

SELEKCIJA I SEMENARSTVO

Plant Breeding and Seed Production



NOVI SAD
XIV (2008)
BROJ 1-4

UDC: 631.52, 631.53.02 - ČASOPIS DRUŠTVA SELEKCIONARA I SEMENARA SRBIJE
YU ISSN 0354-5881

SELEKCIJA I SEMENARSTVO

Plant Breeding and Seed Production

**NOVI SAD
XIV (2008)
BROJ 1-4**

UDC: 631.52, 631.53.02 - ČASOPIS DRUŠTVA SELEKCIONARA I SEMENARA SRBIJE
YU ISSN 0354-5881

YU ISSN 0354-5881

Časopis društva selekcionara i semenara Srbije "Selekcija i semenarstvo"
Journal of the Serbian Association of Plant Breeders & Seed Producers "Plant breeding and Seed Production"

Izdavač: Društvo selekcionara i semenara Srbije

Uređivački odbor:
Editorial board:

Dr Mirjana Milošević
Dr Mladen Mirić
Dr Milanko Pavlović
Dr Zorica Tomić
Dr Vladimir V. Vešelovskij
Dr Kristina Tylkowska
Dr Bill Angus
Dr Steve Quarrie

Izdavački savet:

Prof. dr Miroslav Malešević (predsednik)
Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo,
Novi Sad
Dr Milutin Penčić
Institut za kukuruz "Zemun Polje"
Dr Slobodan Dražić,
Institut za lekovito bilje "Dr Josif Pančić"
Prof. dr Dušan Kovačević
Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun
Milivoj Radin,
"Banat seme", Zrenjanin
Dr Lazar Kovačev,
Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo,
Novi Sad
Mr Miroslav Dimić,
Narodna biblioteka Srbije

Urednik/Editor:

Prof. dr Srbislav Denčić

Sekretar/Secretary:

Mr Mirjana Srebrić

Časopis je štampan uz finansijsku pomoć Ministarstva nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije, naučnoistraživačkih organizacija, preduzeća koja se bave proizvodnjom i prometom semena i drugih poljoprivrednih proizvoda, kao i novčanim sredstvima od članarine.

Časopis je osnovan odlukom Upravnog odbora Društva selekcionara i semenara Srbije donetoj na Petoj sednici održanoj 12.07.1994. godine.

Adresa Društva: 11185 Beograd-Zemun, Slobodana Bajića 1; tel. 011/37-56-292;

<http://www.dsss.org.rs/>

Uslužni telefax: 011/37-54-993; žiro-račun: 245-0106182701024-73 Agrobanka.

Rešenjem Ministarstva za informacije Republike Srbije časopis "SELEKCIJA I SEMENARSTVO" upisan je u registar javnog informisanja pod rednim brojem 1754 od 28.09.1994. godine.

Časopis izlazi četiri puta godišnje ili kao dva dvobroja.
Journal is published four times yearly.

Prodaje se u pretplati za 2008. godinu;

Subscription price for 2008:

Za organizacije / For the organisations.....	3.000,00 din
Za pojedince / Individuals	300,00 din
Za inostrane pretplatnike / For the foreign subscriber	10 EUR

Uplate slati preko žiro računa Društva selekcionara i semenara: 245-0106182701024-73 Agrobanka sa naznakom za "SELEKCIJU I SEMENARSTVO"

Subscription be sent trough the bank account 40805-678-6-97902 ZOP Zemun, Serbia, with an indication "FOR PLANT BREEDING AND SEED PRODUCTION"

Tiraž: 350

Štampa:



feljton. Novi Sad
Stražilovska 17
Tel: 021/66-22-867

TOLERANTNOST GENOTIPOVA PŠENICE PREMA GLIFOSATU U KULTURI *IN VITRO*

PETROVIĆ KRISTINA, KONDIĆ-ŠPIKA ANKICA, JEVTIĆ R., KOBILJSKI B.¹, PUCAREVIĆ MIRA²

IZVOD: *Tolerantnost genotipova pšenice prema glifosatu ispitana je u in vitro kulturi embriona. Za izolaciju korišćeno je šest genotipova pšenice. Embrioni su inokulisani na modifikovanu MS podlogu, kojoj je glifosat dodat u tri koncentracije: I-2.4 g l⁻¹, II-4.8 g l⁻¹ i III-7.2 g l⁻¹. Kontrolna grupa embriona gajena je na podlozi bez herbicida. Posle mesec dana gajenja izmerena je sveža masa kalusa. Rezultati su pokazali da je prisustvo glifosata u podlozi izazvalo inhibiciju porasta kalusa kod svih genotipova. Međutim, genotipovi su se značajno razlikovali među sobom u pogledu reakcije na glifosat. Na najnižoj koncentraciji glifosata (I-2.4 g l⁻¹), genotip Lr-12 imao je najvišu redukciju sveže mase kalusa u odnosu na kontrolu (89.8%), dok je najnižu redukciju imao genotip NS 55-25 (74.5%). Više koncentracije glifosata imale su još jače inhibitorno dejstvo, kod svih genotipova. Rezultati su pokazali da je genotip NS 55-25 bio najtolerantniji, dok je genotip Vel bio najosetljiviji na prisustvo glifosata u podlozi.*

