene klimatske razmere in določen način gojenja (Ivančič, 2002). Poleg novo požlahtnjenih

slovenskih sort in nekaterih introduciranih tujih sort nekatere med njimi pridelujemo še danes. Čeprav so se površine, namenjene pridelavi fižola, v preteklih desetletjih precej

zmanjšale, lahko na marsikateri slovenski kmetiji še vedno najdemo stare domače tradicionalne genske vire.

2 GENSKA BANKA FIŽOLA V SLOVENIJI

Z zbiranjem avtohtonega fižola v Sloveniji je prvi začel Janez Zaplotnik že leta 1937, opisal je morfološke in fenološke lastnosti 287 genskih virov (Zaplotnik, 1952). Zbiranje je v letu 1965 nadaljevala Silva Avšič, ki je zbrala 1507 genskih virov fižola. Zbirka je bila osnova za žlahtniteljsko delo, katerega rezultat so štiri slovenske sorte fižola, ki jih pridelujemo še danes: Jabelski pisanec, Jabelski stročnik, Klemen, Zorin. Žal se je zaradi neustreznih razmer skladiščenja od starih zbirk do danes ohranilo le 55 genskih virov, ki pa niso več kalivi. Tretje zbiranje avtohtonega fižola je na področju celotne Slovenije potekalo v letih 1995 – 1998 pod vodstvom dr. Mihaele Černe s Kmetijskega inštituta Slovenije. V tem času je bilo zbranih 995 avtohtonih genskih virov navadnega ter 52 genskih virov turškega fižola, ki jih danes hranimo v Slovenski rastlinski genski banki (SRGB) – Genski banki kmetijskih rastlin na Kmetijskem inštitutu Slovenije. Zbirko stalno dopolnjujemo z novimi genskimi viri in tako šteje danes skupaj že 1104 genske vire fižola, od katerih jih je bilo 1035 zbranih na območju Slovenije v obdobju 1989-2011, 61 genskih virov pa smo pridobili v okviru sodelovanja v mednarodnih ekspedicijah v tujini. V zbirki hranimo tudi 39 genskih virov fižola, ki smo jih za potrebe raziskovalnega dela pridobili iz drugih genskih bank v Evropi in svetu. Na Kmetijskem inštitut Slovenije hranimo tudi 33 genskih virov navadnega fižola, ki smo jih leta

2000 dobili iz genske banke Agrarbiologie Linz v Avstriji in so stari okrog 200 let. Vzorci so bili nekoč del bogate zbirke nadvojvode Janeza (1782-1859). Zaradi starosti ti vzorci fižola niso več kalivi.

Za vse genske vire fižola, zbrane v zadnjih 25 letih, ki so vključeni v zbirki, imamo izpolnjene osnovne podatke o vzorcu, t.i. multicrop passport podatke. Hranimo jih v prostoru za srednje dolgo hranjenje pri temperaturi +4 °C, dopolnjujemo pa tudi zbirko za dolgoročno hranjenje pri temperaturi -20 °C. Vsako leto določeno število avtohtonih genskih virov razmnožimo v mrežnikih na poskusnem polju v Jabljah. V rastni dobi in ob spravilu pridelka genske vire vrednotimo po deskriptorjih za fižol, ki so bili izdelani v okviru evropskega konzorcija *Phaselieu* in so priporočeni za vrednotenje dednine fižola (de la Cuadra, de Ron, Schachl, 2001: Handbook on evaluation of *Phaseolus* germplasm). Deskriptorji vključujejo vrednotenje 14-ih morfoloških in fenoloških parametrov, za naše potrebe smo deskriptorje dopolnili z nekaj dodatnimi parametri. Za vse ovrednotene vzorce izdelamo tudi slikovno datoteko (cvet, list, zelen strok, suh strok, osušeno seme). Po spravilu pridelka jeseni seme posušimo, določimo kalivost in vsebnost vlage ter vzorce shranimo (v steklenih kozarcih pri +4 °C oziroma v aluminijastih vrečkah pri -20 °C).

3 RAZNOLIKOST SLOVENSКИH GENSKIH VIROV NAVADNEGA FIŽOLA

3.1 Morfološka in biokemijska karakterizacija

V obširni raziskavi smo proučevali 139 genotipov iz rodu *Phaseolus* (Maras, 2007). Iz zbirke SRGB smo izbrali 102 genska vira (91 starih avtohtonih in devet novo požlahtnjenih sort navadnega fižola ter po enega predstavnika vrst *P. coccineus* in *P. lunatus*), iz tujih genskih bank (IPK, Nemčija; NPB, Belgija; INIA, Španija; CIAT, Kolumbija; USDA, ARS-GRIN, ZDA) pa smo pridobili 10 divjih in 27 gojenih genotipov navadnega fižola (*P. vulgaris*). Slednje smo izbrali na osnovi porekla (andska Južna Amerika, Srednja Amerika) in so služili kot referenčni genotipi za umestitev slovenske dednine fižola v svetovni genski sklad.

