

"Zbornik radova", Sveska 42, 2006.

Stručni rad - Technical paper

REZULTATI PRIMENE MODERNE BIOTEHNOLOGIJE U OPLEMENJIVANJU STRNIH ŽITA U NAUČNOM INSTITUTU ZA RATARSTVO I POVRTARSTVO - NOVI SAD

Kobiljski, B.¹, Denčić, S.¹, Kondić-Špika, Ankica¹, Obreht, Dragana²

U radu su analizirani rezultati dobijeni u poslednjih 20 godina u radu na primeni metoda kulture *in vitro* i molekularnih markera - mikrosatelita, u Zavodu za strna žita, Naučnog Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu. Od momenta početka rada zasnovanog na delimično izmenjenom konceptu (početak 2002 godine) pa do današnjih dana istraživači angažovani u prvom ciklusu rada odeljenja za biotehnologiju su publikovali više od 40 radova, a uspešno su odbranjene i 4 magistarske teze i 2 doktorske disertacije na fakultetima Univerziteta u Beogradu i Novom Sadu. Trenutno, u toku je rad na izradi 3 diplomska rada, 3 magistarske teze i 3 doktorske disertacije predviđene za realizaciju u narednom istraživačkom ciklusu (2005-2007 godine). Primarni cilj svih istraživanja je da se marker asistirana selekcija (MAS) koristi kao glavna pomoćna metoda u oplemenjivanju, i da se na taj način smanje troškovi i poveća efikasnost oplemenjivačkih programa na strnim žitima.

Rezultati laboratorije za kulturu *in vitro*

Laboratorija za kulturu *in vitro* Zavoda za strna žita osnovana je 1985. godine, kao jedna od prvih laboratorija tog tipa u ondašnjoj Jugoslaviji. U protekle dve decenije, ova laboratorija se razvijala u pravcu što veće aplikativnosti *in vitro* metoda u oplemenjivanju pšenice.

Kultura diploidnih ćelija i tkiva

Dosadašnja istraživanja su pokazala da se metoda kulture zigotnog embriona može uspešno koristiti za testiranje tolerantnosti genotipova prema solima (Šesek i Kondić, 1997), herbicidima (Kondić i Šesek, 1998; Šesek i Kondić, 1999), teškim metalima (Šesek i sar., 1999) i suši (Kondić i Šesek, 2000b).

-
- 1 Dr Borislav Kobiljski, viši naučni saradnik, dr Srbslav Denčić, naučni savetnik, dr Ankica Kondić-Špika, naučni saradnik, Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad.
 - 2 Dr Dragana Obreht, asistent, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.

Kultura haploidnih tkiva i proizvodnja dvostrukih haploida (DH)

Postoji više različitih metoda za proizvodnju haploida i homozigotnih dvostrukih haploida, među kojima je kultura antera najčešće korišćen metod. Primenom ove metode je u laboratoriji Zavoda za strna žita, proizvedeno do sada više od 300 linija dvostrukih haploida (DH) pšenice, koje su uključene u programe oplemenjivanja. U preliminarnе sortne oglede bilo je uključeno 65, a u oglede Komisije za priznavanje sorti 12 DH linija. Efikasnost metode kulture antera je dosta visoka u našoj laboratoriji, o čemu najbolje govore rezultati koji se odnose na 14 slučajno odabranih F1 hibrida pšenice, kod kojih je ostvaren prosečan androgeni kapacitet od 17.7%, prinos kalusa 50.8%, prosečna frekvencija zelenih regeneranata 9.7% i u proseku je dobijeno 5.8 DH biljaka po klasu. S obzirom na to da se radi o slučajno odabranim genotipovima ove su vrednosti na vrlo visokom nivou.

