

## UTICAJ RODITELJSKIH GENOTIPOVA NA FORMIRANJE HAPLOIDNIH EMBRIONA U UKRŠTANJIMA PŠENICE I KUKURUZA

KONDIĆ-ŠPIKA ANKICA, KOBILJSKI B.<sup>1</sup>

**IZVOD:** Ukrštanja pšenice i kukuruza predstavljaju danas jednu od najčešće korišćenih i najefikasnijih metoda za proizvodnju homozigotnih dvostrukih haploida pšenice. U cilju daljeg povećanja efikasnosti ove metode, u ovom radu ispitan je uticaj genotipa pšenice, kao i genotipa polinatora (kukuruz) na frekvenciju oplodnje (br. stranooplodnih zrna/ukupan br. oprašenih zr.) i frekvenciju haploidnih embriona (broj haploidnih embriona/ukupan br. oprašenih zr.) u ukrštanjima pšenice i kukuruza. Trinaest kombinacija pšenice (*Triticum aestivum* L.) ukršteno je sa dva genotipa kukuruza (*Zea mays* L.). Utvrđene su značajne razlike u pogledu ispitivanih svojstava, kako između kombinacija pšenice, tako i između genotipova kukuruza. U pogledu frekvencije oplodnje značajne razlike između oprašivača utvrđene su kod tri kombinacije pšenice (Banks/Rodna, Banks/NS-205-98 i Lira/Sonata). Kod sve tri navedene kombinacije postignuti su značajno bolji rezultati u oplodnji sa oprašivačem Kelvedon Glory. Prednost ovog oprašivača naročito je ispoljena u pogledu frekvencije formiranih haploidnih embriona, koja se kretala od 0,2-3,6% u odnosu na ukupan broj oprašenih cvetova. U ukrštanjima pšenice sa oprašivačem ZPSC-213 frekvencija haploidnih embriona se kretala od 0-1,2%. Samo kod kombinacije Banks/Rodna nije utvrđena značajna razlika između polinatora u pogledu ovog svojstva, dok su sve ostale kombinacije ukrštanja pšenice dale značajno veći broj haploidnih embriona u ukrštanjima sa polinatorom Kelvedon Glory.

**Ključne reči:** pšenica  $\times$  kukuruz, haploidi, genotip

**UVOD:** Od brojnih metoda za proizvodnju haploida i homozigotnih dvostrukih haploida (DH) kod pšenice, eliminacija hromozoma polenskog roditelja posle udaljenih ukrštanja ispitivana je od velikog broja istraživača i danas se koristi u širokom spektru praktičnih primena (Chaudhary et al., 2005). Ova tehnika inicirana je kod pšenice istraživanjima Barclay (1975), koji je uspeo da proizvede haploide pšenice iz ukrštanja sorte Chinese Spring sa *Hordeum bulbosum*. Međutim, tzv "bulbosum tehnika" bila je u velikoj meri zavisna od genotipa, zbog dominantnih gena (Kr1 i Kr2) inhibitora ukrštanja, koji su bili prisutni u velikom broju sorti pšenice.

Uvođenjem kukuruza kao polenskog roditelja (Laurie and Bennett, 1986) značajno

je unapređena ova tehnika, zbog manje osetljivosti polena kukuruza na dejstvo Kr1 i Kr2 gena. Upravo iz tog razloga, metod ukrštanja pšenice i kukuruza se sve više koristi kao sistem za indukciju haploida kod pšenice (Snape, 1998). Ova metoda se odlično kombinuje sa klasičnim oplemenjivačkim programima i pomaže da se selekcion proces skрати za nekoliko godina.

