

UDK: 631.524; 633.11

## MOGUĆNOST POBOLJŠANJA POPULACIJE OPRAŠIVAČA KORIŠĆENJEM *in vitro* METODA

MEZEI SNEŽANA, ČAČIĆ N., KOVAČEV L., SKLENAR P., NAGL NEVENA<sup>1</sup>

**IZVOD:** Za realizaciju procesa rekurentne selekcije korišćena je mogućnost *in vitro* mikropropagacije iz lateralnih pupoljaka glave korena repe, kod odabranih genotipova. Metodama očuvanja *in vitro* zasnovana je klonska populacija oprasivača. Ultrašećernata sorta Crvenka mz priznata 1997. godine, je triploid čije su roditeljske komponente monogermna cms linija A-0401 i multigermna tetraploidna populacija C-8173. Cilj rada je da se iz očeve komponente odaberu superiorni genotipovi, koji su dobri kombinatori i na taj način dobije nova poboljšana populacija. U cilju ispitivanja specifičnih kombinacionih sposobnosti oprasivača izvršena su test ukrštanja odabranih genotipova multigernog tetraploidnog oprasivača sa linijom A-0401. Ukupno je dobijeno 87 hibridnih kombinacija. U narednoj godini postavljen je mikroogled gde je na bazi proizvodnih karakteristika hibrida odabrano dvadeset superiornih genotipova, koji su sačuvani *in vitro* i umnoženi metodama biljne regeneracije, formiranjem aksilarnih pupoljaka. Njihovi hibridi su značajno bolji od izvorne hibridne sorte Crvenka mz. U daljim istraživanjima, odabrani superiorni genotipovi multigernne populacije C-8173 koristeće se u polikrosu za stvaranje poboljšane populacije.

**KLjučne reči:** vegetativna propagacija, *in vitro*, šećerna repa, prinos korena, sadržaj šećera, prinos polarizacionog šećera, prinos kristalnog šećera, populacija oprasivača.

**UVOD:** Raznovrstnost namena i mogućnosti metoda *in vitro* u oplemenjivanju različitih biljnih vrsta je velika. U programu oplemenjivanja kima stvaraju se sorte sa povećanim sadržajem karvona koji je jedan od osnovnih sastojaka etarskog ulja. *In vitro* metodama propagacije zasnovana je klonska populacija i uključena u program rekurentne selekcije, a kao rezultat dobijeni su genotipovi sa 20% većim sadržajem karvona (Toxopeus 1995). Vegetativnom propagacijom šećerne repe iz somatskih ćelija bilo stimulacijom rasta aksilarnih pupoljaka ili de novo indukcijom adventivnih pupoljaka pruža se mogućnost *in vitro* umnožavanja. Takođe na ovaj način mogu da se sačuvaju heterozigotni genotipovi u neizmenjenom obliku. Vegetativna propagacija nalazi svoje mesto u povratnim programima oplemenjivanja šećerne repe, jer omogućuje da se izbegne segregacija i genetičko razdvajanje tokom procesa samooplodnje (Saunders 1982; Mezei i Kovačev, 1985; Mezei i sar. 1989; Mezei i Kovačev 1991). U uslovima *in vitro* može se sa uspehom očuvati morfogenetska sposobnost za regeneraciju dugi niz godina kod genotipova šećerne repe (Mezei i sar. 1998).

Priznavanjem sorta šećerne repe stiče mogućnost da se nadje u proizvodnji, međutim za njeno širenje veoma je bitno da zadrži osobine koje je pokazala u toku priznavanja, kao i u paralelnim sortnim ispitivanjima. Majčinska komponenta novih hibridnih sorti je inbred linija, a očeva komponenta je populacija uske genetičke osnove te je neophodno održati dobre posebne kombinirajuće sposobnosti (PKS) očeve komponente, a upravo za tu svrhu pogodna je rekurentna selekcija. U poznatim programima klasične povratne (rekurentne) selekcije na šećernoj repi niz autora je opisalo efekat gena kako na prinos korena tako i na sadržaj šećera (Campbell & Kern 1983, Carter 1987, Doney & Theurer 1978). U našim istraživanjima rekurentnom selekcijom smo nastojali zadržati nivo proizvodnje sorte Crvenka mz vršeći selekciju na PKS očeve komponente uz korišćenje vegetativne propagacije *in vitro* za očuvanje genotipova oprasivača duži vremenski period. *In vitro* je zasnovan klon iz autosterilne tetraploidne populacije C-8173 koja je oprasivač u hibridu.

