

Genska banka ajde - vir slovenske genetske variabilnosti

Zlata LUTHAR¹

Received November 05, 2012; accepted November 19, 2012.
Delo je prispelo 05. novembra 2012, sprejeto 19. novembra 2012.

IZVLEČEK

Osnovni razlogi za zbiranje domačih vzorcev ajde po Sloveniji so bili predvsem v opuščanju pridelovanja domačih populacij in nadomestitev s tujimi uvoženimi sortami in populacijami, katerih seme je bilo na razpolago v zadostni količini pridelovalcem. Drug razlog je bil v nevarnosti, da se domače populacije križajo s tujim uvoženim materialom ali z novimi slovenskimi sortami in kot tretji razlog zbran material je nudil veliko variabilnost in možnost izbire ter uporabe kot vir genov za žlahtniteljsko delo. Pogosto so tam, kjer so se oz. se z žlahtnjenjem še ukvarjajo, kot potreba nastajale zbirke posameznih rastlinskih vrst. To so bili glavni razlogi pred 30 in več leti za zbiranje in reševanje gen fonda. Glede na dosedanje opise, bi lahko v grobem razdelili zbrani material v 2 skupini. Vzorce s sivimi semeni, ki imajo drobna siva semena in bele cvetove, le pri nekaterih populacijah se pojavljajo posamične rastline z rahlo roza cvetovi. Prilagojene so nižinskim in gričevnatim talnim in podnebnim razmeram, legam brez pogostih zgodnjih jesenskih slan in megla. V drugi skupini so populacije z nekoliko debelejšimi, temnimi - rjavimi semeni, osnovna barva cvetov je svetlo do temno roza, lahko se pojavijo posamične rastline z rahlo rdečimi cvetovi. Primerne so za višinske, hribovite lege s 7 do 10 dni krajšo rastno dobo. Konec septembra so primerne za žetev, saj jim v ugodnih klimatskih razmerah do takrat že odpade listje. Pri sivih populacijah pa listje odpade šele po prvih jesenskih slanh. Vzorca iz genske banke v preteklosti niso služili samo kot izhodiščni material za žlahtniteljsko delo (slovenske sorte ajde), ampak se je proučevala vitalnost semen, vsebnost polifenolov (tanina) v posameznih delih semen, genetska variabilnost in identifikacija vzorcev na nivoju DNA ter regeneracijska sposobnost *in vitro* razmerah. Značilnost te zbirke je, da se je več ne dopolnjuje z domačimi populacijami, ker jih pridelovalci ne pridelujejo in jih na terenu ni možno več nabrati oz. dobiti.

Ključne besede: ajda, genska banka, populacija, genetska variabilnost

ABSTRACT

BUCKWHEAT GENE BANK - A SOURCE OF SLOVENIAN GENETIC VARIABILITY

The primary reason for collecting domestic samples of buckwheat in Slovenia is the abandonment of growing domestic populations and their replacement with foreign, imported species and populations, whose seed is available in sufficient quantity to growers. Another reason is the threat that domestic populations will cross with foreign imported material or with new Slovenian varieties. A third reason is that the collected material provides a lot of variability and the possibility of choice and use as a source of genes for breeding work. Breeding has often been accompanied with the collection of selected plant species that were required and used during the breeding process. More than 30 years ago, therefore, a buckwheat gene fund was created. Based on existing descriptions, the collected material can be roughly divided into two groups. Samples with small gray seeds mainly have white flowers, although individual plants with slightly pink flowers emerge in some populations. They are adapted to lowland and hilly soil and climatic conditions, as well positions without frequent or early autumn hoarfrosts and mist. The second group includes populations with slightly thicker dark - brown seeds; the basic color of the flowers is light to dark pink, although individual plants with slightly red flowers may emerge. They are suitable for higher altitude, mountainous locations with a 7 to 10 days shorter growth period. They are suitable for harvest at the end of September because, with good weather conditions, the leaves have already fallen off by then. In the case of grey populations, the leaves do not fall until the first autumn hoarfrosts. Samples from the gene bank have not only served as starting material for breeding work in the past (Slovenian buckwheat varieties) but also for investigation of the seed viability, of the seed content of polyphenols (tannins) in individual parts of seeds, genetic variability, identification of samples on the level of DNA and regeneration capacity under *in vitro* conditions. A characteristic of this collection is that it is no longer being supplemented by local populations because these are no longer to be found in the natural environment.

