

UTICAJ TEMPERATURE I DUŽINE ČUVANJA POLENA KUKURUZA NA PROCENAT OPLODNJE

Vojka Babić^{*1}, Natalija Kravić¹, Jelena Srdić¹

Izvod

U programima oplemenjivanja kukuruza, u slučaju kada se nekompatibilnost u vremenu cvetanja oca i majke ne može prevazići setvom roditelja u različitim rokovima ili sposobnošću svile da očuva plodnost 10-15 dana, čuvanje polena bi moglo da ima značaja. Cilj izloženih istraživanja je bio da se u poljskim uslovima ispita sposobnost polena linije kukuruza L217 da nakon čuvanja u uslovima +4 i -20°C, opraši drugu liniju kukuruza i da zrno. Majka je sejana u pet rokova setve, a polen oca je uziman dva puta, prosejavan i skladišten u frižider i zamrzivač zajedno sa silika gelom. Sukcesivno je oprašivano po pet klipova kukuruza. Izuzev očekivano dobro ozrjenih klipova oprašenih svežim polenom, procenat oplođenih zrna, nakon samo jednog dana čuvanja u frižideru, je iznosio 4,4%, da bi četvrtog i petog dana čuvanja opao na 0,2% i 0,4%, respektivno. Biljke oprašene polenom čuvanim 20 dana nisu dale nijedno zrno. Polen čuvan u zamrzivaču je izgubio životnu sposobnost nakon samo jednog dana čuvanja. Ovako loši rezultati mogu biti posledica specifičnosti linije oca (poznato je da polen nekih linija kukuruza zadržava vijabilnost veoma kratko), ali i posledica propusta u manipulaciji polenom. Sa ciljem da se isprave primećeni propusti planirano je ponavljanje eksperimenta.

Ključne reči: konzervacija polena, samooplodna linija, *in vivo* kultura, *Zea mays* L.

Uvod

U cilju proširivanja genetičke osnove radnih kolekcija, oplemenjivači često pokušavaju da ukrste genotipove različite dužine vegetacionog perioda. Kako bi ukrštanje bilo efikasno, potrebno je preduzeti mere koje dovode do istovremenog cvetanja željenih genotipova. U praksi oplemenjivanja kukuruza, to se postiže setvom u različitim rokovima. Međutim, često se dešava da vremenske setve ne daju očekivane rezultate usled različitih ekoloških uslova u kojima se

razvijaju klijanci različitih rokova setve ili zbog osetljivosti genotipova na fotoperiod. U takvim slučajevima, uzimanje polena i njegovo čuvanje u određenim uslovima do momenta kada je moguće oprašivanje majčinske komponente, može da pomogne da se prevaziđe postojeća barijera. Za mnoge biljne vrste su uspostavljene odgovarajuće metode za sakupljanje polena, desikaciju, testiranje životne sposobnosti i dugovečnosti, kao i različiti načini čuvanja polena. Za neke biljne vrste formirane su i banke polena koji se može

Originalni naučni rad (Original Scientific Paper)

¹Babić V, Kravić N, Srdić J, Institut za kukuruz „Zemun Polje“, Beograd – Zemun

*e-mail: vbabic@mrizp.rs

koristiti u istraživačkim programima (Shivanna, 2003). Ovakva vrsta čuvanja polena je posebno važna za voćarske vrste. Prenosjenje genetičkog materijala tranferom polena bezbedno je sa aspekta zaštite od virusa i bolesti. U okviru banaka biljnih gena, korišćenje polena je povezano sa brojnim poteškoćama, kao što su mala produkcija polena kod nekih vrsta, skupe tehnike i oprema za čuvanje polena, nedostatak standardnih protokola za različite bilje vrste, problem regeneracije i zamene starih uzoraka polena novim (Volk, 2011).

