



Značaj citogenetskih istraživanja u oplemenjivanju suncokreta i uljane repice

Jovanka Atlagić · Sreten Terzić · Ana Marjanović-Jeromela · Radovan Marinković

primljeno / received: 25.03.2010. prihvaćeno / accepted: 11.05.2010.
© 2010 IFVC

Izvod: Citogenetska istraživanja suncokreta i uljane repice imaju tradiciju dugu čitav vek. Prvo su izučavani broj i morfologija hromozoma kod vrsta iz roda *Helianthus* i *Brassica*, a zatim citotaksonomija i filogeneza ovih rodova. Citogenetska istraživanja su bila primenjavana u transferu gena iz divljih u gajene vrste, u korišćenju metoda *in vitro* gajenja, u izučavanju fenomena citoplazmatske muške sterilnosti (CMS-a), restauracije fertiliteta i dr.

U ovom radu su prikazani različiti aspekti istraživanja laboratorije za citogenetske analize Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu, čiji su rezultati korišćeni u oplemenjivanju suncokreta i uljane repice.

Glavne reči: citogenetska istraživanja, oplemenjivanje, suncokret, uljana repica

Uvod

Citogenetska istraživanja na suncokretu imaju tradiciju dugu čitav vek. Prva istraživanja su se odnosila na određivanje broja hromozoma kod gajenog suncokreta. Potom je izrađivan kariotip vrsta u rodu *Helianthus*. Broj i osobine hromozoma su korišćene za klasifikaciju vrsta i izučavanje filogenetskih odnosa u rodu *Helianthus*. Korišćenje interspecies hibridizacije u oplemenjivanju gajenog suncokreta, transfer gena iz divljih vrsta u gajeni suncokret iziskivalo je primenu citogenetskih metoda. U stvaranju hibrida suncokreta sedamdesetih godina prošlog veka izučavani su fenomeni citoplazmatske muške sterilnosti i restauracije fertiliteta čija je primena bila od izuzetnog značaja u novim oplemenjivačkim programima. Citogenetska istraživanja su pratila primenu metoda *in vitro* gajenja, naročito kulturu antera, zatim izučavanje procesa oplodnje u smislu razdvajanja prezigotne i postzigotne inkompatibilnosti u interspecies ukrštanjima, odnosno utvrđivanje *cross* kompatibilnosti u izboru roditeljskih parova kod hibrida suncokreta. Poslednjih godina citogenetska istraživanja su često kombinovana sa primenom metoda molekularnih markera.

Citogenetska istraživanja na uljanoj repici, tačnije u rodu *Brassica*, započeta su početkom prošlog veka. Prema autorima Prakash i Chopra (1999) odnosila se na: utvrđivanje broja hromozoma i

analizu genoma u rodu *Brassica*; izučavanje karakteristika somatskih hromozoma; veštačko dobijanje aloploida seksualnim putem ili somatskom hibridizacijom; ispitivanje germplazme; citoplazmatske muške sterilnosti; ugradnju nuklearnih gena hromozomskim manipulacijama u cilju popravljavanja agronomskih osobina i restauracije fertiliteta; disekciju bazičnog genoma za dobijanje linija sa hromozomskom adicijom; identifikaciju genskih linkidž grupa i poređenje genskih sinteza između sličnih vrsta; korišćenje molekularnih markera za mapiranje hromozoma i analizu odnosa genoma.

Svi navedeni aspekti istraživanja na suncokretu, a samo CMS kod uljane repice, bili su izučavani u laboratoriji za citogenetske analize Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu.

Kolekcija divljih vrsta suncokreta

Kolekcija divljih vrsta suncokreta u Novom Sadu je nastala kroz 7 ekspedicija izvedenih u periodu od 1980. do 1991. godine, gde je sakupljeno 917 kolekcionih brojeva. Od 49 vrsta suncokreta koje pripadaju rodu *Helianthus* u kolekciji je bilo 43 vrste. Nažalost, tokom prethodnih godina gajenja izgubljeno je ukupno 15 vrsta. Tako danas kolekcija sadrži 21 višegodišnju vrstu i 7 jednogodišnjih vrsta. Ukupno se u

Ovo istraživanje je deo projekta broj TR20081: *Stvaranje genotipova uljane repice (Brassica napus L.) za ishranu i industrijsku preradu* (01.04.2008-31.12.2010), Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije / This research results from project TR20081: *Development of rapeseed (Brassica napus L.) genotypes for feed and industrial processing* (01.04.2008-31.12.2010) financed by the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia

J. Atlagić (✉) · S. Terzić · A. Marjanović-Jeromela · R. Marinković
Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Maksima Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Srbija
e-mail: jovanka.atlagic@ifvcns.ns.ac.rs

Tabela 1. Kolekcija jednogodišnjih divljih vrsta suncokreta

Table 1. The collection of annual wild sunflower species

Vrsta Species	Broj populacija / No. of accessions		Broj semena No. of seeds
	u gen banci in gene bank data base	sa rezervom semena with seed reserves	
<i>H. annuus</i>	108	70	10-2539
<i>H. petiolaris</i>	33	25	80-9130
<i>H. neglectus</i>	4	4	1564-4838
<i>H. debilis</i>	21	13	33-5490
<i>H. praecox</i>	15	14	335-10710
<i>H. argophyllus</i>	7	7	1616-10396
<i>H. niveus</i>	4	3	259-5910

