



## Uporedna analiza genetske čistoće roditeljskih linija suncokreta u polju i laboratoriji

Ksenija Taški-Ajduković\*, Velimir Radić, Aranka Jevtić,  
Petar Čanak, Milka Vujaković, Vladimir Miklič

Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Maksima Gorkog 30, 21000 Novi Sad

**Izvod:** Jedna od važnih komponenti kvaliteta semena jeste njegova sortna, odnosno genetska čistoća. Uzroci nesortnih primesa mogu poticati od semena nastalog usled nekontrolisane samooplodnje, stranooplodnje ili usled mehaničkog mešanja semena. Genetska čistoća 18 partija roditeljskih linija suncokreta kontrolisana je uporednom analizom morfoloških osobina i elektroforetskom analizom 4 izoenzimska sistema, prema UPOV uputstvu za DUS analizu linija i hibrida suncokreta. U 83,3 % od ukupno ispitanih uzoraka, rezultati u polju i laboratoriji su bili u saglasnosti. Kod roditeljske linije R-8 analizom izoenzima pronađeno je 5 % genetske nečistoće koja nije konstatovana na osnovu morfoloških karakteristika, dok je elektroforetska analiza uzoraka L-10 i L-11 pokazala manju genetsku nečistoću u poređenju sa analizom u polju.

**Ključne reči:** biotest, genetska čistoća, izoenzimi, linije, suncokret

### Uvod

Jedna od važnih komponenti kvaliteta semena jeste njegova sortna, odnosno genetska čistoća. Genetska čistoća stranooplodnih biljnih vrsta je od posebnog značaja, osobito ako se proizvodnja zasniva na korišćenju hibrida. Uzroci nesortnih primesa mogu poticati od semena nastalog usled nekontrolisane samooplodnje, stranooplodnje ili usled mešanja semena različitih sorti ili hibrida (Gerić i sar. 1989).

Genetska čistoća se može kontrolisati putem biotesta u polju, pri čemu se na osnovu fenotipa vrši kontrola semenskog useva. Semenske kompanije obično svake sezone sprovode ogled u polju da bi procenile genetski kvalitet ugovorenih partija. Po pravilu, partija semena se ocenjuje poređenjem sa partijama semena roditeljskih komponenti (sa zaliha), kao i sa drugim partijama semena iste sorte (Aksyonov 2005).

Dugotrajnost kontrole semena na osnovu fenotipskih karakteristika biljaka zahtevala je iznalaženje brzih metoda za kontrolu genetske čistoće semena. Uvedene su laboratorijske tehnike za neposrednu kontrolu ove osobine kvaliteta semena. Laboratorijska kontrola se zasniva na detekciji polimorfizma proteina ili DNK. Prednost ovih metoda kontrole leži u tome što se na ovaj način seme može ispitati do naredne setve, u toku ili posle dorade, a moguća je kontrola semenskog useva pre berbe, pa čak i pre sazrevanja (Zlokolica & Taški 2004). Kako su tehnike zasnovane na DNK molekularnim markerima relativno nove i znatno skuplje, još uvek su u širokoj upotrebi elektroforetske metode kontrole na osnovu rezervnih proteina i funkcionalnih proteina/ izoenzima (Taški-Ajduković et al, 2009).

Ovaj rad je deo projekta TR20080 finansiranog od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije / This research is a part of the project TR20080 financed by Ministry of science and technological development of the Republic of Serbia

\*autor za kontakt / corresponding author  
(ksenijat@ifvns.ns.ac.rs)

Cilj ovog istraživanja je bilo upoređivanje rezultata genetske čistoće partija roditeljskih linija suncokreta dobijenih na osnovu morfoloških karakteristika u polju i elektroforetske analize izoenzima.

### Materijal i metod rada

Ispitivano je 18 roditeljskih linija (15 inbred linija i 3 restorera), kod kojih se zbog problema u semenskoj proizvodnji sumnjalo da može doći do problema sa genetskom čistoćom. Da bi se izbegla greška u analizi koju može prouzrokovati uzorkovanje, iz partije semena je napravljen zbirni uzorak prema ISTA metodu za uzorkovanje (ISTA Handbook, 2009). Radni uzorak je zatim podeljen na dva dela za sejanje u polju i analizu u laboratoriji.

### Ispitivanje u polju

U polju je posejano 300 semena po parceli. Ogled je postavljen na međuredni razmak od 70 cm, odnosno 75 biljaka po dužini jedne parcelice. Setva je obavljena pneumatskom sejalicom, raspored brojeva je bio nasumičan. Ocenjivane su morfološke osobine preporučene od strane UPOV-a za DUS analizu (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 i 42) (UPOV, 2000). Nivo genetske čistoće je određivan na osnovu broja tipičnih biljaka, a dat je u procentima.