Sadržaj vlage u polenu, kao i dužina i temperatura tokom čuvanja, utiču na dužinu života polena (Buitink et al., 2000). Brzina starenja polena takođe veoma zavisi od temperature i relativne vlažnosti vazduha u momentu sakupljanja. Polen brže stari kada se oslobađa iz prašnika na temperaturi od 24°C i relativnoj vlažnosti vazduha od 75% (Van Bilsen et al., 1994). Pre stavljanja na čuvanje u uslovima niskih temperatura važan je proces desikacije. Za dugoročno čuvanje neophodno je sušenje do nivoa kada polen ne sadrži slobodnu vodu. U zavisnosti od biljne vrste, polen se može sušiti do sadržaja vode od 0,05g H₂O g⁻¹ suve materije (DW) bez gubitka vijabilnosti. Za kratkoročno čuvanje se koriste temperature u intervalu od +4 do -20°C, a za dugoročno temperatura na -80°C ili u tečnom azotu (Ganeshan et al., 2008). Pre testiranja vijabilnosti polena u rastvorima, neophodno je izvršiti rehidraciju polena (Parton et al., 2002).

Vijabilnost polena može biti merena procenom vitalnosti polena hemijskim reagensima kao što je bojenje tetrazolijumom (Atlagić et al., 2012), ocenom klijanja polena in vitro (Dafni and Firmage, 2000) ili procenom oplodnje i razvoja semena na biljci - in vivo kultura.

Dužina čuvanja polena zavisi od mnogih faktora koji su vezani za specifičnost vrste, kao i za proceduru manipulacije i čuvanja. Utvrđeno je da je polen kukuruza, čuvan u tečnom azotu, sačuvao svoju vijabilnost 120 dana (Barnabás and Kovacs, 1996). Niske temperature usporavaju pokretljivost molekula unutar citoplazme, što može biti kontrolni faktor dugovečnosti polena (Buitink et al., 2000). Starenje suvog polena je najverovatnije posledica oksidativnih procesa, pri čemu polen sa višim sadržajem nezasićenih masnih kiselina brže gubi životnu sposobnost (Hoekstra 2005).

Uprkos brojnim poteškoćama, dugoročno čuvanje polena, bilo neosetljivog ili osetljivog na sušenje, je moguće (Shivanna, 2003). Potrebna su detaljnija biofizička istraživanja kako bi se definisao optimalni sadržaj vlage i način sušenja. Da čuvanje polena može da bude od značaja za oplemenjivačke programe navode Almeida et al. (2011). Ispitujući različite metode čuvanja i manipulacije, isti autori su dobili najbolje vrednosti vijabilnosti polena kukuruza čuvanog do 30 dana, dehidracijom na silika gelu i pri čuvanju na temperaturi od +4°C.

Cilj ovog istraživanja je bio da se ispita uticaj različitih temperatura i dužine čuvanja polena očinske linije na procenat oplodnje majčinske komponente.

Materijal i metod

Za rad su odabrane dve inbred linije kukuruza (♀ L73b013; ♂ L217) iste dužine vegetacionog perioda. Setva je obavljena ručno u kućice 17.04. (10 kućica majke + 6 kućica oca). Majka je sejana u 5 rokova setve. Svaka naredna setva majke je vršena sukcesivno nakon nicanja preko 50% prethodne setve. Prve četiri kućice oca sejane su istovremeno sa prvom vremenskom setvom majke. Druge dve kućice oca su pratile drugu i treću vremensku

setvu majke. Ovakvim planom setve planirano je da se omogući što duži period postojanja sveže svile za testiranje, kao i obezbeđivanje dovoljne količine polena za čuvanje.

Prvi polen uzet je u fazi punog cvetanja oca iz prvog roka setve 07.07. između 9:00 i 9:30 časova. Polen je stresan sa dve metlice u jednu papirnu kesu i stavljan u ručni frižider u kojem je transportovan do laboratorije. Tu je prosejan kroz sito kako bi se odstranili ostaci antera i insekti. Prosejan polen je spakovan u po 2x25 papirnih kesica, nakon čega je složen u plastične kutije sa silika gelom, a zatim ostavljen je u frižider (+4°C) i zamrzivač (-20°C). Istoga dana kada je uziman polen, po pet biljaka majke je oprášeno svežim polenom. Po istoj proceduri sakupljen je polen i narednog dana 08.07. i po deset uzoraka je ostavljeno na čuvanje.

U narednih 5 dana vršeno je oprášivanje po 5 biljka sa polenom uzetim 07.07., koji je čuvan u frižideru i zamrzivaču, a 14.07. i 28.07. polenom sakupljenim 08.07. Oprášivanje je vršeno oko 9:00 časova.