Morfološke deskriptorje smo izbrali iz nabora dveh deskriptorjev (IBPGR in Phaselieu) in so vključevali meritve 23ih parametrov (za cvet, steblo, list, strok in seme). Genotipe smo vrednotili dve rastni dobi. Na osnovi rezultatov smo ugotovili, da vse morfotipe, ki so prisotni pri referenčnih genotipih, najdemo tudi pri slovenskih genskih virih fižola, kar je potrdilo domnevo oziroma dosedanja poročila o veliki fenotipski pestrosti slovenskega navadnega fižola (Maras, 2007). Na osnovi šestih morfoloških znakov z morfotipi, specifičnimi za srednjeameriški oziroma andski genski sklad (Singh, 1991), smo lahko le tri genotipe z gotovostjo opredelili kot srednjeameriške. Pri vseh ostalih genotipih, vključno z referenčnimi, smo opazili tako srednjeameriške kot andske morfotipe. Morfološki markerji so se v determinaciji porekla genskih virov fižola (srednjeameriško/andsko) izkazali kot neučinkoviti. Pri nekaterih morfoloških znakih smo med slovenskimi, iberskimi (Rodino in sod., 2003) in italijanskimi genotipi (Piergiovanni in sod., 2006) ugotovili izrazito

podobnost v fenotipski strukturi, tj. zastopanosti posameznih morfotipov.

Z analizo fazeolina, glavne založne beljakovine v semenu fižola, smo ugotovili, da slovenski genotipi navadnega fižola vsebujejo vse tri tipe fazeolina, ki so značilni za mediteranski prostor, to je C-, T- in S-tip (Šuštar-Vozlič in sod., 2006). Prevladujoč je delež C-tipa (55 %), sledi T-tip (31 %), najmanj pa je zastopan S-tip (14 %). Ugotovili smo, da imajo slovenski genotipi podobno sestavo fazeolina kot iberski in italijanski, kar nakazuje, da se je v preteklosti fižol v naše kraje stekal preko zahodnih meja (Maras, 2007). Ugotovili smo tudi, da je tip fazeolina v močni korelaciji s poreklom genotipov, določenim v AFLP analizi, kar potrjuje uporabnost tega biokemijskega markerja v raziskavah izvora genotipov navadnega fižola (Maras, 2007).

3.2 Molekulska karakterizacija

3.2.1 RAPD markerji

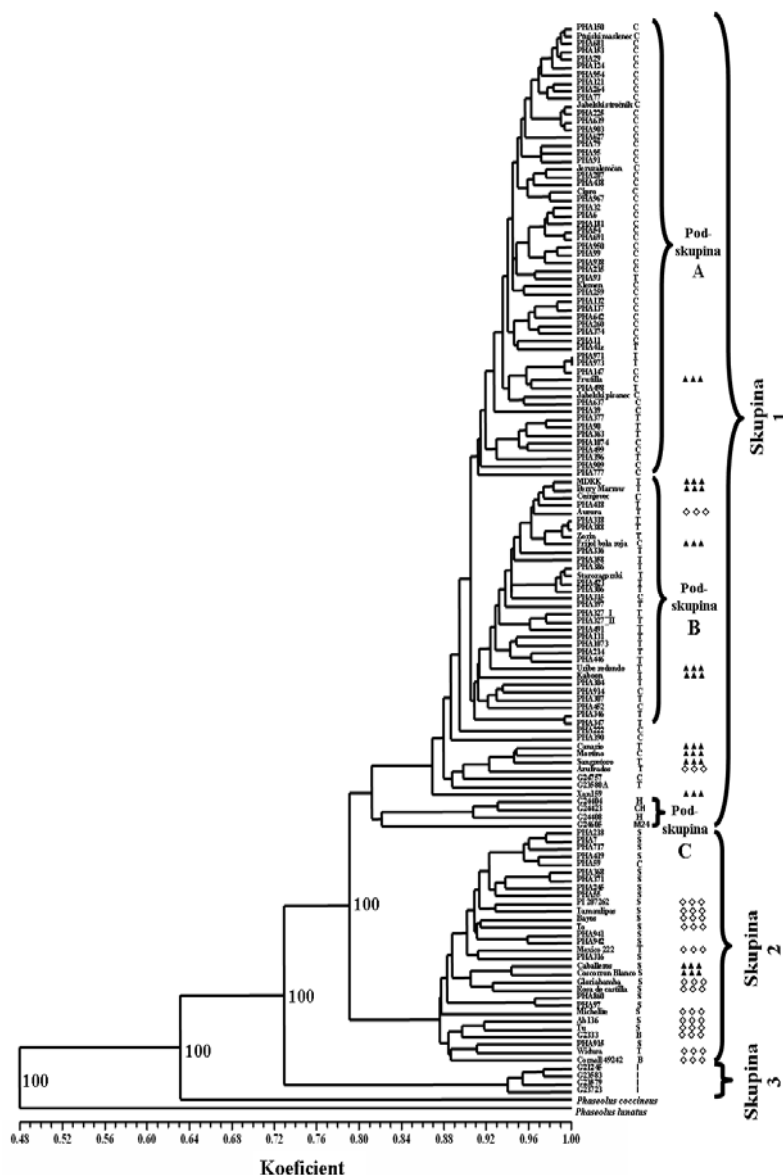
Prva raziskava genske raznolikosti slovenske zbirke fižola je bila narejena z uporabo RAPD markerjev (Meglič in sod., 1999). V raziskavo smo vključili 27 genskih virov navadnega fižola iz zbirke SRGB, ki so v dobršni meri odražali skupno variabilnost zbirke. Da bi lahko sklepali na poreklo dednine slovenskega fižola, je bilo v analizo dodatno vključenih 21 akcesij andskega in srednjeameriškega porekla. Na osnovi rezultatov analize smo ugotovili, da je raznolikost slovenske zbirke navadnega fižola sorazmerno velika. Večji del slovenskih genskih virov se je razporedil okrog andskih referenčnih genotipov, manjši pa okrog srednjeameriških. Štirinajst genskih virov pa je tvorilo povsem samostojno skupino, ki se je razlikovala od vključenih referenčnih genotipov in je nakazala obstoj lokalno specifičnega genskega sklada.