Tabela 2. Kolekcija višegodišnjih divljih vrsta suncokreta

Table 2. The collection of perennial wild sunflower species

Vrsta Species	Broj populacija No. of accessions		Broj semena No. of seeds	Broj populacija u polju No. of accessions in the field
	u banci gena in gene bank data base	sa rezervom semena with seed reserves		
<i>H. tuberosus</i>	41	16	1-650	112
<i>H. rigidus (H. pauciflorus)</i>	13	12	1-400	11
<i>H. mollis</i>	7	5	3-1162	6
<i>H. maximiliani</i>	36	32	1-8630	60
<i>H. divaricatus</i>	10	10	8-680	8
<i>H. decapetalus</i>	8	7	17-622	7
<i>H. grosseserratus</i>	29	9	2-335	31
<i>H. nuttallii</i>	23	22	1-399	15
<i>H. strumosus</i>	20	12	2-354	20
<i>H. laevigatus</i>	7	7	7-91	8
<i>H. glaucophyllus</i>	1	1	38	1
<i>H. giganteus</i>	16	15	1-1800	19
<i>H. eggertii</i>	2	2	1-9	1
<i>H. hirsutus</i>	4	3	3-280	2
<i>H. californicus</i>	1	1	1	1
<i>H. resinosus</i>	2	2	125, 4858	2
<i>H. silphioides</i>	1	1	13	1
<i>H. atrorubens</i>	1	1	2	1
<i>H. microcephalus</i>	2	2	28, 300	2
<i>H. smithii</i>	2	2	13, 90	2
<i>H. glaucophyllus</i>	1	1	10	1

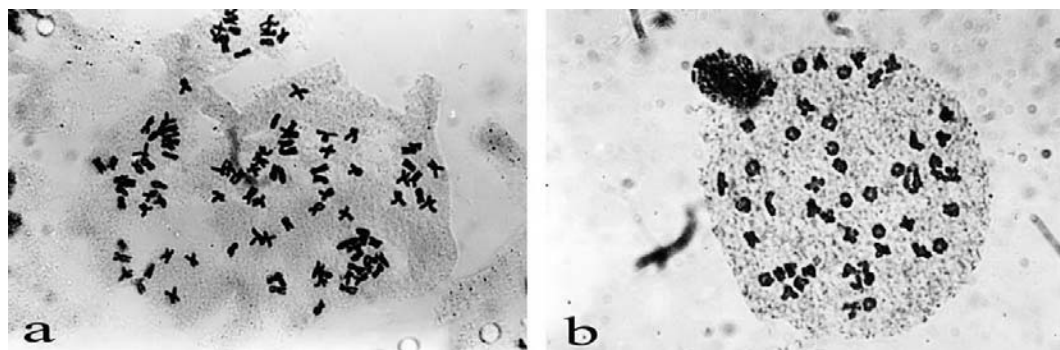
kolekciji nalazi 447 kolekcionih brojeva. Rezerva semena populacija jednogodišnjih vrsta se kreće od nekoliko desetina do nekoliko hiljada (Tab. 1), a višegodišnjih od jednog do nekoliko stotina (Tab. 2). Seme se čuva u hladnoj komori (+ 4° C), a populacije višegodišnjih vrsta se održavaju i u polju (Atlagić et al. 2006).

Ploidnost vrsta roda *Helianthus*

Osnovni broj hromozoma u rodu *Helianthus* je $n=17$, a rod predstavlja poliploidni kompleks koji se sastoji od diploidnih ($2n=2x=34$), tetraploidnih ($2n=4x=68$) i heksaploidnih ($2n=6x=102$) vrsta. Sve jednogodišnje vrste su diploidne, dok

su višegodišnje diploidne, tetraploidne i heksaploidne. Vrste *H. ciliaris* i *H. strumosus* se pojavljuju u tetraploidnoj i heksaploidnoj formi, dok *H. decapetalus* ima diploidnu i tetraploidnu formu (Schilling & Heiser 1981).

U okviru evaluacije vrsta prisutnih u kolekciji bilo je planirano da se odredi kariotip za svaku vrstu, da se pregledaju sve populacije u okviru vrsta u cilju identifikacije vrste, odnosno prirodnih hibrida. Zbog velikog broja kolekcionih brojeva broj hromozoma je određivan za vrste, odnosno populacije koje su bile uključene u program ukrštanja sa linijama gajenog suncokreta. Korišćen je Feulgen metod (Georgieva-Todorova 1976) za određivanje broja hromozoma u somatskim ćelijama vrha korenčića (Sl. 1a). Ovaj metod je uspješno korišćen, ali je iziskivao trošenje rezervi semena. Iz tih razloga se prešlo na određivanje broja hromozoma u mejcitama koristeći acetokarmin metod za analizu mejoze. U dijakinezi je određivan broj bivalenata, a time i broj *n*-hromozoma (Sl. 1b).



Slika 1. *H. rigidus* a) Somatska ćelija ($2n=6x=102$); b) Mejcita (51 bivalent)
Figure 1. *H. rigidus* a) Somatic cell ($2n=6x=102$); b) Meicyte (51 bivalents)

Na taj način su pregledane vrste zastupljene u kolekciji, korišćene populacije tih vrsta u hibridizaciji sa gajenim suncokretom. Za neke od vrsta je ustanovljeno da se pojavljuju u različito ploidnim formama kako je bilo poznato u literaturi, a za neke su ustanovljeni nivoi ploidnosti koji nisu saopšteni ranije. Tako su Atlagić et al. (1992) utvrdili da se diploidna vrsta *H. smithii* pojavljuje u heksaploidnoj formi, a vrsta *H. strumosus* pojavljuje se i u diploidnoj formi, osim u tetraploidnoj i heksaploidnoj.

Interspecies hibridizacija

Mogućnost ukrštanja divljih vrsta sa gajenim suncokretom bila je ispitivana prethodnih 28 godina kroz vrlo obiman program hibridizacije uz korišćenje klasičnih metoda ukrštanja. Izvedeno

je nekoliko hiljada ukrštanja, a uspješno su preneti poželjna svojstva i ugrađena su u hibride suncokreta iz novosadskog selekcionog programa. Uspješnost ukrštanja je prikazana kroz dva perioda, gde se može zapaziti da je u prvom periodu izveden veći broj ukrštanja i dobijeno je više biljaka F_1 interspecies hibrida (Tab. 3).

