

Stvaranje homozigotnih linija kukuruza u roku od dve generacije

- Originalni naučni rad -

Dragana BRANKOVIĆ RADOJČIĆ, Jelena VANČETOVIĆ,
Dragana IGNJATOVIĆ-MIČIĆ i Ana NIKOLIĆ
Institut za kukuruz "Zemun Polje", Beograd-Zemun

Izvod: U radu je prikazana nova metoda dobijanja inbred linija kukuruza u roku od dve generacije putem stvaranja dihaploida. U ovu svrhu korišćen je induktor haploida, nemačka inbred linija RWS. Ova linija sadrži dva marker gena: R1-nj, koji ostavlja plavu boju na endospermu i klici, i pl-1, koji boji stablo u ljubičasto. RWS linija je u prvoj generaciji korišćena kao otac za ukrštanje sa pet genotipova dobijenih ukrštanjem elitnih inbred linija kukuruza (F1 generacija). Gamete tih genotipova ukrštene sa RWS linijom dale su izvestan broj zrna koja imaju plavo obojenje na endospermu, ali belu klicu, što je indikacija da je došlo do oplodnje endosperma ali ne i jajne ćelije. Ona je ostala haploidna, a samo je stimulisana na dalju deobu i formiranje haploidne klice. Ovako dobijena zrna su naklijana, a zatim tretirana kolhicinom i dobijene su dihaploidne biljke koje su posađene u polju. U radu je dat je procenat indukcije haploida za svako od pet potomstava i procenat dobijenih F1 biljaka. Za svaki od pet genotipova izračunat je procenat uspešnosti dobijanja dihaploida. Diskutovan je potencijalni značaj ove metode u selekciji kukuruza.

Ključne reči: Dihaploid, induktor haploida, kukuruz.

Uvod

Interesovanje za haploid/dihaploid (H/DH) tehniku veoma se povećalo poslednjih godina. Kod nekih vrsta, kao što su pšenica, ječam ili šećerna repa, H/DH tehnika bila je postepeno uvođena kao dopunski metod u praktičnoj selekciji. Uvođenje H/DH tehnike u oplemenjivanje kukuruza je stara ideja koja datira još s početka XX veka. Stadler i Randolph su prvi put opisali haploide kod kukuruza 1929 godine, cit. **Randolph**, 1932. Posle prvih izveštaja o spontanim pojavama H/DH biljaka kod kukuruza u frekvenciji od 0,1%, **Chase**, 1947, 1951, naučnici i oplemenjivači su se trudili da ovu tehniku približe praktičnom oplemenjivanju i

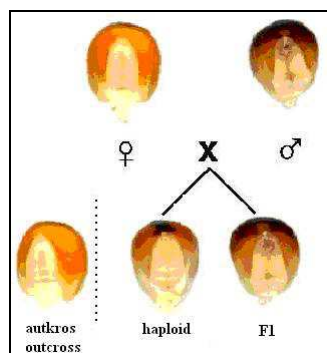
komercijalnoj upotrebi. **Coe**, 1959, je dobio 2,3% haploida kod kukuruza ukrštanjem sa linijom Stock 6 kao ocem, a desetak godina kasnije **Lashems** i **Beckert**, 1988, su stvorili liniju WS14, ukrštanjem linija W23ig i Stock 6, sa procentom indukcije haploida 3-5%. **Sarkar i sar.**, 1994, i **Shatskaya i sar.**, 1994, su dobili induktore sa procentom indukcije od oko 6% kod potomstva iz ukrštanja Stock 6 i indijske i ruske germ plazme. **Chalyk**, 1999, je dobio slične rezultate ukrstivši Stock 6 i moldavsku germplazmu. Ovako je tekao proces stvaranja induktora haploida sa sve većim procentom indukcije.

Cilj ovog istraživanja je bio dobijanje dihaploidnih inbred linija kukuruza u kratkom vremenskom periodu u odnosu na klasične metode selekcije i praćenje procenta indukcije haploida u našem klimatu.

Materijal i metode

Kao induktor haploida korišćena je nemačka linija RWS, poreklom iz ukrštanja WS14xKEMS. Ova linija sadrži dva marker gena: R1-nj koji ostavlja plavo obojenje na endospermu i klici i pl-1 koji boji stablo u ljubičasto. R1-nj gen se zahvaljujući ovoj osobini koristi za prepoznavanje dihaploidnih od haploidnih zrna kod majke. Ovaj gen izaziva ekspresiju antocijana na endospermu i embrionu, a haploidna zrna se razlikuju po tome što se antocijan javlja na endospermu, ali ne i na embrionu (Slika 1). To je indikacija da je došlo do oplodnje endosperma ali ne i jajne ćelije. Ona je ostala haploidna a samo je stimulisana na dalju deobu i formiranje haploidne klice. Dupliranjem broja hromozoma kod takvih zrna dobijaju se gotove inbred linije koje su 100% homozigotne.