Key words: buckwheat, genebank, population, genetic variability

¹ izr. prof. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za agronomijo, Jamnikarjeva 101, SI-1111 Ljubljana

1 RAZLOGI ZA ZBIRANJE SLOVENSКИH POPULACIJ NAVADNE AJDE IN NALOGE GENSKЕ BANKE

Analiza zmanjševanja pridelovanja navadne ajde je pokazala, da se je površina 31.715 ha posejane z ajdo na območju Slovenije pred 2. svetovno vojno od leta 1939 zmanjšala v letu 1997 na 405 ha. Pred 30 in več leti, ko je bila zbrana in skladiščena večina vzorcev, se je ajdo pridelovalo na približno 1.300 ha (Statistični letopis RS, več letnikov). V tem obdobju se niso samo občutno zmanjšale površine avtohtonih populacij, ampak so jih začele izpodrivati požlahtnjene domače sorte Siva, Darja in v Slovensko sortno listo vpisana tetraploidna sorta Bednja 4n ter tudi druge uvožene tuje sorte. Opuščanje pridelovanja domačih populacij in nadomestitev s tujimi uvoženimi sortami in populacijami, katerih seme je bilo na razpolago v zadostni količini pridelovalcem ter nevarnost, da se domače

populacije skrižajo s tujim uvoženim materialom ali z novimi slovenskimi sortami so bili osnovni razlogi za zbiranje domačih populacij ajde po letu 1975. Zbran material je nudil veliko variabilnost in možnost izbire ter uporabe kot vir genov za žlahtnjenje in proučevanje njihovih lastnosti.

Naloge oz. delo genske banke je osredotočeno na pravilno dolgoročno hranjenje vzorcev, obnavljanje in razmnoževanje semen. Zbiranje osnovnih (passport) podatkov o vzorcih (vzgojna stopnja semen, vrsta, rod, družina, izvor, zbiratelj, čas, lokacija in način zbiranja ter prostor in čas skladiščenja), opisovanje in vrednotenje zbranih podatkov po mednarodnih deskriptorjih, sodelovanje med genskimi bankami ter dosegljivost zbirke oz. vzorcev.

2 RAZMERE HRANJENJA VZORCEV

Semena navadne ajde se hranijo *ex situ* - izven naravnega okolja v hladilnikih, prostornine 650 in 1450 l, zapakirani v steklenih kozarcih ali v papirnatih in plastičnih vrečkah. Vsak vzorec je opremljen s silikagelom - indikatorjem vlage. Pri povišani vlagi v vzorcu se barva silikagela spremeni in to je opozorilo, da je potrebno vzorec dosušiti, mu dodati suh silikagel, ga ponovno zapakirati in čimprej vrniti v hladilnik. Vzorci so pred hranjenjem očiščeni, odstranjeni so morebitni škodljivci in dosušeni na 8 % vlage. Hranijo se pri

temperaturi 4 °C in to je srednjeročno hranjenje, običajno 10 do 20 let. Ajda ohrani v teh razmerah dobro kalivost tudi do 30 in več let, kar je že dolgoročno hranjenje. Po tem, priporočljivo je že prej in tudi potrebno, da se vzorce obnovi oz. razmnoži. V ta namen, da se čim bolj ohrani vzorce in zmanjša stroške hranjenja, je bil v letu 2011 prenovljen in opremljen hlajen prostor in vzorci bodo v bližnji prihodnosti po potrebi dosušeni, prepakirani v boljšo embalažo in preseljeni.

3 NAČIN RAZMNOŽEVANJA VZORCEV

Navadna ajda (*Fagopyrum esculentum* Moench.) je tujeprašna rastlina, ki jo opašujejo žuželke, predvsem čebele. Za preprečitev neželjenega opráševanja med vzorci in zagotovitvi identičnosti obnovljenega semena z originalnim vzorcem je potrebno razmnoževati akcesije v izolaciji. To lahko

zagotovimo s prostorsko izolacijo s primerno razdaljo 1 km in več, odvisno od razgibanosti terena in naravnih pregrad, lahko pa znotraj večjega posevka tetraploidne (4n) ajde razmnožujemo v primerni razdalji več manjših diploidnih (2n) vzorcev. Zadnji način

razmnoževanja uporabljamo za obnavljanje hranjenih vzorcev od leta 1997.

Diploidne vzorce navadne ajde v velikosti parcel do 4 m² se razmnožuje znotraj večjega posevka tetraploidne ajde. Diploidna ajda s 16 kromosomi in tetraploidna ajda z 32 kromosomi se med saboj ne križata. Razdalja med posameznimi parcelami naj bi bila 12 in več metrov (Adhikari in Campbell, 1998). To je razdalja oz. pas tetraploidne izolacije, da insekti, med njimi so glavni oprasovalci čebele, naj ne bi prenašali pelod med diploidnimi vzorci.

Pri ajdi je, zaradi relativno visokega koeficienta razmnožitve, velikost parcel približno 4 m² zelo primerna. Za to površino se porabi zelo malo osnovnega oz. originalnega semena in manj časa, saj se v ugodnih klimatskih razmerah lahko pridela zadostno količino semena za obnovo bazične kolekcije in do 10 manjših vzorcev po 50 semen, za izmenjavo uporabnikom.

