

UDK

## MOLDOVANSKA LINIJA MHI IZVOR ZA DOBIJANJE VELIKOG BROJA HAPLOIDNIH BILJAKA KUKURUZA

VANČETOVIC J., M. VIDA KOVIĆ, D. IGNJATOVIĆ-MICIĆ, K. MARKOVIĆ I N. DELIĆ<sup>1</sup>

*IZVOD: Testirana je mogućnost skraćivanja procesa selekcije, tj. dobijanja i testiranja novih inbred linija kod kukuruza na 2-3 godine, zavisno od korišćenja zimske generacije, uz pomoć linije MHI (Moldovan Haploid Inducer) kao inducera haploida kod F1 generacija dobijenih ukrštanjem elitnih inbred linija namenjenih za selekciju. Dobijeni broj haploidnih biljaka je sasvim dovoljan za selekciju (obuhvatanje genetičke varijabilnosti datih elitnih ukrštanja), ako se za početno ukrštanje sa MHI koristi po 15 biljaka F1 generacije. Kod manjeg broja haploidnih biljaka dupliran je broj bromozoma primenom kolbicina, i dobijene su normalno dibaploidne biljke, čija je samooplodnja i testiranje sa opozitnim testerima 100% uspelo. Ovo navodi na zaključak da bi se proces selekcije mogao skratiti na 3 faze:*

1. *F1 x MHI za proizvodnju i selekciju haploida (ovo se može uraditi i u zimskoj generaciji)*
2. *Dupliranje broja bromozoma kod haploida i setva ovih biljaka u polju pored odgovarajućih opozitnih testera. Samooplodnja ovih biljaka i njihovo istovremeno ukrštanje (kao očeva) sa testerima.*
3. *Setva samooplođenih potomstava klip na red radi fenotipske selekcije dibaploidnih linija, i setva test-ukrštanja u test-ogledima radi provere njihove kombinacione sposobnosti. Samo dibaploidne linije dobre per se i u test-ogledima mogu se dalje komercijalno koristiti.*

**Ključne reči:** kukuruz, MHI, indukcija haploida, duplikacija broja bromozoma

UVOD: Skraćenje procesa selekcije kod bilo koje biljne vrste, pa i kukuruza, predstavlja važan ekonomski momenat i omogućava brže dobijanje novih, poboljšanih hibrida, tj. sorti. Ova mogućnost kod kukuruza pojavila se otkrićem tzv. Stock 6 (Coe, 1959), čijim se ukrštanjem (kao oca) javlja izvestan broj haploidnih zrna kod korišćene majke (3,2%). Lashermes and Beckert (1988) su otkrili da je ova osobina kontrolisana veoma malim brojem gena. *R1-nj* gen se koristi za prepoznavanje diploidnih od haploidnih zrna kod majke. Naime, ovaj gen izaziva ekspresiju antocijana na endospermu i embrionu. Haploidna zrna se razlikuju po tome što se antocijan javlja na endospermu, ali ne i na embrionu. Dupliranjem broja hromozoma kod ovako dobijenih haploidnih biljaka dobijaju se tzv. dihaploidi (DH biljke),

odnosno gotove nove inbred linije u jednoj generaciji.

Selekcijom iz Stock-a 6 dobijene su dve moldovanske linije, ZMS i KMS, sa većim kapacitetom indukcije haploida od originalnog Stock-a. Ove linije poseduju seriju marker gena: *A1, C1, R1-nj, al, B1, P11*, koji omogućuju dobijanje i sigurno prepoznavanje velikog broja haploida (Tyrnov and Zavalishina, 1984). Selekcijom iz ove dve linije dobijena je MHI linija (Moldovan Haploid Inducer), čiji je kapacitet proizvodnje haploida u proseku 6,5%.

Osim za skraćenje selekcionog procesa ove linije su kod kukuruza veoma uspešno korišćene i u tzv. haploidnoj rekurentnoj selekciji (Eder and Chalyk, 2002), za popravku osobina sintetičkih populacija *per se*. Ovo pre svega jer se recesivne štetne mutacije

Originalni naučni rad (Original scientific paper)

<sup>1</sup>JELENA VANČETOVIC, istraživač saradnik, VIDA KOVIĆ, M., istraživač saradnik, IGNJATOVIĆ-MICIĆ, K. istraživač saradnik, MARKOVIĆ, I., istraživač saradnik, DELIĆ, N., istraživač saradnik, Institut za kukuruz "Zemun Polje"

odmah otkrivaju kod haploidnih biljaka, dok to kod diploida nije slučaj.

