

## UTICAJ VREMENA PRIMENE AUKSINA NA FORMIRANJE HAPLOIDNIH EMBRIONA PŠENICE

PRODANOVIĆ S.<sup>1</sup>, MATZK F.<sup>2</sup>, ZORIĆ DRAGICA<sup>1</sup>

*IZVOD: Posle ukerštanja pšenice sa kukuruzom nastaje hibridni interspecies zigot. Zigot nastao uobičajenom samooplodnjom pšenice deli se mitotičkim deobama i formira embrion. Međutim, interspecies zigot relativno brzo abortira. Da bi se podstakao njegov razvoj koristi se auksinski tretman. Auksini su hormoni rasta koji u zavisnosti od koncentracije i vremena primene imaju stimulatívni ili toksični efekat na razvoj biljnih tkiva. U ovom radu analiziran je efekat vremena primene auksina dikamba u koncentraciji od 100 ppm na formiranje embriona pšenice dobijenih posle ukerštanja sa kukuruzom. U ćelijama takvih embriona tokom razvoja brzo se gube bromozomi donora polena, te oni postaju haploidni embrioni. Zaključeno je da za proizvodnju haploidnih embriona optimalno vreme tretiranja klasova pšenice je jedan dan posle oprašivanja polenom kukuruza.*

**Ključne reči: pšenica, embrion, auksin, haploid**

UVOD: Proizvodnja haploidnih embriona putem hibridizacije između pšenice i kukuruza ima veliki značaj u oplemenjivačkim programima. Od haploidnih embriona u in vitro uslovima proizvode se haploidne biljčice, koje tretirane kolhicinom daju dihaploidne biljke već u prvoj godini rada. Dihaploidne linije imaju potpunu homozigotnost, a postizanje takve homozigotnosti klasičnim putem traje do desetak godina. Zenkteler i Nitzsche (1984) su prvi publikovali rezultate o mogućnostima proizvodnje haploidnih embriona iz hibridizacije pšenice i kukuruza. Laurie i Bennett (1986) su citološki ispitali embrione i utvrdili da hromozomi kukuruza nestaju iz embriona pšenice tokom prve tri mitotičke deobe. Brojni autori ispitivali su uticaj pojedinih faktora na nastanak i razvoj haploidnih embriona (Inagaki i Tahir, 1990; Suenaga, 1994; Campbell et al., 2000; Kaushik et al., 2004). Kao ključni faktori identifikovani su: vreme emskulacije pšenice, kvalitet polena kukuruza, spoljni uslovi u kojima se vrši oprašivanje, tip auksinskog preparata kojim se tretiraju klasovi, koncentracija auksina, vreme i način primene auksina, način

manipulacije sa klasovima pšenice. U ovom radu postavljeno je za cilj da se odredi optimalno vreme tretmana auksinom za dobijanje haploidnih embriona pšenice.

### Materijal i metod rada

Ogled je izveden u Institutu za oplemenjivanje bilja IPK - Gatersleben, Nemačka. Korišćena je ozima sorta pšenice Viginta kao majka. Donor polena je bio kineski voštani kukuruza varijetet ceratina. Pojedinačne biljke pšenice gajene su u saksijama prečnika 16 cm, a biljke kukuruza u saksijama prečnika 40 cm. Jedan dan pred cvetanje pšenice izvršena je emaskulacija, a emaskulirani klasovi su izolovani u pergament kese. Oprašivanje je uvek bilo jedan dan nakon emaskulacije. Za oprašivanje je korišćen svež polen kukuruza, sakupljen u petri kutije neposredno pred nanošenje četkicom na žigove tučka. Na klasovima je oprašeno 22 do 24 cveta. Oprašivanje je obavljeno u staklenoj bašti na temperaturi od 19°C.

Za tretiranje klasova izabran je sintetički auksin dikamba. U prethodnim istraživanjima

Originalni naučni rad (Original scientific paper)

<sup>1</sup> SLAVEN PRODANOVIĆ, [slavenp@agrifaculty.bg.ac.yu](mailto:slavenp@agrifaculty.bg.ac.yu), vanredni prof.; DRAGICA ZORIĆ, vanredni prof., Poljoprivredni fakultet, Beograd

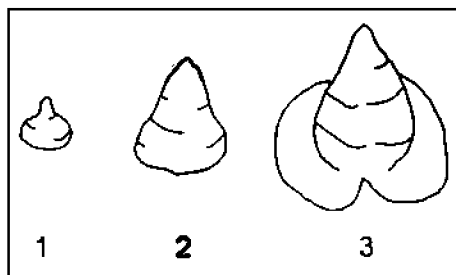
<sup>2</sup> FRITZ MATZK, Plant breeding institute IPK-Gatersleben, Germany

određena je optimalna koncentracija ovog auksina od 100 ppm. Ispitivan je uticaj vremena primene dikambe na broj formiranih embriona i njihove karakteristike. Urađena su četiri tretmana: potapanje klasova u rastvor dikambe pre emaskulacije - 1 dan i posle emaskulacije - 2, 6 i 10 dana (odnosno 1, 5 i 9 dana posle oprašivanja). Odabrano je po 7 primarnih klasova za svaki tretman.