3.2.2 Analiza z AFLP markerji

Z namenom dodatno pojasniti variabilnost slovenske zbirke navadnega fižola in jo umestiti v skupni genski fond fižola smo 139 genskih virov fižola, ki smo jih proučevali z morfološkimi in biokemijskimi markerji, analizirali tudi z AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markerskim sistemom (Šuštar-Vozlič in sod., 2006). Seznam genotipov, vključenih v raziskavo, je podan v poglavju 3.1. Za analizo smo uporabili 10 kombinacij začetnih oligonukleotidov. Na podlagi visokega števila namnoženih (skupno 424) in polimorfnih (300 ali 71 %) DNA fragmentov smo med seboj ločili vse genotipe razen dveh, ki sta si bila na ravni DNA identična. Na UPGMA dendrogramu (Slika 1) so se genotipi navadnega fižola razdelili v tri jasno ločene skupine, od katerih sta se oddaljila predstavnika vrst *P. lunatus* in *P. coccineus* (Maras, 2007). Najmanjšo skupino na dendrogramu so tvorili štirje divji perujski in ekvadorski genotipi z I-tipom fazeolina. Od 100 proučevanih slovenskih genotipov navadnega fižola se jih je 85 razporedilo poleg andskih referenčnih genotipov (Skupina 1), 15 pa poleg srednjeameriških (Skupina 2), kar kaže na močnejšo zastopanost andskega

genskega sklada znotraj slovenske dednine navadnega fižola.

Znotraj andske Skupine 1 smo v analizi molekulskih markerjev, tako kot predhodno že v RAPD analizi (Meglič in sod., 1999), zasledili diferenciacijo gojenih genotipov v dve podskupini. Ugotovili smo, da se podskupini ločita tudi po nekaterih morfoloških znakih kot tudi na ravni fazeolina. Za podskupino, ki naj bi predstavljala dodaten - lokalno specifičen - genski sklad navadnega fižola, je bil značilen C-tip fazeolina, visok tip rasti, višja in širša semena, večja masa 100 semen, odsotnost nitke, dolgi stroki idr. Podobnost med omenjenimi genotipi in 'Frutillo', čilskim referenčnim genotipom, je bila izrazita tako na ravni DNA kot na ravni fazeolina in fenotipa, iz česar sklepamo, da podskupina slovenskih genotipov ne predstavlja posebne, dodatne variabilnosti, ki ne bi bila prisotna že v samem primarnem centru genetske raznolikosti. Njena močna zastopanost v slovenski dednini navadnega fižola je najverjetneje posledica visoke adaptacijske sposobnosti na specifične klimatske razmere ter izrazite preference pridelovalcev in potrošnikov za določen tip fižola.



Slika 1: UPGMA dendrogram, sestavljen na osnovi AFLP podatkov in izračunanih Jaccardovih koeficientov genetske podobnosti med 139 *Phaseolus* genotipi. Bootstrap vrednosti so izpisane ob nodijih glavnih razvejitev, tip fazeolina pa ob imenu genotipa. ◇◇◇-srednjeameriški referenčni genotipi, ▲▲▲-andski referenčni genotipi (cit. po Maras, 2007).

3.3 Odpornost izbranih vzorcev fižola na glivo *Colletotrichum lindemuthianum*

Fižolov ožig, ki ga povzroča gliva *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magnus) Briosi et Cav., je najpomembnejša glivična bolezen fižola v Sloveniji. Pojavlja se v vseh pridelovalnih območjih in v letih, ko so vremenske razmere za razvoj bolezni ugodne, povzroča precejšnjo gospodarsko škodo. Gliva

napade vse nadzemne dele rastline, kjer povzroči udrtje temno rjave lezije. Interakcija med genotipom fižola in glivo *C. lindemuthianum* je rasno specifična (Ferreira in sod., 2012). Na osnovi odziva 12ih diferencialnih sort je bilo opisanih že več kot 100 ras patogena (Mahuku in Riascos, 2004; Campa in sod., 2011). V Sloveniji smo do sedaj ugotovili štiri fiziološke rase, ki smo jih na podlagi binarnega nomenklaturega sistema

identificirali kot rase št. 23, 55, 103 in 131 (Munda in sod., 2002). Najbolj pogosti in razširjeni sta rasi št. 55 in 23, ki ju po drugačni klasifikaciji imenujemo lambda in delta. Gensko raznolikost identificiranih ras smo proučili z AFLP analizo (Munda in sod., 2009).

Vzgoja odpornih sort je najučinkovitejša metoda za varstvo pred boleznijo. Odpornost fižola proti glivi *C. lindemuthianum* je pogojena z več neodvisnimi geni, poimenovanimi kot *Co*- geni, med katerimi so vsi, razen *Co-8*, dominantni (Goncalves-Vidigal in sod., 2012). Večina med njimi je bila identificirana v srednje ameriški dednini fižola. Žlahtnjenje na odpornost proti fižolovemu ožigu je težavno zaradi velike variabilnosti patogena, zato dolgotrajno odpornost dosežemo le s kombiniranjem, tj. piramidenjem čim večjega števila odpornostnih genov (Kelly in Miklas, 1998).

V laboratorijskih in poljskih pogojih smo z umetno infekcijo proučili odpornost izbranih 26 slovenskih genskih virov fižola na štiri, v Sloveniji identificirane rase glive *C. lindemuthianum* (Munda in sod., 2009). V poskus smo vključili tudi diferencialne sorte fižola. Ugotovili smo, da nobeden od 26 preizkušenih genotipov fižola ni povsem odporen na vse rase glive, šest pa je zmerno

odpornih. Visoko stopnjo odpornosti smo ugotovili zlasti pri tistih diferencialnih sortah, ki izvirajo iz srednjeameriške dednine.