Pet genotipova (1-5) nastalih ukrštanjem elitnih srodnih linija kukuruza Instituta za kukuruz "Zemun Polje" ukršteno je sa RWS linijom kao ocem 2006. godine. Dobijen je izvestan broj zrna sa gore navedenom ekspresijom gena. U proleće 2007. godine za duplikaciju broja hromozoma korišćena je metoda po **Deimlingu i sar.**, 1997. Zrna su naklijavana četiri dana na 26°C.



Slika 1. Ekspresija R1-nj gena na endospermu i embrionu
The expression of the R1-nj gene on the endosperm and embryo

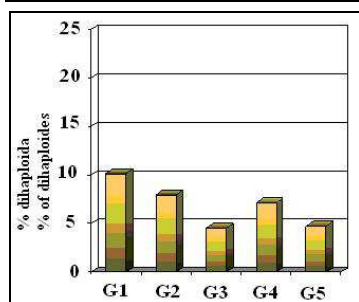
Klijancima je seckan koleoptil i glavni koren a zatim su potapani u 0,06% rastvor kolhicina u trajanju od 12h. Potom su klijanci posađeni u biorazgradive saksije i gajeni u staklari do pojave trećeg lista, posle čega su biljčice presađene u polje. Za razlikovanje pravih dihaploida od F1 biljaka u polju koristio nam je *pl-1* marker gen (Slika 2). Sve biljke koje su imale ljubičasto stablo bile su F1 i one su uklonjene iz polja.



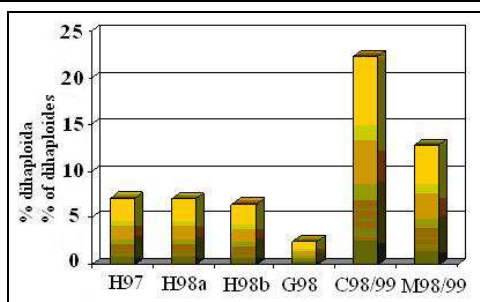
Slika 2. Ekspresija *pl-1* gena na stablu u polju
The expression of the pl-1 gene on the stalk in the field

Rezultati i diskusija

Dobijeni broj klipova iz genotipova ukrštenih sa RWS linijom kretao se od 23 do 35 (Tabela 1). Na klipovima je u laboratoriji prilikom odabira haploidnih zrna (vizuelnom metodom) praćen minimalan i maksimalan procenat indukovanih haploidnih zrna po klipju, i on se kretao od 0% u genotipovima 3 i 4 do čak 53,85% u genotipu 5. Situacija u polju je pokazala nešto drugačije rezultate. U polju se broj F1 biljaka, koje su promakle prilikom odabira zrna u laboratoriji, kretao od 0 % u genotipu 2 do 82,5% u genotipu 5 (Tabela 1). Ovako veliki procenat F1 biljaka u genotipu 5 može se objasniti lošom ekspresijom *R1-nj* gena na klici. Na Grafikonu 1 se vidi konačan procenat stvarnih dihaploida u polju, i on se kretao od 4,48% u genotipu 3 do 10,12% u genotipu 1. Ovaj procenat indukcije haploida je sasvim zadovoljavajući za RWS liniju u našem klimatu. Tvorci linije RWS, **Röber i sar.**,



Grafikon 1. Procenat dihaploida u Zemun Polju
Percentage of dihaploides at Zemun Polje



Grafikon 2. Procenat dihaploida u Nemačkoj, Čileu i Meksiku, Röber i sar., 2005
Percentage of dihaploides in Germany, Chile and Mexico, Röber et al., 2005

2005, su u Nemačkoj dobili procenat indukcije od 1,23% do 7,46% u 1997. i 1998. godini, a u Čileu i Meksiku u zimskoj generaciji 1998/99. taj procenat je iznio 22,32% i 12,84% (Grafikon 2).

Šema selekcije putem dobijanja haploida u što kraćem vremenskom periodu koju su dali Röber i sar., 2005, prilagođena našim uslovima:

- 1- Formiranje F1 generacije od odabranih inbred linija (Zemun Polje);
- 2 - Indukcija haploida *in vivo* (zimski generacija u Čileu); Max % indukcije po Röber i sar., 2005;
- 3 - Dupliranje broja hromozoma kod haploidnih klijanaca i uzgoj biljaka u polju - DH 0 generacija, i samooplodnja ovih DH biljaka (eventualno istovremeno ukrštanje sa tester majkom);
- 4 - Setva DH1 generacije klip na red i paralelna ukrštanja sa testerom i umnožavanje (ako je prethodne godine urađeno ukrštanje sa testerom, odmah se seju i test ogledi (TO) - cela šema traje dve godine);
- 5 - Setva TO i odabir eksperimentalnih hibrida - (šema traje tri godine).

