

## MEĐUZAVISNOST PLUS-HIBRID EFEKTA NA PRINOS ZRNA KUKURUZA I GENETIČKE DISTANCE ISPITIVANIH HIBRIDA

BOŽINOVIĆ SOFIJA, VANČETOVIĆ JELENA, RISTIĆ DANIJELA,  
IGNJATOVIĆ-MIČIĆ DRAGANA, NIKOLIĆ ANA<sup>1</sup>

*IZVOD: Kombinovani uticaj citoplazmatske muške sterilnosti i ksenija na svojstva hibrida kukuruza naziva se Plus-hibrid efekat. Seje se mešavina dva hibrida, od kojih je jedan sterilna majka, a drugi fertilni polinator. Cilj istraživanja je bio da se utvrdi da li se sa povećanjem genetičke distance hibrida povećava dobit od Plus-hibrid efekta na prinos zrna.*

*Za ispitivanje su odabrana dva ZP hibrida (ZP 1 i ZP 2), tj. njihove sterilne i fertile verzije, kao i pet hibrida oprašivača (ZP 1, ZP 2, ZP 3, ZP 4 i ZP 5).*

*Za utvrđivanje genetičke distance između hibrida korišćeni su SSR markeri. Izračunati su i koeficijenti genetičke distance po Dice-u i Jaccard-u. Najveća genetička distanca po Dice-u dobijena je između hibrida ZP 1 i ZP 5 (0.37), a najmanja između ZP 1 i ZP 4 (0.08). Vrednosti genetičke distance po Jaccard-u su u opsegu od 0.54 (ZP 1 i ZP 5) do 0.14 (ZP 1 i ZP 4). Klaster analiza je grupisala četiri hibrida ZP 1, ZP 4, ZP 3 i ZP 2 u jedan subklaster za koji je labavo vezan ZP 5.*

*Oba hibrida su u kombinaciji sa ZP 5, koji im je genetički najudaljeniji, dali najlošije rezultate. Može se zaključiti da Plus-hibrid efekat, ipak, zavisi od genotipa hibrida, a ne njihove genetičke distance.*

**Ključne reči:** kukuruz, genetička distanca, Plus-hibrid efekat

UVOD: Citoplazmatična muška sterilnost (cms) se kod kukuruza koristi radi smanjivanja troškova i povećanja efikasnosti semenske proizvodnje. Efekat muške sterilnosti na prinos zrna kukuruza dosta je istraživan još od samog početka korišćenja cms-a. Iako se u literaturi sreću različiti rezultati, većina istraživača je utvrdila pozitivan efekat

cms-a na prinos zrna hibrida kukuruza, posebno u nepovoljnim uslovima spoljne sredine (Rogers and Edwardson, 1952, Kalman et al., 1985.)

Ksenija predstavlja neposredan efekat stranooplodnje na osobine zrna majke u godini ukrštanja. Tsai and Tsai (1990), Weiland (1992) i Westgate et al. (1999) su utvrdili značajno povećanje mase zrna i prinosa

Originalni naučni rad (Original scientific paper)

<sup>1</sup> BOŽINOVIĆ SOFIJA, VANČETOVIĆ JELENA, RISTIĆ DANIJELA, IGNJATOVIĆ-MIČIĆ DRAGANA, NIKOLIĆ ANA. Institut za kukuruz „Zemun Polje“, Slobodana Bajića 1, Beograd-Zemun, Republika Srbija; e-mail: sbozinovic@mripz.co.rs

zrna kukuruza hibrida pod uticajem hibrida oprašivača.

Od kraja 20-og veka krenulo se sa novijim pristupom u gajenju hibrida kukuruza: mešanje sterilne verzije jednog rodnog hibrida i fertile verzije drugog hibrida, pri čemu dolazi do kombinovanog efekta cms-a i ksenija na prinos zrna sterilnog hibrida, a bez smanjenja kvaliteta istog (Weingartner et al., 2004, Vančetović et al., 2009). Ovakav sistem proizvodnje naziva se Plus hibrid sistem (Weingartner et al., 2002b).

Veća dobit od ksenija postiže se sa povećanjem genetičke distance ukrštanih materijala (Bulant and Gallas, 1998). Weingartner et al., (2002 a, b) su prilikom odabira početnog materijala vodili računa da hibridi polinatori budu genetički što udaljeniji od hibrida na kojima su ispitivali Plus-hibrid efekat. Cilj istraživanja bio je da na molekularnom nivou utvrdimo da li genetička distanca utiče na Plus-hibrid efekat na prinos zrna kukuruza. Hteli smo da utvrdimo koliko su oba ispitivana hibrida majke udaljeni od hibrida oprašivača. Analizirali smo SSR molekularne markere za utvrđivanje genetičke distance hibrida i ove rezultate, zajedno sa podacima o poreklu ispitivanih hibrida, uporedili sa dobijenim rezultatima ogleđa. Do sada nisu vršena ovakva istraživanja.

