

"Zbornik radova", Sveska 42, 2006.

### Pregledni rad - Review

## **DOPRINOS NAUKE U PROMENI GENETIČKE KONSTITUCIJE SORATA ŠEĆERNE REPE TOKOM ČETRDESET GODINA SEMINARA AGRONOMA**

*Kovačev, L., Čačić, N., Mezei, Snežana, Nagl, Nevena<sup>1</sup>*

### IZVOD

U proteklih četrdeset godina u vremenu trajanja seminara agronoma zahvaljujući rezultatima fundamentalne nauke mnogo češće nego kod drugih gajenih biljaka kod šećerne repe je nekoliko puta dolazilo do kompletne promene genetičke kompozicije gajenih sorti šećerne repe. Svaka promena dovela je do povećanja genetičkog potencijala rodnosti za najvažnije kvantitativne karakteristike ili do povećanja ekonomičnosti i profitabilnosti proizvodnje. Oplemenjivanje šećerne repe u Naučnom institutu za ratarstvo i povrtarstvo je uglavnom vrlo efikasno pratilo evropske i svetske trendove u smislu stvaranja sorti koje po svojim karakteristikama nisu zaostajale za sortama multinacionalnih kompanija. U zadnjih nekoliko dekada povećanje potencijala rodnosti koje se duguje isključivo poboljšanom genotipu iznosi 2% godišnje što predstavlja nesumnjivo veliki uspeh genetičara i oplemenjivača šećerne repe.

KLJUČNE REČI: šećerna repa, oplemenjivanje, prinos, monogermnost, triploidi, rizomanija, *in vitro*, transformacije

### Uvod

Svakim danom sve veća populacija ljudi na našoj planeti nameće potrebu za sve većom proizvodnjom hrane. Najcelishodniji i najekonomičniji način povećanja prinosa a samim tim i ukupne proizvodnje je povećanje genetičkog potencijala rodnosti gajenih biljaka korišćenjem rezultata naučno-istraživačke delatnosti.

Smatra se da je šećerna repa *Beta vulgaris* L. jedna od najproduktivnijih gajenih biljaka u severnim agroekološkim uslovima gajenja Fisher (1989) i da ju je u pravom

---

<sup>1</sup> Dr Lazar Kovačev, naučni savetnik, dr Nikola Čačić, naučni savetnik, dr Snežana Mezei, naučni savetnik, dr Nevena Nagl, naučni saradnik, Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

smislu te reči stvorila nauka. Ona je jedna od "najmlađih glavnih" gajenih biljaka koja se za proizvodnju šećera nije gajila u praistorijsko vreme. Istorijat gajenja i korišćenja šećerne repe za proizvodnju šećera datira od pre samo 250 godina.

Koristeći rezultate do kojih je došla fundamentalna ili primenjena nauka genetički potencijal rodosti kod šećerne repe višestruko je povećan. Prosečni prinosi koji se postižu današnjim hibridnim sortama ili hibridima veći su od onih koji su dobijani pre četrdesetak ili više godina. Ne zna se međutim koliko stvarno iznosi to povećanje a naročito koliki je deo tog povećanja uslovljen poboljšanim genotipom, koliki poboljšanom tehnologijom proizvodnje ili pak interakcijom genotip-tehnologija proizvodnje.

Mnogo češće nego kod drugih gajenih biljaka čak i u zadnjih četrdeset godina nekoliko puta je u potpunosti menjana genetička kompozicija gajenih sorti šećerne repe. Promene su uglavnom uslovljene zahtevima proizvođača i prerađivača za povećanje ekonomičnosti i profitabilnosti proizvodnje ili pak pojavom specifičnih bolesti šećerne repe koje su bukvalno dovele u pitanje proizvodnju šećerne repe u Evropi.

### Genetički resursi u oplemenjivanju šećerne repe

Imajući u vidu genezu nastanka i porekla šećerne repe može se konstatovati da ona ima vrlo usku genetičku osnovu, što može biti limitirajući faktor u stvaranju nove genetičke varijabilnosti a samim tim i novih, produktivnijih genotipova. Ali veliki broj divljih srodnika (tab 1.) korišteno je a i sada se vrlo intenzivno koriste kao izvori poželjnih gena uglavnom za otpornost prema bolestima, štetočinama ili nekim abiotičkim faktorima.

Tab.1. Broj bromozoma u genusu *Beta* (Coons 1975) i centri porekla

Tab.1. Number of chromosomes in genus *Beta* (Coons 1975) and centers of origin

Sekcija i vrsta Section and species	Broj hromozoma Number of chromosomes	Centar porekla Centre of origin
Section Vulgares: <i>Beta vulgaris</i> L., <i>Beta Maritima</i> L., <i>Betamacrocarpa</i> Guss., <i>Beta patula</i> Ait., <i>Beta ariplicifolia</i> , Rouy.,	18 18 18 18 18	Mediterean Sea North Africa West Europa
Section Ptelares: <i>Beta patellaris</i> Mog., <i>Beta procumens</i> Shr. Sm., <i>Beta webbiana</i> Mog.,	36 18 18	Canary islands Northwest Africa
Section Corollinae: <i>Beta macrorhiza</i> Stev., <i>Beta trigyna</i> Wald et Kit., <i>Beta foliosa</i> sensu Haussk., <i>Beta Lomatogona</i> Fisch et Mey., <i>Beta corolliflora</i> Loss.	18 36; 45; 54 18 18; 36 36	Near East
Section Nanae: <i>Beta nana</i> Bios. Et Held.	18	Greece

Većina divljih srodnika šećerne repe su ili "korovske" biljke ili imaju vrlo izraženu egzotičnu germplazmu te se ne mogu direktno koristiti u komercijalnom oplemenjivanju. Divlji srodnici se uglavnom koriste kao donori poželjnih gena, u proširenju genetičke varijabilnosti i u pribriđing programima. Većina vrsta u genu su Beta iako su po poreklu a pojedine vrste i broju hromozoma bliske imaju vrlo izražene genetičke barijere koje onemogućavaju lako ukrštanje i dobijanje hibridnog potomstva.

U budućnosti poboljšanje populacija ili komercijalnih hibridnih sorti neće se moći ostvariti bez valjanih i vrlo detaljnih informacija o dostupnim genetičkim resursima.