Zaključak

Linija RWS je pogodan induktor haploida zbog visokog procenta indukcije kao i svojih relativno pouzdanih marker gena, R1-nj i pl-1, pomoću kojih se lako vizuelno razlikuju zrna sa haploidnim i F1 embrionom.

Trebalo bi koristiti najkraći i najjednostavniji metod za što brže dobijanje i testiranje DH linija, kako bi se uštedelo na vremenu u procesu oplemenjivanja, i dobile što bolje DH linije *per se*, sa uz to dobrom kombinacionom sposobnošću.

Još jedna od prednosti DH linija je to što su 100 % homozigotne, što olakšava njihovu identifikaciju, zaštitu autorskih prava, kao i semensku proizvodnju (lakše prepoznavanje atipičnih biljaka).

Literatura

- Chalyk, S.T.** (1999): Use of maternal haploids for improving maize inbred lines. *Maize Gen. Coop. Newsletter* 73: 54-56.
- Chase, S.S.** (1947): Techniques for isolating monoploid maize plants. *J. Bot.* 34: 582.
- Chase, S.S.** (1951): The monoploid method of developing inbred lines. Book of Proceeding of the 6th Annual Hybrid Corn Industry Research Conference. Chicago, Illinois, USA, pp.29-30.
- Coe, E.H.** (1959): A line of maize with high haploid frequency. *Am. Nat.* 93: 381-382.
- Deimling S., F. Röber und H.H. Geiger** (1997): Methodik und genetik der in-vivo haploideninduktion bei mais. *Vortr Pflanzenzuchtung* 38: 203-204.
- Lashermes, P. and M. Beckert** (1988): Genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays L.*) and selection of haploid inducing lines. *Theor. Appl. Genet.* 76 (3): 405-410.
- Randolph, L.F.** (1932): Some effects of high temperature on polyploidy and other variations in maize. *Genetics* 18: 222-229.
- Röber F.K., G.A. Gordillo and H.H. Geiger** (2005): *In vivo* haploid induction in maize performance of new inducer and significance of doubled haploid lines in hybrid breeding. *Maydica* 50: 275-283.
- Sarkar, K.R., A. Pandey, P. Gayen, J.K. Mandan, R. Kumar and J.K.S. Sachan** (1994): Stabilization of high haploid inducer lines. *Maize Gen. Coop. Newsletter* 68: 64-64.
- Shatskaya, O.A., E.R. Zabirowa, V.S. Scherbark and M.V. Chumak** (1994): Mass induction of maternal haploids in corn. *Maize Gen. Coop. Newsletter* 68: 51.

Primljeno: 13.11.2007.

Odobreno: 26.11.2007.

* *
*

The Development of Homozygous Maize Inbreds over Two Generations

- Original scientific paper -

Dragana BRANKOVIĆ RADOJČIĆ, Jelena VANČETOVIĆ,
Dragana IGNJATOVIĆ-MICIĆ and Ana NIKOLIĆ
Maize Research Institute, Zemun Polje, Belgrade-Zemun

Summary

A new method of deriving maize inbreds lines over two generations by the development of dihaploids was presented in this paper. A German inbred line RWS was used as a haploid inducer. This inbred encompasses two marker genes: **R1-nj**, which colours the endosperm and the germ blue, and **pl-1**, which colours stalk purple. The RWS inbreds was used as a male component in the first generation for crosses to five genotypes developed from crosses of elite maize inbred lines (F1 generation). Gametes of these genotypes crossed to the inbred RWS resulted in a certain number of kernels with the white germ and blue stains on the endosperm, pointing out that the endosperm was fertilised, but the ovum was not. It remained haploid, and it was only stimulated to a further division and a formation of a haploid germ. Such developed kernels were germinated, then treated with colchicine and derived plants were planted in the field. This paper presents the percentage of both, haploid induction for each of five progenies and derived F1 plants. The percentage of the haploid production efficiency was estimated for each of five genotypes. The potential importance of this model in maize breeding and selection was discussed.

Received: 13/11/2007

Accepted: 26/11/2007

Adresa autora:

Dragana BRANKOVIĆ RADOJČIĆ
Institut za kukuruz "Zemun Polje"
Slobodana Bajića 1
11185 Beograd-Zemun
Srbija
E-mail: dbrankovic@mrizp.co.yu