Iako se u početku činilo da ova metoda nije zavisna od genotipa, prvo je uočeno da genotip polinatora utiče na produkciju haploida (Lefebvre and Devaux, 1996; Zhang et al., 1996; David et al., 1999). Uticaj genotipa pšenice postaje vidljiv postepeno, više kao usputni rezultat u istraživanjima sa različitim ciljevima, nego iz direktnog ispitiva-

Originalni naučni rad (Original scientific paper)

<sup>1</sup> Dr ANKICA KONDIĆ-ŠPIKA, [ankica@ifvcns.ns.ac.yu](mailto:ankica@ifvcns.ns.ac.yu), naučni saradnik, dr BORISLAV KOBILJSKI, viši naučni saradnik, Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

nja ovog fenomena (Suenaga et al., 1997; Verma et al., 1999). Tek u novijim istraživanjima ova tema biva detaljnije obrađena, ispitivanjem uticaja obe roditeljske komponente na efikasnost u proizvodnji haploida pšenice (Verma et al., 1999; Cherkaoui et al., 2000; Garcia-Llamas et al., 2004).

U cilju daljeg povećanja efikasnosti proizvodnje haploida metodom ukrštanja pšenice i kukuruza, u ovom radu ispitan je uticaj genotipa muškog (kukuruz) i ženskog (pšenica) roditelja na frekvenciju oplodnje (br. stranooplodnih zrna/ukupan br. oprашenih zrna) i frekvenciju haploidnih embriona (broj haploidnih embriona/ukupan br. oprашenih zrna).

### Materijal i metode

Za proizvodnju haploida metodom ukrštanja pšenice i kukuruza, korišćena je F2 generacija trinaest kombinacija pšenice (*Triticum aestivum* L.). Ove kombinacije predstavljaju deo oplemenjivačkog programa Zavoda za strna žita, Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu i korišćene su kao majčinske komponente u ukrštanjima. Za polinatore izabrana su dva genotipa kukuruza šećerca (*Zea mays* L.), Kelvedon Glory (V. Britanija) i ZPSC-213 (SCG). Kukuruz je proizveden u uslovima staklare, a pšenica u polju.

Ukrštanje je vršeno u poljskim uslovima, bez prethodne kastracije pšenice, u trenutku kada je tučak spreman za oplodnju, ali prašnici pšenice još uvek nisu zreli, te je tako izbegnuta samooplodnja pšenice. Ovim putem nije moguće sasvim eliminisati samooplodnju, ali je moguće lako vizuelno razdvojiti samooplodna od stranooplodnih zrna. Na taj način je izbegnuto dugotrajno vršenje kastracije svakog pojedinačnog klasa. Svež polen kukuruza sakupljan je u staklari i zatim nošen u polje, gde je vršeno njegovo nanošenje na prethodno pripremljene klasove. Tretman klasova rastvorom auksina dicamba (20mg<sup>-1</sup>) vršen je 24h nakon oplodnje, tako što su klasovi isprskani ovim rastvorom.

Nakon tri nedelje gajenja u poljskim uslovima, klasovi sa embrionima su odvojeni od majčinskih biljaka. Okrunjena zrna su prvo razdvojena na samooplodna i stranooplodna. Stranooplodna zrna su površinski sterilisana potapanjem u 70% rastvor etanola (10<sup>0</sup>), zatim u 20% rastvor varikine (10<sup>1</sup>) i isprana u sterilnoj destilovanoj vodi (3x). Izolacija embriona

vršena je u aseptičnim uslovima, a zatim su izolovani embrioni kultivisani na Gamborg B5 hranljivu podlogu (Gamborg et al., 1968).

Prvih 10 dana embrioni su gajeni u hladnoj komori na +4°C i u mraku, a zatim u komori za kulturu na 22-25°C i pri osvetljenju od 1600-2000lx.

Dobijeni rezultati statistički su obrađeni metodom analize varijanse, a značajnost razlika između genotipova, u pogledu ispitivanih svojstava, određena je pomoću LSD vrednosti. Za statističku analizu korišćen je MSTAT-C kompjuterski program.