### Faktori koji su uslovlili promenu genetičke konstitucije gajenih sorti

Saznanja i korišćenje principa i zakonitosti do kojih je došla fundamentalna genetika, upravo u vreme početka održavanja seminara agronoma (1965) za samo 1-2 godine po prvi put došlo je do potpune promene genetičke konstitucije gajenih sorti šećerne repe Kovačev i sar. (1996).

Krajem 60-tih godina u oplemenjivanju šećerne repe intenzivno su korišćena dva fenomena - heterozis i poliploidija. Rad na stvaranju anizoploidnih sorti i triploidnih hibrida šećerne repe bio je u direktnoj vezi sa prevođenjem diploidnih genotipova ( $2x=18$ ) na tetraploidni nivo ( $4x=36$ ), (Mezei 1985). U to vreme najveći deo multigermskih tetraploida dobijen je dejstvom kolhicina, a koristili su se kao majčinska komponenta kod anizoploidnih sorti ili kao polinatori za sterilne diploide. Da bi se povećala produktivnost triploidnih hibrida korišćeni su monogermni tetraploidi kao majčinske komponente. Triploidi stvoreni ovim načinom u proseku su bili produktivniji od recipročnih triploida, onih koji su dobijeni sa diploidne majčinske komponente (Bosemark 1977, Smith i sar. 1979, Mezei i sar. 1996).

Fenomen poliploidije i otkriće da triploidi dobijeni ukrštanjem diploida i tetraploida po svojoj produktivnosti prevazilaze oba roditelja dovelo je do uvođenja u proizvodnju anizoploidnih multigermskih sorti šećerne repe (period 1965-1974), (tab. 2).

Tab.2. Distribucija prinosa korena šećerne repe u različitim periodima ostvarenja  
Tab.2. Distribution of sugar beet root yield in different periods

Prinos Yield t/ha	1955-1964	1965-1974	1975-1984	1985-1994	1995-2004	2005
10.1-20.0	+					
20.1-30.0	++++++			++	++++	
30.1-40.0	+++	+++++++		+++	+++	
40.1-50.0		+++	+++++++	+++++	+++	
50.1-60.0						+

Posle preko dvesta godina gajenja multigermskih diploidnih populacija šećerne repe one su izbačene iz proizvodnje i njihovo mesto zauzele su

produktivnije i otpornije prema bolestima multigermsne anizoploidne sorte šećerne repe. U Novom Sadu se od samog početka radilo na stvaranju anizoploidnih sorti normalnog i šećernatog tipa. Za relativno kratko vreme stvoreno je nekoliko sorata koje su po svojoj produktivnosti bile na nivou ili bolje od najrasprostranjenijih inostranih sorti (tab.3).

Tab. 3. Kvantitativne osobine multigermsnih anizoploidnih hibridnih sorti u dvogodišnjim ispitivanjima

Tab. 3. Quantitative traits of multigerm anisoploid varieties in two-year trials

Sorta Variety	Prinos korena Root yield t/ha	Sadržaj šećera Sugar percentage %	Prinos šećera Sugar yield t/ha
KW-Cercopoly	55.5	17.25	9.56
Polyrave	64.5	15.44	9.96
Hilleshog poly	59.4	15.89	9.45
KW-Polybeta	59.6	16.46	9.81
Polyx	58.5	16.28	9.53
Polanowici tri tetra	57.9	17.35	10.05
Beta-poly-3	57.8	16.51	9.55
Maribo poly st.	57.4	16.71	9.82
Aleksinac poly-1	56.5	17.14	9.68
Novi Sad poly-1	52.8	17.90	9.45
Novi Sad poly-2	56.2	17.33	9.75
Novi Sad poly-3	55.6	17.32	9.57
Osijek poly-1	54.4	17.91	9.74
Aleksinac poly-2	53.8	17.53	9.43
Aleksinac-N	51.0	16.94	8.64

Iako su po produktivnosti zadovoljavale kako proizvođače tako i prerađivače brza promena pravca oplemenjivanja, pronalazak monogermnosti dovodi da se krajem šezdesetih i početkom sedamdesetih godina kod nas uvode genetički monogermne sorte anizoploidnog tipa. Međutim za kratko vreme i ove sorte bivaju zemenjene prvo stranim a kasije domaćim monogermnih triploidnim hibridnim sortama Kovačev i sar. (1992)

Tab.4. Kvantitativne osobine monogermnih triploidnih hibridnih sorti šećerne repe

Tab.4. Quantitative traits of monogerm triploid sugar beet hybrid varieties

Sorta Variety	Prinos korena Root yield t-ha		Sadržaj šećera Sugar content %		Prinos šećera Sugar yield t-ha
	t/ha	rank	%	rank	t/ha
Delta	64.50	1	16.11	3	9.103
Dana	61.79	2	16.21	1	8.737
Nomega	61.36	4	15.95	5	8.530
Neta	61.58	3	15.92	6	8.527
Nera	60.69	5	16.05	4	8.480
Neda	60.06	7	16.16	2	8.473
Standard	60.52	6	15.39	7	7.970

Triploidne hibridne sorte šećerne repe obeležile su proizvodnju od 1975-1984. god. kada se u svih deset godina prosečan prinos kretao od 40-50 t/ha (tab.1). U to vreme priznate su i prve novosadske hibridne sorte koje po produktivnosti nisu zaostajale za najboljim stranim (tab.4).

### Rizomanija i njen uticaj na promenu sorti šećerne repe

Sve veća rasprostranjenost i štetnost rizomanije u većini zemalja gde se gaji šećerna repa gde spada i Srbija dovela je u pitanje ekonomičnost gajenja ove industrijske biljke. Po svojoj destruktivnosti i promenama kod obolelih biljaka štetnosti koje izaziva i mogućnosti suzbijanja, rizomanija u ovom momentu predstavlja ekonomski najznačajnije obolenje šećerne repe.