Proučili smo tudi odpornost 104-ih slovenskih genskih virov fižola, ki so jih v enoletnem poljskem poskusu na poskusnem polju v Jabljah umetno okužili z mešanico trosov vseh štirih fizioloških ras glive *C. lindemuthianum*, ki se pojavljajo pri nas. V poskus smo vključili tudi štiri diferencialne sorte (Cornell, MDRK, Michelite, Mexico), ki so nam služili kot standardi pri ocenjevanju stopnje občutljivosti. Ugotovili smo, da je bilo 11 akcesij fižola odpornih na okužbo, pri tem so bile štiri akcesije povsem odporne, pri sedmih akcesijah pa so se znamenja okužbe pojavila, vendar so rastline uspele omejiti nadaljnji razvoj bolezni. Preostalih 93 akcesij fižola je bilo na okužbo občutljivih, od tega je bilo 24 akcesij zmerno občutljivih (stopnja občutljivosti 4 - 6), 69 pa močno občutljivih (stopnja občutljivosti 7 - 9). Pri slednjih so bolezenska znamenja (nekroze) zajela več kot 70 % listne površine, močno prizadeta so bila tudi stebela, rastline so hirale in propadale.

Na podlagi dobljenih rezultatov sklepamo, da bi z vnosom nekaterih genov iz srednjeameriške dednine lahko bistveno prispevali k izboljšanju odpornosti slovenskih genskih virov fižola.

4 SPREMEMBE V GENETSKI STRUKTURI SLOVENSkih GENSKIH VIROV NAVADNEGA FIŽOLA SKOZI ČAS

4.1 Genetska erozija in raznolikost navadnega fižola tipa Češnjevca

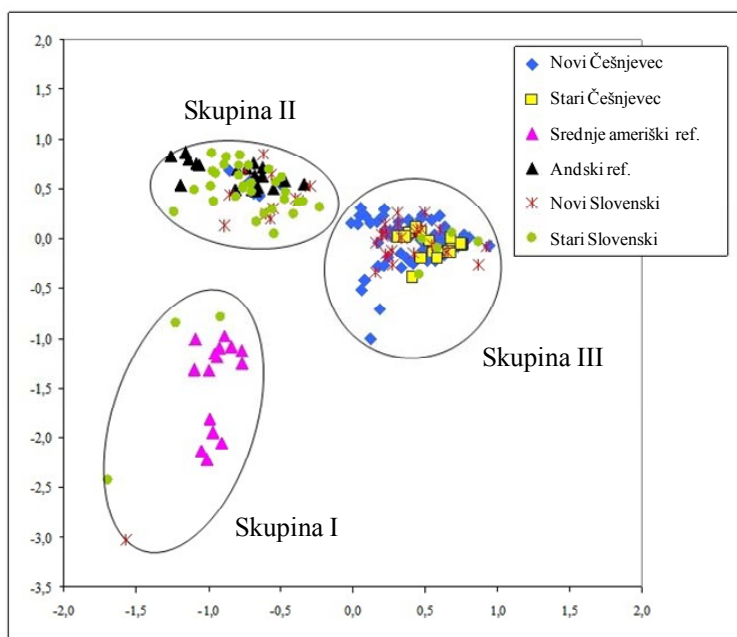
Na primeru avtohtonih lokalnih populacij fižola tipa 'Češnjevca' smo proučevali pojav genske erozije v dednini slovenskega fižola v zadnjih 50-ih letih (Maras in sod., 2006a). Stopnjo genske erozije smo ocenjevali na osnovi sprememb oziroma razlik v mikrosatelitni alelni diverziteti pri starih in novih akcesijah češnjevca, ki smo jih na

osnovi morfoloških lastnosti semena (oblike in barve) izbrali iz 50-let stare kolekcije na KIS. V začetku smo v raziskavo vključili pet genotipov iz stare kolekcije (Stari Češnjevca) in 19 genotipov iz zbirke SRGB (Novi Češnjevca). V nadaljevanju pa smo v analizo dodatno vključili 20 fenotipsko različnih genotipov iz nove zbirke, ki so bili ob vključitvi v SRGB imenovani kot češnjevca oz. kot njegovi sinonimi (češnjevca, češnovar ipd.). Prav tako smo vključili tudi kontrolne

genotipe (16 genotipov iz stare zbirke, štiri genotipe iz nove kolekcije in tri genotipe, ki smo jih pridobili iz genske banke IPK v Nemčiji).

V prvem delu raziskave smo pri 19-ih novih akcesijah (95-ih vzorcih) na 14-ih lokusih identificirali 62 mikrosatelitnih alelov, pri 5-ih starih akcesijah (25-ih vzorcih) pa 36 alelov. Podobnost med obema skupinama češnjencev se je pokazala v istovrstnosti najbolj pogostih alelov in kasneje tudi potrdila v statistični analizi. Analiza je pokazala, da v tem času ni prišlo do izgube alelov, pač pa je prišlo do sprememb v njihovi frekvenci ter do introgresije novih alelov v njihovo genetsko strukturo. V nadaljevanju, ko smo v analizo vključili dodatne genotipe fižola, smo na 14-ih mikrosatelitnih lokusih identificirali 108 različnih alelov. Pri skupini Novi Češnjevec je bilo prisotnih 62 alelov, 36 jih je bilo pri