Izvorni naučni rad (Original scientific paper)

<sup>1</sup> Dr SNEŽANA MEZEI, naučni savetnik; dr NIKOLA ČAČIĆ, viši naučni saradnik; dr LAZAR KOVAČEV, naučni savetnik; mr PAVLE SKLENAR, istraživač saradnik; mr NEVENA NAGL, istraživač saradnik Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

## Materijal i metod rada

### Materijal

U radu je korišćena populacija oprašivača C-8173 i CMS linija A-0401 koje su komponente priznate hibridne sorte Crvenka mz.

### Ispitivanja u polju i laboratoriji

Fenotipskim odabiranjem u polju 1997 godine izdvojeno je 400 korenova oprašivača C-8173. Tokom 1998. godine analizirana je masa i refrakcija i na osnovu toga odabrano je 106 superiornih korenova. U cilju ispitivanja specifičnih kombinacionih sposobnosti populacije oprašivača C-8173 izvršena su u istoj godini test ukrštanja u prostornoj izolaciji konoplje. Svaki pojedinačan koren isečen je na polovine i rasadjen sa po šest CMS korenova linije A-0401. Za očuvanje genotipa *in vitro* uzeti su lateralni pupoljci iz glave korena C-8173. Iste godine poznjeveno je 87 uspehlih hibridnih kombinacija sa kojima je u 1999. godini postavljen mikroogled u 5 ponavljanja, a kao standard poslužila je izvorna sorta Crvenka mz. Na kraju vegetacije utvrđen je prinos korena, sadržaj šećera, sadržaj nešećera (K, Na -amino N) a iz dobijenih podataka izračunat je polarizacioni šećer, iskorišćenje šećera na repu i prinos kristalnog šećera. Dobijeni rezultati za ispitivana svojstva statistički su obradjena analizom varijanse.

### Sterilizacija u *in vitro* uslovima

Ranije korišćene metode sterilizacije nisu mogle sa uspehom da se primene u ovom radu. Početni eksplantati za vegetativnu multiplikaciju bili su lateralni pupoljci glave korena iz polja, koji su bili zaraženi gljivčnim i bakterijskim infekcijama. Iz tih razloga postavljen je ogled sa 9 različitih metoda sterilizacije sa HgCl<sub>2</sub>, NaOCl, Benlate i 70% etanolom u različitim koncentracijama.

### Zasnivanje klonske populacije *in vitro*

Niske koncentracije citokinina omogućile su stimulaciju rasta aksilarnih pupoljaka iz lateralnih pupoljaka glave u periodu od 10 subkultivacija. Na podlogu koja je sadržala mikro i makro elemente po Murashige i Skoog-u, (1962) i 0,3 mg/l BA (benzil adenin) i 0,01 mg/l GA<sub>3</sub> (giberelin) svake 3 nedelje subkultivirani su sveži pupoljci, i tako je održavan oprašivač u toku 1998. godine. U narednoj godini testirana je sposobnost morfogeneze korena na 20 superiornih članova klona i njihova mogućost aklimatizacije u uslovima staklenika. U ogledu u *in vitro* uslovima analiziran je uticaj fitohormona u podlozi na indukciju *de novo* korenskih primordija. Korišćene su dve podloge (I<sub>RIM</sub>- 1/3 MS+5 mg/l BA i II<sub>RIM</sub> -1/3 MS + 0,1mg/l BA + 1mg/l NAA). Takođe je analiziran uticaj koncentracije soli na razvoj korenovog sistema na podlogama (III<sub>RDM</sub>- 1/3 MS i IV - MS) kod populacije oprašivača.

### Očuvanje populacije *in vitro*

Članovi klona sačuvani su u kontrolisanim uslovima dugog dana, na temperaturi 19±2°C za vreme trajanja selekcionog programa do odabiranja superiornih genotipova.