Ključne reči: *pšenica, herbicidi, tolerantnost, kultura embriona*

UVOD: Efikasna kontrola korova u proizvodnji gajenih biljaka jedan je od bitnih preduslova za postizanje visokih prinosa i dobrog kvaliteta. Danas postoji širok spektar veoma efikasnih herbicida, koji se primenjuju u cilju zaštite pšenice od korova, ali veoma često selektivnost ovih preparata je nedovoljna. Upravo iz tog razloga, jedan od značajnih ciljeva oplemenjivačkih programa jeste stvaranje genotipova tolerantnih prema postojećim efikasnim herbicidima nedovoljne selektivnosti. Pored konvencionalnih metoda oplemenjivanja, u ovu svrhu sve više se u praksi koriste biotehnoške metode, kao što su: *in vitro* kultura, mutageneza, genetički inženjering itd (Mulwa and Mwanza, 2006).

Glifosat je derivat fosfonata, koji je patentiran kao herbicid 1969. godine, a po prvi put je stavljen u promet 1971. godine. To je neselektivni, translokacioni herbicid širokog spektra delovanja. Upotrebljava se za suzbijanje višegodišnjih korovskih biljaka sa razvijenim rizomima, uključujući i šiblje i drvenaste biljke. Ispoljava toksično delovanje

na biljke inhibirajući sintezu aromatičnih aminokiselina, kao i enzima prenat dehidraze. Primenjuje se posle nicanja, a registrovan je za primenu u više od 50 gajenih biljaka, kao i za totalno uništavanje vegetacije nepoljoprivrednih površina (Janjić, 2005). Danas se smatra da glifosat učestvuje sa 15-20% u ukupnom prometu pesticida. Posle trodecenijske primene glifosata, njegova upotreba se stalno povećava, jer su stvorene transgene biljke, poznate pod nazivom Roundup ReadyTM (kukuruz, soja, lucerka, sirak, uljana repica i pamuk), koje se u SAD-u, Kanadi, Brazilu, Argentini i dr. zemljama sveta gaje na velikim površinama. Primena ovog totalnog herbicida u usevima transgenih biljaka potpuno je selektivna (James, 2003).

S obzirom na to da je gajenje GMO biljaka zabranjeno u EU, pa i u našoj zemlji, sva istraživanja na identifikaciji i stvaranju genotipova gajenih biljaka tolerantnih prema herbicidima, od velikog su značaja za poljoprivrednu proizvodnju. Iz tog razloga, u ovom radu ispitana je tolerantnost genotipova

Originalni naučni rad (Original scientific paper)

¹ Dipl. ing KRISTINA PETROVIĆ, istraživač-pripravnik, stina@metrohive.net, dr ANKICA KONDIĆ-ŠPIKA, naučni saradnik, dr RADIVOJE JEVTIĆ, naučni savetnik, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

² Dr PUCAREVIĆ MIRA, redovni prof., Fakultet zaštite životne sredine, EDUCONS, S. Kamenica, V. Putnika bb

pšenice prema glifosatu, u kulturi zigotnog embriona, s ciljem iznalaženja optimalne selektivne koncentracije za testiranje velikog broja genotipova, koji se koriste u oplemenjivačkim programima.

Materijal i metode

Za testiranje tolerantnosti prema glifosatu, slučajno je odabrano šest genotipova pšenice (*Triticum aestivum* L.): Lr-12, Durin, NS 55-25, Pobjeda, Florida i Vel.

Sterilizacija i izolacija embriona vršena je po ranije opisanoj proceduri (Kondić i Šesek, 1998). Embrioni su inokulisani na modifikovanu MS (Murashige and Skoogu, 1962) hranljivu podlogu, u koju je glifosat dodat u tri različite koncentracije. Prva koncentracija (I) predstavlja standardnu dozu, koja se najčešće koristi za tretiranje u polju. U zavisnosti od vrste korova, glifosat se primenjuje u količini 1-5.4kg/ha. Druge dve koncentracije preračunate su kao dvostruka (II) i trostruka (III) standardna doza. U ovom istraživanju korišćene su sledeće koncentracije aktivne materije herbicida, tehničke čistoće 95%: I-2.4 gl⁻¹, II-4.8 gl⁻¹ i III-7.2 gl⁻¹. Kontrolna grupa embriona gajena je na podlozi bez herbicida.