### Rezultati i diskusija

Rezultati su pokazali da na frekvenciju oplodnje u ukrštanjima pšenice i kukuruza nije imao značajnog uticaja genotip polenskog roditelja (kukuruz). Sa polinatorom ZPSK-213 ostvarena je prosečna frekvencija oplodnje od 45,5%, dok je sa oprашivačem Kelvedon Glory (KG) ona bila 51,8% (tab. 1). U pogledu frekvencije oplodnje, značajne razlike između polinatora utvrđene su samo kod tri kombinacije pšenice (Banks/Rodna, Banks/NS 205-98 i Lira/Sonata). Kod sve tri navedene kombinacije postignuti su značajno bolji rezultati sa oprашivačem KG. Najniži procenat oplodnje ostvaren je kod kombinacije NS 174-98/NS 30-95 i to sa oba primenjena oprашivača. Takođe, najviši procenat oplodnje postignut je sa oba genotipa kukuruza kod iste kombinacije pšenice, Banks/NS 30-95 (tab. 1).

U pogledu frekvencije haploidnih embriona samo kod kombinacije Banks/Rodna nije utvrđena značajna razlika između genotipova kukuruza (tab. 2). Kombinacija Fortuna/Lira je sa oprашivačem ZPSK-213 formirala najveći broj haploidnih embriona (1,2 embriona na 100 oprашenih cvetova), dok je sa oprашivačem KG dala najmanji broj embriona (0,2 embriona na 100 oprашenih cvetova). Ostale kombinacije imale su značajno veći broj formiranih haploidnih embriona u ukrštanjima sa oprашivačem KG. U ukrštanjima sa polinatorom ZPSK-213 dve kombinacije nisu formirale haploidne embrione (Prima/Bezostaja 1 i Banks/NS 30-95). Interesantno je da je kombinacija Banks/NS 30-95 imala najviši procenat oplodnje (83,4%) sa ovim polinatorom, ali ipak nije formirala ni jedan haploidni embrion, što ukazuje na različitu genetičku kontrolu ovih svojstava.

**Tab. 1. Uticaj polinatora na frekvencija oplodnje u ukrštanjima pšenice i kukuruza**  
**Tab. 1. Effect of pollinator on fertilization frequency in wheat x maize hybridization**

Br.	F2 kombinacija	Frekvencija oplodnje (%)	
No.	F2 combination	Fertilization frequency (%)	
		ZPSK-213	KG
1.	Prima/Bezostaja 1	22,1	24,5
2.	NS 174-98/NS 30-95	10,9	20,3
3.	Fortuna/Lira	30,9	41,4
4.	Zlatka/Radika	28,6	25,5
5.	Banks/Rodna	28,8	51,5**
6.	NS 109-98/NS 173-98	49,9	60,2
7.	NS 30-95/NSP 11	50,3	55,0
8.	Banks/NS 205-98	42,3	61,7*
9.	NS 42-00/Sofija	62,3	50,3
10.	Lira/Sonata	50,7	70,1*
11.	NS 121-98/Sofija	70,2	61,4
12.	Banaks/NS 30-95	83,4	76,7
13.	Banks/Pobeda	61,6	74,9
Prosek - Mean:		45,5	51,8
LSD	0,05	15,38	
	0,01	20,80	

Značajan uticaj na ispitivana svojstva, pored genotipa oprašivača, imao je i genotip pšenice, odnosno kombinacija ukrštanja. Frekvencija oplodnje kretala se od 15,6% (NS 174-98/NS 30-95) do 80,0% (Banks/NS 30-95), sa prosečnom vrednošću od 48,6% (tab. 3). Nižu frekvenciju oplodnje od prosečne imalo je 5 kombinacija, dok je 8 kombinacija imalo viši procenat oplodnje od prosečnog. Najmanji broj formiranih embriona (0,6 na 100 oprašenih cvetova) imale su kombinacije NS 174-98/NS 30-95 i Lira/Sonata, dok je najveći broj embriona (2,3%) formiran kod kombinacije NS 121-98/Sofija. U proseku za sve ispitivane kombinacije pšenice formirano je 1,1 haploidnih embriona na 100 oprašenih cvetova. Niže vrednosti od prosečne imalo je 8 kombinacija, dok je kod 5 kombinacija formirano više haploidnih embriona od prosečne vrednosti.