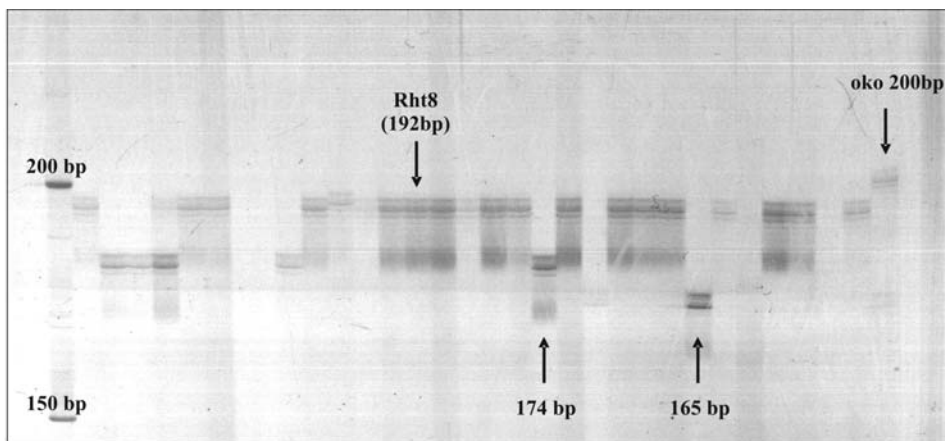
Prateći svetske trendove iz ove oblasti, Zavod za strna žita je u 2002 godini delimično promenio prioritete i način rada laboratorije za proizvodnju DH linija. Tendencija daljeg rada je, pored proizvodnje DH kulturom antera uvođenje nove metodologije (veoma proširene u svetu) dobijanja DH linija nakon oprašivanja pšenice kukuruzom. Značaj ove metode najbolje ilustruje činjenica da kompanija "Advanta Seed" iz Engleske, svoj oplemenjivački program na pšenici u potpunosti zasniva na ovoj tehnologiji. Testiranje adekvatnih linija kukuruza (oprašivača) je urađeno, a urađena su i 2 turnusa oprašivanja pšenice sa kukuruzom, sa ciljem dobijanja DH linija pšenice. Dosadašnji rezultati rada na proizvodnji DH ovom metodom nisu spektakularni, izolovano je 390 embriona, od kojih je proizvedeno oko 50 DH biljaka. Međutim, obzirom da smo metodu primenjivali u poljskim uslovima, a što je jedinstveni slučaj u svetu, više smo nego zadovoljni postignutim, jer cilj je u ovoj fazi bio da istraživači i saradnici prođu nekoliko ciklusa rada, te da se potpuno obučeni i spremni, a nakon stavljanja staklare u punu funkciju (prvo tromesečje 2006 godine) odmah uključimo u rad na proizvodnji DH ovom metodom.

Rezultati laboratorije za molekularne markere

Laboratorija za molekularne markere je nakon kupovine opreme i edukacije kadrova u referentnim svetskim laboratorijama počela sa radom 2002 godine. U inicijalnom periodu je celokupni rad bio usmeren ka testiranju i optimizaciji protokola za rad sa mikrosatelitima (molekularni markeri posebno pogodni za rad sa pšenicom, ali i ječmom, durum pšenicom, tritikaleom itd.). Ovo se pre svega odnosi na ekstrakciju DNK, njenu kvantifikaciju, optimizaciju PCR uslova, vizuelizaciju rezultata, njihovo tumačenje i statističku analizu.

Istraživanja su u periodu 2002-2005 godina obuhvatila ispitivanja na molekularnom nivou: genetičke varijabilnosti, detekciju alelenog polimorfizma u lokusu Rht8 gena pšenice, ispitivanje tolerantnosti na bor, otpornost na predžetveno proklijavanje i mirovanje semena, analizu parametara tehnološkog kvaliteta pšenice itd. (Kobiljski i sar., 2004). Značajno je istaći da se aktivnosti ove laboratorije u velikoj meri oslanjaju na saradnju sa vodećim evropskim i svetskim institucijama i pojedincima koji se ovom problematikom bave.

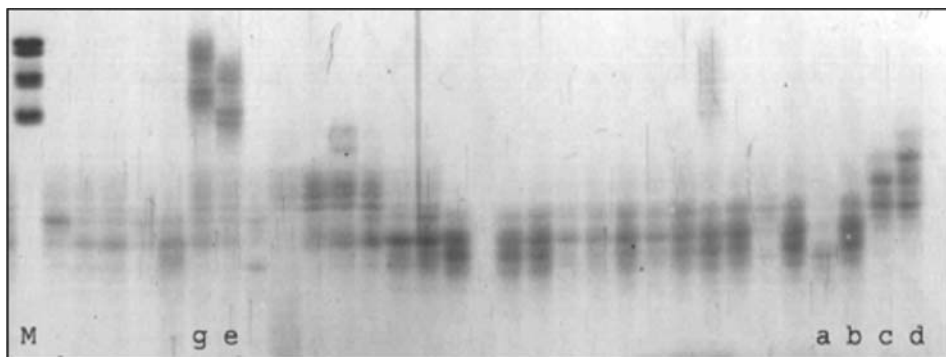
Detekcija alelnog polimorfizma u lokusu Rht8 gena kod 377 genotipova pšenice (274 iz naše zemlje) je potvrdila očekivano prisustvo Rht8 gena kod većine (174) domaćih genotipova. Međutim, pored Rht8 gena, za koji se smatralo da je isključivo prisutan u sortama pšenice poreklom iz naše zemlje, utvrđeno je i prisustvo alternativnih alela sa produktima od 174bp (38 genotipova) i 165bp (19 genotipova). Takođe utvrđeno je i prisustvo do sada nezabeleženih alelnih varijanti u najnovijim sortama, a što može biti izuzetno važno u daljem oplemenjivanju za naše agroekološke uslove (Slika 1). Primenom tzv. asocijativnog pristupa" utvrđeno je postojanje visoko značajne međuzavisnosti između prisustva alela sa 192bp i povećane mase 1000 zrna i broja zrna po klasu pšenice. Ovo pruža osnovu za direktnu primenu MAS u oplemenjivanju pšenice na akumulaciju ovog alela u našim oplemenjivačkim programima (Pilipović, 2005).