Jednogodišnje divlje vrste suncokreta su filogenetski bliske gajenom suncokretu pa ih je moguće koristiti bez velikih teškoća u interspecies programima. Od 11 jednogodišnjih divljih vrsta, 7 vrsta (*H. annuus*, *H. argophyllus*, *H. petiolaris*, *H. praecox*, *H. debilis*, *H. neglectus*, *H. niveus*) uspješno su ukrštene sa linijama gajenog suncokreta (Tab. 3) (Atlagić 1990, Terzić 2006). Dobijeni interspecies hibridi različitih generacija ukrštanja (F_1 , BC_1F_1 – BC_4F_1) najčešće su korišćeni kao izvori CMS-a i Rf gena.

Grupa diploidnih višegodišnjih vrsta je vrlo interesantna za oplemenjivače kao izvor otpornosti prema prouzročivačima bolesti (*H. giganteus*, *H. maximiliani* i *H. occidentalis*), kao izvor visokog sadr-

žaja ulja u semenu (*H. salicifolius*), ranostasnost (*H. nuttallii*) i novog ideotipa (*H. mollis*). Ove vrste su uspješno ukrštene sa linijama gajenog suncokreta i dobijen je veći broj interspecies hibrida (Tab. 3) (Atlagić 1991, Atlagić et al. 1995).

Tetraploidne vrste *H. hirsutus*, *H. decapetalus*, *H. laevigatus*, *H. strumosus* uspješno su ukrštene sa gajenim suncokretom i korišćene su kao izvori otpornosti na bolesti (Tab. 3) (Atlagić 1994, Terzić 2006).

Od heksaploidnih vrsta najčešće je korišćena vrsta *H. tuberosus* kao izvor otpornosti na različite patogene. F_1 hibridi su dobijeni sa velikim brojem populacija ove vrste (Atlagić et al. 1993). Dodatne tri heksaploidne vrste *H. rigidus*, *H. resinosus* i *H. eggertii* uspješno su ukrštene sa linijama gajenog suncokreta (Tab. 3) (Atlagić 1996, Terzić 2006).

Tabela 3. Uspešnost ukrštanja divljih vrsta i gajenog suncokreta
 Table 3. The success of crossing wild species and cultivated sunflower

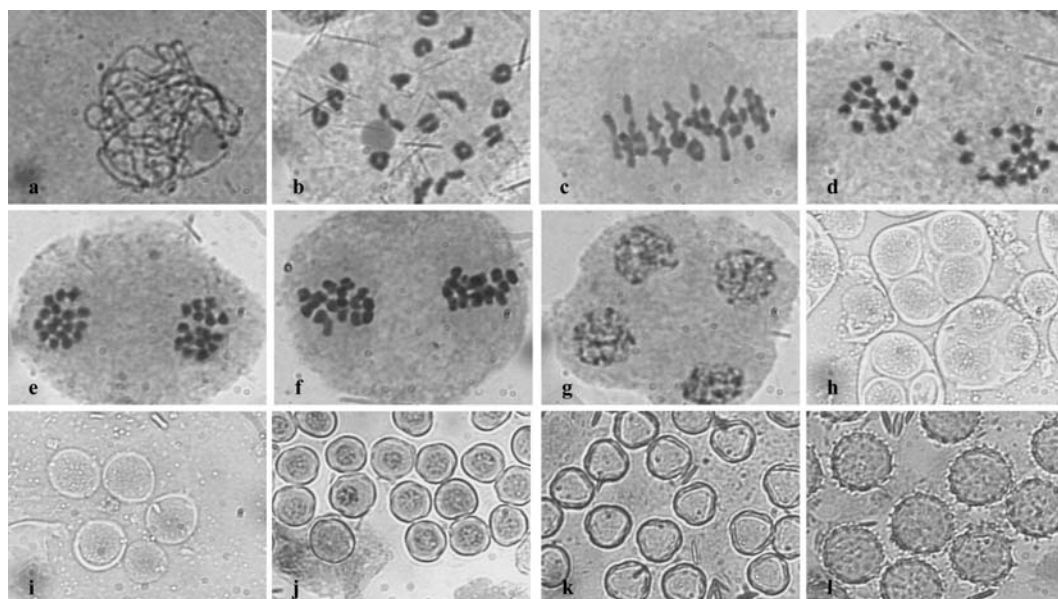
Vrste Species	Broj hrom. No. of chrom.	1981 - 1991			1992 - 2008		
		Broj populacija No. of accessions		F ₁ gen.	Broj populacija No. of accessions		F ₁ gen.
		Oprašene Polinated	Ukrštene Crossed	Broj bilj. No. of plants	Oprašene Polinated	Ukrštene Crossed	Broj bilj. No. of plants
<i>H. annuus</i>	17	24	17	123	28	11	169
<i>H. petiolaris</i>	17	22	20	35	23	3	7
<i>H. argophyllus</i>	17	8	6	24	9	2	30
<i>H. neglectus</i>	17	2	2	14	4	1	12
<i>H. debillis</i>	17	12	9	32	13	1	3
<i>H. praecox</i>	17	11	9	24	19	4	0
<i>H. niveus</i>	17	2	1	8	3	0	0
<i>H. mollis</i>	17	4	3	10	7	2	0
<i>H. salicifolius</i>	17	2	1	7	7	2	0
<i>H. maximiliani</i>	17	7	3	10	31	5	0
<i>H. occidentalis</i>	17	3	1	8	0	0	0
<i>H. nuttallii</i>	17	3	1	9	24	1	0
<i>H. smithii</i>	17	2	2	27	0	0	0
<i>H. decapetalus</i>	17,34	5	1	28	10	1	0
<i>H. hirsutus</i>	34	3	2	66	3	1	0
<i>H. strumosus</i>	34,51	8	1	13	14	5	24
<i>H. laevigatus</i>	34	5	3	51	3	1	4
<i>H. tuberosus</i>	51	17	9	90	11	4	27
<i>H. rigidus</i>	51	7	3	105	11	4	0
<i>H. eggertii</i>	51	1	1	5	1	1	0
<i>H. resinosus</i>	51	2	2	89	3	1	0
<i>H. divaricatus</i>	17	6	1	1	13	2	3
<i>H. giganteus</i>	17	6	1	0	12	0	0
<i>H. grosseserratus</i>	17	3	0	0	16	0	0
<i>H. microcephalus</i>	17	2	0	0	1	0	0