Semena se poseje v pet vrst v razdalji 40 cm. Ta razdalja je nekoliko večja kot jo zahteva optimalna agrotehnika. Za večjo medvrstno razdaljo je več razlogov: rastline imajo več prostora za rast in razvoj, zagotovljena je večja preglednost pri opisih in vzorčenju, ki se jih opravlja na polju in manj se poškoduje rastline. Za tako velike parcele potrebujemo minimalno razdaljo 10–12 m, željeno je tudi več. To metodo so uvedli ruski raziskovalci, in če dodamo znano dejstvo racionalnega obnašanja čebel, je ta metoda zelo primerna za razmnoževanje večjega števila različnih vzorcev istočasno na isti lokaciji. S tem si olajšamo in pocenimo delo ter prihranimo na času, kot če bi imeli več raztresenih izolacij v razdalji 1 km in več. Ugotovitve Adhikari in Campbell (1998) potrjujejo primernost te metode in navajajo 4,8 % neželjene (tuje) oprasitve pri razdalji 12 m. Da bi ugotovili primernost metode v naših razmerah z razdaljo 12 m in nekoliko več, smo v letih 1997 in 1998, ko smo začeli z načrtnim

razmnoževanjem vzorcev iz genske banke, izvedli poskus medsebojnega križanja. Znotraj 1 ha 4n posevka smo posejali 40 parcel velikosti 4 m² z diploidnimi vzorci. Na 37 parcelah so bili posejani vzorci iz genske banke, na eni standardna sorta Darja in na dveh determinantna sorta Darina, ki je bila uporabljena za testiranje morebitne tujeprašnosti med rastlinami posameznih parcel.

Na izražanje determinantne oblike rasti vpliva recesivni gen oz. alel (*d*). Pri 2n rastlinah sta za determinantno obliko rasti oz. habitus potrebna dva recesivna gena oz. alela (*dd*). Vzorci iz genske banke, ki so bili vključeni v poskus, so pretežno nedeterminantne oblike rasti. Včasih se med populacijami ajde s sivimi semeni, ki so bile tudi vključene v poskus, pojavljajo posamezne rastline z determinantno rastjo in ker se ta lastnost deduje dominantno/recesivno v razmerju 3:1 je takih rastlin zelo malo. Genotip nedeterminantnih rastlin je lahko homozigoten (*DD*) oz. heterozigoten (*Dd*), v razmerju 1:2. Fenotip enih in drugih je enak – nedeterminantna oblika rasti. V primeru, če se determinantna rastlina skriža z nedeterminantno, se to že naslednje leto odraža na fenotipu potomcev - obliki rasti. Potomci skrižanih rastlin ne bodo več determinantni, ampak nedeterminantni. Del semena pridelanega v letu 1997 smo v letu 1998 naključno posejali na dve parceli znotraj 4n posevka. Po preštetju fenotipov znotraj vsake parcele smo ugotovili, da je odstotek nedeterminantnih rastlin oz. takih, ki so nastale po križanju z nedeterminantnimi rastlinami s parcel, kjer so se razmnoževali vzorci iz genske banke zelo majhen, v povprečju 3,5%. Tudi, če vzamemo v obzir možnost pojavljanja majhnega odstotka determinantnih rastlin na parcelah, kjer so se razmnoževali vzorci, pri katerih se občasno pojavlja recesivni gen - *d* (v letu 1997 so bili 4 taki vzorci) in možnost križanja teh determinantnih rastlin z Darino, bi nastanek determinantnih rastlin, ki so rezultat tega križanja lahko zmanjšal dobljen odstotek. Vendar so ta naključja zanemarljivo majhna,

možna pa so. Ker je 3,5 % tujeprašnosti zelo malo, smo se na podlagi tega poskusa odločili za tak način razmnoževanja semena, ker ohranja zadovoljivo identičnost z osnovnim, hranjenim vzorcem. Istočasno pa omogoča razmnoževanje večjega števila vzorcev v istem letu z manj stroški v primerjavi z razmnoževanjem na različnih lokacijah.

Tatarska ajda (*Fagopyrum esculentum* (L.) Gaertner) je samoprašna rastlina in ne potrebuje izolacije. Razmnoževanje je tehnično manj zahtevno ima pa nekoliko daljšo rastno dobo kot navadna ajda oz. semena dozorevajo zelo neenakomerno, še bolj kot pri navadni ajdi. Za razmnoževanje teh vzorcev so dobrodošla leta brez zgodnjih jesenskih slani in v času zorenja obdobje s čim manj dežja oz. vlage.