Ogled je postavljen po slučajnom blok-sistemu, u 5 ponavljanja. Svako ponavljanje činila je jedna epruveta sa dva izolovana embriona.

Nakon 30 dana gajenja merena je sveža masa kalusa. Na osnovu ovih podataka preračunata je redukcija sveže mase kalusa na pojedinim koncentracijama glifosata, u odnosu na kontrolu i izražena u procentima. Dobijeni podaci statistički su obrađeni u programu STATISTICA 7.0.

Rezultati i diskusija

Rezultati merenja sveže mase kalusa pšenice pokazali su da je prisustvo glifosata u hranljivoj podlozi imalo inhibitoran efekat na porast kalusnog tkiva, pri svim ispitivanim koncentracijama (tab. 1). Uočava se da je inhibicija porasta kalusa bila veoma izražena već pri prvom tretmanu (I-2.4 gl⁻¹ glifosata), koji predstavlja preračunatu standardnu koncentraciju preparata, koja se koristi za tretiranje u polju. Na ovoj koncentraciji sveža masa kalusa kretala se od 1.9 mg (Lr-12), do 18.0 mg (Vel). Sa porastom koncentracije herbicida u podlozi, pojačava se i njegovo inhibitorno dejstvo na porast kalusa pšenice (tab. 1).

Tab. 1. Sveža masa kalusa (SMK) i redukcija sveže mase kalusa (RSMK) kod šest genotipova pšenice, na različitim koncentracijama glifosata (Kontrola-bez herbicida, I-2.4 gl⁻¹, II-4.8 gl⁻¹ i III-7.2 gl⁻¹ glifosata)

Tab. 1. Fresh callus weight (FCW) and reduction of fresh callus weight (RFCW) of six wheat genotypes at different glyphosate concentrations (Control-herbicide free, I-2.4 gl⁻¹, II-4.8 gl⁻¹ and III-7.2 gl⁻¹ glyphosate)

Br. No.	Genotip Genotype	SMK FCW (mg)				RSMK RFCW (%)		
		Kontrola Control	I	II	III	I	II	III
1	Lr-12	17.5	1.9	3.5	2.2	89.8	80.7	87.3
2	Durin	51.5	8.1	3.0	5.8	84.2	93.6	88.0
3	NS 55-25	41.0	9.3	8.1	4.7	74.5	78.9	87.8
4	Pobjeda	60.1	9.0	9.9	7.8	85.1	83.5	87.1
5	Florida	57.4	13.1	7.7	6.8	77.3	86.6	88.2
6	Vel	162.5	18.0	10.4	6.6	86.4	92.2	95.0
	Mean	65.0	9.9	7.1	5.6	82.3	85.9	88.9

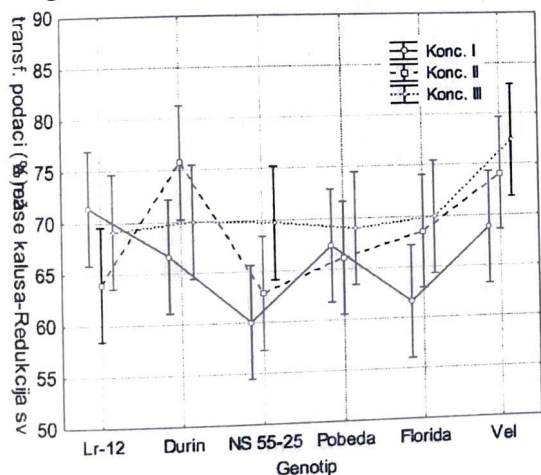
Kao pokazatelj tolerantnosti genotipova korišćena je redukcija sveže mase kalusa (RSMK) na pojedinim koncentracijama herbicida, u odnosu na kontrolu (tab. 1). S obzirom na to da su ovi podaci izraženi u procentima,

izvršena je njihova transformacija, pre dalje statističke analize. Na prvoj i drugoj koncentraciji glifosata (I-2.4 gl⁻¹, II-4.8 gl⁻¹) izdvaja se genotip NS 55-25 kao potencijalno najtolerantniji (RSMK na I konc. 74.5%, a na II konc.