### Materijal i metode

Za ispitivanja su korišćena dva sterilna hibrida: ZP 1st i ZP 2st (S tip sterilnosti) i njihovi fertile analozi, a za oprašivače je izabrano pet fertile hibrida (imaju normalnu – N citoplazmu) – ZP 1, ZP 2, ZP 3, ZP 4 i ZP

5. Izabrani hibridi su ranostasni i pripadaju FAO grupi 300-400.

Eksperiment je izveden na lokaciji Zemun Polje 2009. godine po slučajnom blok (RCB) split-plot eksperimentalnom dizajnu u tri ponavljanja. Ispitivane majke su predstavljale glavne parcele (sterilne i fertile varijante hibrida ZP 1 i ZP 2), s tim što su se fertile majkama zakidale metlice i one su služile samo za izračunavanje efekta cms-a u ogledu. Podparcele su činili fertile hibridi oprašivači. Svaka podparcela sastojala se od 14 redova, dužine 18 m, sa rastojanjem između redova od 0,75 m. Gustina useva bila je 77220 biljaka/ha. U srednja dva reda podparcele, posejane određenim oprašivačem, posejana je majka udaljena 3,7m od gornje i donje strane parcele. Ogled je sejan mašinski, a bran ručno.

Plus-hibrid efekat je računat kao razlika između prosečne vrednosti osobine izogeno oprašenog fertile hibrida i neizogeno oprašenog sterilnog hibrida.

Za dobijene podatke urađena je ANOVA za slučajni blok (RCB) split-plot eksperimentalni dizajn u tri ponavljanja u programu MSTAT-C. Takođe, urađeni su t-testovi kako bi se utvrdila značajnost razlike između pojedinačnih genotipova za svaku od osobina.

Pet hibrida kukuruza (ZP 1, ZP 2, ZP 3, ZP 4 i ZP 5) je analizirano sa SSR markerima. DNK je izolovana po Mini CTAB metodi iz lista i amplifikovana sa 12 odabranih SSR markera PCR-om. Produkti amplifikacije su razdvojeni elektroforezom na 4% agaroznom gelu. Na osnovu prisustva/odsustva alela za parove svih 5

hibrida izračunati su koeficijenti sličnosti po Dice-u i Jaccard-u, a pomoću UPGMA metode je urađena klaster analiza primenom kompjuterskog programa NTSYSpc2.1.

### Rezultati i diskusija

Od 12 SSR prajmera 10 je upotrebljeno za statističku obradu podataka: 1109, 2235, 1492, 1507, 1282, 2047, 126, 087, 1782 i 1695. Broj identifikovanih alela sa različitim prajmerima iznosio je 29, a prosečan broj alela po lokusu je 2.9. Najmanji broj alela (jedan) je dao prajmer umc2047, a najveći brojalela (pet) su dali prajmeri umc1109 i bnlg2235.

*Tabela 1. Koeficijenti genetičke distance po Dice-u*

*Table 1. Coefficients of genetic distance according to Dice*

Koef.	ZP 1	ZP 2	ZP 3	ZP 4	ZP 5
ZP 1	1				
ZP 2	0,15	1			
ZP 3	0,13	0,18	1		
ZP 4	0,08	0,22	0,1	1	
ZP 5	0,37	0,32	0,36	0,36	1