Citogenetska ispitivanja interspecies hibrida

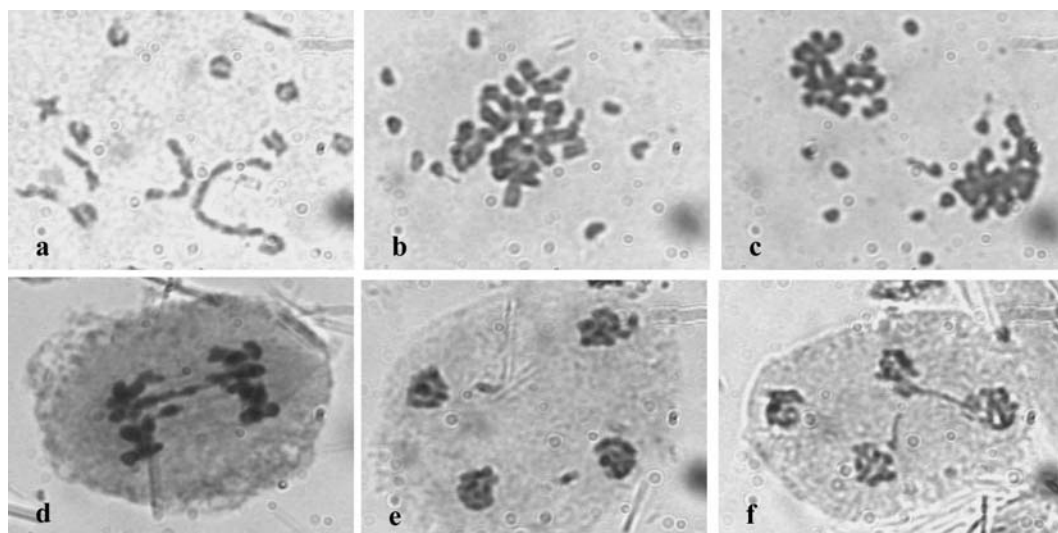
Najčešće barijere u primeni interspecies hibridizacije su *cross* inkompatibilnost (prezigotna i postzigotna - abortivnost embriona), smanjena fertilnost ili potpuna sterilnost F₁ i drugih ranih generacija interspecies ukrštanja. Razlike u ploidnosti, filogenetske razlike i različita taksonomska pripadnost divljih vrsta u odnosu na gajeni suncokret uzrok su navedenih pojava. Citogenetska ispitivanja divljih vrsta, kao i interspecies hibrida doprinose detektovanju problema i njihovom prevazilaženju. Najčešće se koriste citogenetske metode za analizu mejoze – mikrosporogeneze i vitalnosti polena. Praćenje mejoze podrazumeva posmatranje mejozita u arhesporijalnom tkivu prašnika primenom acetokarmin metode, dok je vitalnost polena odre-

đivana bojenom metodom po Alexandru (Atlagić 1989). Analiza mejotskog ciklusa daje dragocene informacije o homolognosti hromozoma i hromozomskim aberacijama tipa translokacija (konfiguracija u dijakinezi); izmeni genetskog materijala (broj hijazmi); detekcije hromozoma u eliminaciji (univalenti); aberacije tipa neuključenih hromozoma (izbegli i izostali hromozomi); o hromozomskim aberacijama tipa inverzija (hromozomski mostovi i fragmenti). Ocena vitalnosti polena služi za procenu potencijala za oplodnju.

Normalan tok mejoze koji je zapažen kod gajenog suncokreta i različitih vrsta roda *Helianthus* prikazan je na slici 2. Kod F₁ interspecies hibrida vrlo često su detektovane nepravilne faze mejoze (Sl. 3). Dobijeni rezultati su pokazali da ponekad postoje razlike u strukturi hromozoma (pojava multivalenata u dijakinezi biljaka interspecies



Slika 2. Faze mejoze (pravilne) a) Pahiten; b) Dijakineza; c) Metafaza I; d) Anafaza I; e) Telofaza I; f) Metafaza II; g) Telofaza II; h) Tetrade; i) Jednojedarne mikrospre; j,k) Mikrospre; l) Polenova zrna
 Figure 2. Phases of meiosis (normal) a) Pachyten; b) Diakinesis; c) Metaphase I; d) Anaphase I; e) Telophase I; f) Metaphase II; g) Telophase II; h) Tetrads; i) Mononuclear microspores; j,k) Microspores, l) Pollen grains



Slika 3. Faze mejoze (nepravilne) a) Dijakineza sa kvadri i heksivalentom; b) Metafaza I sa izbeglim hromozomima; c) Anafaza I sa izostalim hromozomima; d) Anafaza I sa hromozomskim mostovima; e) Telofaza II sa izostalim hromozomima; f) Telofaza II sa hromozomskim mostovima
 Figure 3. Phases of meiosis (irregular) a) Diakinesis with quadrivalent and hexavalent.; b) Metaphase I with fast chromosomes; c) Anaphase I with lagging chromosomes; d) Anaphase I with chromosome bridge; e) Telophase II with lagging chromosomes; f) Telophase II with chromosome bridges

hibrida), iako jednogodišnje vrste imaju isti broj hromozoma kao gajeni suncokret. Genom višegodišnjih diploidnih vrsta se razlikuje od genoma jednogodišnjih – gajenog suncokreta, pa je njihovo korišćenje praćeno velikim brojem teškoća.