skupini Stari Češnjevec, 69 pri skupini novega fižola, 68 pri skupini starega fižola in 61 pri kontrolnih skupinah. 29 alelov je bilo prisotnih le v skupini Novi Češnjevec, trije aleli pa so bili le pri skupini Stari Češnjevec, kar potrjuje rezultat, ki smo ga dobili pri analizi manjšega števila genotipov, da torej v zadnjih 50-ih letih ni prišlo do večje izgube alelov. Prisotnost nekaterih novih alelov v skupini Novi Češnjevec pa kaže na to, da je prišlo v tem času do introgresije nekaterih novih alelov v skupini češnjencev. Rezultat analize prikazuje razsevni grafikon (slika 2), kjer vsak simbol predstavlja določen genotip oziroma akcesijo. Razpršenost novih akcesij 'Češnjevca' na razsevni grafikonu je posledica vnosa novih alelov in sprememb v frekvenci posameznih alelov, ki so se v zadnjih 50-ih letih zgodile z mešanjem populacij, rekombinacijami in mutacijami.



Slika 2: Razsevni grafikon, ki prikazuje sorodstvene odnose med 67imi genskimi viri fižola (skupno je bilo vključenih 231 vzorcev) (cit. po Maras in sod., 2006a).

4.2 Spremembe genetske strukture genskih virov fižola iz geografsko različnih območij v obdobju 1800 do 2000

Spremembe v genetski strukturi fižola, ki so ga pridelovali na območju Slovenije in sosednje Avstrije v obdobju zadnjih 200 let, smo proučili z uporabo 14 mikrosatelitnih markerjev (Maras in sod., 2006b; Maras, 2007). V raziskavo smo vključili 128 genskih virov navadnega fižola iz treh različnih časovnih obdobj, I obdobje – 33 akcesij iz 200 let stare zbirke, ki smo jo pridobili iz genske banke pri Agrarbiologie Linz, Avstrija, II obdobje - 49 akcesij iz 50 let stare slovenske zbirke, III obdobje - 39 akcesij iz SRGB. V raziskavo smo vključili tudi sedem kontrolnih genotipov za andsko in srednjeameriško dednino (3 tuje in 7 lokalnih sort fižola).

Na osnovi analize molekulske variance in klastrske analize smo ugotovili, da se je velik delež variabilnosti navadnega fižola izpred 200 let ohranil do danes. V tem času je prišlo do izgube nekaterih alelov, vendar bilanca na račun introdukcije novih alelov ni negativna. Zaradi povečanja frekvence nekaterih alelov v današnji populaciji navadnega fižola se je zmanjšala povprečna skupna variabilnost. Z genske povezave, prikazane na UPGMA dendrogramu, smo ugotovili, da se združujejo genotipi, ki so iz različnih geografskih področij, kar kaže na skupni izvor slovenske in avstrijske dednine fižola. Genotipi so se razvrstili v andsko, srednje ameriško in tretjo skupino, ki bi lahko bila specifična za to območje.

5 UPORABNOST ZBIRKE

Zbirko fižola uporabljamo za različne raziskave, med katerimi prevladujejo raziskave sušnega stresa, s katerimi se raziskovalna skupina na KIS ukvarja zadnje desetletje. Obsežna zbirka genskih virov pa predstavlja tudi vir genov tako za žlahtnjenje novih sort kot za ponovno uvajanje starih sort v pridelovanje.

5.1 Raziskave sušnega stresa

Izpostavljenost sušnemu stresu povzroči v rastlinah niz fizioloških sprememb in ima lahko uničujoč vpliv na številne celične funkcije. Do sprememb pride tako na ravni genov, kot tudi na ravni proteinov (Seki in sod., 2002; Yamaguchi et al., 2010). Fižol je občutljiv na sušo, ki vpliva na rast in razvoj rastlin in v vremensko neugodnih letih se pridelek lahko zmanjša tudi za 60 % in več. Zaradi genetske kompleksnosti in zapletenega mehanizma tolerance mehanizmi odgovora na sušo pri fižolu še niso podrobno preučeni (Beaver in Osorno, 2009).

Na osnovi rezultatov meritev vodnega potenciala in integritete membran pri devetih sortah navadnega fižola v sušnem stresu smo ugotovili, da je na sušo najbolj tolerantna sorta Tiber, najmanj pa sorta Starozagorski črn (Hieng in sod., 2004). Fiziološke spremembe, ki nastanejo kot posledica izpostavljenosti suši, smo v listih sort Tiber in Starozagorski črn proučevali tudi z uporabo TRAP (Total Radical-Trapping Potential) testa, PAM (Pulse-Amplitude-Modulation) fluorometrije in reflektometrije (Razinger in sod., 2010). Rezultati meritev so pokazali, da je sorta Tiber bolj odporna na sušni stres, vendar stres pri nobeni sorti ni bil tako močan, da bi povzročil nepovratne spremembe fotosintetskega aparata. V listih osmih genotipov navadnega fižola smo proučevali izražanje genov pri različnih stopnjah dehidracije (Kavar et al. 2008). Z analizo genske ekspresije smo ugotovili diferencialno izražanje 15 transkriptov, od katerih se šest diferencialno izraža tudi pri navadnem repnjakovcu. Odkrili smo pet transkriptov, ki pri drugih rastlinskih vrstah niso bili poznani in ugotovili, da pet od

osmih transkriptov z nižano ravniyo izražanja sodi v funkcionalno kategorijo fotosinteze. Da bi ugotovili, ali so spremembe v izražanju 13ih transkriptov, ki smo jih potrdili kot navzgor ali navzdol regulirane, del splošnega odziva na sušo v rodu *Phaseolus*, oziroma so specifične za posamezno vrsto, smo pri vrstah *P. coccineus*, *P. lunatus* in *P. acutifolius* naredili relativno analizo izražanja s kvantitativnim PCR (Kavar in sod., 2011). Rezultati so pokazali, da je vzorec izražanja pri vseh vrstah podoben, ne glede na dejstvo, da se te štiri vrste različno odzivajo na sušo, tako na fiziološkem kot na morfološkem nivoju.