Još jedna u nizu promena genetičke konstitucije sorata šećerne repe dogodila se upravo iz razloga pojave i veoma brzog širenja rizomanije. Od niza različitih mogućnosti suzbijanja u ovom momentu najefikasniji i ekonomski najprijateljniji način je stvaranje tolerantnih ili otpornih genotipova šećerne repe Kovačev i sar. (1997). Monogermne triploidne hibridne sorte i pored toga što su se odlikovale visokom produktivnošću za skoro sva proizvodna svojstva morale su biti zamenjene diploidnim hibridnim sortama prvo tolerantnim a kasnije otpornim prema ovom obolenju (tab. 5).

Tab.5. Kvantitativna svojstva monogermnih sorti tolerantnih i otpornih hibridnih prema rizomaniji u trogodišnjim sortnim ispitivanjima

Tab.5. Quantitative traits of monogerm varieties tolerant and resistant to rhizomania in three-year field trials

Sorta Variety	Priros korena Root yield t/ha	Sadržaj šećera Sugar content %	Prinos šećera Sugar yield t/ha
Sara	77.0	14.7	10.1
Lara	75.6	15.1	10.5
Drena	77.6	14.8	10.4
Darija	76.9	14.5	10.1
Irina	81.3	14.1	11.4
Mara	67.3	13.6	10.0
St. otporan	75.8	14.5	8.8
St. osetljiv	64.5	13.7	-

Kao posledica izuzetnog napretka molekularne biologije i genetike, u poslednjih nekoliko decenija je razvijen niz metoda koji su obuhvaćeni nazivom **agro-biotehnologija** i podrazumevaju skup tehnika koje se koriste za stvaranje, poboljšavanje ili modifikaciju biljaka, životinja i mikroorganizama. Jedan od najznačajnijih agro-biotehnoških metoda su **genetske transformacije**, koje predstavljaju proces unošenja, eliminacije ili modifikacije gena nekog živog organizma. Kao rezultat transformacija dobijaju se genetski modifikovani organizmi (**GMO**). Genetske transformacije se već skoro dve decenije koriste za poboljšavanje mnogih gajenih biljaka, uključujući tu i šećernu repu, uglavnom

radi prevazilaženja problema koji se nisu mogli prevazići primenom standardnih agrotehničkih i agrohemijskih mera. Geni koji se na ovaj način unose u šećernu repu najčešće imaju za cilj da olakšaju njeno gajenje (otpornost na herbicide), izmene ili povećaju prinos (sinteza fruktana, povećanje broja sprovodnih sudova) ili unesu novu otpornost (na rizomaniju, nematode).

### **Primena kulture tkiva u oplemenjivanju šećerne repe**

Vegetativno umnožavanje *in vitro* početkom osamdesetih godina našlo je svoje mesto u programu oplemenjivanja šećerne repe. Od pojedinačne individue iste muško sterilne linije delovanjem malih doza citokinina, kroz nekoliko subkultivacija, stvoreni su identični klonovi. Rezultati Hussey i Hepher iz 1978 ukazuju na mogućnosti mikropropagacije kod šećerne repe. Članice klona su genetski stabilne, jer su nastale stimulacijom aksilarnih pupoljaka koji vode poreklo iz meristemskog tkiva vegetacijskog vrška i ne dolazi do varijabilnosti unutar genotipa. Ovako nastale linije korištene su u ispitivanju kombinacionih sposobnosti polinatora, jer sve razlike u testu koje se jave mogu da se pripisu isključivo oprašivaču, (Mezei i sar. 1983). Razmnožavanje *in vitro* stvaranjem identičnih genotipova primenjeno je u oplemenjivačkom radu gde se koristi izrazito stranooplodni materijal na kome je teško dobiti homozigote, a takođe i kod održavanja autosterilnih genotipova u ne izmenjenom stanju, (Mezei i sar. 1987). Vegetativna propagacija *in vitro* kod šećerne repe nalazi svoje mesto u programima oplemenjivanja, jer omogućuje da se izbegne segregacija i genetičko razdvajanje tokom procesa samooplodnje, (Atanasov 1980, Saunders 1982, Mezei 1992, Mezei i Kovačev 1996). U narednom periodu, istraživanja su obuhvatila rad na eksplantatima poreklom iz semenske generacije. Stvorene su stabilne klonске populacije stimulacijom aksilarnih pupoljaka sa pojedinačnih cvetova, delova cvetnog stabla i delova cvasti u različitim fazama ontogenetskog razvića, (Mezei i sar. 1990). Zahvaljujući spoznaji da se u *in vitro* uslovima može sa uspehom zadržati morfogenski potencijal za regeneraciju kod genotipova šećerne repe, danas primenjujemo metod, kojim se poboljšana populacija oprašivača dobijena *in vitro*, koristi u programu rekurentne selekcije, (Mezei i sar. 2000).

Veoma aktuelna tema za istraživanja u ratarstvu u proteklom periodu bila je mogućnost dobijanja haploida androgenozom ili ginogenozom. Kod šećerne repe dobri rezultati ostvareni su kulturom neoplođenog semenog zametka (Hosemans i Bossoutrot 1983). U našim istraživanjima eksplantati su uzimani iz F1 generacije. Dobijene su optimalne koncentracije i odnosi auksina i citokinina u podlozi. Za dalji rad odabrana je podloga koja je dala u nekoliko ispitivanih godina najveći procenat haploida (9,5  $\mu$ M NAA + 4,4  $\mu$ M BA). Obzirom da se haploidi praktično ne mogu koristiti u oplemenjivanju indukovani su dihaploidi *in vitro*. Oni su imbred linije, potpuni homozigoti na sve alelne gene koje sadrže. Na osnovu zakona citogenetike za očekivati je bilo da budu diploidi sa 18 hromozoma, sposobni za normalni rast i razmnožavanje. Međutim u našim ispitivanjima prilikom gajenja u polju zapaženo je zaostajanje u porastu osetljivost na bolesti, slabo razvijeno cvetno stablo i smanjena fertilitnost. Takođe na osnovu polimorfizma nekih enzimskih pokazatelja dobijeni su rezultati gde su analizirane

biljke bile homozigoti za ispitivane lokuse, ali je došlo do promena u alelima ovih lokusa (Zlokolica i sar., 1994). Iz ovih razloga do danas se ne koriste u stvaranju inbred linija šećerne repe.