Tetraploidne i heksaploidne vrste se razlikuju po broju i strukturi hromozoma od gajenog suncokreta. Kod interspecies hibrida nastalih ukrštanjem ovih vrsta i gajenog suncokreta konstatovan je veliki broj nepravilnosti tipa univalenata

i multivalenata u dijakinezi, „neuključenih“ hromozoma u metafazi i anafazi, kao i hromozomskih mostova u anafazi i telofazi (Sl. 3). Posledica nepravilne mejoze – mikrosporogeneze je smanjena vitalnost polena kod interspecies hibrida, naročito F_1 i BC_1F_1 generacije u odnosu na roditeljske vrste, a česta je bila i pojava muško sterilnih biljaka (Atlagić 2004, Terzić 2006).

Interesantno je istaći da od svih citogenetskih analiza kod interspecies hibrida najveći broj autora (Georgieva-Todorova 1976, Chandler et al. 1986, Georgieva-Todorova 1990, Jan 1997, Jan & Seiler 2007) izdvaja analizu mejoze - redukcione deobe i vitalnosti polena. Pored mogućnosti ukrštanja, karakteristike mejoze, pojave sterilnosti i smanjene fertilitnosti kod interspecies hibrida pokazuju mogućnost korišćenja neke vrste u oplemenjivanju gajenog suncokreta.

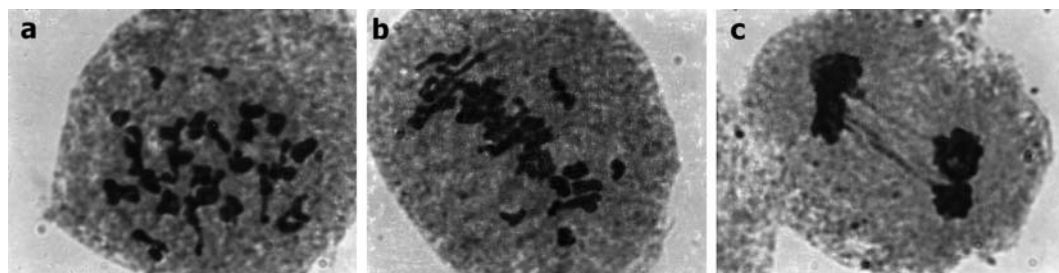
Citogenetsko-molekularna istraživanja

Pored unošenja poželjnih gena iz divljih vrsta u gajeni suncokret, u interspecies hibridizaciji unosi se i veliki broj nepoželjnih svojstava (grananje,

mali prečnik glave i dr.), zbog čega je potrebno izvesti povratna ukrštanja F_1 interspecies hibrida sa gajenim suncokretom. Citogenetske analize BC_1F_1 hibrida su pokazale visok procenat abnormalnosti u mejozi, pojavu aneuploida, biljaka sa različitim brojem hromozoma i smanjenu vitalnost polena (Atlagić & Škorić 1999). S druge strane, izvođenjem nekoliko povratnih ukrštanja sa gajenim suncokretom gube se i poželjni geni, zbog čega je potrebno analizirati prisustvo genoma divlje vrste u odnosu na genom gajenog suncokreta kod interspecies hibrida ne samo na citogenetskom (Sl. 4), već i na molekularnom nivou (Sl. 5) (Atlagić et al. 2003a).

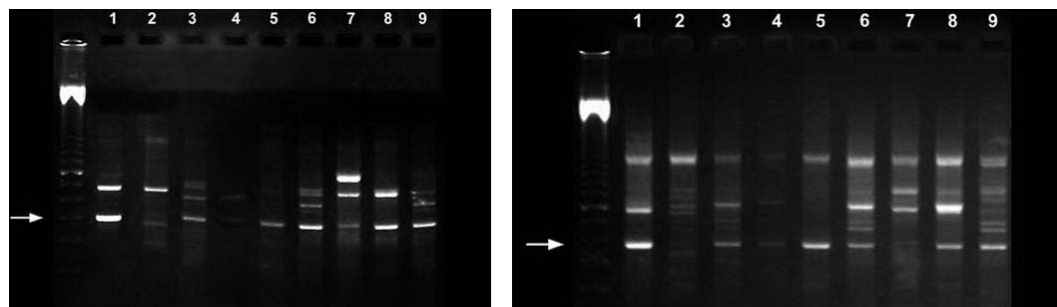
Citoplazmatska muška sterilnost kod suncokreta i uljane repice

Stvaranje hibrida suncokreta i uljane repice podrazumeva korišćenje postojećih ili stvaranje novih izvora citoplazmatske muške sterilnosti (CMS), kao i njihovo prenošenje u genotipove koji poseduju poželjne gene za agronomski važna svojstva. Muška sterilnost je definisana kao pojava da se kod biljaka u prašnicima ne formiraju vitalna polenova zrna. Ekspresija ovog



Slika 4. Citogenetske analize interspecies hibrida a) Dijakineza (bivalenti, univalenti, fragmenti); b) Metafaza I (izbegli hromozomi); c) Telofaza II (hromozomski mostovi)

Figure 4. Cytogenetic analysis of interspecific hybrids a) Diakinesis (bivalents, univalents and fragments), b) Metaphase I (fast chromosomes), c) Telophase II (chromosome bridges)



Slika 5. Molekularne analize interspecies hibrida – Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) fragmenti dobijeni amplifikacijom sa prajmerom UBC-39 i sa prajmerom UBC-43

Figure 5. Molecular analysis of interspecific hybrids - Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) fragments amplified with primers UBC-39 and UBC-43

svojstva varira od potpunog odsustva prašnika do slabo razvijenih antera, odnosno od odsustva polena do prisustva deformisanih ili normalno razvijenih polenovih zrna u anterama. CMS kod suncokreta i uljane repice je najčešće aloplazmatska i nastala je u interspecies ili intergenus ukrštanjima.