Nakon berbe, na svakom od oprášenih klipova je utvrđen broj razvijenih zrna.

Dinamika oplodjenih i razvijenih zrna prikazana je grafički.

Rezultati i diskusija

Polovinom septembra oprášeni klipovi majke su obrani i izbrojan je broj razvijenih zrna. Generalno, broj razvijenih zrna je bio veoma mali za sve obrane klipove koji su sukcesivno oprášivani čuvanim polenom. Svaki klip bio je oprášen u momentu optimalno razvijene svile sa količinom polena dobijenom od dve metlice oca u punom prašenju. Tučkovi jednog klipa kukuruza se pojavljuju sukcesivno,

od donjeg dela klipa na gore. Generalno, od momenta pojavljivanja prvih niti svile izvan komušine klipa, potrebno je 2-3 dana da se svi tučkovi jednog klipa pojave i budu spremni za oplodnju. Na dnevnom nivou svila raste 2,5-3,8 cm sve dok ne bude oplodjena. Najbolja oplodnja se postiže na svili staroj 3-5 dana (Kaeser et al., 2003). Stoga je smatrano da je optimalni momenat za oprášivanje klipa kada je svila bila dugačka 8-10 cm. Očekivano, oprášivanje svežim polenom dalo je najbolje rezultate. Sa izuzetkom klipa 5, koji nije bio u potpunosti ozrnjen, ostali klipovi su bilo u potpunosti ispunjeni (302, 248, 238, 290 i 95 zrna za prvi, drugi, treći, četvrti i peti klip, respektivno). Loša ozrnjenost petog klipa je najverovatnije posledica tehničkog propusta prilikom oprášivanja. Narednog dana, 08.07., izvršeno je oprášivanje sledećih pet biljaka sa optimalno razvijenom svilom. Na klipovima oprášanim polenom koji je bio čuvan samo jedan dan razvilo se od 0 do 19 zrna, u proseku 10,4 zrna. Prosek dobijenih zrna klipova oprášenih 09.07. je iznosio 1,4 zrno po klipu, u rasponu od nule do maksimalno tri zrna na klipu. Već četvrtog dana čuvani polen u frižideru je dao samo jedno zrno na jednom klipu, a petog dana po jedno zrno na dva klipa. Četnaestog jula oprášeno je pet klipova polenom koji je uzet 08.07., znači nakon 6 dana čuvanja. Tada je dobijeno u proseku 1,8 zrna po klipu, odnosno od nule do šest zrna po klipu. Biljke oprášene polenom čuvanim 20 dana (od 08.07 do 28.07.) nisu dale nijedno zrno. Trend gubitka sposobnosti polena da da razvijeno zrno prikazan je na Grafikonu 1. Ozrnjenost klipova koji su oprášeni svežim polenom uzeta je kao 100%, a iznosila je u proseku 243,6 zrna po klipu.



Grafikon 1. Procenat oplođenih zrna na klipovima majke, oprašenih polenom čuvanim u frižideru
 Graph 1. Seed setings percentage, as a result of pollination with pollen stored in the refrigerator

Broj razvijenih zrna na klipovima oprašenim polenom iz zamrzivača je bio nula 08.07., 9.07., 11.07., 14.07. kao i 28.07. Samo se razvilo po jedno zrno na dva klipa oprašena 10.07. i jednom klipu 12.07. Polen kukuruza spada u grupu tzv *tri-cellular* polena čiji se metabolizam ne zaustavlja posle prašenja. Stoga on veoma brzo gubi klijavost u poljskim uslovima. Polen kukuruza na temperaturi 28-30°C i relativnoj vlažnosti vazduha od >53% gubi vitalnost za jedan do dva sata (Luna et al., 2001). Sa druge strane, svila kukuruza može da očuva sposobnost plodnosti 10 do 15 dana (Cerović et al., 2014). U slučajevima kada se vreme cvetanja ne poklapa duže od perioda koji se može prevazići setvom u različitim rokovima ili sposobnošću svile da očuva plodnost 10-15 dana, konzervacija polena bi mogla da ima značaja. Tokom oprašivanja korišćeni su klipovi koji su se razvili na biljkama sejanim u prva tri roka setve. Interesantno je da se biljke

četvrtog i petog roka setve, iako su nikle i imale dovoljno vlage u zemljištu, nisu dobro razvijale. Rast im je bio usporen i neujednačen, vreme cvetanja takođe neujednačeno, a kod nekih biljaka je i izostalo. Na kraju vegetacije, u uslovima slobodnje oplodnje, bio je veliki broj jalovih bljaka. Očigledno da je dužina dana imala uticaja na razvoj biljaka majke kasnijih rokova setve (Gouesnard et al., 2002).