U genetskim istraživanjima veoma često se postavlja za cilj povećanje varijabilnosti u oplemenjivačkom materijalu. Početkom devedesetih godina vršeno je niz istraživanja na kalusima koji su vodili poreklo sa različitog selekcionog materijala. Organogenezom iz kalusa dobijeni su regeneranti, (Mezei i Kovačev 1992). Do danas nije dat konačan odgovor na to čime je stimulirana jedna ćelija iz grupe ćelija šećerne repe da izrazi totipotenciju, a grupe ćelija pored nje nisu imale tu sposobnost. Morfogenezna *in vitro* je veoma kompleksan razvojni proces u kome se dešava niz promena na nivou ćelije. Iako je cilj bio da se dobije univerzalni protokol za regeneraciju iz kalusnih tkiva nalik protokolu za vegetativno umnožavanje šećerne repe, to nije postignuto. Potvrđeno je postojanje somaklonske varijabilnosti, genetička nestabilnost na nivou genotipa i na nivou hromozoma, ali mehanizam pomoću koga je moguće dovesti ćelije u kompletno stanje da reaguju regeneracijom i samim tim daju niz heterogenih, heterozigotnih potomaka, iz mase kalusnih ćelija nije dobijen. Utvrđeno je da ogroman broj faktora utiče na organogene procese, a samo neki od njih su: odnos i izbor fitohormona, temperatura, osvetljenje, izbor genetičkog materijala za indukciju kalusa i drugi. Ako se osvrnemo na objašnjenje uticaja genotipa i genetske konstitucije na regeneraciju iz kalusa možemo da pođemo od dve pretpostavke: da genotip ima prevashodni uticaj bez obzira na njegovu genetsku konstituciju, ili je genetička konstitucija ta koja je od bitnog značaja za regeneracione procese. Rezultati naših istraživanja u tom periodu pokazuju da je bolja regeneracija postignuta iz populacije i F1 trolinijskih hibrida, što navodi na zaključak da ako imamo široku genetsku osnovu lakše će se izdvojiti ćelije koje će se u jednom momentu diferencirati i ispoljiti totipotenciju.

### Transformacija šećerne repe

Iako istraživanja na transformaciji šećerne repe traju više od decenije (Lindsey i Gallois, 1990; Lindsey i sar., 1991), rezultati još uvek nisu doveli do razvoja efikasnog metoda transformacije, koji bi se mogao primeniti na različite genotipove i vektore za transformaciju.

Transformacija repe indirektnim putem, odnosno pomoću bakterija iz roda *Agrobacterium* je do sada dala polovične rezultate: dobijanje transgenih korenova nakon transformacije pomoću vrste *Agrobacterium rhizogenes* (Kifle i sar., 1999; Menzel i sar., 2003) je već razvijeno kao standardna metoda, koja, na žalost, ima samo akademski značaj, jer regeneracija biljaka iz transgenih korenova još nije postignuta. Transformacija pomoću vrste *Agrobacterium tumefaciens* je do sada rezultirala veoma niskim procentom regeneracije transgenih biljaka ili njihovim potpunim odsustvom, bez obzira na to da li su kao eksplantati korišćeni kotiledoni i hipokotil (Jacq i sar., 1993; Mannerloef i sar., 1997), prelazna zona hipokotila i kotiledona (Krens i sar. 1996) ili organogeni i embriogeni kalus (Zhang, 1998). Ako se ima na umu da je *A. tumefaciens* u stanju da proдре u tkivo repe (Krens i sar., 1988), najverovatnije objašnjenje za slab i neujednačen uspeh



ovog načina transformacije bi bilo da je ugardnja T-DNK u genom repe, iz za sada nepoznatih razloga, veoma otežana.

I direktne metode transformacija su do sada pokazale raznolike, mada još uvek nezadovoljavajuće rezultate: prilikom transformacija bombardovanjem mikročesticama vršnog meristema (Mahn i sar., 1995) i ćelijske suspenzije (Ingersoll i sar., 1996) do regeneracije transformisanih biljaka nije došlo, dok je bombardovanje embriogenog kalusa (Snyder i sar., 1999) kod pojedinih genotipova dalo veći procenat regeneracije nego ostali metodi transformacije. Druga direktna metoda transformacije, pomoću polietilen glikola (PEG) je kod kulture protoplasta ćelija zatvaračica stoma (Hall i sar., 1996, Sevenier i sar., 1998) pokazala dobre rezultate i razvila se, uprkos znatne tehničke zahtevnosti, u za sada jedini poznat metod koji omogućuje transformaciju različitih genotipova i upotrebu raznovrsnih vektora za transformaciju.

### **Transgena otpornost na virus nekrotičnog žutila nerava repe (BNYVV) izazivača rizomanije**

Rad na stvaranju transgene otpornosti na rizomaniju započet je pokušajima unošenja gena za protein omotača BNYVV u šećernu repu, Objavljeni rezultati ovih istraživanja ukazivali su da je gen unešen u biljno tkivo, ali do regeneracije transegih biljaka nije došlo (Kallerhoff i sar., 1990; Ehlers i sar., 1991). Uspešan primer unošenja gena za protein omotača transformacijom sa *A. tumefaciens* objavljen je od strane kompanije PLANTA (Einbeck, Nemačka) (Mannerloef i sar., 1996).

U cilju stvaranja transgene repe koja bi u sebi nosila otpornost na BNYVV i herbicid glufosinat amonijum Zavod za šećernu repu, Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu, je pokrenuo projekat sa Agor BioInstitutom u Sofiji. Cilj projekta je bio stvaranje vektora za transformaciju koji bi u sebi imao oba željena svojstva i pokušaj stvaranja transgene šećerne repe.