#### Materijal i metode rada

Pet F1 generacija iz komercijalnog programa Instituta za kukuruz "Zemun Polje", namenjenih samooplodnji za dobijanje novih komercijalnih linija, poslato je 2001. godine u Moldaviju, radi indukcije haploidnih biljaka pomoću moldovanske linije MHI. Ovih pet F1 generacija propada FAO grupi zrenja 300-400, radi uklapanja vegetacije sa linijom MHI. Po genetičkoj konstituciji one su:

F1-1: Lancaster x Ohio

F1-2: BSSS x Iowa dent

F1-3: BSSS x linija iz Pioneer-ovog hibrida Valeria

F1-4: BSSS x Iowa dent x linija iz Pioneer-ovog hibrida Valeria

F1-5: F-7R germplazma x Lancaster

Po 15 biljaka od ovih F1 generacija upotrebljene su kao majke za ukrštanje se linijom MHI kao ocem. U Moldaviji je izvršena selekcija haploidnih zrna dobijenih ovim ukrštanjem (pojava markera na endospermu, ali ne i na klici), i u Zemun Polje poslat je sledeći broj potencijalno haploidnih zrna po F1 generacijama: F1-1: 482, F1-2: 521, F1-3: 509, F1-4: 517 i F1-5: 474. Pošto gamete F1 generacije već predstavljaju potencijalne biljke F2 generacije, smatrali smo da bi duplikacijom hromozoma ovih haploidnih biljaka dobili homozigotne inbred linije u jednoj generaciji. Zato smo od svake grupe F1 haploidnih zrna uzeli po 40 za duplikaciju broja hromozoma kolhicinom. Za duplikaciju broja hromozoma masovno su do sada korišćena dva metoda (Zabirova et al., 1996. i Deimling et al., 1997). Metod Deimling-a et al. pokazao se uspešnijim (Eder and Chalyk, 2002), pa je on i korišćen u našem istraživanju.

Ostatak haploidnih zrna sejan je u polju radi njihovog fenotipskog zapažanja, kao i zapažanja eventualne spontane pojave polena na njima i fertilitnosti takvog polena. Zbog jako nepovoljnih uslova u vreme setve u 2002. godini (jaka suša) veoma mali broj ovako dupliranih haploida je preživeo u polju do vremena polinacije. Uporedo sa ovim biljkama sejani su i opozitni tester i za ukrštanje eventualno fertilitnih haploidnih biljaka, kao i biljaka čiji je broj hromozoma dupliran primenom kolhicina. Ovime bismo proverili tezu o mogućnosti završetka ciklusa selekcije

za 2-3 godine (zavisno koristi li se zimsko generacija u prvoj fazi indukcije haploida ili ne) znači istovremena samooplodnja dobijenih inbred linija i njihovo istovremeno testiranje, od čega će seme sledeće godine ići u test-ogled za proveru kombinacionih sposobnosti, a seme iz samooplodnje (klip na red) radi fenotipske selekcije ovako dobijenih inbred linija.

#### Rezultati i diskusija

Dobijeni broj haploidnih biljaka na polju iz svake testirane F1 generacije bio je statistički dovoljan za uspešnu selekciju, (Tab. 1; Jansen, 1992). Naime, Nei (1963) je pokazao da se poželjne rekombinacije gena kod haploida mogu naći u mnogo manjem uzorku nego što je to slučaj kod diploidnih biljaka, zahvaljujući drugačijem odnosu segregacije kod haploida.

Veliki broj autkroseva kod F1-4 i F1-5 ukazuje na nešto smanjenu efikasnost selekcije haploida kod ove dve F1 generacije. Naime, ovi materijali su tvrdunci, kod kojih postoje dominantni geni *C1-I*, *C2-Idf* i *In1-D* koji inhibiraju sintezu antocijana marker gena za selekciju haploida (Coe, 1994). Ovo je u suprotnosti sa rezultatima do kojih su došli Eder and Chalyk (2002), koji su našli čak veći procenat ekspresije marker gena kod tvrdunaca nego kod zubana.

Procenti haploidnih biljaka koje su pokazivale vidljive količine polena date su u Tabeli 1. Kod ovih biljaka rađena je samooplodnja radi utvrđivanja fertilitnosti ovog polena. Pošto ni jedna samooplodnja nije uspela, zaključak je da ovi haploidi nisu proizveli funkcionalan polen. Ovo je u saglasnosti sa rezultatima Chalyk-a (1994).

Za razliku od pomenutog autora, koji je pronašao izvestan procenat spontane diploidizacije u svom materijalu, kod nas to nije bio slučaj. Naime, među haploidima nije nađena ni jedna biljka koja bi se mogla klasifikovati kao spontani dihaploid.

S obzirom na veoma sušne uslove u vreme setve, odnosno presađivanja veštački dobijenih DH biljaka, njihov broj u polju bio je relativno nizak za sve ispitivane F1 generacije, i to: za F1-1 5, za F1-2 0, za F1-3 5 i 1 autkros, za F1-4 4 i 2 autkrosa i za F1-5 4 i 1 autkros (Tab. 1). Sve DH biljke bile su normalno fertilitne i, osim autkroseva, po habitusu i vigoru ličile su na tipične inbred linije. Samooplodnja ovih biljaka, kao i njihovo

ukrštanje sa opozitnim testerima uspeli su 100%. Test-ukrštanja su stavljena u ogleda radi ispitivanja kombinacionih sposobnosti ovako dobijenih DH linija. Rezultati ovih ogleda su poslovna tajna Instituta za kukuruz

"Zemun Polje". Ovo ukazuje na to da je moguće u jednoj generaciji dobiti i testirati DH biljke korišćenjem metoda indukcije haploida.