Na osnovu nekih literaturnih navoda (Almeida et al., 2011), polen kukuruza je očuvao dobru vijabilnost i nakon 30 dana čuvanja, i to varijanta sušena na silika gelu i čuvana na temperaturi od +4°C stepena. Naši rezultati nisu u saglasnosti sa ovim navodima. Dobijeni rezultati su nas čak naveli i na sumnju da je zapravo došlo do potpunog izumiranja polena, a da je sporadična pojava po kojeg zrna zapravo posledica moguće stranooplodnje. Međutim, gotovo potpuni nedostatak zrna na klipovima oprašenim sa polenom koji je čuvan

u zamrzivaču je otklonio tu pretpostavku.

Jedan od važnih faktora tokom čuvanja polena je temperatura i način desikacije. Davide et al. (2009) su dobili nisku klijavost polena u kuturi nakon čuvanja na temperaturi od -10°C . Naši rezultati su takođe pokazali lošije preživljavanje polena čuvanog na nižoj temperaturi. Od izabrane dve temperature, čuvanje u frižideru je dalo bolje rezultate.

Veoma osetljiva tačka prilikom skladištenja polena, posebno kod vrsta čiji je polen osetljiv na dehidraciju, kakav je polen kukuruza, je sušenje polena pre skladištenja. Polen i antere se mogu sušiti i uz pomoć silika gela na sobnoj temperaturi (Martinez-Gómez et al., 2002). Polen se može sušiti i u sušnici, ali tada postoji velika opasnost od presušivanja koje dovodi do gubitka životne sposobnosti (Yates et al., 1991). Polen kukuruza se lako može čuvati ukoliko se brzo osuši do $0,19 \text{ g H}_2\text{Og}^{-1} \text{ DW}$. Dugovečnost čuvanja polena kod vrsta koje su osetljive na dehidraciju, i njegova tolerantnost na niske temperature, se mogu povećati upotrebom brzih metoda za dehidraciju. Kalkar and Neha (2012) su ispitivali različite tehnike čuvanja polena i najbolji rezultati, nakon 20 dana čuvanja, su postignuti čuvanjem na temperaturi od -80°C .

Faktor genotipa takođe može veoma uticati na dužinu preživljavanja polena. U sobnim uslovima polen sorte 5057 nije preživeo nakon 8 sati, dok je polen Exp24 i sorte *Tuxpeno sequia* klijao i do 24 sata. U istom eksperimentu utvrđena je velika interakcija genotip x vreme trajanja dehidracije/dužina čuvanja (Youmbi et al., 2005). Znači, da različiti genotipovi kukuruza različito reaguju na dužinu i temperaturu čuvanja, kao i na dužinu i načine dehidracije polena. Isti autori zaključuju da za kratkoročno čuvanje (do deset dana) sušenje polena nije potrebno. Za duže čuvanje (12 i više dana) preporučuju kratkotrajno sušenje

(5-6 sati) na 30°C . Polen čuvan na temperaturi od -20°C nije dao nikakve rezultate, što je u saglasnosti sa našim rezultatima. Youmbi et al. (2005) navode da rezultati klijanja polena u različitim medijumima u laboratorijskim uslovima nisu uvek u saglasnosti sa rezultatima iz polja. Poznato je iz prakse da čak ni oprašivanje svežim polenom ne daje uvek kompletnu ozrjenost klipa, jer oplodnja umnogome zavisi od uslova u momentu oprašivanja (Cerović et al., 2014). Moguće je i da je to jedan od razloga veoma loših rezultata našeg *in vivo* eksperimenta.