Fragmenti koji sadrže gen za protein omotača BNYVV su izolovani pomoću PCR reakcije sa specifičnim prajmerima iz listova biljaka indikatora zaraženih ovim virusom. Sekvence dobijenih fragmenata (CPS i CPL) su upoređene sa postojećim sekvencama ovog gena u u bazama podataka, a zatim su fragmenti su unešeni u modifikovane vektore za transformaciju koji su sadržali gen za otpornost na glufosinat amonijum (pC3301M) i gen za otpornost na antibiotik higromicin (pC1304M) (Nagl i sar., 2005a). Vektori su nakon toga unešeni u *A. tumefaciens* te je njima izvršena transformacija model biljaka *Nicotiana excelsior*, *Nicotiana benthamiana* i duvana. Transformacije sa oba vektora su dovela do stvaranja transgenih biljaka, pri čemu se uneseno svojstvo prenelo i u sledeću generaciju. Znatno veću efikasnost je imao vektor pC1304M, sa genom otpornosti na higromicin kod svih ispitivanih model biljaka, dok je vektor pC3301M uspešno transformisao samo *Nicotiana excelsior* (Nagl i sar., 2005b).

Nakon transformacije model biljaka urađena je i transformacija aksilarnih pupoljaka šećerne repe, a primenjeni metod transformacije se zasnivao na sposobnosti repe da na podlozi sa citokininima formira u velikom broju (Miadema, 1982; Mezei i sar., 1983/4), što predstavlja osnovu metoda njene



vegetativne multiplikacije *in vitro*. Pošto ovo svojstvo, za razliku od regeneraci- one sposobnosti, nije vezano za genotip ili stepen ploidnosti, može da predstavlja dobru osnovu za razvoj metoda transformacije aksilarnog meristema, koji bi se sa lakoćom mogao primeniti na velikom broju genotipova. Procenat transformacije je bio izuzetno nizak, a za sada su dobijeni samo privremeni transformanti (Nagl, 2003). Navedeni rezultati su još uvek nedovoljni da bi se efikasnost predsta- vljenog metoda mogla sa sigurnošću proceniti, ali dobijanje makar i jednog privremenog transformanta ukazuje na eventualni potencijal koji bi on mogao imati.

### **Šta nas dalje čeka: koje su nam mogućnosti a koja ograničenja**

Kao i sve prognoze i ova se zasniva na pretpostavci da će se ulaganja u nauku u budućnosti povećati da će se održati i poboljšati uslovi proizvodnje i da će se genetički potencijal rodnosti iz godine u godinu stalno povećavati.

Kao što se zna, ni kod jedne vrste bilja nije postignut genetički limit visine prinosa. Koje i kakve genetičke promene na šećernoj repi treba izvršiti, i šta nam to u ovom momentu stoji na raspolaganju što će uticati na dalji uspeh i efikasnost selekcije, a da to do sada nije adekvatno i racionalno iskorišćeno.

Značajan faktor daljeg uspeha oplemenjivanja sa sigurnošću se može reći, predstavljajući raspoloživa nasledna osnova i postojanje efikasnih oplemenjivačkih metoda za identifikaciju superiornih genotipova, Kovačev i sar. (1989).

Mogućnosti daljeg povećanja genetičkog potencijala za najvažnije kvantita- tivne osobine kod šećerne repe može se odvijati kroz nekoliko osnovnih pravaca. Osvrnućemo se u najkraćim crtama na nekoliko najvažnijih.

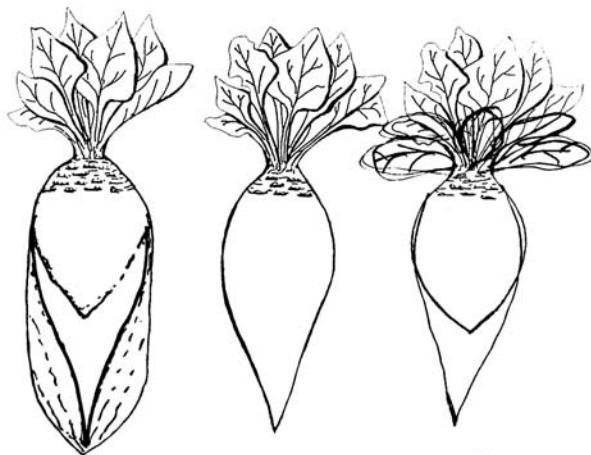
**Promena žetvenog indeksa.** Opšte je poznato da šećerna repa vrlo neraci- onalno obrazuje kako broj tako i površinu lista. Mišljenja pojedinih genetičara, oplemenjivača i biljnih fiziologa su, da se zadovoljavajući prinosi korena i sadržaj šećera mogu dobiti sa samo 3-5 pari listova. Ovakvom genetičkom transfor- macijom šećerne repe povećao bi se žetveni indeks, u korist akceptora asimilata. Ideja kao takva zaslužuje punu pažnju i takvi genotipovi su u ovom momentu već stvoreni, s napomenom da se mora voditi računa o otpornosti prema bolesti lista, jer oni genetički ne obnavljaju lisnu masu.

**Produženje perioda vegetacije.** Pošto na ekološke uslove veoma teško ili pak nikako ne možemo uticati, a prinos je upravo proporcionalan dužini vegeta- cije indirektnim putem, korišćenjem nekih genetičkih parametara, možemo pro- dužiti period vegetacije. Selekcijom takvih genotipova koji će klijati, nicati i razvijati se pri nižim temperaturama, u rano proleće, mogu se ostvariti dve prednosti, produženje vegetacije i alokmpetacija sa korovima.

**Izmena modela (idiotipa) šećerne repe.** Da bi se stvorile još bolje sorte i hibridi šećerne repe od postojećih, a to se može jer genetička granica maksimuma još ni kod jedne biljne vrste nije dostignuta mora se znati kakav će se model hibrida u budućnosti stvarati, u tom smislu mora se imati u vidu koren šećerne repe koji bi mogao da primi planirano povećanje proizvoda fotosinteze iz listova. Prilikom modeliranja, od značaja su ne samo osobine korena (veličina, oblik, težina) već i osobine njegovih ćelija.

Ali nije dovoljno samo modelirati kakav bi trebalo da bude fenotip, nužno je razraditi genetičku strukturu fenotipa a takođe definisati uslove spoljne sredine za koje će se hibridi stvarati, jer je opšte poznato da je fenotip rezultat realizacije genotipa, u uslovima spoljne sredine.

U ovom momentu u Institut za ratarstvo i povrtarstvo, u Zavodu za šećernu repu, egzistiraju tri različita modela (sl.1) na kojima se sa podjednakim intenzitetom, ne forsirajući ni jedan od njih radi.