### Rezultati istraživanja sa diskusijom

Mogućnost da se u uslovima *in vitro* heterozigotni genotip vegetativnom propagacijom i njegovim čuvanjem u toku više godina zadrži u nepromenjenom obliku iskorištena je u ovim istraživanjima. Cilj je bio sprečiti pomeranje vrednosti populacije oprašivača u slobodnoj oplodnji i samim tim sačuvati osobine koje je pokazala hibridna sorta u toku priznavanja. Preko 100 genotipova iz očeve populacije sorte Crvenka mz vegetativnom propagacijom iz lateralnih pupoljaka zadržano je metodama čuvanja u *in vitro* uslovima

Tab. 1. Procenat sterilnih biljaka dobijenih različitim metodama sterilizacije lateralnih pupoljaka glave korena šećerne repe (*Beta vulgaris* L) *in vitro*

Tab. 1. Percentage of sterile plants obtained by different *in vitro* methods for sterilizing lateral buds of sugar beet (*Beta vulgaris*) root heads

Genotip	Hg Cl <sub>2</sub> 0,05%	Hg Cl <sub>2</sub> 0,08%	NaOCl 7%	NaOCl 10%	0,3% Benlate 7% NaOCl	70% etanol + NaOCl			
						7%	10%	15%	20%
1	0.0	0.0	100.0	80.0	80.0	22.2	38.5	28.6	20.0
2	0.0	0.0	0.0	0.0	63.6	23.1	23.0	57.2	14.3
3	60.0*	40.0*	0.0	40.0	50.0	25.0	30.0	41.6	28.6
4	0.0	0.0	40.0	0.0	37.5	20.0	62.5	46.0	22.2
5	0.0	0.0	60.0	60.0	22.2	24.0	40.0	25.5	15.5
6	0.0	0.0	40.0	0.0	41.0	28.5	20.0	58.0	14.6
7	40.0*	20.0*	20.0	60.0	27.3	20.0	32.6	14.3	25.0
8	0.0	0.0	0.0	0.0	55.5	22.2	33.3	42.0	60.0

\* Biljke su nakon nekoliko dana uginule

\* Plants died after several days

Tab. 2. Uticaj fitohormona i koncentracije soli u podlozi na inicijaciju *de novo* korenskih primordija kod populacije oprašivača

Tab. 2. Influence of fitohormone and salt concentration in the medium on *de novo* initiation of root primordia in pollinator population - RIM

Genotip	Podloge		
	I <sub>RIM</sub> - III <sub>RDM</sub>	II <sub>RIM</sub> - III <sub>RDM</sub>	A <sub>2</sub> 1 - IV
	ožiljenih eksplantata (%)	ožiljenih eksplantata (%)	ožiljenih eksplantata (%)
3	11.11	-	-
4	55.55	-	-
8	-	-	-
14	100.00	50.00	33.33
24	40.00	30.33	-
29	-	-	16.16
40	77.77	-	42.85
46	-	-	-
60	-	-	-
96	100.00	20.00	-
98	10.00	-	-

Tab. 3. Proizvodna svojstva odabranih hibrida šećerne repe

Tab. 3. Production characteristics of selected sugar beet hybrids

Red. br. No	Hibridna kombinacija Hybrid combin.	Prinos korena (t/ha) Root yield	Sadržaj šećera (%) Sugar con.	Prinos polariz. šećera (%) Polarization sugar yield	Relativ. iskorišć. šećera (%) Relative sugar yield	Prinos kristalnog šećera (t/ha) Yield of white sugar
1	A-0401 x C-8173/3	66,33	14,68	9,74	12,08	8,01
2	A-0401 x C-8173/4	71,33	14,88	10,62	12,37	8,83
3	A-0401 x C-8173/8	63,72	14,71	9,38	12,14	7,74
4	A-0401 x C-8173/14	65,44	15,16	9,92	12,74	8,34
5	A-0401 x C-8173/20	67,33	14,29	9,62	11,43	7,68
6	A-0401 x C-8173/24	72,22	14,27	10,31	11,56	8,35
7	A-0401 x C-8173/25	70,28	15,13	10,63	13,36	8,69
8	A-0401 x C-8173/29	62,89	15,28	9,61	12,95	8,14
9	A-0401 x C-8173/33	70,33	14,65	10,30	12,00	8,44
10	A-0401 x C-8173/34	66,78	14,56	9,72	11,92	7,96
11	A-0401 x C-8173/37	69,89	14,55	10,16	12,01	8,39
12	A-0401 x C-8173/39	69,67	14,34	9,98	11,61	8,09
13	A-0401 x C-8173/40	66,56	14,62	9,73	12,00	7,99
14	A-0401 x C-8173/46	73,06	14,39	10,52	11,88	8,68
15	A-0401 x C-8173/48	66,94	14,13	9,45	11,52	7,71
16	A-0401 x C-8173/56	66,94	14,81	9,91	12,46	8,34
17	A-0401 x C-8173/60	67,78	14,39	9,75	11,97	8,11
18	A-0401 x C-8173/96	65,56	14,68	9,62	11,98	7,86
19	A-0401 x C-8173/97	72,22	14,60	10,56	11,90	8,59
20	A-0401 x C-8173/97	64,17	15,20	9,73	12,73	8,17
21	Crvenka mz	60,56	14,36	8,71	11,75	7,14
LSD	0.05	4.96	0.73	0.71	0.59	0.62
	0.01	6.56	0.57	0.94	0.78	0.81
CV%		6.28	1.69	6.44	3.04	6.69