Zaključak

Efikasno čuvanje polena kukuruza u cilju prevazilaženja barijera prilikom ukrštanja materijala različitog vremena cvetanja bi moglo imati značaja u programima introgresije egzotičnog materijala u adaptiranu germplazmu. Dobijeni rezultati su daleko lošiji od rezultata koji su nađeni u literaturi. Postoji više razloga koji su mogli dovesti do ovakvih rezultata. Prvi mogući razlog je uticaj genotipa, odnosno sposobnosti polena očinske linije koja je odabrana za eksperiment da sačuva vijabilnost nakon oslobađanja iz antera. Takođe, veoma visoke temperature, čak i u jutarnjim časovima u momentu nanošenja čuvanog polena mogle su da doprinesu njegovoj abortivnosti. Dodatni razlog je nedovoljno precizna manipulacija nakon sakupljanja polena, odnosno verovatna manjkavost u procesu dehidracije. Izgubilo se dosta vremena oko prosejavanja polena i odstranjivanja antera i insekata, u sobnim uslovima. Primećeno je određeno zgrudnjavanje polena za to vreme. Dehidracija polena nije vršena u eksikatoru, već su papirne kesice sa prosejanim polenom stavljane između kesica sa silika gelom i onda sve zajedno u plastične kutije koje su odlagane u frižider/zamrzivač. Sa ciljem da se isprave primećene manjkavosti

u eksperimentu, ogled će biti ponovljen 2017. godine.

Zahvalnica

Prikazano izraživanje je deo rezultata Projekta TR 31068, Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Literatura

- Almeida C, Leite do Amaral A, Fernandes Barbosa Neto J, Cruz de Melo Sereno MJ (2011): Conservação e germinação *in vitro* de pólen de milho (*Zea mays* subsp. *mays*). Revista Brasil. Bot., Vol. 34 (4): 493-497.
- Atlagić J, Terzić S, Marjanović-Jeromela A (2012): Staining and fluorescent microscopy methods for pollen viability determination in sunflower and other plant species. Industrial Crops and Products, 35: 88-91.
- Barnabás B, Kovács G (1996): Storage of pollen. In: Shivanna KR, Sawhney VK, editors. Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement. Cambridge University Press, Cambridge, UK. pp. 293–314.
- Buitink J, Leprince O, Hemminga MA, Hoekstra FA (2000): The effects of moisture and temperature on the ageing kinetics of pollen: interpretation based on cytoplasmic mobility. Plant, Cell and Environment, 23: 967–974.
- Cerović R, Pajić Z, Filipović M, Fotirić-Akšić M, Radičević S, Nikolić D, Djordjević M (2014): Pollen germination and pollen tube growth in ZP maize lines. Genetika, 46 (3): 935-948.
- Dafni A, Firmage D (2000): Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. Plant Systematics and Evolution 222:113–132.
- Davide LMC, Pereira RC, Abreu GB, Souza JC, Pinho EVRV (2009): Viabilidade de pólen de milho em diferentes períodos de armazenamento em baixa temperatura. Revista Brasileira de Milho e Sorgo, 8:199-206.
- Ganeshan S, Rajasekharan PE, Shashikumar S, Decruze W (2008): Cryopreservation of pollen In: Reed BM, editor. Plant Cryopreservation: A Practical Guide. Springer, New York, pp. 443–464.
- Gouesnard, B., C. Rebourg, C. Welcker and A. Charcosset, 2002. Analysis of photoperiod sensitivity within a collection of tropical maize populations. Gen. Res. Crop Evol. 49: 471–481.
- Hoekstra FA (2005): Differential longevities in desiccated anhydrobiotic plant systems. Integrated and Comparative Biology, 45: 725–733.
- Kaesler O, Chowchong S, Stamp P (2003): Influence of silk age on grain yield and yield components of normal and male-sterile maize (*Zea mays* L.). Maydica, 48: 171-176.
- Kalkar SA and Neha K (2012): Evaluation of FDA Staining Technique in Stored Maize Pollen. Middle-East Journal of Scientific Research, 12 (4): 560-562.
- Luna, SY, Figueroa JM, Baltazar BM, Gomez RL, Townsend R, Schoper JB (2001): Maize pollen longevity and distance isolation requirements for effective pollen control. Crop Science, 41: 1551-1557.
- Martínez-Gómez P, Gradiel TM, Ortega E, Dicenta F (2002): Low temperature storage of almond pollen. Horticultural Science, 37: 691–692.
- Panella L, Wheeler L, McClintock ME (2009):