*Sl.1. Mogući modeli hibrida šećerne repe*  
*Fig.1. Potential models of sugar beet hybrids*

Model sam za sebe nije dovoljan ako iza njega ne stoje određene prednosti u smislu povećanja potencijala rodnosti ili pak, poboljšana eknomičnost proizvodnje.

**Genetički inženjering.** Genetički inženjering, kao revolucionarno nova metoda, predstavlja fascinantno otkriće nauke i grandiozno saznanje ljudskog uma. Transfer gena, ili deova genoma, pomoću genetičkog inženjeringa, može dovesti do stvaranja programirane genetičke varijabilnosti, naročito kod prokariota. Ali istraživanja na nivou eukariota, kao kompleksnog organizma biljke, nisu i ne mogu biti uprošćene, jer se susrećemo s problemima identifikacije poželjnog gena njegovim transferom i načinom funkcionisanja u novom organizmu. Pored toga, ako se ta prepreka uspešno savlada, činjenica da su sve značajne agronomske osobine zbir delovanja velikog broja gena, koji su raspoređeni na delovima većeg broja hromozoma, u mnogome komplikuje i otežava direktnu primenu genetskog inženjeringa u oplemenjivanju. Izvesne tendencije koje fetišiziraju ulogu genetičkog inženjeringa, ističući da se s njim može sve rešiti, zapostavljaju činjenicu da se na ovom nivou znanja i razvoja genetički inženjering može ograničeno koristiti u stvaranju nove genetičke vrednosti ili direktno u oplemenjivanju bilja. Sasvim je sigurno da se dostignuća iz oblasti biljne biotehnologije moraju pomno pratiti, te da ni u kom slučaju te metode ne smeju zauzeti marginalne pozicije u naučnoj raspodeli.

## Ostvareni rezultati u oplemenjivanju šećerne repe

Najveća vrednost, a ujedno i rezultat sa kojim oplemenjivač može da se ponosi je stvoreni novi genotipovi ili priznata sorta u zemlji i inostranstvu. Iz tih razloga se kao značajniji naučni rezultati rada Zavoda za šećernu repu ističe bogat i plodonosan period u kome su u prethodnom nizu godina priznavane sve kvalitetnije i bolje hibridne sorte šećerne repe.

Tab.6. Priznate sorte i hibridi šećerne repe kod nas i u svetu (1992-2005)

Tab.6. Sugar beet hybrids and varieties approved in country and abroad (1992-2005)

Sorta Variety	Priznata Approved	Autori Authors
<b>A) U Srbiji (In Serbia)</b>		
Norma*	1992	P.Dokić, N. Čačić, M. Stojaković
Nomega*	1992	T.Sedlmayer, P.Dokić, M. Stojaković, N. Čačić,
Neta*	1993	T.Sedlmayer, M. Stojaković, P.Dokić, N. Čačić,
Delta*	1993	P.Dokić, T.Sedlmayer, M. Stojaković, L. Kovačev
Novita*	1994	P.Dokić, M. Stojaković, N. Čačić
NS-AI-926*	1996	Ž. Nikolić, I. Stančić, P.Dokić, N. Čačić, S.Đorđević, L. Kovačev, M. Stojaković
Dada*	1998	L. Kovačev, N. Čačić, Snežana Mezei
Crvenka mz*	1998	L. Kovačev, N. Čačić, P.Dokić, Snežana Mezei
Sara	2000	L. Kovačev, N. Čačić, Snežana Mezei
Anastasija*	2000	L. Kovačev, N. Čačić, Snežana Mezei
Vojvodanka*	2000	L. Kovačev, N. Čačić, Snežana Mezei
NS-AI-966*	2000	N. Čačić, L. Kovačev, Snežana Mezei, Ž. Nikolić, I. Stančić
Mara*	2001	L. Kovačev, N. Čačić, Snežana Mezei
Lara	2001	L. Kovačev, N. Čačić, Snežana Mezei, R.Jansen
Anisija*	2001	L. Kovačev, N. Čačić, Snežana Mezei
Bačka*	2001	L. Kovačev, N. Čačić, Snežana Mezei
Drena	2002	L. Kovačev, N. Čačić, Snežana Mezei
Mada*	2002	L. Kovačev, N. Čačić, Snežana Mezei
Darija	2004	L. Kovačev, N. Čačić, Snežana Mezei
Irina	2005	L. Kovačev, N. Čačić, Snežana Mezei
<b>B) U inostranstvu (Abroad)</b>		
1) Ukrajina (Ukraine)		
Slavjanski	1992	L. Kovačev, V.Bulin, I. Babijaš
Dana	1993	L. Kovačev, N. Čačić, Snežana Mezei
Sara	2002	L. Kovačev, N. Čačić, Snežana Mezei
2) Ruska federacija (Russia)		
NS-Hy-1	1996	L. Kovačev, N. Čačić, Snežana Mezei
3) Rumunija (Romania)		
Dana	1996	L. Kovačev, N. Čačić, Snežana Mezei
Poenta	1996	L. Kovačev, N. Čačić, Snežana Mezei
4) Slovenija (Slovenia)		
NS-Hy-11	2005	L. Kovačev, N. Čačić, Snežana Mezei

\*sorte koje se ne nalaze u proizvodnji

Međunarodna aktivnost je prvenstveno usmerena na razmenu selekcionog materijala i stvaranje zajedničkih hibrida sa vodećim svetskim kompanijama, koje rade u oblasti oplemenjivanja šećerne repe. Do danas se u sortnim komisijama nekoliko evropskih država nalazilo na ispitivanju veći broj triploidnih ili diplidnih hibridnih sorti šećerne repe. Najintenzivnija saradnja bila je sa KWS kompanijom i kao rezultat te saradnje priznate su tri monogermne, triploidne sorte šećerne repe pod nazivom Nomega, Neta, Delta. Monogermna diploidna hibridna sorta Lara priznata je 2001. godine i karakteriše se otpornošću prema rizomaniji i cercospori.

Takođe je u proteklih 5 godina sarađivano sa zemljama u tranziciji i to: Ruskom Federacijom, Ukrajinskim institutima, i institutima u Moldaviji. Osim razmene informacija ostvaren je timski rad na stvaranju zajedničkih hibrida šećerne repe, adaptiranih za određeno agroekološko područje.