tokom trajanja programa povratne selekcije. Rezultati ispitivanja devet različitih metoda sterilizacije pokazali su da sa uspehom sterilisan početni eksplantat ne mora da zadrži regeneracioni potencijal za morfo genuzu a u najdrastičnijim primerima dolazi do nekroze ispitivanog materijala (tab. 1). Na osnovu istraživanja na iznalaženju najuspešnijeg metoda sterilizacije kao standardni metod za dalju sterilizaciju lateralnih pupoljaka glave usvojen je metod sterilizacije sa 0,3% rastvorom Benlate i 7% rastvorom NaOCl, Mezei i sar. (1999). Rezultati ispitivanja uticaja fitohormona i koncentracije soli na

morfogenezu korena članova klonova oprašivača ukazuju da se u najvećem procentu ožilio genotip 14, 96 i 40. Ovi genotipovi su zadržali veoma visok potencijal za inicijaciju *de novo* korenskih primordija i razvoj korenovog sistema. Podloga koja je sadržala smanjenu koncentraciju soli i auksin (5 mg/l indolbuterna kiselina) dala je najveći procenat ožiljenih biljaka. Podloga koja je sadržala punu koncentraciju soli, bez auksina, kod istih genotipova dala je značajno manji procenat ožiljenih biljaka (tab.2). Nakon ispitivanja njihovih posebnih kombinacionih sposobnosti (PKS), odabrani su

Tab. 4. Variranje ispitivanih svojstava hibrida šećerne repe  
Tab. 4. Variation of studied traits in sugar beet hybrids

Red. br	Svojstvo Trait	Svi ispitivani hibridi (87) All hybrids			Odabrani hibridi (20) Selected hybrids		
		min	max	8	min	max	8
1	Prinos korena (t/ha) Root yield	50,56	80,83	63,16	63,72	73,06	67,97
2	Sadržaj šećera (%) Sugar content	11,40	15,28	14,00	14,13	15,28	14,67
3	Prinos polariz. šećera (t/ha) Polarization sugar yield	6,96	10,66	8,83	9,38	10,62	9,96
4	Relativno iskorišćenje šećera (%) Relative sugar utilization	8,12	12,95	11,31	11,43	12,74	12,08
5	Prinos kristalnog šećera (t/ha) White sugar yield	5,08	8,83	7,13	7,68	8,83	8,21

superiorni genotipovi za formiranje nove-poboljšane populacije. Odabrani genotipovi su se odlikovali boljim kombinacionim sposobnostima za prinos korena i sadržaj šećera iz čega je rezultirao veći prinos kristalnog šećera. Odabrane kombinacije su imale veći prinos kristalnog šećera od sorte Crvenka mz od 0,57 t/ha (A-0401xC-8173/48) do 1,69 t/ha (A-0401xC-8173/4) (tab.3).

Kao rezultat razlike u kombinirajućim sposobnostima korišćenih genotipova oprašivača došlo je do variranja ispitivanih svojstava. Najveće variranje bilo je kod prinosa korena kao izrazito kvantitativnog svojstva i kretalo se od 50,56 t/ha do 80,83 t/ha. Nešto manje, ali takođe značajno variranje bilo je i kod sadržaja šećera, a kretalo se od 11,40% do 15,28%. Kao rezultat variranja navedena dva svojstva došlo je do veoma značajnog variranja u prinosu kristalnog šećera koji se kretalo od 5,08 t/ha do 8,83 t/ha (tab. 4).

### Zaključak

Imajući u vidu ciljeve i pretpostavke od kojih se pošlo, na bazi rezultata istraživanja može se zaključiti sledeće:

Primenjena je nova metoda za sterilizaciju lateralnih pupoljaka glave korena šećerne repe, a zatim je *in vitro* zasnovana klonska populacija oprašivača.

U kontrolisanim uslovima izvršena je uspešna prezervacija i umnažanje *in vitro* odabranih matičnih korenova ultra šećernate sorte Crvenka mz.