- Long-term survival of cryopreserved sugarbeet pollen. *Journal of Sugar Beet Research*, 46: 1–9.
- Parton E, Vervaeke I, Delen R, Vandenbussche B, Deroose R, De Proft M (2002): Viability and storage of bromeliad pollen. *Euphytica*, 125:155–161.
- Shivanna KR (2003): *Pollen Biology and Biotechnology*. Science Publishers, Enfield, New Hampshire. pp. 204–210.
- Van Bilsen DGJL, Hoekstra FA, Crowe LM, Crowe JH (1994): Altered phase behavior in membranes of aging dry pollen may cause imbibitional leakage. *Plant Physiology*, 104:1193–1199.
- Volk GM (2011): Collecting pollen for genetic resources Conservation *in* Collecting plant genetic Diversity: Technical guidelines: 1-10
- Yates IE, Sparks D, Connor K, Towill L (1991): Reducing pollen moisture simplifies long-term storage of pecan pollen. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116: 430–434.
- Youmbi E, The C, Tedjacno A (2005): Conservation of the germination capacity of pollen grains in three varieties of maize (*Zea mays* L.). *Grana*, 44: 152-159.

EFFECT OF TEMPERATURE AND DURATION OF MAIZE POLLEN STORAGE ON THE SEED SET RATE

Vojka Babić, Natalija Kravić, Jelena Srdić

Summary

In plant breeding programs, it is often necessary to cross genotypes incompatible in time of flowering. In maize, when the incompatibility in flowering period could not be overcome by different sowing dates, or by the ability of silk to preserve its fertility in 10-15 days, conservation of pollen could be of great importance. For many plant species, the appropriate methods for pollen management have been set up, including methods of collecting, desiccation, testing of viability and longevity, as well as for pollen storage. The longevity of pollen during its storage depends upon plant species, conditions at the time of pollen collecting, pollen moisture content, as well as upon storage temperature and duration. Even within the same plant species, different genotypes exhibit different level of viability preservation during the conservation. Although maize pollen belongs to a tricellular pollen group and rapidly loses viability under field conditions, its preservation is possible. According to the literature, pollen viability could be preserved for 30 days in the conditions of refrigerator (+4°C), while in liquid nitrogen (-196°C) up to 120 days. In the majority of studies, pollen viability was evaluated in the laboratory conditions, and the results obtained could largely be differed from those obtained under field conditions, due to impossibility to control a number of environmental factors. This experiment was conducted under field conditions in order to evaluate the ability of pollen from commercial maize inbred line L217, stored under the conditions of +4°C and -20°C, to pollinate maize inbred L73B013 and produce grain. Inbred L73B013 is sown in five sowing dates in order to ensure the longer presence of fresh silk. Pollen samples from line L217 were taken twice, and along with silica gel, stored in refrigerator and freezer. Each of successive pollination included five silks. Except for the expected good ear seed set when silks were pollinated with fresh pollen, the next successive pollination resulted in extremely poor ear seed set. Pollen stored in the freezer for one day completely lost vitality, while the pollination with pollen stored for three days resulted in one kernel per ear (for two ears). Pollination with pollen stored for four days resulted in one kernel per ear for only one ear. Pollen stored at + 4°C gave slightly better, but still very poor results. Compared to control, the percentage of seed set for pollen stored only for one day was 4.4%, being decreased to 0.2% and 0.4% for pollen stored for four and five days, respectively. Plants pollinated with pollen stored for 20 days did not give any grain. Such poor results may be a consequence of *species specific* properties of inbred L217, but also a consequence of failure in the manipulation of pollen. A highly sensitive point during the storage of pollen, especially in species with pollen sensitive to dehydration, such as the maize pollen, is the process of drying before its storing. Therefore, we concluded that the procedure of pollen desiccation probably was not adequate. With the aim of correcting the deficiencies observed, the experiment will be repeated in 2017.

Key words: pollen conservation, inbred line, *in vivo* culture, *Zea mays* L.

Primljen: 22.04.2017.
Prihvaćen: 03.05.2017.