### Analiza izoenzima

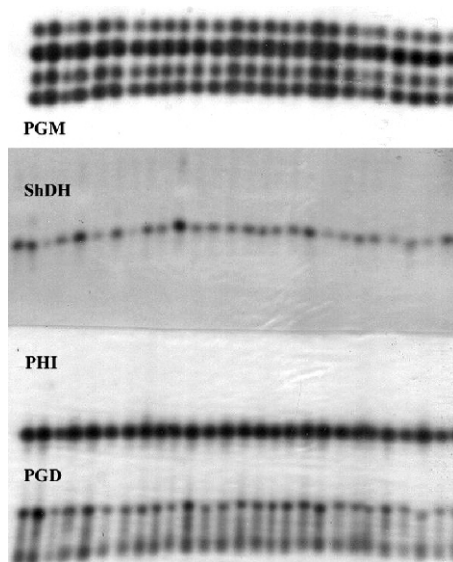
Klijanci stari pet dana su homogenizovani u 0,5 M Tris-HCl puferu pH 6,8 sa 1 % -merkptoetanolu. U homogenizovano tkivo su uronjeni filter papirići (Watman N°3) i nakon absorpcije tečne faze postavljeni na 12 % skrobni gel. Iz svakog uzorka je analizirano 100 pojedinačnih klijanaca. Elektroforeza je rađena u 0,065M L-histidin-citratnom puferu pH 6,5 tokom 3,5 sata pri konstantnoj snazi od 16W na 4 °C. Nakon elektroforeze gel je isečen na ploče koje su inkubirane u specifičnim rastvorima za bojenje phosphohexose phosphoglucumutase (PGM; E.C: 5.4.2.2), phosphohexose isomerase (PHI; E.C. 5.3.19), 6-phosphogluconate dehydrogenase (PGD;

E.C. 1.2.1.44) i Shikimate dehydrogenaze (ShDH; E.C. 1.1.1.25) (UPOV, 2000).

Dobijeni zimogrami su analizirani. Nivo genetske čistoće je određivan na osnovu očekivanog zimograma kontrolnih linija.

### Rezultati i diskusija

Uporedna analiza nivoa genetske čistoće na osnovu morfoloških osobina i analize izoenzima (Sl. 1) u najvećem broju uzoraka bila je u saglasnosti (Tab. 1). Rezultati su bili vrlo slični kod 15 uzoraka što iznosi 83,3 % od ukupno ispitanih uzoraka. U tim uzorcima razlika se kretala između 0 % do 2,24 %, što je veći procenat podudarnih rezultata nego što je dobio Aksyonov (2005) (73,3%) komparativnom analizom genetske čistoće suncokreta u polju i elektroforetskom analizom rezervnih proteina.



Sl. 1. Zimogram ispitivane linije suncokreta  
Fig. 1. Isozyme patterns of sunflower inbred line

Kod roditeljske linije R-8 analizom izoenzima pronadeno je 5 % genetske nečistoće koja nije konstatovana na osnovu morfoloških karakteristika, što dokazuje da fenotip može služiti kao indikator genetske čistoće, dok genetički kontrolisane kvantitativne osobine definišu fenotip. Zbog toga morfološko

određivanje genetske čistoće u polju može pokazati veći procenat homogenosti ispitivane partije semena.

Tab. 1. Podaci komparativne analize genetske čistoće linija suncokreta (ispitivanje u polju i analiza izoenzima)

Tab. 1. Comparative analysis data of genetic purity of sunflower inbred lines (field trial and isoenzyme analysis)

Broj uzorka / Sample number	Biotest / Field trial		Izoenzimi / Isozymes
	Atipične biljke / Atypical plants (%)	UPOV*	Genetska nečistoća / Genetic impurity (%)
L-1	1,22	23	0
L-2	1,38	23	0
L-4	2,19	23,33	2
L-5	0,5	23	1
L-7	4,24	23,29	2
L-8	2,04	23,29.32	0
L-10	6,1	32	1
L-11	5,6	32	0
L-13	0	-	0
L-14	0,9	3	0
L-16	0	-	0
L-17	0,94	29,23	0
L-18	0,94	29,32	0
L-19	0	-	0
L-20	0	-	0
R-7	0	-	0
R-8	0	-	5
R-9	0,48	23	1

\*Broj karakteristike po UPOV-u po kojoj su se atipične biljke razlikovale / Number of characteristic, according to the UPOV, for which the atypical plant is different