Svojstva CMS-a je analizirano pre svega na osnovu morfoloških razlika u građi cveta, razvijenosti antera i produkciji polena (muško fertilnog i muško sterilnog), procenta vitalnosti polena, kao i na osnovu pojave i pravilnosti toka pojedinih faza mejoze - mikrosporogeneze.

U najvećem broju slučajeva rezultati analize morfologije muško sterilnog cveta ukazivali su na slabu razvijenost antera, samo ponekad su antere bile bolje razvijene, ali su bile prazne ili su sadržavale malu količinu deformisanih, sterilnih polenovih zrna.

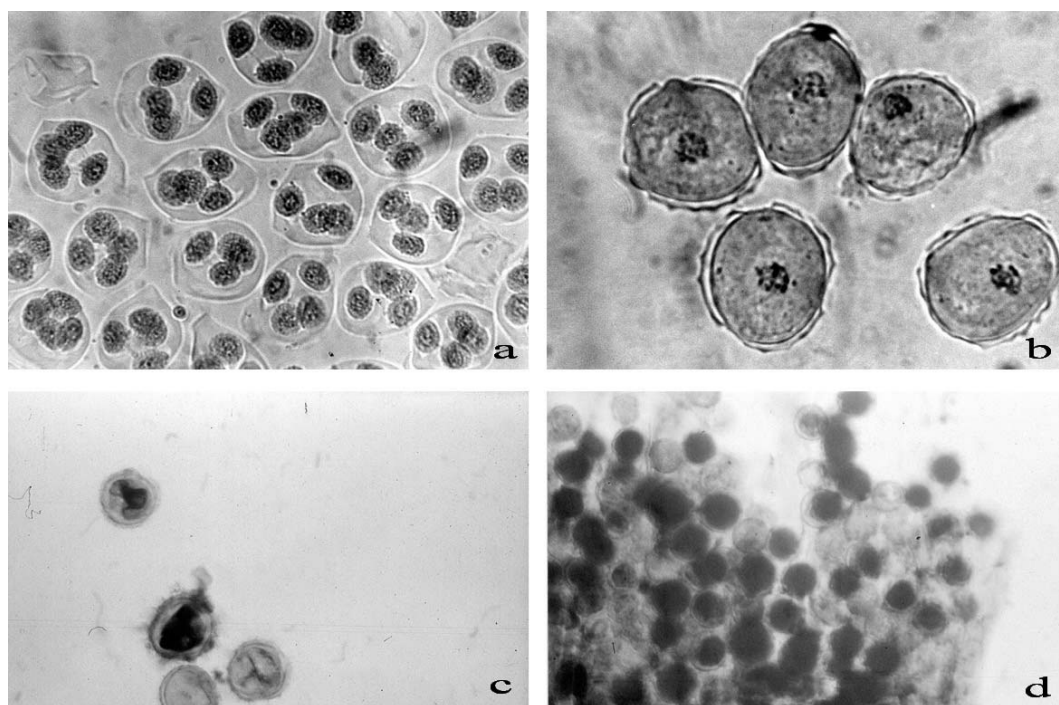
Kod muško fertilnih cvetova suncokreta i uljane repice mejoza se odvijala normalno kroz sve faze (pahiten, dijakineza, metafaza I, anafaza I, telofaza II), kao i postmejotskog deljenja do formiranja polenovog zrna (Sl. 7a). Kod CMS biljaka u najvećem broju slučajeva mejoza je proticala normalno (jedino je bio manji broj mejocita u deobi nego kod muško fertilnih bi-

ljaka), dok je postmejotsko deljenje izostajalo. Najčešća faza prekida u mikrosporogenezi je bila faza tetrada (Sl. 6a), a samo ponekad i ranije, kasne faze mejoze. Takođe se vrlo retko dešavalo da su rezultat mikrosporogeneze bile deformisane mikrospre (Sl. 6b i 7b) ili sterilna polenova zrna.

Preko 70 CMS izvora je identifikovano u potomstvima ukrštanja između divljih vrsta i gajenog suncokreta, za 34 su nađeni geni za restauraciju fertilnosti, a način nasleđivanja restauracije za 19 CMS (Seriyes 2002).

Citoplazmatsku mušku sterilnost dobijenu u interspecies ukrštanju *H. petiolaris* i *H. annuus* (Leclercq 1969) ispitivao je Paun (1974), koji je analizirao mejozu kod četiri sterilne linije, ali i njihovih fertilnih analoga. Kod fertilnih analoga mejoza je proticala normalno, dok je kod dve sterilne linije sporogeno tkivo degenerisalo još u premejotskom stadijumu, a kod druge dve je došlo do degeneracije posle faze tetrada. Autor pretpostavlja da je degeneracija uslovljena određenim enzimatskim reakcijama koje su rezultat inaktivacije mehanizama za sazrevanje polena.

Horner (1977) je koristio svetlosnu i elektronsku mikroskopiju radi poređenja mikrosporoge-



Slika 6. Mikrosporogeneza u muško sterilnom cvetu suncokreta, a) Tetrade, b) Mikroskore, c) Sterilna polenova zrna, d) Antera sa sterilnim polenom

Figure 6. Microsporogenesis in male sterile flower of sunflower a) Tetrads; b) Microspores, c) Sterile pollen grains, d) Anthers with sterile pollen grains

neze kod fertile linije HA232 i njenog sterilnog analoga sa izvorom CMS - PET 1. Prvenstveno je posmatrao razvoj antera i sporogenog tkiva, a zatim hromozome. Autor je mikrosporogenezu podelio u 11 faza, gde su faze 1-4 do tetrada, a od 5-11 od tetrada do zrelog polena. Sterilni i fertilni analozi se ne razlikuju u mikrosporogenezi do faze 5. Promene koje se dešavaju u tapetumu i tetradama rezultiraju u sterilnosti. Izduživanje i degeneracija ćelija tapetuma na kraju 5. faze izaziva degeneraciju mikrospora u tetradama.