4 OPISOVANJE HRANJENIH VZORCEV

Med rastno dobo se vzorce opisuje po 43 priporočenih mednarodnih deskriptorjih (Engels in Arora, 1994). Obdobje spremljanja oz. opisovanja se začne s fazo kalitve oz. vznika in se zaključi s polno zrelostjo oz. žetvijo rastlin. To obdobje je tudi pokazatelj ranosti. Med tem se opisuje vegetativni del rastline - steblo in liste ter generativni del - cvet in seme, ki je v bistvu zaprt plod (orešek) in se v agronomiji imenuje seme. Steblo se opisuje oz. spremlja z desetimi deskriptorji: način rasti - habitus, determinantnost, višina rastlin, razrast rastlin, število internodijev, dolžina, barva in premer glavnega poganjka, debelina steblovega tkiva in občutljivost na poleganje. Liste se opisuje z enajstimi deskriptorji: barva lista, listnega roba, listnih

žil in listnega peclja, število listov na glavnem poganjku, dolžina listnega peclja, dolžina, širina in oblika listne ploskve, teža svežih listov in zračno suhih listov. Cvet oz. socvetje se opisuje z desetimi deskriptorji: število dni od vznika do cvetenja, število socvetij, kompaktnost oz. zbitost socvetja, dolžina socvetja, razrast socvetja, barva socvetnega peclja, število cvetov v grozdu in vršnem pakobulu, barva cvetov, morfologija oz. oblika cveta in zakrnelost cvetov. Seme (plod - orešek) se opisuje z desetimi deskriptorji: število semen v grozdu in vršnem pakobulu, barva semen, teste in luske, oblika semen, površina oz. videz semen, dolžina in širina semen, povprečni pridelek na rastlino in teža 1000 semen.

5 VREDNOTENJE ZBRANIH PODATKOV O VZORCIH

Na primeru 10 obnovljenih in opisanih vzorcev in standardni sorti Darja z agronomsko pomembnimi deskriptorji, ki vplivajo na višino pridelka semen, so prikazane razlike in podobnosti med vzorci (preglednica 1). V grobem izhaja prvih 5 vzorcev iz skupine s svetlimi semeni - svetlo siva brez priž in temnejše siva s temnimi prižami. Ostalih 5 vzorcev je iz skupine z rjavimi semeni - svetlo in temno rjava s temnejšimi prižami. Statistično značilne razlike in enakosti znotraj in med obema skupinama so bile izračunane

ter testirane z analizo variance in Duncanovim testom pri tveganju ($p = 0,05$) in so prikazane s črkami, ki sledijo povprečjem in odstotkom za vsak vzorec. Vrednosti označene z različnimi črkami se statistično značilno razlikujejo, z enakimi pa se statistično značilno ne razlikujejo (preglednica 1).

Navadna ajda se lahko močno ali slabo razrašča in običajno vsak stranski poganjek oblikuje socvetje in v ugodnih razmerah tudi seme. Intezivnost razrasti je odvisna od

genotipa in gostote posevka. Celotno socvetje enega poganjka se imenuje sestavljeno mešano socvetje, katerega osnova je grozdasta in končuje se pakobulasto. Znotraj sestavljenega

grozda je pri nedeterminantnih ajdah več socvetnih vejic. Pri determinantnih ajdah pa je eden oz. sta največ dva grozda, ki se končujeta s končnim pakobulom.

Preglednica 1: Povprečne vrednosti in odstotki za lastnosti, ki vplivajo na velikost pridelka pri 10 vzorcih ajde in sorti Darja. Povprečja in odstotki označeni z različnimi črkami se statistično značilno razlikujejo med vzorci, testirano z Duncanovim testom pri tveganju ($p = 0,05$).

Oznaka vzorca	Št. cvetov v grozdu in vršnem pakobulu	% semen v grozdu in vršnem pakobulu	% lusk v grozdu in vršnem pakobulu	Dolžina semen (mm)	Širina semen (mm)	Teža semen na rastlino (g)	Teža 1000 semen (g)
Svetla semena – svetlo in temno siva s prižami							
114	21,7 abcd	24,6 a	23,3 ab	5,7 d	3,3 c	0,6 c	20,7 gh
119	23,5 abcd	7,5 d	21,4 ab	6,0 abc	3,6 b	0,1 f	21,7 efg
134	24,7 ab	7,3 d	29,4 a	5,4 ef	3,0 d	0,1 f	21,2 fgh
149	23,3 abcd	18,5 ab	19,5 ab	5,3 f	3,3 c	0,3 d	22,3 def
152	19,5 bcd	14,5 bcd	27,2 a	5,6 de	3,2 cd	0,2 e	20,3 h
Temna semena – svetlo in temno rjava s prižami							
113	25,3 a	9,5 bcd	15,9 b	5,9 bc	3,5 b	0,9 b	21,4 efgh
135	24,4 ab	15,2 bcd	23,0 ab	6,1 ab	3,8 a	0,7 bc	23,9 c
150	18,6 d	17,6 abc	20,5 ab	5,2 f	3,1 cd	0,5 cd	22,6 cde
151	18,8 cd	14,0 bcd	23,1 ab	5,8 cd	3,8 a	0,6 c	25,6 b
157	23,5 abcd	8,6 cd	18,8 ab	6,2 a	3,9 a	0,6 c	23,1 cd
Kontrola							
Darja	26,1 a	10,4 bcd	23,5 ab	5,8 cd	3,8 a	1,6 a	27,2 a