Slika 1. Alelna varijabilnost u lokusu Rht8 gena pšenice

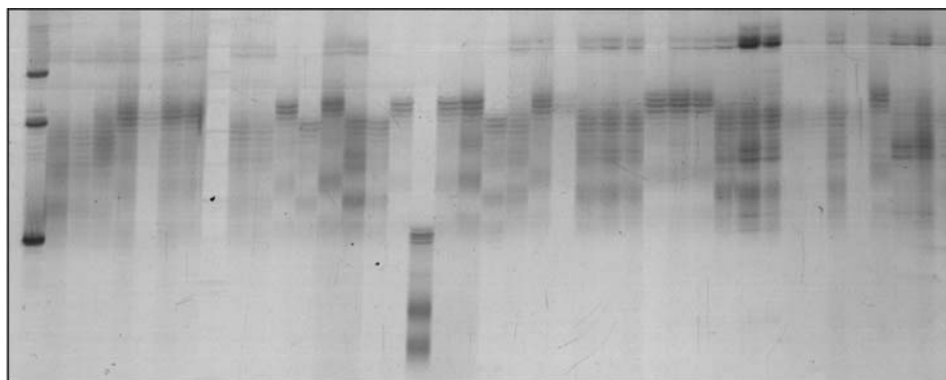
Genetička analiza i dalje unapređenje tehnološkog kvaliteta su trenutno najznačajniji zadaci u programima oplemenjivanja pšenice u Novom Sadu. Zato je i logično da je deo molekularnih istraživanja bio usmeren ka iznalaženju mogućnosti za primenu mikrosatelita u MAS na ovo svojstvo. Dobijeni rezultati jasno i nedvosmisleno ukazuju na mogućnost detekcije na molekularnom nivou prisustva 1BL/1RS translokacije, poželjnih puroindolinskih lokusa, najznačajnijih gluteninskih subjedinica i akumulaciju alela za poboljšanje pekarskih kvaliteta. Neki od markera-prajmera koji će se koristiti u daljem radu za MAS na ova svojstva su Taglgap, GWM 720 i GWM 674 (Obreht, 2005).

U poslednjih nekoliko godina intenzivirali smo fenotipske i genetičke istraživačke aktivnosti fenomena mirovanja semena, a koje su sa oplemenjivačkog, semenarskog i komercijalnog stanovišta izuzetno važne, kako direktno, tako i zbog čitavog niza svojstava koji su indirektno vezane za fenomen mirovanja semena (FN-broj padanja po Harbergu, predžetveno proklijavanje itd.). Obimnim fenotipsko-molekularnim istraživanjem na 375 genotipova utvrđena je mogućnost za primenu prajmera GWM 134 i GWM 3 u oplemenjivanju pšenice na ova svojstva (Slika 2), (Barjaktarović, 2005).