78,9%) dok je III koncentracija bila podjednako toksična za sve ispitivane genotipove (graf. 1). I u analizi prosečne reakcije genotipova na sve primenjene koncentracije glifosata, genotip NS 55-25 izdvojio se kao potencijalni izvor tolerantnosti prema glifosatu, dok je genotip Vel bio najosetljiviji prema ovom herbicidu (graf. 2).

Graf. 1. Uticaj različitih tretmana herbicida (I-2.4 $g\ l^{-1}$, II-4.8 $g\ l^{-1}$ i III-7.2 $g\ l^{-1}$ glifosata) na redukciju sveže mase kalusa (transformisani podaci) kod šest genotipova pšenice

Fig. 1. Effects of different herbicide treatments (I-2.4 $g\ l^{-1}$, II-4.8 $g\ l^{-1}$ and III-7.2 $g\ l^{-1}$ glyphosate) on reduction of fresh callus weight (transformed data) of six wheat genotypes



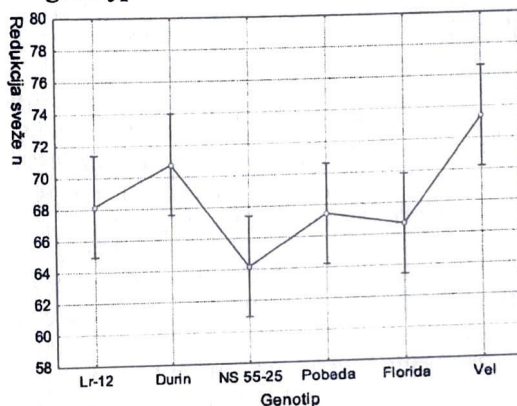
Vertikalne linije označavaju 0.95 interval poverenja
Vertical bars denote 0.95 confidence intervals

Rezultati su pokazali da glifosat, u svim ispitivanim koncentracijama, izaziva inhibiciju porasta kalusnog tkiva, kod svih genotipova pšenice. Međutim, utvrđene su i značajne razlike u reakciji pojedinih genotipova na primenjene doze herbicida. Tako je genotip NS 55-25 ispoljio najviši nivo tolerantnosti, dok je genotip Vel bio najosetljiviji na ispitivane koncentracije glifosata. Genotip Pobeda nije ispoljio visok nivo tolerantnosti, ali je potrebno izdvojiti ga zbog ispoljene veoma slične reakcije na sve tri primenjene koncentracije, odnosno ispoljene stabilnosti i pri delovanju multiplikovanih doza. Time je pokazano da se tolerantnost prema herbicidima može testirati u kulturi *in vitro*, odnosno da se u ovakvim testovima može ispoljiti razlika između genotipova u pogledu nivoa tolerantnosti prema herbicidima. Ovi rezultati u saglasnosti su sa našim ranijim istraživanjima, kao i sa rezultatima drugih autora, za druge

herbicide i druge gajene vrste (Kintzios et al., 1999; Singh and Wright, 2002; Kondić-Špika i Jevtić, 2002; Kondić-Špika i sar., 2007).

Graf. 2. Prosečna redukcija sveže mase kalusa (transformisani podaci) za tri koncentracije glifosata kod šest genotipova pšenice

Fig. 2. Average reductions of fresh callus weight (transformed data) for three glyphosate concentrations in six wheat genotypes



Vertikalne linije označavaju 0.95 interval poverenja
Vertical bars denote 0.95 confidence intervals.

Pored identifikacije tolerantnih genotipova, kultura *in vitro* koristi se i za stvaranje genotipova tolerantnih prema herbicidima, indukovanjem somaklonalne varijabilnosti, na subletalnim i letalnim koncentracijama herbicida u hranljivim podlogama. Neka od brojnih istraživanja ove vrste, rezultirala su stvaranjem linija i hibrida gajenih biljaka tolerantnih prema različitim herbicidima (Sellin et al., 1992; Taregyan et al., 2001; Zambrano et al., 2003; Mulwa and Mwanza, 2006).

Inhibitorno dejstvo primenjenih doza herbicida bilo je veoma izraženo, što je bilo i očekivano s obzirom na neselektivni karakter glifosata. Pored visoke toksičnosti samog herbicida, razlog tome može biti i činjenica da biljna tkiva u kulturi *in vitro* reaguju mnogo osjetljivije u poređenju sa biljkama koje se gaje *in situ* i na koje se herbicid primenjuje folijarno (Kondić-Špika et al., 2007). Iz tog razloga, u budućim istraživanjima trebalo bi ispitati dejstvo nižih koncentracija glifosata, u nastojanju da se pronađe optimalna subletalna doza, kako za selekciju genotipova različitog nivoa tolerantnosti prema ovom herbicidu, tako i za indukovanje somaklonalne varijabilnosti i stvaranja novih genotipova tolerantnih prema glifosatu.