Iz preglednice 1 je razvidno, da so vključeni vzorci v obnovo nastavili sorazmerno veliko število cvetov. V povprečju je bilo v vsaki socvetni vejici oz. grozdu s pripadajočim vršnim pakobulom od 19–26 cvetov, odvisno v katerem poganjku se je nahajal (na glavnem ali stranskih prvega ali več redov). To je kar veliko, če vzamemo v obzir, da je bila dolžina grozda v povprečju 0,5–2,5 cm, odvisno od razraščенosti socvetja in kje na rastlini se je nahajal. Samo 7,3–24,6 % cvetov je po cvetenju oblikovalo semena. V povprečju je bilo 15,9–29,4 % praznih lusk oz. gluhih semen. Vsaj polovica oz. več kot polovica cvetov (46–77 %) je abortirala oz. propadla v prvih dneh po oploditvi oz. v prvi fazi oblikovanja semen. Vzroki so lahko v slabi oprasitvi oz. oploditvi, večji problem je verjetno v nepravilnem oblikovanju zasnove

semen in dotoku asimilatov v formirajoča semena, saj veliko teh nežnih form propade, ne da bi opazili. Proučevani vzorci se glede števila cvetov bistveno niso razlikovali, razen vzorcev z oznako 113, 134 in 135, ki so izstopali v povprečju s 24,8 cvetovi v grozdu s pripadajočim pakobulom. Ajde z rjavimi semeni (plodovi - oreški) so imele nekoliko večje že zasnove - luske semen, kar se pri pravilnem dotoku asimilatov pozna tudi na končni teži semen. Pri teh je verjetno dotok in napolnjevanje semen z asimilati boljše in intenzivnejše (preglednica 1). Kljub temu, da vzorci z rjavimi semeni za polno seme potrebujejo več asimilatov, pa ti vzorci niso oblikovali več praznih semen, glede na sive populacije. V odstotku praznih semen med skupinami sivih in rjavih vzorcev ni bilo bistvenih razlik. Izoblikovale so se tri skupine. Največ 29,4 % praznih semen v grozdu s

pripadajočim pakobulom je bilo pri vzorcu z oznako 134 in v isti skupini s 27,2 % praznih semen je bil vzorec 152, oba iz skupine s sivimi semeni. Vse ostale vrednosti se prekrivajo, oz. med njimi ni značilnih razlik, razen vzorca z oznako 113 iz skupine temnih - rjavih semen, ki je imel najmanj 15,9 % praznih semen. Teža semen na rastlino je bila večja pri vzorcih z rjavimi semeni, nihala je od 0,5–0,9 g, medtem ko so imeli vzorci s sivimi semeni manjšo povprečno težo, od 0,1–0,6 g na rastlino. Sorta Darja je imela največjo povprečno težo semen 1,6 g na rastlino. Štirje od 5 vzorcev z rjavimi semeni so imeli težo 1000 semen večjo od 22,6 g, medtem ko je imel samo 1 vzorec iz skupine s sivimi semeni 22,3 g, ostali 4 so imeli manjšo težo. Napolnjena rjava semena so bila tudi večja kot siva. Trije vzorci z oznako 135, 151, 157 in Darja so imeli najširša in najdaljša, trikotna semena. Pri vzorcih 113, 135 in 150 so se pojavljala trikotna in jajčasta semena. Vzorci s sivimi semeni so imeli nekoliko krajša semena, 3 vzorci od 5 so imeli najkrajša in najožja in prevladovala je jajčasta oblika. Pri vzorcih 114 in 149 pa sta se pojavljali jajčasti in stožčasti obliki. Nasplošno imajo vzorci s sivimi semeni krajša in ožja, stožčasta oz.

ovalna semena, vzorci z rjavimi semeni pa imajo daljša in širša, trikotna semena.

Sorta Darja, ki je bila vključena v opise kot kontrola, se je v nekaterih lastnostih, in to predvsem v tistih, ki vplivajo na velikost pridelka, bistveno razlikovala od testiranih populacij. Žlahtniteljsko delo pri Darji se, razen drugih izboljšanih lastnosti, odraža predvsem na teži semen, ki je bila statistično značilno večja (27,2 g teža 1000 semen) od teže semen ostalih vzorcev. Prav tako je bila teža semen pridelana na rastlino 1,6 g značilno večja od ostalih vzorcev. Po številu cvetov je bila v skupini z najbujnejšim cvetenjem, napolnila je 10,4 % semen, praznih semen je bilo 23,5 %, kar jo je uvrstilo v srednji razred. Kljub tem pomanjkljivostim, ki v času žlahtnjenja niso bile odpravljene, je pridelek stabilnejši in zadovoljivejši kot pri vzorcih. V povprečju doseže 0,8 t/ha, v ugodnih rastnih razmerah tudi 1,0 do 1,2 t/ha. Opisovanje vzorcev iz genske banke je pomembno, saj samo na tak način dobimo temeljite informacije, kaj se hrani in katere vzorci oz. njihove lastnosti so zanimive za žlahtnjenje boljših genotipov – sort.