Slika 2. Produkti amplifikacije sa GWM 3

Deo aktivnosti rada odeljenja za biotehnologiju je obuhvatio (u saradnji sa kolegama iz Nemačke) i utvrđivanje mogućnosti za primenu MAS u oplemenjivanju na tolerantnost na suvišak bora. Imajući u vidu činjenicu da postoji pozitivna međuzavisnost u tolerantnosti pšenice na povišen sadržaj mikroelemenata i povećan sadržaj soli, i na osnovu podataka da se oko 200.000 ha zemljišta u Vojvodini odlikuje povećanim sadržajem soli u zemljištu, bio je razumljiv naš interes za ovu vrstu istraživanja. Rad na ovoj problematici obuhvatio je testiranje u kulturi zigotnog embriona tolerantnosti 112 genotipova pšenice na suvišak bora kao i molekularnu detekciju alenog polimorfizma u lokusu mikrosatelita GWM 46 (Slika 3). Dobijeni rezultati pokazuju postojanje značajne veze između nivoa tolerantnosti u *in vitro* uslovima i prisustva odgovarajućih alela u pomenutom lokusu, pa predstavljaju odličnu polaznu osnovu kako za MAS u selekciji genotipova tolerantnih na suvišak bora tako i za dalji rad na ovoj problematici (Marjanović, 2005).



Slika 3. Produkti amplifikacije sa GWM 46

Drugi ciklus rada započeo je sredinom 2005 godine, a planirano je da se završi 2007 godine. Rad je u ovom periodu baziran na angažovanju naučnog i stručnog kadra zaposlenog u Zavodu i istraživača koji rade na izradi diplomskih radova, magistarskih teza i doktorskih disertacija na fakultetima Univerziteta u

Novom Sadu i Beogradu. U ovom periodu, istraživanja obuhvataju dalji rad sa mikrosatelitima u cilju izdvajanja seta prajmera pogodnih za marker asistiranu selekciju (MAS), i to pre svega najvažnije major gene koji utiču na adaptabilnost i tolerantnost na stresne uslove sredine (Rht, Ppd, Vrn itd.), bolesti (Fusarium), tehnološki kvalitet (Glu i Gli geni) itd., te važne QTL za metrička-kvantitativna svojstva. Takođe, u toku je rad na utvrđivanju genetičkog profila sorti pšenice nastalih u Srbiji u poslednjih 40 godina, što će pružiti mogućnost da se na osnovu DNK profila na validan i međunarodno priznat način omogući zaštita naših rezultata na međunarodnom nivou. Očekujemo da će eventualna nabavka DNK sekvencera u 2006. godini omogućiti da se dobijeni rezultati u ovoj, ali i laboratorijama širom sveta, uspešno implementiraju u oplemenjivački proces Zavoda i na taj način poveća efikasnost i ekonomičnost oplemenjivanja.

LITERATURA

- Barjaktarović R., 2005: Determinacija mirovanja semena pšenice upotrebom molekularnih markera - mikrosatelita. Magistarska teza. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu. 57 strana.
- Kobiljski B., Obreht D., Kondić - Špika A., Denčić S., Vapa Lj., Pilipović J., Barjaktarović R., Marjanović M., Davidović M., 2004: Primena marker asistirane selekcije (MAS) u oplemenjivanju pšenice u Novom Sadu. Zbor. apstrakta. III Kongres genetičara Srbije, 30. nov.-4 dec., 2004, Subotica. 100.
- Kondić A. i Šesek S., 2000: Korišćenje kalusne kulture za ispitivanje tolerantnosti genotipova pšenice prema suši. Selekcija i semenarstvo, VII, 1-2, 57-59.
- Kondić Ankica i Šesek S., 1998: *in vitro* selection of wheat genotypes for herbicide tolerance. In: Proc. of 2nd Balkan Symp. on Field Crops, Novi Sad, Yugoslavia, 169-171.
- Marjanović M., 2005: Testiranje tolerantnosti pšenice na bor primenom *in vitro* i tehnike molekularnih markera - mikrosatelita. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu. 59 strana.
- Obreht D., 2005: Genetička evaluacija komponenti tehnološkog kvaliteta pšenice primenom molekularnih markera. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad. 95 strana.
- Pilipović J., 2005: Detekcija alelene varijabilnosti u lokusu Rht8 gena pšenice primenom molekularnih markera - mikrosatelita. Magistarska teza. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu. 51 strana.
- Šesek S. i Ankica Kondić, 1997: Primena kalusne kulture u selekciji genotipova pšenice tolerantnih na visoke koncentracije soli (NaCl). Selekcija i seminar., IV(1-2), 55-59.
- Šesek S., 1993: Dvostruki haploidi - proizvodnja i primena u oplemenjivanju pšenice, XXVII Seminar agronoma, Zbornik radova, vol. 21, 379-387.
- Šesek S., Ankica Kondić i Kastori R., 1999: Effect of lead and cadmium on callus growth and dry matter content in zygotic embryo cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.), Zbor. Matice Srpske za prirodne nauke, 97, 57-62.