Protekli period bio je karakterističan po solidnoj privrednoj saradnji ugalvnom sa bivšim istočno-evropskim zemljama. Prvi koraci u ovoj saradnji bili su stvaranje zajedničkih sorata i prijavljivanje ovih sorti šećerne repe sortnim komisijama. Zajedno sa prijavama postepeno se otpočelo s promocijskim tj. markentiškim nastupom u cilju uvođenja i približavanja institutskih kreacija stranim proizvođačima.

Prva zajednička sorta sa Ukrajinskim institutom za šećernu repu tj. Uladovskom selekcionom stanicom priznata je 1992. godine. Po svojoj prilici ovo je i prvo zajednička hibridna sorta Instituta sa nekom istočno Evropskom institucijom. Posle ovoga određen broj hibridnih sorti priznavan je i u drugim državama. U Ukrajini je 1993. godine priznata hibridna sorta Dana, u Rusiji je 1996. godine priznata hibridna sorta NS-Hy-1 a u Rumuniji 1999. dve sorte Dana i Poenta. U sortnoj komisiji Bugarske trogodišnja ispitivanja prošle su dve sorte Poenta i Vitara, a u sortnoj listi Slovenije registrovana je sorta NS-Hy-11.

## ZAKLJUČAK

U poslednje četiri dekade gajenja šećerne repe koristeći rezultate naučnih istraživanja permanentno se povećavao potencijal rodnosti pored vrlo česte promene genetičke konstitucije gajenih sorti.

Pošto ni kod jedne gajene biljke a samim tim i kod šećerne repe nije postignut genetički maksimum rodnosti, u budućnosti će se, ako je verovati zakonomernosti prošlosti i imajući u vidu veliki napredak u fundamentalnim istraživanjima, nesmetano nastaviti sa daljim povećanjem rodnosti za najvažnija kvantitativna svojstva. Pored ovoga ne mali napredak očekuje se i u povećanju otpornosti prema najznačajnijim bolestima i štetočinama

## LITERATURA

- Atanasov A.J. (1980): Method for Continuous bud Formation in Tissue Cultures of Sugar-Beet *Beta vulgaris*/ Z.Planzenzucht, 84, 23-29.
- Bosemark N.O. (1977): Use of mendelian male steriles in triploid hybrid-seed production. Proceeding Int. Inst. For Sugar Beet Res. 271-287.

- Ehlers U., Commandeur U., Frank R., Landsmann J., Koenig R. and Burgermeister W. (1991): Cloning of the coat protein gene from beet necrotic yellow vein virus and its expression in sugar beet hairy roots. *Theor.Appl.Genet.* 81: 777-782.
- Fischer, H.E. 1989: Origin of the "Weisse Schlesische Rude" (white Silesian beet) and resynthesis of sugar beet. *Euphytica* 41, 75-80.
- Hall R.D., Riksen-Bruinsma T., Weyens G.J., Rosquin I.J., Denys P.N., Evans I.J., Lathouwers J.E., Lefebvre M.C., Dunwell J.M., vanTunnen A. and Krens F.A. (1996): A high efficiency technique for the generation of transgenic sugar beets from stomatal guard cells. *Nature Biotechnol.* 14: 1133-1138.
- Hussey G. and A. Hopher (1978): Clonal propagation of sugarbeet plants and the formation of polyploids by tissue culture. *Ann. Bot.* 42, 477.
- Hosemans D., and Bossoutrot D. (1983): Induction of Haploid Plants from *in vitro* culture of unpollinated Beet Ovules (*Beta vulgaris* L.). *Z. Pflanzenzucht.* 91, 74-77.
- Ingersoll J.C., Heutte T.M. and Owen L.D. (1996): Effect of promoter-leader sequences on transient expression of reporter gene chimeras biolistically transferred into sugarbeet (*Beta vulgaris*) suspension cells. *Plant Cell Rep.* 15(11): 836-840.
- Jacq B., Lesobre O., Sangwan R.S. and Sangwan-Norreel B.S. (1993): Factors influencing T-DNA transfer in Agrobacterium-mediated transformation of sugarbeet. *Plant Cell Rep.* 12: 621-624.
- Kallerhoff J., Perez P., Bouzoubaa S., Ben Tahar S. and Perret J. (1990): Beet necrotic yellow vein virus coat protein-mediated protection in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Cell Rep.* 9:224-228.
- Kifle S., Shao M., Jung C. and Cai D. (1999): An improved transformation protocol for studying gene expression in hairy roots of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Cell Rep.* 18: 514-519.
- Kovačev L., 1989: Stremljenja u oplemenjivanju šećerne repe - pogled u budućnost. XXIV seminar agronoma. Poljoprivredni fakultet-Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad. "Zbornik radova" - Sveska 16, 183-190.
- Kovačev L., 1992: Sorta kao faktor povećanja prinosa šećerne repe. Poljoprivredni fakultet-Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad. "Zbornik radova" - Sveska 20, 193-201..
- Kovačev L., Čačić N. and Mezei Snežana, 1996: Germplasm in sugar beet breeding. *Genetika*, vol. 28, No.2, 73-78.
- Kovačev L., Čačić N., Mezei Snežana, 1996: Oplemenjivanje šećerne repe, stanje i perspektive. "Zbornik radova", sveska 25, p. 93-98.
- Kovačev L., Čačić N., Mezei Snežana, 1997: Mogućnosti genetike, oplemenjivanja i genetičkog inženjeringa u stvaranju otpornih genotipova šećerne repe prema Rizomaniji. "Zbornik radova", sveska 29, p. 485-493.
- Krens F.A., Zijlstra C., v.d. Molen W., Jamar D and Huizing H.J. (1988): Transformation and regeneration in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) induced by shooter mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. *Euphytica* 5: 185-194.
- Krens F.A., Trifonova A., Keizer L.C.P. and Hall R.D. (1996): The effect of exogenously-applied phytohormones on gene transfer efficiency in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Sci.* 116: 97-106.