V sodelovanju z dr. Marjetko Kidrič in skupino z Inštituta Jožef Stefan proučujemo spremembe v proteolitični aktivnosti pri odzivu navadnega fižola na sušo. Ugotovili smo, da imajo kompleksno in verjetno specifično vlogo pri odgovoru na sušni stres različne proteaze, saj se aktivnost nekaterih od njih poveča in drugih zmanjša (Hieng s sod., 2004; Budič in sod., 2009). V pogojih izrazitega sušnega stresa je odgovor na nivoju proteazne aktivnosti v korelaciji z občutljivostjo posameznega genotipa. V listih navadnega fižola se nahaja več serinskih endopeptidaz in aminopeptidaz, na katere suša različno vpliva (Budič in sod. 2009; Budič 2009). Identificirani in karakterizirani sta bili dve novi serinski endopeptidazi, ki sta podobni subtilizinu, ena od njih je vpletena v odziv na sušo (Budič 2009).

Za analizo proteinov, udeleženih pri odzivu na sušo v listih fižola sort Tiber in Starozagorski, smo uporabili proteomsko analizo (Zadražnik in sod., 2011). Poskus smo izvedli v rastlinjaku, kjer so bile rastline podvržene različnim stopnjam sušnega stresa, normalno zalivane rastline so služile kot kontrola. Vzorce proteinov ekstraktov smo označili s fluorescentnimi barvili in jih ločili s pomočjo dvo-dimenzionalno gelske elektroforeze. S statistično analizo regresije na osnovi vsote najmanjših kvadratov, ki je bila opravljena na

osnovi 543 proteinskih lis sorte Starozagorski čern in 400 proteinskih lis sorte Tiber, smo določili proteinske lise, pri katerih se je izražanje spremenilo v sušnem stresu. Proteinske lise, pri katerih je prišlo do povečanega ali zmanjšanega izražanja v stresnih razmerah glede na kontrolne, smo identificirali z LC-MS/MS, analiza MS spektrov pa je bila obdelana s programom Mascot, z uporabo podatkovne zbirke NCBI nr. Pri sorti Starozagorski čern smo identificirali 64 proteinov, pri sorti Tiber pa 58 proteinov, ki so se diferencialno izražali v suši (Zadražnik in sod., 2012). Ugotovili smo, da je največ identificiranih proteinov udeleženih v procesih energijskega metabolizma (glikoliza, Krebsov cikel), v sintezi proteinov ali njihovi proteolizi, imajo zaščitno in detoksifikacijsko vlogo ali pa so udeleženi v procesih fotosinteze. Med sortama ni bilo bistvenih razlik pri identificiranih proteinih ali večjih razlik pri izražanju določene skupine proteinov. Povezave med identificiranimi proteini, ki smo jih ponazorili z bioinformacijsko analizo, omogočajo kompleksnejši vpogled v biološke poti in molekulske funkcije, na katere vpliva sušni stres. Raziskave na področju proteomike so bile narejene v sodelovanju z dvema raziskovalnima skupinama na Norveškem, inštitutom Nofima v Aasu in skupino z Oddelka za molekularne bioznanosti Univerze v Oslu, v okviru doktorskega študija mlade raziskovalke.

Sorti Tiber in Starozagorski čern, ki se razlikujeta v toleranci na sušo, smo uporabili tudi kot starševski liniji za pridobitev rekombinantnih inbridiranih linij (RIL). Dobljeno F8 generacijo 80 RIL bomo uporabili za izdelavo genske karte.

5.2 Žlahtnjenje

Zbirko avtohtonih genskih virov fižola uporabljamo tudi kot vir za žlahtnjenje slovenskim razmeram prilagojenih, odpornih

in slovenskemu potrošniku vsečnih sort. Pomanjkljivost domačih sort fižola se kaže v nezadostni odpornosti, saj so vse bolj ali manj občutljive na nekatere glivične in bakterijske bolezni (fižolov ožig, fižolova vdrta pegavost, fižolova rjava pegavost, mastna in navadna fižolova bakterijska pegavost), škodljivce (črna fižolova uš) in viruse (navadni in rumeni fižolov mozaik virus, fižolova virusna pegavost), ki zmanjšujejo količino in kakovost pridelka (Šuštar Vozlič in Meglič, 2000).

Cilj žlahtnjenja je vzgoja novih slovenskih sort fižola, odpornih na fižolov ožig in spremenjene klimatske razmere (toleranca na sušo in ekstremno vlago). Osredotočili smo se predvsem na nizek fižol za zrnje. V ta namen

izvajamo ciljna križanja med slovensko sorto Zorin in genotipi, odpornimi proti fižolovemu ožigu in/ozroma tolerantnimi na sušo. Selekcija v zgodnjih generacijah poteka po metodi potomstva enega semena (single seed descend), v kasnejših generacijah (F4 in F5) posadimo in vrednotimo več rastlin. V letu 2009 smo začeli tudi z reintrodukcijo starih genskih virov. Iz zbirke fižola v SRGB smo izbrali genske vire tipa češnjevec, lišček in 'dan in noč'. Izbrane genotipe smo tri leta vrednotili na poskusnem polju v Jabljah, v letu 2012 smo pet najboljših virov vrednotili tudi na treh drugih lokacijah v Sloveniji. Žlahtnjenje je v preteklosti potekalo v okviru ciljnih raziskovalnih projektov, katerih financiranje pa se je v letu 2011 zaključilo.