**Tab. 2. Uticaj polinatora na frekvenciju haploidnih embriona u ukrštanjima pšenice i kukuruza.**  
**Tab. 2. Effect of pollinator on frequency of haploid embryos in wheat x maize hybridization**

Br.	F2 kombinacija	Frekvencija haploidnih embriona (%)	
No.	F2 combination	Frequency of haploid embryos (%)	
		ZPSK-213	KG
1.	Prima/Bezostaja 1	0,0	2,9**
2.	NS 174-98/NS 30-95	0,3	0,9**
3.	Fortuna/Lira	1,2	0,2**
4.	Zlatka/Radika	0,5	1,1**
5.	Banks/Rodna	0,8	1,1
6.	NS 109-98/NS 173-98	0,1	1,2**
7.	NS 30-95/NSP 11	0,5	1,0*
8.	Banks/NS 205-98	0,5	2,2**
9.	NS 42-00/Sofija	0,5	1,3**
10.	Lira/Sonata	0,1	1,1**
11.	NS 121-98/Sofija	1,0	3,6**
12.	Banks/NS 30-95	0,0	2,9**
13.	Banks/Pobeda	0,7	2,7**
Prosek - Mean:		0,5	1,7
LSD	P<0,05	0,4213	
	P<0,01	0,5695	

Sve kombinacije pšenice uspešno su ukrštene sa kukuruzom, čime je još jednom potvrđena osnovna premisa data u ranim radovima (Laurie and Bennett, 1987; Suenaga, 1994), da su ova ukrštanja nezavisna od delovanja alela Kr1 i Kr2. Međutim, utvrđene su značajne razlike između kombinacija pšenice u frekvenciji oplodnje, dok se genotipovi kukuruza nisu međusobno značajno razlikovali u pogledu ovog svojstva. Veći uticaj genotipa pšenice, u odnosu na genotip kukuruza, na efikasnost oplodnje, utvrdili su i Cherkaoui et al. (2002), iz ukrštanja 10 genotipova durum pšenice i 9 genotipova kukuruza. U pogledu efikasnosti u proizvodnji haploidnih embriona, utvrđene su značajne razlike kako između kombinacija pšenice, tako i između korišćenih polinatora. Slične rezultate dobili su i drugi autori (Verma et al., 1999; Cherkaoui et al., 2000; Karanja et al., 2002). Međutim, Garcia-Llamas et al. (2004) nisu utvrdili značajne razlike između

genotipova kukuruza u proizvodnji haploidnih embriona. Mogući razlog za ovakve rezultate je što su oni u istraživanju koristili tri genotipa kukuruza iz iste kompanije, koja su verovatno imala veoma sličnu genetičku osnovu.

**Tab. 3. Uticaj genotipa pšenice na frekvenciju oplodnje i broj haploidnih embriona u ukrštanjima pšenice i kukuruza.**  
**Tab. 3. Effect of wheat genotype on fertilization frequency and number of haploid embryos in wheat x maize hybridization**

Br.	F2 kombinacija	Frekvencija oplodnje	Frekvencija haploidnih emb.
No.	F2 combination	Fertilization frequency (%)	Frequency of haploid emb. (%)
1.	Prima/Bezostaja 1	23,3 ab	1,45 cd
2.	NS 174-98/NS 30-95	15,6 a	0,60 a
3.	Fortuna/Lira	36,1 bc	0,70 a
4.	Zlatka/Radika	27,0 ab	0,80 a
5.	Banks/Rodna	40,1 bd	0,95 abc
6.	NS 109-98/NS 173-98	55,0 cde	0,65 a
7.	NS 30-95/NSP 11	52,6 cde	0,75 a
8.	Banks/NS 205-98	52,0 cde	1,35 bd
9.	NS 42-00/Sofija	56,3 de	0,90 ab
10.	Lira/Sonata	60,4 c	0,60 a
11.	NS 121-98/Sofija	65,8 ef	2,30 e
12.	Banaks/NS 30-95	80,0 f	1,45 cd
13.	Banks/Pobeda	68,2 ef	1,70 d
Prosek - Mean:		48,6	1,09
LSD	P<0,01	19,08	0,5045

Srednje vrednosti praćene različitim slovima se značajno razlikuju na pragu od  $P < 0,01$ .