6 RAZNOLIKOST HRANJENEGA MATERIALA IN UPORABNOST

Zbrani material lahko razdelimo v dve skupini: navadna ajda (*Fagopyrum esculentum* Monch) in tatarska ajda (*Fagopyrum tataricum* Gerth.). Navadna ajda je tujeprašna (žužkocvetka) heterostilna rastlina z dvema oblikama cvetov pin (*ss*) in thrum (*Ss*). Cvetovi se navzkrižno oprašujejo. Tatarska ajda je samoprašna rastlina.

Velika večina vzorcev navadne ajde je diploidnih (2n), nekaj jih je tetraploidnih (4n). Populacije tetraploidnih se ločijo od diploidnih po tem, da imajo večje liste z valovitim listnim robom, nekoliko večje cvetove z večjimi zaobljenimi cvetnimi listi in večja temna semena. Ena populacija ima siva semena.

Zbrane diploidne vzorce bi lahko glede na dosedanje opise v grobem razdelili v dve skupini. Vzorce s sivimi semeni, ki imajo drobna siva semena, od svetlo- do temno sivih, pri katerih so pogoste temnejše priže in beli cvetovi, le pri nekaterih populacijah se pojavljajo posamične rastline z rahlo roza cvetovi. Pri nekaterih rastlinah znotraj teh populacij se pojavlja recesivni gen *d* za determinantno obliko rasti. Prilagojene so nižinskim in gričevnatim talnim in podnebnim razmeram Dolenjske in okolice, Primorske ter legam brez pogostih zgodnjih jesenskih slan in megla. V drugi skupini so populacije z nekoliko debelejšimi temnimi semeni od

svetlo - do temno rjavih, pogosto so v osnovni barvi semen prisotne temne priže, osnovna barva cvetov je svetlo do temno roza, lahko se pojavijo posamične rastline z rahlo rdečimi cvetovi. Primerne so za višinske, hribovite lege Gorenjske in Koroške s 7 do 10 dni krajšo rastno dobo. Konec septembra so primerne za žetev, saj jim v ugodnih klimatskih razmerah do takrat že odpade listje. Pri sivih populacijah pa listje odpade šele po prvih jesenskih slanih. Kombajniranje lahko olajšamo in pridobimo na čistosti pridelka, če takoj po slani, še preden sonce omehča rastline, kombajniramo zmrznjene rastline (Luthar, 1998).

Vzorci iz genske banke v preteklosti niso služili samo kot izhodiščni material za

žlahtnjenje (slovenske sorte ajde Siva, Darja, Rana 60 in Darina), ampak se je proučevala vitalnost semena, vsebnost polifenolov (tanina) v posameznih delih semen, genetska variabilnost in identifikacija vzorcev na nivoju DNA ter regeneracijska sposobnost v *in vitro* razmerah.

6.1 Vsebnost in razporeditev tanina ter vitalnost semen

Vsebnost tanina v semenih naključno izbranih vzorcev ajde iz genske banke je bila od 0,5 do 4,5 %. Pri tetraploidnih vzorcih so bile dobljene manjše vrednosti (preglednica 2).

Preglednica 2: Vsebnost tanina v semenih ajde hranjenih v genski banki

Ajda	% tanina			Št. vzorcev
	minimalna vrednost	maksimalna vrednost	povprečje	
Diploidna 2n = 16	0,50	4,50	2,46	63
Tetraploidna 4n = 32	1,06	3,18	2,08	4
Tatarska 2n = 16	0,71	3,12	1,86	12

To je lahko posledica manjšega števila analiziranih vzorcev, s katero nismo zajeli celotne variabilnosti, na razpolago smo imeli samo 4 vzorce. Tetraploidne populacije oz. sorte so redke in manj razširjene kot diploidne.

Pri tatarski ajdi so bile določene manjše vsebnosti tanina, kot pri navadni ajdi.

Ugotovili smo tudi, da so imeli starejši vzorci stari 10 in več let, manj tanina kot novo razmnoženi. Isti vzorci razmnoženi na različnih lokacijah so vsebovali različno količino tanina. Sinteza in nalaganje tanina kot sekundarnega metabolita, je močno odvisno od okolja, predvsem od temperature.

Preglednica 3: Odstotek tanina v suhi masi luske in teste pri 4 vzorcih ajde hranjenih v genski banki

Ajda	% tanina v	
	luski	testi
Siva 2n	2,82	8,35
Darja 2n	2,94	9,06
Petra 4n	2,35	7,06
Bednja 4n	2,93	6,35

V katerih delih semena (plod - orešek) se nalaga tanin, smo proučevali pri dveh diploidnih sortah Siva in Darja ter pri tetraploidnem vzorcu Petra in sorti Bednja 4n. Ugotovljeno je bilo, da se tanin nahaja samo v plodni ovojnici - luski in semenski ovojnici - testi. V luski je od 2,35 do 2,94 % tanina, v testi pa od 6,35 do 9,06 % (preglednica 3). Največ ga je v testi in to od 68,35 do 75,50 % vsega tanina v semenu ajde. Delež teste, glede na celotno seme, je najmanjši in znaša 3,44 do 3,67 % odvisno od vzorca. V luski je od 24,50 do 31,65 % vsega tanina. Delež luske je od 21,67 do 25,19 %. Osrednji deli semena: endosperm in kalček s kotiledoni ne vsebujejo tanin.