Tab. 1: Ukupan broj haploidnih biljaka, koje pokazuju vidljive količine polena, strano-oplodnjaka (biljaka nastalih zaista oplodnjom jajne ćelije F1 biljaka sa MHI linijom) i dupliranih haploida po različitim F1 početnim generacijama

Generacija	Ukupan br. bilj.	Br. stranoplod.	% stranoplodnja	Haploidi sa poja. polena	% od ukupnog broja haploida
nF1-1	293	36	12,29	19	7,39
nF1-1 kolhicin	5			Fertilno	
nF1-2	323	14	4,33	10	3,24
nF1-2 kolhicin	0				
nF1-3	311	30	9,65	32	11,39
nF1-3 kolhicin	5	1	20	Fertilno	
nF1-4	336	118	35,12	14	6,42
nF1-4 kolhicin	4	2	50	Fertilno	
nF1-5	309	85	27,51	47	20,98
nF1-5 kolhicin	4	1	25	Fertilno	

### Zaključak

Proces selekcije kod kukuruza mogao bi se svesti na 3 faze:

1. F1 x MHI za proizvodnju i selekciju haploida (ovo se može uraditi i u zimskoj generaciji)
2. Dupliranje broja hromozoma kod haploida i setva ovih biljaka u polju pored odgovarajućih opozitnih testera. Samooplodnja

ovih biljaka i njihovo istovremeno ukraštanje (kao očeva) sa testerima.

3. Setva samooplođenih potomstava klip na red radi fenotipske selekcije dihaploidnih linija, i setva test-ukrštanja u test-ogledima radi provere njihove kombinacione sposobnosti. Samo dihaploidne linije dobre *per se* i u test-ogledima mogu se dalje komercijalno koristiti.

### LITERATURA

- COE, E.H. (1959): A line of maize with high haploid frequency. *Am. Nat.* 93: 381-382.
- COE, E.H. (1994): Anthocyanin genetics. In: Freeling M, Walbot V (eds) *The maize handbook*. Springer-Verlag, New York, pp 279-281.
- DEIMLING, S., F. ROBER and H.H. GEIGER (1997): Methodik und genetik der in-vivo-haploideninduktion bei mais. *Vortr Pflanzenzucht* 38: 203-204.
- EDER, J., and S. CHALYK (2002): In vivo haploid induction in maize. *TAG* 104: 703-708.
- JANSEN, R.C. (1992): On the selection for specific genes in doubled haploids. *Heredity* 69: 92-95.
- LASHERMES, P., and M. BECKERT (1988): Genetic control of maternal haploidy in maize (*Zea mays* L.) and selection of haploid inducing lines. *TAG* 76: 405-410.
- NEI, M. (1963): The efficiency of haploid methods of plant breeding. *Heredity* 18: 95-100.
- TYRNOV, V.S., and A.N. ZAVALISHINA (1984): Inducing high frequency of matroclinal haploids in maize. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 276: 735-738. (in Russian)
- ZABIROVA, E.R., M.V. CHUMAK, O.A. SHATSKAIA and V.S. SCHERBAK (1996): Technology of the mass accelerated production of homozygous lines (in Russian). *Kukuruz a i sorgo* 4: 17-19.

**MOLDOVAN LINE MHI THE SOURCE FOR OBTAINING A LARGE  
NUMBER OF HAPLOID PLANTS IN MAIZE**

VANČETOVIĆ J., M. VIDAKOVIĆ, D. IGNJATOVIĆ-MICIĆ, K. MARKOVIĆ, and N. DELIĆ

SUMMARY

The hypothesis of the shortening the cycle of selection was tested in maize, by using the MHI line (Moldovan Haploid Inducer) for inducing haploids in five F1 elite single crosses, made for the purposes of further inbreeding and gaining new elite inbred lines. Obtained number of haploid plants was quite enough for the further breeding, by using 15 F1 plants as the female parent for the MHI line as the male parent. Doubling of the chromosome number of a smaller number of haploids was quite successful. With such obtained dihaploid plants a 100% successful selfing and crossing with opposite testers was made. All of this gained to the conclusion that the process of breeding in maize could be conducted in three phases:

1. F1 x MHI for producing and selecting of haploids (could be done in the winter nursery)
2. Doubling of the chromosome number of the obtained haploids and sowing this plants in the field along with the appropriate opposite testers. Selfing of this plants and outcrossing (as males) to the testers.
3. Sowing of selfed progenies ear to row for the phenotypic selection of the obtained dihaploid lines, and sowing of the test-crosses in the trials for the check of their combining ability. Only dihaploid lines which performe good per se and in the test-crossses could be further commercially used.

**Key words:** maize, MHI, haploid incuction, chromosome doubling