Mean values followed by different letters differ significantly at level of  $P < 0,01$ .

Prosečne vrednosti parametara efikasnosti kod 13 kombinacija pšenice su pokazale veoma širok interval variranja. Nasuprot tome, razlike između genotipova kukuruza su bile manje. Ovi rezultati su u suprotnosti sa rezultatima Verma et al. (1999), koji su utvrdili veća variranja između genotipova kukuruza, nego između genotipova pšenice. Navedene razlike su najverovatnije posledica korišćenog različitog broja kombinacija pšenice i genotipova kukuruza u poređenim istraživanjima.

Naime, u radu Verma et al. (1999) ispitivana je proizvodnja haploida u ukrštanjima 5 kombinacija pšenice sa 15 genotipova kukuruza, dok je u našem istraživanju korišćeno 13 kombinacija pšenice i 2 genotipa kukuruza. Uočljivo je da su, u oba istraživanja, veće razlike utvrđene kod vrste koja je bila zastupljena sa većim brojem genotipova. To znači da bi eksperiment trebalo ponoviti sa jednakim brojem kombinacija pšenice i genotipova kukuruza, kako bi se doneli pouzdaniji zaključci o tome koji roditelj ima većeg uticaja na efikasnost ove metode.

Prioritetni cilj u ovom istraživanju bio je da se utvrdi efikasnost metode u proizvodnji haploidnih embriona kod što većeg broja kombinacija pšenice, a polinatori su izabrani na osnovu rezultata preliminarnog istraživanja, u kome je bila ispitana efikasnost 6 genotipova kukuruza u produkciji polena (neobjavljeni podaci). Izabran je Kelvedon Glory, koji se pokazao kao najbolji polinator u preliminarnom eksperimentu i genotip ZPSK-213, kao najbolji od korišćenih genotipova iz domaće selekcije. Cilj je bio da se utvrdi da li je moguće i sa polinatorom domaće proizvodnje dobiti podjednako dobre rezultate, jer je nabavka semena mnogo jednostavnija, nego u slučaju genotipa KG. Međutim, rezultati su pokazali da je u ukrštanjima sa KG u proseku dobijeno oko tri puta više haploidnih embriona, nego u ukrštanjima sa ZPSK-213. Superiornost genotipa Kelvedon Glory kao polinatora utvrdili su i Karanja et al. (2002), u istraživanju u kome je KG dao najbolje rezultate od 6 korišćenih genotipova kukuruza, ukrštenih sa 20 kombinacija pšenice.

### Zaključak

Ukrštanja između pšenice i kukuruza moguće je izvesti nezavisno od genotipa kukuruza, korišćenog kao oprašivač. Međutim, na broj formiranih haploidnih embriona, od kojih će kasnije nastati haploidne biljke i homozigotni dvostruki haploidi, velikog uticaja ima genotip oba roditelja. S obzirom na to da se izbor kombinacija ukrštanja pšenice vrši prema agronomskim kriterijumima, a ne prema njihovoj sposobnosti da formiraju embrione u ukrštanjima sa kukuruzom, efikasnost ove metode može se povećati samo izborom najuspešnijeg oprašivača. Pravilnim izborom polinatora (genotip kukuruza)

moгуće je povećati broj formiranih embriona i do nekoliko puta, čime se povećava i efi-

kasnost primene ove metode u oplemenjivanju pšenice.