Odabrani genotipovi odlikovali su se boljim kombinacionim sposobnostima, naročito za prinos korena što je pored povećanog sadržaja šećera dovelo do prosečnog povećanja prinosa kristalnog šećera za 15% u odnosu na sortu Crvenka mz.

Prinos korena šećerne repe kao izrazito kvantitativno svojstvo kontrolisano je velikim brojem gena a što je uslovalo veoma veliko variranje ovog svojstva.

Sadržaj šećera kontroliše manji broj gena a što je uslovalo manje variranje ovog svojstva.

Odabrani genotipovi će se koristiti za stvaranje nove – poboljšane populacije oprašivača za sortu Crvenka mz.

### LITERATURA

- CAMPBELL, L. G. and KERN, J. J. (1983): Relationships Among Components of Yield and Quality of Sugarbeets. *Journal of the A.S. S-B.T.*, Vol. 22, No.2, 135-145.
- CARTER, J. N. (1987): Sucrose Production as Affected by Root Yield and Sucrose Concentration of Sugarbeets. *Journal of the A.S. S-B.T.*, Vol. 24, No.1, 14-31.
- DONEY, D. L. and THEURER, J.C. (1978): Reciprocal recurrent selection in sugarbeet. *Field Crops Res.*, 1. No.2, 173-181.
- MEZEI S., ČAČIĆ N., NAGL N., KOVAČEV L. I SKLENAR P. (1999): Mogućnost primene mikro-propagacije laterarnih pupoljaka glave korena šećerne repe u rekurentnoj selekciji. Drugi kongres genetičara Srbije, Sokobanja, abstrakt 167-168
- MEZEI S., KOVAČEV L. (1985): *In vitro* vegetative multiplication of sugarbeet breeding lines and genetic evaluation in F1 generation. *Glasnik Instituta za botaniku i botaničke bašte Univerziteta u Beogradu*, 19. 337-338.
- MEZEI S., DOKIĆ P., KOVAČEV L. (1989): Razmnoženje saharnoj svekli *in vitro* U: *Ispoljzovanie Biotehnologičeskikh metodov v selekcii saharnoj svekli*. str.70-75, Kiev, SSSR.

- MEZEI S., KOVAČEV L., DOKIĆ P., NAGL N., SKLENAR P. (1998): Different methods on *in vitro* vegetative propagation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.): 2<sup>nd</sup> Balkan Symposium on Field Crops, Vol. (1), 421-425 Novi Sad, Yugoslavia.
- MEZEI S., KOVAČEV L. (1991): Mikropropagacija šećerne repe u uslovima *in vitro*, *Savremena poljoprivreda* 39 (1) 53-61.
- TOXOPEUS H. (1995): Breeding research and *in vitro* propagation to improve carvone production of caraway (*Carum cavi* L.) *Industrial Crops and Products*. V. 4 (1) 33-38.
- SAUNDERS, I.W. (1982): A flexible *in vitro* shoot culture propagation system for sugarbeet that induces rapid floral induction of ramets. *Crop Sci.* 22 (6), 1102-1105.

## IMPROVEMENT OF COMBINING ABILITIES OF SUGAR BEET POPULATION C-8173 USING *IN VITRO* METHODS

by

MEZEI SNEŽANA, ČAČIĆ N., KOVAČEV L., SKLENAR P., NAGL NEVENA

### SUMMARY

The ultrasugary cultivar Crvenka mz, released in 1997, is a triploid whose parental components are the monogerm cms line A-0401 and the multigerm tetraploid population C-8173. The objective of our study was to select from the male parental component superior genotypes that are good combiners and thereby develop a new, improved population. Based on the phenotype, 400 roots of the C-8173 pollinator were chosen in the field. Later that year, 106 of them were selected on the basis of root mass and refraction. In the spring of the following year, each of these genotypes was transplanted onto a special plot with six roots of the female parental component A-0401. Hemp was used as the isolator. *In vitro* micropropagation from lateral head buds was used in the selected genotypes to carry out the recurrent selection process. In 1999, a small-plot trial with successful hybrids was established in which the hybrid cultivar Crvenka mz was used as the standard. Based on the hybrids' production characteristics, 20 superior genotypes were chosen, which were then maintained *in vitro* and propagated using methods of plant regeneration through the formation of axillary buds. Their hybrids have proven to be significantly better than the standard cultivar and will be used in further research to develop an improved pollinator population. The selected hybrids outperformed the standard in the following areas: root yield (by 12.2%), sugar content (by 2.2%, in relative terms), raw sugar yield (by 14.4%), and white sugar yield (by 15.0%).