Zaključak

Prisustvo glifosata u hranljivoj podlozi imalo je inhibitoran uticaj na porast kalusa pšenice. U testiranju *in vitro* uočene su

značajne razlike između genotipova u pogledu njihove tolerantnosti prema ovom herbicidu. Genotip NS 55-25 predstavlja potencijalni izvor tolerantnosti prema glifosatu, dok je genotip Vel bio najosetljiviji.

LITERATURA

- JAMES, C. (2003): Preview: Global Status of Commercialized Transgenic Crops: 2003. ISAAA Briefs, 30, Ithaca, New York.
- JANJIĆ, V. (2005): Fitofarmacija. Društvo za zaštitu bilja Srbije, Beograd, pp 578-813.
- KINTZIOS, S., MARDIKIS, M., PASSADEOS, K., ECONOMOU, G. (1999): In vitro expression of variation of glyphosate tolerance in *Sorghum halepense*, Weed Research, 39: 49-55.
- KONDIĆ, A., ŠESEK, S. (1998): In vitro selection of wheat genotypes for herbicide tolerance, Proc. of 2nd Balkan Symposium on Field Crops, Novi Sad, Yugoslavia, pp 169-171.
- KONDIĆ-ŠPIKA, A., JEVTIĆ, R., HRISTOV, N. (2007): Ecological aspects of *in vitro* wheat herbicide tolerance testing. In: I International congress Food Technology, Quality and Safety / XVI Sym. Cereal-Bread and Confectionery Products, Novi Sad, Serbia, pp 1-6.
- KONDIĆ-ŠPIKA, ANKICA, JEVTIĆ, R. (2002): Tolerantnost jarih i ozimih sorti pšenice prema herbicidima u kulturi *in vitro*. Pesticidi, 17: 125-129.
- MULWA, R.M.S., MWANYA, L.M. (2006): Biotechnology approaches to developing herbicide tolerance/selectivity in crops. African J. Biotechnol., 5(5): 396-404.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F. (1962): A revised medium for rapid growth on bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- SELLIN, C., FORLANI, G., DUBOIS, J., NIELSEN, E., VASSEUR, J. (1992): Glyphosate tolerance in *Chicorium intybus* L. var. Magdebourg. Plant Sci., 85: 223-231.
- SINGH, G., WRIGHT, D. (2002): In vitro studies on the effects of herbicides on the growth of rhizobia. Letters of Applied Microbiology, 35: 12-16.
- TAREGYAN, M.R., MORTIMER, A.M., PUTWAIN, P.D., COLLIN, H.A. (2001): Selection for resistance to the herbicide imazethapyr in somaclones of soybean, Weed Research, 41: 143-154.
- ZAMBRANO, A.Y., DEMEY, J.R., GONZALEZ, V. (2003): In vitro selection of a glyphosate-tolerant sugarcane cellular line. Plant Mol. Biol. Rep., 21: 365-373.

GLYPHOSATE TOLERANCE OF WHEAT GENOTYPES IN *IN VITRO* CULTURE

PETROVIĆ KRISTINA, KONDIĆ-ŠPIKA ANKICA, JEVTIĆ R., KOBILJSKI B., PUCAREVIĆ MIRA

SUMMARY

Tolerance of wheat genotypes to glyphosate was studied using *in vitro* embryo culture. Six randomly selected wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes were used for the isolation. The mature zygotic embryos were inoculated onto a modified MS medium to which three concentrations of glyphosate were added: I-2.4 g l⁻¹, II-4.8 g l⁻¹ and III-7.2 g l⁻¹. The control group of embryos was cultivated on a herbicide-free medium. After one month of cultivation callus fresh weight was measured. The results have shown that the presence of glyphosate in the nutrient medium caused an inhibition of callus growth in all genotypes. However, there were significant differences among the genotypes regarding their reaction to different glyphosate concentrations. At the glyphosate concentration I (2.4 g l⁻¹), the highest reduction of fresh callus weight relative to the control was in the genotype Lr-12 (89.8%), while the lowest reduction was in the genotype NS 55-25 (74.5%). Further increase of the herbicide concentration caused an even higher inhibition rates in all genotypes. The results of the study indicated that the genotype NS 55-25 had the highest and the genotype Vel had the lowest tolerance to the presence of the glyphosate in the medium.

Key words: wheat, herbicide tolerance, embryo culture