#### LITERATURA

- BARCLAY, I. R. (1975): High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum* L.) by chromosome elimination. *Nature* (London), 256, 410-411
- CHAUDHARY, H. K., SETHI, G. S., SINGH, S., PRATAF A., SHARMA, S. (2005): Efficient haploid induction in wheat by using pollen of *Imperata cylindrical*. *Plant Breeding*, 124, 96-98
- CHERKAoui, S., LAMSAOURI, O., CHLYAH, A., CHLYAH, H. (2000): Durum wheat x maize crosses for haploid wheat production: Influence of parental genotypes and various experimental factors. *Plant Breeding*, 119, 31-36
- DAVID, J. L., DUSUTOIR, J. C., RAYNAULD, C., ROUMET, P. (1999): Heritable variation in the ability to produce haploid embryos via pollination with maize and embryo rescue in durum wheat. *Genome*, 42, 338-342
- GAMBORG, O. L., MILLER, R. A., OJIMA, K. (1968): Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50, 151-158
- GARCIA-LLAMAS, C., RAMIREZ, M. C., BALLESTEROS, J. (2004): Effect of pollinator on haploid production in durum wheat crossed with maize and pearl millet. *Plant Breeding*, 123, 201-203
- LAURIE, D. A., BENNETT, M. D. (1987): Wide crosses involving maize (*Zea mays* L.). *Annual Report of the Plant Breeding Institute*, 66-68
- LEFEBVRE, D., DEVAUX, P. (1996): Doubled haploids of wheat from wheat x maize crosses: genotypic influence, fertility and inheritance of the 1BL-1RS chromosome. *Theor. Appl. Genet.*, 92, 1267-1273
- SNAPE, J. W. (1998): Golden calves or white elephants? Biotechnologies for wheat improvement. In: *Wheat: Prospects for global improvement*, H.-J. Braun et al. (Ed.) Kluwer Academic Publ., Dordrecht, the Netherlands, 273-283
- SUENAGA, K., MORSHEDI, A. R., DARVEY, N. L. (1997): Haploid production of Australian wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars through wheat x maize (*Zea mays* L.) crosses. *Aust. J. Agric. Res.*, 48, 1207-1211
- VERMA, VINESH, BAINS, N. S., MANGAT, G. S., NANDA, G. S., GOSAL, S. S., SINGH, KULDEEP (1999): Maize genotypes show striking differences for induction and regeneration of haploid wheat embryos in the wheat x maize system. *Crop Sci.*, 39, 1722-1727
- ZHANG, J., FRIBE, B., RAUPP, W. J., HARRISON, S. A., GILL, B. S. (1996): wheat embryo-genesis and haploid production in wheat x maize hybrids. *Euphytica*, 90, 315-324

#### EFFECT OF PARENTAL GENOTYPES ON HAPLOID EMBRYO FORMATION IN WHEAT X MAIZE HYBRIDIZATION

KONDIĆ-ŠPIKA ANKICA, KOBILJSKI B.

#### SUMMARY

Wheat x maize hybridization method is an efficient and frequently used system for production of haploids in wheat. With the intention of further improving the efficiency of this method, the aim of this work was to analyze the influence of wheat genotype, as well as pollinator genotype (maize) on fertilization frequency (no. of open-pollinated seeds per 100 pollinated florets) and frequency of haploid embryos (no. of haploid embryos per 100 pollinated florets) in wheat x maize hybridization.

Thirteen wheat (*Triticum aestivum* L.) combinations were crossed with two different maize (*Zea mays* L.) genotypes. The results have shown that there were significant differences among wheat combinations, as well as between maize genotypes in relation to the studied characters. Significant differences in fertilization frequency were found between pollinators in three wheat combinations (Banks/Rodna, Banks/NS-205-98 and Lira/Sonata). In these combinations, significantly

better results were obtained in the crosses with Kelvedon Glory pollinator. The advantage of this pollinator was specially expressed in the frequency of haploid embryos, which ranged from 0.2 to 3.6% in relation to the total number of pollinated florets. In wheat crosses with ZPSC-213 pollinator, the frequency of haploid embryos ranged from 0 to 1.2%. No significant difference between the pollinators in regard of this trait was found in combination Banks/Rodna, while all other wheat combinations had significantly greater number of haploid embryos in the crosses with Kelvedon Glory pollinator.

**Key words:** wheat x maize, haploids, genotype