S kalilnimi poskusi smo ugotovili, da ajda pri trenutnih razmerah hranjenja, približno 6–8 % vlagi v semenih in pri 4 °C, relativno dolgo ohrani visok odstotek kalivosti. To lahko pripišemo tudi taninu in njegovim lastnostim. To, da je sestavina zunanjih delov semena (luska v povprečju vsebuje 27,1 % tanina in testa 72,9 %), je zelo pozitivno, glede na njegovo antioksidativno dejavnost, saj preprečuje vstop kisiku v osrednje dele semena. Kot naravni konzervans ima tako pomembno vlogo pri procesih staranja, obstojnosti in kvarjenja semena. Pri starejših vzorcih, starih 10 in več let, smo ugotovili visok odstotek kalivih semen in manjše vsebnosti tanina kot v novo razmnoženih vzorcih. To je verjetno posledica tega, da oksidirane tanina, ki nima več pravih lastnosti tanina, je pa prisoten, ne moremo dokazati z metodami za kvantitativno določanje (Luthar, 1992). Vsebnost tanina v zunanjih delih semen je verjetno eden od razlogov za dobro ohranjanje kalivosti.

6.2 Genetska variabilnost beljakovin – globulinov

Populacije s sivimi in rjavimi semeni so bile vključene v križanja z namenom ugotoviti genetsko variabilnost globulinov. Med njimi je bilo 22 heterozigotnih in 6 homozigotnih staršev. Na podlagi SDS-PAGE elektroforetske analize vključenih staršev v križanja in njihovih potomcev je bil določen beljakovinski multipli *Glob-1* lokus z 12 aleli, ki se kodominantno izražajo oz. dedujejo (Luthar in sod., 2008).

6.3 Regeneracijska sposobnost v *in vitro* razmerah

Regeneracija poganjkov iz kotiledonskih izsečkov ajde je bila testirana pri 33 diploidnih in 4 tetraploidnih vzorcih. Po 60 dneh inokulacije na gojišče je samo 4 % vzorcev formiralo poganjke. Frekvenca regeneracije je bila zelo majhna in ni presegla 5 %, pogosto se je gibala od 1 do 2 %. Kljub temu smo ugotovili, da sta vitalnost inokuliranih kotiledonskih izsečkov in regeneracija poganjkov močno odvisni od vzorca in njegove vitalnosti, ki smo jo našli med in znotraj populacij ajde. Zato smo selekcionirali ajdo z namenom izboljšati regeneracijo v primerjavi z osnovnim vzorcem. Regenerante sorte Darina z izhodiščno 1,56 % regeneracijo smo aklimatizirali. Uspešno aklimatizirane rastline smo pustili v medsebojni opraitvi in pri testiranju regeneracije F1 semen ugotovili, da se je odstotek regeneracije bistveno dvignil. Nihal je v razponu od 5,2 do 24,4 %, odvisno od rastline (genotipa) s katere so bila pobrana semena (preglednica 4) (Luthar in Marchetti, 1994; Luthar, 1996).

Preglednica 4: Odstotek regeneracije iz kotiledonskih izsečkov po medsebojnem opraševanju regenerantov sorte Darina. Odstotki označeni z različnimi črkami se statistično značilno razlikujejo ($p = 0,05$), obdelano s *hi*-kvadrat testom.

Oznaka regeneranta	Št. semen uporabljenih za izsečke	% izsečkov s poganjki
1	18	24,4 a
2	10	23,9 a
3	17	22,7 a
4	13	13,6 b
5	11	13,6 b
6	10	12,5 b
7	8	11,9 bc
8	16	9,1 bc
9	18	8,5 bc
10	10	7,4 c
11	16	6,8 c
12	9	5,2 c

6.4 Genska erozija rjavih in sivih populacij ajde

Genska erozija rjavih ajd oz. populacij na območju Koroške in Gorenjske ter sivih ajd na območju Dolenjske in Primorske, kjer je bilo med leti 1978 do 1985 zbranih največ vzorcev ajde je bila potrjena z ogledi in poizvedbami na terenu v letih 1999 in 2000.

Rezultati študije na terenu na območju Koroške so pokazali, da redki kmetje še gojijo ajdo, ampak na zelo majhnih površinah. Večina kmetov oz. njihovih potomcev, ki so v preteklosti gojili ajdo, se več ne ukvarja s pridelovanjem ajde oz. so popolnoma opustili kmetovanje. Kljub temu je bil v letu 1999 najden vzorec originalne rjave ajde, na hribu blizu Holmca.