*Tabela 2. Koeficijenti genetičke distance po Jaccard-u*

*Table 2. Coefficients of genetic distance according to Jaccard*

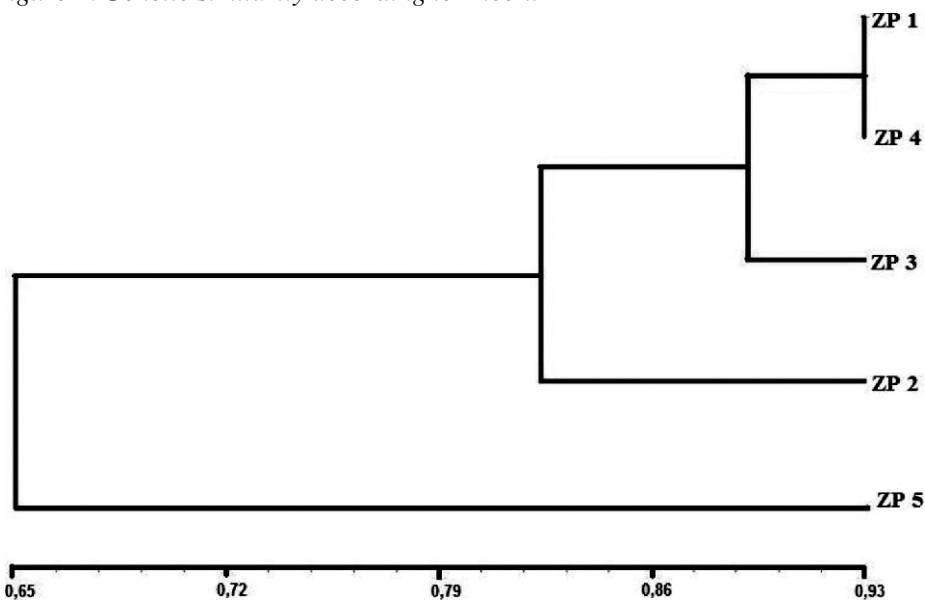
Koef.	ZP 1	ZP 2	ZP 3	ZP 4	ZP 5
ZP 1	1				
ZP 2	0,25	1			
ZP 3	0,22	0,30	1		
ZP 4	0,14	0,36	0,19	1	
ZP 5	0,54	0,48	0,52	0,52	1

Vrednosti genetičkih distanci po Dice-u su se kretale u opsegu od 0.08 (ZP 1 i ZP 4) do 0.37 (ZP 1 i ZP 5) (Tabela 1). Najveća genetička distanca po Jaccard-u se kretala od 0.14 (ZP1 i ZP 4) do 0.54 (ZP 1 i ZP 5) (Tabela 2). Na osnovu oba koeficijenta ZP 1 je genetički najrodniji sa ZP 4, a genetički najudaljeniji mu je ZP 5. Sa druge strane, drugi ispitivani hibrid, ZP 2, je genetički najbliži ZP 1 hibridu, a najudaljeniji mu je, takođe, ZP 5. Dakle, hibrid ZP 5 je genetički najudaljeniji od oba ispitivana hibrida.

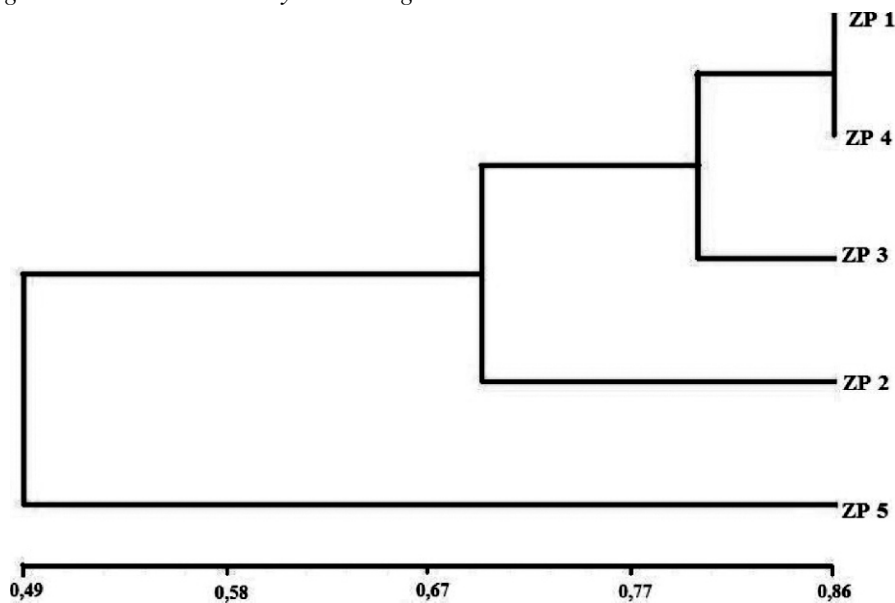
Na osnovu matrica genetičkih distanci po Dice-u i Jaccard-u primenom UPGMA klaster metode dobijeni su dendogrami. Dendogrami pokazuju identično grupisanje uzoraka, koje se slaže sa našim podacima o poreklu hibrida. Klaster analiza je je grupisala četiri hibrida ZP 1, ZP 4, ZP 3 i ZP 2 u jedan subklaster za koji je labavo vezan ZP 5 (Slika 1, 2).