Elektroforetska analiza uzoraka L-10 i L-11 (11,1 % od ukupnog broja uzoraka) pokazala je manju genetsku nečistoću u poređenju sa analizom u polju. Kako je polimorfizam izoenzima suncokreta ograničen, najverovatnije da deo genoma koji kod suncokreta određuje osobinu po kojoj su se atipične biljke izdvajale (položaj glave) nije pokriven. Proteini /izoenzimi mogu biti uspešno korišćeni u više od 80 % slučajeva kada se traži genetska čistoća u testiranju kvaliteta semena (Della Vecchia et al. 1999, Aksyonov 2005). Glavno ograničenje ove me-

tode u analizi genetske čistoće suncokreta je mali broj lokusa koji se mogu koristiti (Chikkadevaiah & Nandini 2003).

Zbog toga se u daljem radu planira uvođenje molekularnih markera na nivou DNK da bi se povećala pokrivenost genoma i dobili što precizniji rezultati homogenosti partija semena suncokreta u laboratoriji. Poseban razlog potrebe za analizom uzoraka suncokreta DNK markerima jeste identifikacija linija i hibrida, jer zbog malog polimorfizma proteina suncokreta to nije uvek moguće postići analizom funkcionalnih ili rezervnih proteina.

### Zaključak

Na osnovu podataka dobijenih uporednom analizom genetske čistoće partija roditeljskih linija suncokreta na osnovu morfoloških karakteristika u polju i elektroforetske analize izoenzima, može se zaključiti da nijedna od korišćenih metoda ne dozvoljava potpuno otkrivanje genetske nečistoće. Pomoću izoenzimskih markera, u preko 80 % slučajeva je adekvatno određen nivo genetske čistoće, te se ova metoda može uspešno koristiti za brzo definisanje čistoće partije semena inbred linija suncokreta.

### Literatura

- Aksyonov I V (2005): Use of albumin markers for defining genetic purity of sunflower parent lines and hybrids. *Helia* 28: 43-48
- Chikkadevaiah N, Nandini R (2003): Isozymes as markers for differentiating sunflower genotypes. *Helia* 36: 51-58
- Della Vecchia P T, Da Silva C A R, Terenciano-Sobrinho P (1999): Use Of Molecular Marker Techniques In Seed Testing By Brazilian Seed Companies. *Scientia Agricola* 55: 79-82
- Gerić I, Zlokolica M, Gerić C (1989): Application of isoenzymes in control of genetic purity of seed of agricultural plants. *Agricultural News* 3-4: 555-564
- ISTA (2009): International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association, Switzerland
- Taški-Ajduković K, Knoblauch R, Nevena N, Jevtić A, Vujaković M (2009): Genetic purity in seed testing using biomolecular markers, Book of abstracts, IV Congress of the Serbian Genetic Society, Tara, 279
- UPOV (2000): Guidelines for the Conduct of Tests for Distinctness, Uniformity and Stability Sunflower (*Helianthus Annuus* L.) [http://www.upov.int/en/publications/tg-rom/tg081/tg\\_81\\_6.pdf](http://www.upov.int/en/publications/tg-rom/tg081/tg_81_6.pdf), International Union for the Protection of New Varieties of Plants, Geneva
- Zlokolica M, Taški K (2005): Genetska čistoća semena. U: Milošević M, Malešević M (ured.), *Semenarstvo 1*, Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo i Nacionalna laboratorija za ispitivanje semena, Novi Sad, 201-240

## **Comparative analysis of laboratory and field procedures for testing genetic purity of sunflower parent lines**

**Ksenija Taški-Ajduković, Velimir Radić, Aranka Jevtić,  
Petar Čanak, Milka Vujaković, Vladimir Miklič**

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

**Summary:** One of the main features that confer high quality to the seed is its genetic purity. Genetic impurities in sunflower seed lot can originate from seed due to self-pollination, uncontrolled cross-pollination or mechanical mixing of seeds. Genetic purity of 18 seed lots of sunflower parental lines is controlled by comparative analysis of morphological traits and electrophoretic analysis 4 isoenzyme systems, according to the UPOV guidelines for DUS test of sunflower lines and hybrids. In 83.3% of the total analysed samples, results in the field and laboratory were in agreement. In parental line R-8 5% genetic impurity was found by isoenzyme analysis, which was not detected based on morphological characteristics, while electrophoretic analysis of samples L-10 and L-11 showed less genetic impurities in comparison with the analysis in the field.

**Key words:** field trial, genetic purity, isozymes, lines, sunflower

Primljeno / Received: 17.11.2009.

Prihvaćeno / Accepted: 10.12.2009.