Rezultati obiskov na Gorenjskem so pokazali popolnoma različno situacijo glede na Koroško. Ajda raste na številnih poljih, predvsem v nižinah, kljub temu ni bila najdena tipična rjava populacija. Kmetje povečini pridelujejo nove sorte ali mešanice s starimi populacijami. Nekaj kmetov je povedalo, da so zmešali kupljene sorte z domačimi in potem čez nekaj let je ta isti kmet prodal drugemu za setev kot domačo. Če se pogovarjaš s slednjim je prepričan, da goji domačo ajdo. Po

pogovoru s prejšnjim, ki je ajdo prodal, pa se da razvozlati izvor in običajno se ugotovi, da gre v takih primerih za zmešano oz. skrižano seme. Takih primerov je trenutno največ na Gorenjskem.

V letu 2000 je bila narejena podobna študija genske erozije sivih populacij na območju Dolenjske in Primorske. Preliminarne ugotovitve so kazale na to, da številni vzorci, ki se hranijo v genski banki, niso več prisotni *in situ* na terenu, kjer so bili zbrani. V nekaterih zelo redkih primerih ajdo na isti lokaciji sicer še pridelujejo, predvsem na Vrhtrebnjem in okolici, vendar se je v preteklosti pri naključnih obiskih in pogovorih na terenu velikokrat pokazalo, da gre za pridelavo sodobnih požlahtnjenih domačih oz. tujih sort in ne več avtohtonih populacij. Pred 30 in več leti se je na teh območjih največ pridelovalo populacije s sivimi semeni in belimi do rahlo roza cvetovi, ki so bile nekoliko višje od populacij z rjavimi semeni, ki so se pridelovale na Koroškem in Gorenjskem.

Rezultati na terenu so pokazali, da na območju Primorske pridelujejo zelo malo ajde in da se ne prideluje ajda s starim poreklom, ampak se sive populacije pridelujejo šele približno 30 let. Prej so na območjih Primorske pridelovali

večinoma rjavo ajdo, ki pa je ni bilo več že v času zbiranja vzorcev za gensko banko. Zato so bile zbrane po Primorskem večinoma sive populacije. Kljub temu je bil najden vzorec, ki

ga ista kmetija prideluje že 40 let, po pripovedovanju pridelovalca tega vzorca, v tem obdobju niso menjali seme.

7 SKLEP

Na podlagi statističnih raziskav zmanjševanja pridelave ajde in po množičnem pojavljanju na slovenskih njivah požlahtnjenih domačih in tujih sort ter populacij predvsem po letu 1975 je bila odločitev, da se zbere obstoječe populacije, ki so se pridelovale po Sloveniji, pravilna. Namen tega dela je bil tudi prikazati pomembnost zbiranja in ohranjanja vzorcev v sklopu aktivnosti genskih bank. Ajda ni

samo v Sloveniji, ampak je bila tudi po mnenju IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute), sedaj Bioversity International uvrščena med najbolj ogrožene rastlinske vrste, za katere je IPGRI leta 1993 predlagal da se jo obravnava v skupini rastlin, ki imajo odločilno prednost pri zbiranju in hranjenju (IPGRI, Annual Report, 1993).

8 ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem sodelavcem prof. dr. Ivanu Kreftu, prof. dr. Branki Javornik in prof. dr. Borutu Bohancu, da so pravilno presodili in zbrali slovenske populacije ajde ter

Fitosanitarni upravi Ministrstva za kmetijstvo in okolje RS za večletno kontinuirano financiranje genske banke, ki je prispevalo k ohranitvi tega materiala.

9 LITERATURA

- Adhikari, K.N., Campbell, C.G. 1998. Natural outcrossing in common buckwheat. *Euphytica*, 102: 233-237
- Engels, J.M.M., Arora, R.K. 1994. Descriptors for buckwheat (*Fagopyrum* spp.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 48 s.
- International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Annual Report 1993, Rome: 47
- Luthar, Z. 1992. Tanin v semenih navadne in tatarske ajde (*Fagopyrum esculentum* Moench in *F. tataricum* Gaertn.). *Zb. Bioteh. fak. Univ. Ljublj., Kmet.*, 59: 55-62
- Luthar, Z., Marchetti, S. 1994. Plant regeneration from mature cotyledons in a buckwheat (*Fagopyrum*

esculentum Moench) germplasm collection. *Fagopyrum* (Ljublj.), 14: 65-69

Luthar, Z. 1996. Improvement of regeneration of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) cv. Darina. *Zb. Bioteh. fak. Univ. Ljublj., Kmet.*, 67: 79-84

Luthar, Z. (1998). Genska banka ajde. *Sodobno kmetijstvo* 31(2): 67-70

Luthar, Z., Rogl, S., Kump, B., Javornik, B. 2008. 38-48 kDa subunits of buckwheat 13S globulins are controlled by a single locus. *Plant breeding*, 127: 322-324

Statistični letopis RS, več letnikov