Rezultati ogleđa bili su različiti za ispitivane hibride (Tabela 3). Svaka Plus-hibrid kombinacija ZP 1 bila je lošija od ZP 1 fertilnog. Najlošija kombinacija bila je ZP 1st ZP 5, upravo sa hibridom koji mu je genetički najudaljeniji, gde je došlo do smanjenja prinosa zrna za 12,6%, na nivou značajnosti 0,1. Nasuprot ZP 1, drugi ispitivani hibrid je u svakoj Plus-hibrid kombinaciji imao uvećanje prinosa zrna na nivou značajnosti ( $P=0,05$ ). Najbolje kombinacije su bile ZP 2st ZP 1i ZP 2st ZP 3, gde je došlo do uvećanja prinosa od 11,94, odnosno 11,51%, dok je ZP 2st ZP 5 imala povećanje prinosa od 5,27%, bez nivoa značajnosti.

Slika 1. Genetička sličnost po Dice-u  
 Figure 1. Genetic similarity according to Dice-u



Slika 2. Genetička sličnost po Jaccard-u  
 Figure 2. Genetic similarity according to Jaccard-u



Oba hibrida oprašena sa ZP 5 su imala najlošiji prinos u odnosu na druge kombinacije. To je hibrid koji im je genetički najudaljeniji. Takođe, primećuje se da je ZP 2 bio najbolji u kombinaciji sa hibridima koji su mu

genetički najrodniji, pa se ne može pouzdano tvrditi da genetička distanca između korišćenih hibrida utiče pozitivno na dobit od Plus-hibrid efekta, kao na ksenije (Bulant and Gallas, 1998). Dok su Weingartner et al. (2002) izabrali genetički nesrodne hibride oprašivače za Plus-hibrid smeše, genetička osnova hibrida koje smo koristili u našem eksperimentu je uska, pa verovatno distanca zbog toga nema presudnu ulogu u ispoljavanju ispitivanog efekta. Takođe, Weingartner et al. (2002) su u svojim ispitivanjima koristili hibride FAO grupe 100-200, koji imaju širu genetičku osnovu od FAO 300-400, pa je i to uticalo na neispoljavanje uticaja genetičke distance na Plus-hibrid efekat.

*Tabela 3. Plus-hibrid efekat na prinos zrna kukuruza dva ZP hibrida*  
*Table 3. Plus-Hybrid effect on grain yield of two ZP hybrids*

Hibrid	Polinator	t/ha (%) <sup>a</sup>
ZP 1st	ZP 2	-8,03ns
	ZP 3	-9,96†
	ZP 4	-9,76†
	ZP 5	-12,6†
ZP 2st	ZP 1	11,94*
	ZP 3	11,51*
	ZP 4	10,36ns
	ZP 5	5,27ns

<sup>a</sup>Vrednosti (%) ukazuju na promene u odnosu na fertilni hibrid izogeno oprašen/Values (%) on grain yield indicate changes relative to the male-fertile hybrid, isogenically pollinated.

†- značajno na nivou 0,1/significant at the 0,1 probability level, \* - značajno na nivou 0,05/significant at the 0,05 probability level, ns- bez značajnosti/not significant.

Ono što se primećuje je da na Plus-hibrid kombinacije presudno

utiču genotipovi korišćenih hibrida. Hibrid ZP 5 je nešto lošiji hibrid, pa je svojim genotipom uticao na ispitivane hibride, dok su ZP 1, ZP 2 i ZP 3 hibridi sa nešto višim potencijalom rodosti. Takođe se primećuje i jak materinski efekat: kombinacija ZP 2st ZP 1 je mnogo bolja od ZP 1st ZP 2.

### Zaključak

Istraživanja su pokazala da, pojedinačno, cms i ksenije pozitivno utiču na prinos zrna hibrida kukuruza. Plus-hibrid sistem predstavlja novi način gajenja hibrida kukuruza, gde se u smeši gaji sterilna verzija jednog i fertilna verzija drugog hibrida, uz iskorišćavanje pozitivnog efekta citoplazmatične muške sterilnosti i ksenija. Smatrali smo da bi bilo korisno znati da li postoji međuzavisnost između Plus-hibrid efekta i genetičke distance hibrida.

Naše istraživanje ukazuje na to da genetička distanca između korišćenih hibrida ne utiče na dobit od Plus-hibrid efekta na prinos zrna. Pokazalo se da da presudnu ulogu, kako se čini, imaju genotipovi korišćenih hibrida. U Plus-hibrid smeši je izražen i jak materinski efekat, tj. uticaj sterilne majke hibrida u smeši.

S obzirom na mali broj SSR prajmera koji smo analizirali, nastavimo sa daljnjom molekularnom analizom hibrida iz ogleada, kako bi dobili veći broj iskoristivih alela. Takođe, ogled će biti postavljen i 2010. godine i dobijene podatke iz obe godine (2009/2010) ćemo porediti sa rezultatima molekularne analize.