6 SKLEPI

Zbirka genskih virov fižola predstavlja najboljše zbirko v Slovenski rastlinski genski banki, saj trenutno obsega 1035 avtohtonih genskih virov fižola. V okviru programa SRGB, predvsem pa v okviru več raziskovalnih projektov smo del zbirke podrobno ovrednotili in ugotovili, da se je v stoletjih pridelovanja v Sloveniji oblikovala

raznolika dednina, ki jo je vredno ohraniti in uporabiti tudi kot vir za žlahtnjenje slovenskih sort fižola. Pridelovanje fižola in njegova uporaba v prehrani ljudi imata v Sloveniji dolgo tradicijo. Fižol, ki ga danes pridelamo v Sloveniji, pa ne zadostuje za samooskrbo, zato veliko fižola uvozimo

7 ZAHVALA

Hranjenje, razmnoževanje in osnovno vrednotenje genskih virov fižola poteka v okviru programa Slovenska rastlinska genska banka, za kar skrbi Boštjan Lipavac. Raziskave genske raznolikosti in genske erozije so potekale v okviru projekta L4-3284-0401-01, ki ga je sofinanciralo takratno Ministrstvo za šolstvo, znanost in šport in Ministrstvo za

kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano. Raziskave sušnega stresa so oziroma še potekajo v okviru projektov J4-6355 in J4-4126, financiranih s strani Agencije za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije. Raziskave fižola so bile oziroma so tudi tema doktorskih disertacij treh mladih raziskovalk.

6 VIRI

Batista K.A., Prudencio S.H., Fernandes K.F. 2010. Changes in the functional properties and antinutritional factors of extruded hard-to-cook

common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Food Chemistry, 75, 3: 286-290.

- Beaver J., Osorno J.M. 2009. Achievements and limitations of contemporary common bean breeding using conventional and molecular approaches. *Euphytica*, 168: 145–175
- Broughton W.J., Hernandez G., Blair M., Beebe S., Gepts P., Vanderleyden J. 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) - model food legumes. *Plant and Soil*, 252: 55-128
- Budič M. 2009. Proteaze, vpletene v odziv navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) na vodni stres. Doktorska disertacija. Ljubljana: 112 str.
- Budič M., Kidrič M., Meglič, V. in Cigić B. 2009. A quantitative technique for determining proteases and their substrate specificities and pH optima in crude enzyme extracts. *Analytical Biochemistry* 388, 1: 56-62
- Campa A., Giraldez R., Ferreira J.J. 2011. Genetic Analysis of the Resistance to Eight Anthracnose Races in the Common Bean Differential Cultivar Kaboon. *Phytopathology*, 101, 6: 757-764
- De la Cuadra C., de Ron A.M., Schachl R. 2001. Handbook on evaluation of *Phaseolus* germplasm. PHASELIEU - FAIR - PL97-3463 Misión Biológica de Galicia (CSIC): 86 s.
- Duranti M. 2006. Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 77: 67-82
- Freyre R., Rios R., Guzman L., Debouck D.G., Gepts P. 1996. Ecogeographic distribution of *Phaseolus* spp (Fabaceae) in Bolivia. *Economic Botany*, 50: 195-215
- Gepts P., Bliss F.A. 1986. Phaseolin variability among wild and cultivated common beans (*Phaseolus vulgaris*) from Colombia. *Economic Botany*, 40: 469-478
- Gepts P., Bliss F.A. 1988. Dissemination paths of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae) deduced from phaseolin electrophoretic variability. II. Europe and Africa. *Economic Botany*, 42: 86-104
- Gepts P., Osborn T.C., Rashka K., Bliss F.A. 1986. Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. *Economic Botany*, 40: 451-468
- Goncalves-Vidigal M.C., Meirelles A.C., Poletine J.P., De Sousa L.L., Cruz A.S., Nunes M.P., Lacanallo G.F., Vidigal F.P.S. 2012. Genetic analysis of anthracnose resistance in 'Pitanga' dry bean cultivar. *Plant Breeding*, 131, 3: 423-429
- Hieng B., Ugrinovič K., Šuštar-Vozlič J. in Kidrič M. 2004. Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars differing in sensitivity. *Journal of Plant Physiology*, 161, 5: 519-530
- Ivančič A. 2002. Hibridizacija pomembnejših rastlinskih vrst. Maribor, Fakulteta za kmetijstvo: 776 str.
- Jose Ferreira J., Campa A., Perez-Vega E., Rodriguez-Suarez C., Giraldez R. 2012. Introgression and pyramiding into common bean market class fabada of genes conferring resistance to anthracnose and potyvirus. *Theoretical and Applied Genetics*, 124, 4: 777-788
- Kavar T., Maras M., Kidrič M., Šuštar-Vozlič J, Meglič V. 2011. The expression profiles of selected genes in different bean species (*Phaseolus* spp.) as response to water deficit. *Journal of Central European Agriculture*, 12, 4: 557-568
- Kavar T., Maras M., Kidrič M., Šuštar-Vozlič J., Meglič V. 2008. Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. *Molecular Breeding*, 21: 159-172
- Kelly J.D., Miklas N. 1999. Marker assisted selection. V: Singh S.P (ur.): Common bean improvement in the twenty-first century. The Netherlands, Dodrecht, Kluwer Academic Publishers: 405 str.
- Kelly J.D., Miklas P.N. 1998. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. *Molecular breeding*, 4, 1: 1-11
- Koenig R., Gepts P. 1989a. Segregation and linkage of genes for seed proteins, isozymes, and morphological traits in common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Heredity*, 80: 455-459
- Madhujith T., Nacz M., Shahidi F. 2004. Antioxidant activity of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Food Lipids*, 11: 220-233
- Mahuku G.S., Riascos J.J., 2004. Virulence and molecular diversity within *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Andean and Mesoamerican bean varieties and regions European. *Journal of Plant Pathology*, 110, 3: 253-263
- Maras M. 2007. Karakterizacija slovenskih genskih virov navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) z morfološkimi, biokemijskimi in molekularskimi markerji. Doktorska disertacija. Ljubljana: 134 s.
- Maras M., Sušnik Bajec S., Meglič V., Šuštar-Vozlič J. 2006a. Characterization and genetic diversity changes in the Slovenian common bean Češnjevce landrace. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 48, 2: 39-47