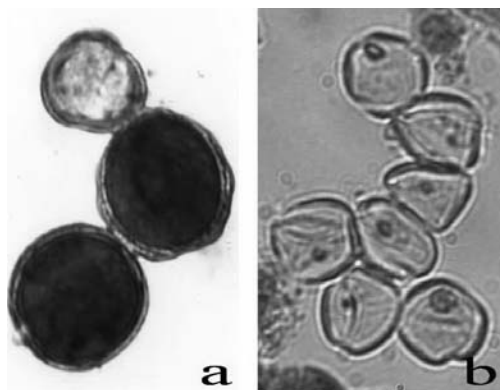
Stabilnost pet izvora CMS-a (PET-1, PET-2, MAX-1, GIG-1, ANN-6) izučavana je pri unošenju u inbred liniju HA-89, kao i izvora CMS-a PET-1, PET-2, ANN-5, ANN-44, ANN-164 pri unošenju u inbred linije novosadske selekcije (L-1, L-98, L-74 i L-22). Citogenetske analize su pokazale da su antere kod nekih izvora normalno razvijene, dok su kod drugih rudimentirane. Mikrosporogenezu je u najvećem broju slučajeva bila prekinuta u fazi tetrada (Sl. 6a). Kod nekih izvora u anterama su bila zapažena polenova zrna, deformisana i sterilna (Sl. 6c, d) (Atlagić et al. 1996).

Takođe je utvrđeno da su izvori CMS-a GIG-1 i PET-2 nestabilni (vitalnost polena je bila 10,42% i 1-63,43%) (Atlagić et al. 1996).

Potencijalni izvori CMS-a (interspecies hibridi sa šest populacija *H. annuus* i jednom populacijom *H. petiolaris*) bili su citogenetski izučavani. Sve biljke u BC₁F₁ generaciji su bile muško sterilne. Razlike su postojale u razvijenosti antera i prisustvu pojedinih faza mejoze (Atlagić & Marinković 1998).

U novosadskom oplemenjivačkom programu izučavanje CMS-a uljane repice obuhvatalo je korišćenje metoda citogenetskih istraživanja, pre svega za analizu mejoze i vitalnosti polena kod: 1. potomstva iz samooplodnje biljaka hibrida uljane repice (Atlagić et al. 2003b); 2. inbred linije u sterilnoj formi; 3. potomstva povratnih ukrštanja između izdvojenih steril-

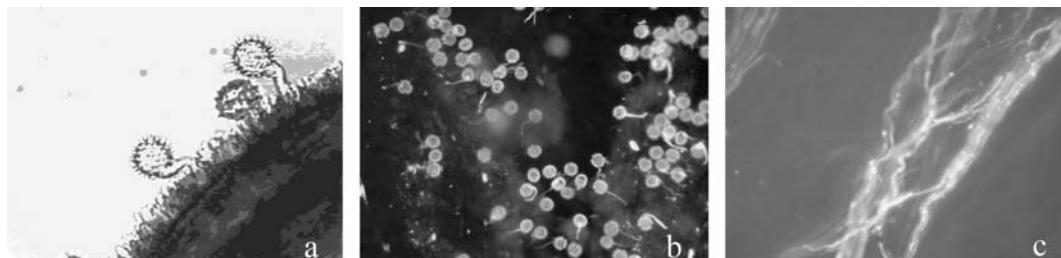
nih biljaka i sorti održivača; 4. različitih tipova CMS-a unetih u inbred linije iz novosadskog oplemenjivačkog programa (Atlagić et al. 2007).



Slika 7. a) Polen muško-fertilnog cveta; b) Deformisane mikrospore muško-sterilnog cveta
Figure 7. a) Pollen grains in male fertile flower; b) Deformed microspores in male sterile flower

Oplodnja

Kao kod većine biljnih vrsta, oplodnja kod suncokreta je vrlo kompleksan i osjetljiv proces, a izučavana je u smislu razdvajanja prezigotne i postzigotne inkompatibilnosti u interspecies ukrštanjima, kao i u izboru roditeljskih parova kod stvaranja hibrida suncokreta. Podaci o vitalnosti polena dobijeni bojenom metodom bili su indicacija potencijala za oplodnju, što je relativna ocena, te je tražen metod koji će biti bliži *in vivo* uslovima. Metod fluorescentne mikroskopije omogućuje praćenje klijanja polena na žigu i rasta polenovih tuba kroz stubić i plodnik do embrionove kese (jajne ćelije), već nekoliko sati nakon oprašivanja (Sl. 8). Ocena dobijena fluorescentnom mikroskopijom predstavlja sigurnu procenu potencijala za oplodnju.



Slika 8. Oplodnja a) Klijanje polena na žigu (svetlosni mikroskop); b) Klijanje polena na žigu (fluorescentni mikroskop); c) Rast polenove tube kroz stubić (fluorescentni mikroskop)
Figure 8. Fertilization a) Pollen grain germination on stigma (light microscope); b) Pollen germination on stigma (fluorescent microscope); c) Pollen tube growth through the style (fluorescent microscope)