## LITERATURA

- BULANT, C. and A. GALLAIS (1998): Xenia effects in maize with normal endosperm: I. Importance and stability. *Crop Sci.* 38: 1517 - 1525.
- KALMAN, L., L. PINTER and Z. PINTER (1985): Comparative study on major agronomic characteristics of male fertile (normal) and cytoplasmic male sterile analogues in maize (*Zea Mays* L.). *Acta Agron. Acad. Sci. Hung.* 34: 128-134.
- ROGERS, J. S., EDWARDSON, J. R. (1952): The utilization of cytoplasmic male-sterile inbreds in the production of corn hybrids. *Agron. J.* 44, 8-13.
- TSAI, C. L. and C. Y. TSAI (1990): Endosperm modified by cross-pollinating maize to induce changes in dry matter and nitrogen accumulation. *Crop Sci.* 30, 804-808.
- VANČETOVIĆ, J., Lj. JANKULOŠKI, S. BOŽINOVIĆ and D. DODIG (2009): The effects of cytoplasmic male sterility and xenia on the chemical composition of maize grain. *Genetika* 41(1): 95-105.
- WEILAND, R. T. (1992): Cross-pollination effects on maize (*Zea Mays* L.) hybrid yields. *Can. J. Plant Sci.* 72, 27-33.
- WEINGARTNER, U., O. KAESER, M. LONG, and P. STAMP (2002a): Combining male sterility and xenia increases grain yield of maize hybrids. *Crop Sci.* 42, 127-134.
- WEINGARTNER, U., T.J. PREST, K.-H. CAMP and P. STAMP (2002b): The plus-hybrid system a method to increase grain yield by combined cytoplasmic male sterility and xenia. *Maydica* 47, 127-134.
- WEINGARTNER, U., K.-H. CAMP and P. STAMP (2004): Impact of male sterility and xenia on grain quality traits of maize. *Europ. J. Agronomy* 21: 239-247.
- WESTGATE, M.E., Z. WICKS and N. BARBOUR (1999): Selecting maize hybrids for increased yield in mixed stands. In: *Proceedings of the ASA-CSSA-SSSA Annual Meeting, Salt Lake City, Utah, 31 October – 4 November 1999, Div. C-4, pp.119.*

### THE INTERRELATION BETWEEN PLUS-HYBRID EFFECT ON GRAIN YIELD AND GENETIC DISTANCE OF STUDIED HYBRIDS

BOŽINOVIĆ SOFIJA, VANČETOVIĆ JELENA, RISTIĆ DANIJELA, IGNJATOVIĆ-MIČIĆ DRAGANA, NIKOLIĆ ANA

### SUMMARY

The combined effect of cytoplasmic male sterility and xenia is referred to as the Plus-Hybrid effect. A mixture of hybrids, in which one is a sterile female component and the other is a fertile pollinator, was sown. The objective of the present study was to determine whether the increase of a hybrid genetic distance would result in the increased gain from Plus-hybrid effects on grain yield.

Two ZP hybrids (ZP 1 and ZP 2), i.e. their sterile and fertile counterparts, as well as, five hybrid pollinators (ZP 1, ZP 2, ZP 3, ZP 4 and ZP 5) were selected for

the studies. The three-replicate trial was set up according to the randomised split-plot design at Zemun Polje in 2009.

SSR markers were used to determine the genetic distance between hybrids. Ten out of total 12 applied primers gave results. Coefficients of similarity were estimated according to Dice and Jaccard. The greatest (0.37), i.e. smallest genetic distance (0.08), according to Dice, was obtained between hybrids ZP 1 and ZP 5, i.e. ZP 1 and ZP 4, respectively. Values of genetic distance according to Jaccard were between 0.14 (ZP 1 and ZP 4) and 0.54 (ZP 1 i ZP 5 ). By using the cluster analysis, four hybrids (ZP 1, ZP 4, ZP 3 and ZP 2) were grouped into one sub-cluster that was loosely linked to ZP 5.

The Plus-hybrid effect on grain yield of the hybrid ZP 1 was negative. The greatest gain was detected in the ZP 2st ZP 1 combination, between two hybrids that were genetically very similar and belonged to the same sub-cluster, and then in ZP 2st ZP 3 and ZP 2st ZP 4 combinations, between hybrids that also belonged to the same sub-cluster. It can be concluded that the Plus-hybrid effect, after all, depends not on the hybrid genetic distance but on the hybrid genotype.

**Key words:** corn, genetic distance, Plus-Hybrid effect