- Lindsey K. and Gallois P. (1990): Transformation of Sugarbeet (*Beta vulgaris*) by *Agrobacterium tumefaciens*. J. Experiment. Bot. 226(41): 529-536.
- Lindsey K., Gallois P. and Eady C. (1991): Regeneration and transformation of sugarbeet by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Tiss. Culture Manual B7: 1-13.
- Mahn A., Matzk A., Sautter C. and Schiemann J. (1995): Transient gene expression in shoot apical meristems of sugarbeet seedlings after particle bombardment. J. Exp. Bot. 46(291): 1625-1628.
- Mannerloef M., Lennerfors B.-L. and Tenning P. (1996): Reduced titer of BNYVV in transgenic sugar beets expressing the BNYVV coat protein. Euphytica 90: 293-299.
- Mannerloef M., Tuvesson S., Steen P. and Tenning P. (1997): Transgenic sugar beet tolerant to glyphosate. Euphytica 94: 83-91.
- Menzel G., Harloff H.-J. and Jung C. (2003): Expression of bacterial poly (3-hydroxybutyrate) synthesis genes in hairy roots of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Appl. Microb. Biotechnol. 60: 571-576.
- Mezei S., Kovačev L. i Stojaković M. (1983/4): Mogućnosti vegetativnog razmnožavanja šećerne repe. Arhiv za polj. nauke 44 (156): 461-467.
- Mezei S., Kovačev L., Stojaković M. (1983): Mogućnosti vegetativnog razmnožavanja monogermnih linija šećerne repe. Arhiv za poljoprivredne nauke, 44, 156, 461-467.
- Mezei S., Kovačev L., Dokić P. (1987): Mikropropagacija šećerne repe u uslovima *in vitro*. Zbornik Matice Srpske za prirodne nauke, 72, 73-48.
- Mezei S., Jelaska S., and Kovačev L. (1990): Vegetative Propagation of Sugarbeet from Floral Ramets. Journal of Sugar Beet Research, 27, 3-4, 90-96.
- Mezei S. (1992): Biotehnološke metode u selekciji šećerne repe. Revijalni rad, Zbornik radova Institut za rat. i pov. Novi Sad, 20, 213-218.
- Mezei S. i Kovačev L. (1992): Regeneration of plants from callus tissue of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). Genetika, 24:3, 173-179.
- Mezei S. i Kovačev L. (1996): Primena novih tehnologija u oplemenjivanju šećerne repe. Revijalni rad, Zbornik radova Institut za rat. i pov. Novi Sad, 25, 99-107.
- Mezei S. i Kovačev L., Kuprešanin N., Čačić N., Mrkovački N. (1996): Effect of colchicine on some quantitative traits and technological parameters of sugar beet. Acta Agronomica Hungarica, vol.44(4) 1-6.
- Mezei S., Čačić N., Kovačev L., (2000): Mogućnost poboljšanja populacije oprašivača korišćenjem *in vitro* metoda. Selekcija i semenarstvo. VII, 1-2, 61-65.
- Mezei S. (1985): Efikasnost različitih metoda prevođenja diploidnih genotipova šećerne repe u tetraploide. Arhiv za polj. nauke, 46, 387-402.
- Miadema P. (1982): A tissue culture technique for vegetative propagation and low temperature preservation of *Beta vulgaris*. Euphytica 31: 635-643.
- Nagl N. (2003): Kloniranje vektora za transformaciju biljaka uvođenjem gena za protein omotača virusa izazivača rizomanije. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Beograd.
- Nagl N., Atanassov I., Roussanov K., Paunovich S., Atanassov A., Kovachev L. (2005): Construction of plant transformation vectors carrying Beet necrotic yellow vein virus coat protein gene (I) - Transformation vectors. Biotechnol. & Biotechnol. Eq. 19(2): 80-86.
- Nagl N., Atanassov I., Roussanov K., Paunovich S., Atanassov A., Kovachev L. (2005): Construction of plant transformation vectors carrying Beet necrotic



- yellow vein virus coat protein gene (II) - Plant transformation. *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 19(3): 39-45.
- Sevenier R., Hall R.D., v.d.Meer I.M., Hakkert H.J.C., v.Tunen A.J. and Koops A.J. (1998): High level fructan accumulation in a transgenic sugar beet. *Nature Biotech.* 16: 843-846.
- Smith G.A., Hecker R.J Martin S.S.(1979): Effect of ploidy level on components of sugarbeet. *Crop Sci.*19:319-323.
- Saunders J.W. (1982): A Flexible *in vitro* Shoot Culture Propagation System for Sugar Beet that Includes Rapid Floral Induction of Ramets. *Crop Sci.* 22, 1102-1105.
- Snyder G.W., Ingersoll J.C., Smigocki A.C. and Owens L.D. (1999): Introduction of pathogen defense genes and a cytokinin biosynthesis gene into sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by *Agrobacterium* or particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 18: 829-834.
- Zhang C.-L., Chen D.-F., Kubis S., McCormac A., Kubalaková M., Zhang J., Bao M.-Z., Scott N.W., Slater A., Heslop-Harrison J.S. and Elliot M.C. (1998): Improved procedures for transformation of sugar beet. *Proc. 61th IIRB Congress, Brussels, Belgium:* 381-389.
- Zlokolica M., Mezei S., Kovačev L. (1994): Genetic Variability in Haploids and Induced Dihaploids of Sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Jci.Agric.Research*, 56,198, 3-9.

**CONTRIBUTION OF SCIENCE IN CHANGES OF GENETIC  
CONSTITUTION OF SUGAR BEET VARIETIES DURING FOURTY  
YEARS OF AGRONOMISTS SEMNAR**

***Kovačev, L., Čačić, N., Mezei, Snežana, Nagl, Nevena***

Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad

**SUMMARY**

In the forty years of seminars of agronomists, the genetic composition of sugar beet hybrids and varieties has been completely changed, mainly due to development of different scientific methods. Every change lead to increase of genetic yield potential for important quantitative and qualitative traits, or improvement of efficiency and profitability of production. Sugar beet breeding in Institute of field and vegetative crops always managed to follow European and world trends, in order to create hybrid and varieties whose performance was equal to hybrids made by international companies. Increase in yield potential of 2% per year in the last few decades, is mostly due to genotype improvement, which presents huge success of scientists involved in sugar beet genetics and breeding.