Literatura

- Atlagić J (1989): Citogenetika suncokreta, U: Škorić D i dr, Suncokret. Nolit, Beograd, 231-258
- Atlagić J (1990): Pollen fertility in some *Helianthus* L. species and their F₁ hybrids with the cultivated sunflower. *Helia* 13: 47-54
- Atlagić J (1991): Karakteristike mejoze i fertilitnosti biljaka F₁ interspecies hibrida suncokreta. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet.
- Atlagić J (1994): Mogućnost korišćenja tetraploidnih vrsta roda *Helianthus* L. u oplemenjivanju suncokreta. Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo 22: 463-473
- Atlagić J (1996): Cytogenetic studies in hexaploid *Helianthus* species and their F₁ hybrids with cultivated sunflower, *H. annuus*. *Plant Breed.* 115: 257-260
- Atlagić J (2004): Roles of interspecific hybridization and cytogenetic studies in sunflower breeding. *Helia* 27: 1-24
- Atlagić J, Marinković R (1998): Cytogenetic study of potential sources of cytoplasmic male sterility in sunflower. Proceedings of 2nd Balkan Symposium on Field Crops, 16-20 June, Novi Sad, Yugoslavia, Vol. 1, 365-368
- Atlagić J, Škorić D (1999): Cytogenetic study of *Helianthus laevigatus* and its F₁ and BC₁F₁ hybrids with the cultivated sunflower, *H. annuus*. *Plant Breed.* 118: 555-559
- Atlagić J, Dozet B, Škorić D (1992): Chromosome number ploidy level in some perennial species of the genus *Helianthus* L. Proc. of the 13th International Sunflower Conference, 8-10. Septem. 1992., Pisa, Italy, 1349-1356
- Atlagić J, Dozet B, Škorić D (1993): Meiosis and pollen viability in *H. tuberosus* L. and its hybrids with cultivated sunflower. *Plant Breed.* 111: 318-324
- Atlagić J, Dozet B, Škorić D (1995): Meiosis and pollen grain viability in *Helianthus mollis*, *Helianthus salicifolius*, *Helianthus maximiliani* and their F₁ hybrids with cultivated sunflower. *Euphytica* 81: 259-263
- Atlagić J, Škorić D, Marinković R (1996): Cytogenetic study of different sources of CMS in sunflower. Proc. of 14th Inter. Sunf. Conf., 12-20 June 1996, Beijing/Shenyang, China, 156-162
- Atlagić J, Panković D, Pekanović A (2003a): Backcrosses in interspecific hybridization in sunflower. *Genet.* 35: 187-199
- Atlagić J, Marjanović-Jeromela A, Marinković R, Škorić D (2003b): Cytogenetic study of CMS in rapeseed genotypes at the Novi Sad breeding center. Proc. of the 11th International Rapeseed Congress, 6-10 July 2003, Copenhagen, Denmark, 336-339
- Atlagić J, Terzić S, Škorić D, Marinković R, Vasiljević Lj, Panković-Sačić D (2006): The wild sunflower collection in Novi Sad. *Helia* 29: 55-64
- Atlagić J, Marjanović-Jeromela A, Marinković R, Terzić S (2007): Cytogenetic studies of cytoplasmic male sterility in rapeseed. Proceedings of the 12th International Rapeseed Congress, March 26-30, Wuhan, China, I, 66-70
- Chandler J M, Jan C C, Beard H (1986): Chromosomal differentiation among the annual *Helianthus* sp. *Syst. Bot.* 11: 354-371
- Georgieva-Todorova J (1976): Interspecies relationships in the genus *Helianthus* (in Bulgarian). Bulgarian Academy of Sciences, Sofia
- Georgieva-Todorova J (1990): Genetic and cytogenetic investigation of the genus *Helianthus* L. (in Bulgarian). Bulgarian Academy of Sciences, Sofia
- Horner H T (1977): A comparative light- and electron microscopic study of microsporogenesis in male fertile and cytoplasmic male-sterile sunflower (*Helianthus annuus*). *Am. J. Bot.* 64: 745-759
- Leclercq P (1969): Une sterilité cytoplasmique chez le tournesol. *Ann. Amélior. Plantes* 19: 99-106
- Jan C C (1997): Cytology and interspecific hybridization. In: Schneider A A et al. (ed.), *Sunflower technology and production*. Agron. Monogr. 35. ASA, CSSA and SSSA, Madison, WI, 497-558
- Jan C C, Seiler G J (2007): Sunflower. In: Singh R J (ed.), *Genetics resources, chromosome engineering, and crop improvement*, Volume 4, Oilseed crops, CRC Press, Taylor and Francis Group, New York, 103-165
- Paun L (1974): The cytologic mechanism of male sterility in sunflower. Proc. of 6th Inter. Sunfl. Conf., 22-24 July, Bucharest, Romania, 249-257
- Prakash S, Chopra VL (1999): Eighty years of Brassica cytogenetics. Proc. 10th Int. Rapeseed Congress, Canberra, Australia
- Schilling E E, Heiser Ch B (1981): Infrageneric classification of *Helianthus* (*Compositae*). *Taxon* 30: 393-403
- Serieys H (2002): Identification, study and utilization in breeding programs of new cms sources. Progress report 1999-2001. Technical FAO Meeting and a GRESO Meeting 7-9 October, Montpellier, France, 1-54
- Terzić S (2006): Mogućnosti korišćenja divljih vrsta roda *Helianthus* u oplemenjivanju gajenog suncokreta. Magistarski rad. Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet

Significance of Cytogenetic Research in Sunflower and Rapeseed Breeding

Jovanka Atlagić · Sreten Terzić · Ana Marjanović-Jeromela · Radovan Marinković

Institute of Field and Vegetable Crops, Maksima Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Serbia

Summary: Cytogenetic research of sunflower and rapeseed has a century long tradition. Chromosome number and morphology were studied at first in species from the *Helianthus* and *Brassica* genera, and than their cytotaxonomy and phylogenesis. Cytogenetic research facilitated gene transfer from wild into cultivated species, *in vitro* plant growing, understanding and usage of cytoplasmic male sterility (CMS), fertility restoration, etc.

This paper describes various research aspects used in the cytogenetic laboratory of Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad, the results of which were used in sunflower and rapeseed breeding.

Key words: breeding, cytogenetic research, rapeseed, sunflower