- Maras M., Sušnik Bajec S., Šuštar-Vozlič J., Meglič V. 2006b. Temporal changes in genetic diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) accessions cultivated between 1800 and 2000. *Russian Journal of Genetics*, 42, 7: 775-782
- Maras M., Šuštar-Vozlič J., Javornik B., Meglič V. 2008. The efficiency of AFLP and SSR markers in genetic diversity estimation and gene pool classification of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta agriculturae Slovenica*, 91, 1: 87-96
- Meglič V., Johns M.A., Šuštar-Vozlič J. 1999. Genetic diversity in a Slovenian bean germplasm collection as related to the Andean *Phaseolus* gene pool. V: Denholm I., Pickett J.A., Devonshire A.L. (ur.): Cambridge UK: ISTA 75th Anniversary: a unique event: programme & abstracts. World Seed Conference 1999, Cambridge, Velika Britanija, 6-8 sept. 1999. Cambridge, ISTA: 28
- Munda A., Radišek S., Šuštar-Vozlič J., Javornik B. 2009. Genetic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Slovenia and resistance of local *Phaseolus vulgaris* germplasm. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 116, 1: 23-29
- Munda A., Žerjav M., Šuštar-Vozlič J. 2002. Identification of physiological races of *Colletotrichum lindemuthianum* occurring in Slovenia. *Acta biologica Slovenica*, 45, 1: 3-7
- Negri V., Tosti N. 2002. *Phaseolus* genetic diversity maintained on-farm in central Italy. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49: 511-520
- Piergiorganni A.R., Taranto G., Losavio F.P., Pignone D. 2006. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from Abruzzo and Lazio regions (Central Italy). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 313-322
- Razinger J., Drinovec L., Šuštar-Vozlič J., Čremožnik B., Meglič V., Čerenak A. 2010. Physiological response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to drought stress. *Hmeljarski bilten*, 17: 44-56
- Rodino A.P., Santalla M., De Ron A.M., Singh S.P. 2003. A core collection of common bean from the Iberian peninsula. *Euphytica*, 131: 165-175
- Seki M., Narusaka M., Kamiya A., Ishida, J., Satou M., Sakurai T., Nakajima, M.), Enju, A., Akiyama, K., Oono, Y., Muramatsu, M., Hayashizaki, Y., Kawai, J., Carninci, P., Itoh, M., Ishii, Y., Arakawa, T., Shibata, K., Shinagawa, A., Shinozaki, K. 2002. Functional annotation of a full-length Arabidopsis cDNA collection. *Science*, 296, 5565: 141-145
- Singh S.P., Gepts P., Debouck D.G. 1991. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economic Botany*, 45: 379-396
- Šuštar-Vozlič J., Černe M., Meglič V. 2000. Genetska variabilnost fižola v Sloveniji. *Sodobno kmetijstvo*, 33, 9: 378-379
- Šuštar-Vozlič J., Mara, M., Javornik, B., Meglič, V. 2006. Genetic diversity and origin of Slovene common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm as revealed by AFLP markers and phaseolin analysis. *Journal of the American Society of Horticultural Sciences*, 131, 2: 242-249
- Šuštar-Vozlič J., Maras M., Javornik B., Meglič V. 2006. Genetic diversity and origin of Slovene common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm as revealed by AFLP markers and phaseolin analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131: 242-249
- Yamaguchi M., Valliyodan B., Zhang J., Lenoble M., Yu O., Rogers E., Nguyen H., Sharp R.E. 2010. Regulation of growth response to water stress in the soybean primary root. I. Proteomic analysis reveals region-specific regulation of phenylpropanoid metabolism and control of free iron in the elongation zone. *Plant Cell and Environment*, 33, 2: 223-243
- Zadražnik T., Hollung, K., Meglič V., Šuštar-Vozlič J. 2011. Proučevanje proteoma listov navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris* L.) v povezavi s sušnim stresom. V: Potočnik, U. (ur.), Ramšak, A. (ur.). 2. kolokvij iz genetike, Piran, 16. september 2011. Ljubljana: Slovensko genetsko društvo: 92-99
- Zadražnik T., Hollung, K., Egge-Jacobsen W., Meglič V., Šuštar-Vozlič J. 2012. Differential proteomic analysis of drought stress response in elaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Proteomics*, v tisku, doi: 10.1016/j.prot.2012.09.021.
- Zaplotnik J. 1952. Naš fižol. Ljubljana, Kmečka knjiga: 99 str.
- Zeven A.C. 1997. The introduction of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) into Western Europe and the phenotypic variation of dry beans collected in the Netherlands in 1946. *Euphytica*, 94: 319-328