Tretirani klasovi sa dve vršne internodije stabla stavljeni su u posude sa dnevno svežom vodom. Vađenje embriona iz kariopsisa pšenice obavljeno je pomoću pinceta pod binokularom, 20 dana posle oprašivanja. Embrioni svakog klasa su brojani po tretmanima, izmerena je njihova veličina i određen stadijum njihovog razvoja.

Za ocenu stadijuma razvoja embriona korišćena je skala od 1 do 3 (Sl. 1).

*Sl. 1. Razvojni stadijumi embriona*  
*Fig. 1. Development stages of embryo*



Frekvencija formiranja embriona izračunata je iz jednačine:

$$EFF = \left( \frac{\text{Broj obrazovanih embriona}}{\text{Broj obrazovanih kariopsisa}} \right) \times 100$$

### Rezultati i diskusija

Rezultati dobijeni analizom ispitivanih klasova pšenice iz svih tretmana za broj zrna i embriona, kao i za veličinu i stadijum razvoja embriona prikazani su u tabeli 1.

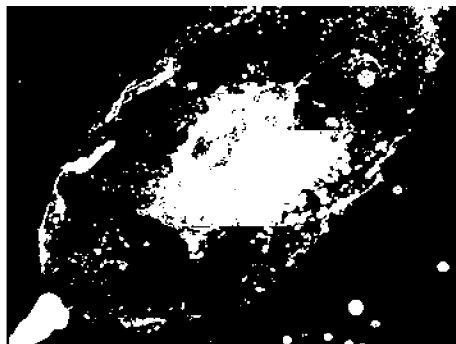
Iz podataka u tabeli 1 uočava se da je do obrazovanja haploidnih embriona došlo samo kada je dikamba primenjena 1 i 5 dana posle oprašivanja. U klasovima tretiranim dikambom jedan dan pre oprašivanja i devet dana posle oprašivanja nisu nađeni embrioni.

Postavlja se pitanje zašto u tretiranim klasovima pre oprašivanja nema embriona i zašto auksin dikamba nije stimulatивно delovao u tom slučaju na razvoj embriona? Poznato je da auksini imaju brzo i sistemsko

dejstvo, lako se transportujući kroz sva biljna tkiva (Fischer-Iglesias et al., 2001). Egzogeno primenjeni auksini dospevaju do embrionove kesice i jajne ćelije pre nego što su obavljene oprašivanje i oplodnja. Auksini utiču na izduživanje i druge promene u građi ćelija (Rober-Kleber et al., 2003). U emaskuliranim klasovima dikamba je delovala tako da je jajna ćelija očigledno izgubila sposobnost za fertilizaciju. Dakle, dikamba je onemogućila obrazovanje zigota i njen stimulatívni efekat na razvoj embriona uopšte nije došao do izražaja. Izvađene embrionove kesice iz kariopsisa klasova ovog tretmana bile su izdužene, sa vakuoliziranim ćelijama, i aparatom jajne ćelije koji se nije bojio aceto-karminom (Sl. 2).

*Sl. 2. Vakuolizirane ćelije embrionove kesice pšenice bez embriona*

*Fig. 2. Vacuolized cells of wheat embryo sac without the embryo*



Pri proizvodnji haploidnih embriona, oplemenjivači moraju obratiti pažnju na navedeno negativno dejstvo auksina posebno ukoliko koriste veći broj klasova na istoj biljci. Klasovi sukcesivno dospevaju u fazu "pred cvetanje", a emaskulacija i oprašivanje traju 5 do 10 dana. Ukoliko se prvi oprašeni klas tretira prskanjem auksinom na biljci, auksin će se transportovati kroz biljna tkiva i ispoljiće letalno dejstvo na formiranje zigota u svim ostalim mlađim klasovima koji još nisu oprašeni. Oplemenjivači zato moraju odsecati oprašene klasove pšenice i potapati ih u auksin, pazeći da auksin ne dođe u kontakt sa neoprašenim klasovima.

U klasovima tretiranim dikambom devet dana posle oprašivanja takođe nije došlo do obrazovanja embriona. U ovom slučaju, auksin nije onesposobio jajnu ćeliju i dolazilo je do oplodnje i formiranja zigota. Početnim

**Tab. 1. Broj, veličina i stadijum razvoja embriona u klasovima pšenice tretirane dikambom**  
**Tab. 1. Number, size and development stage of embryos in spikes of wheat treated with dicamba**

Tretman dikambom Dicamba treatment	Broj klasa No of spike	Broj kariopsisa u klasu Caryopses / spike	Broj embriona u klasu Embryos / spike	Veličina embriona (mm) Embryo size (mm)	Razvojni stadijum embriona Development stage of embryo
1 dan pre oprašivanja 1 day before pollination	1	17	0	0	0
	2	14	0	0	0
	3	13	0	0	0
	4	16	0	0	0
	5	15	0	0	0
	6	13	0	0	0
	7	15	0	0	0
1 dan posle oprašivanja 1 day after pollination	1	19	2	2.1; 2.2	3; 3
	2	22	0	0	0
	3	22	1	1.8	3
	4	22	1	2.4	3
	5	26	1	2.3	3
	6	20	2	1.9; 2.1	3; 3
	7	24	1	2.0	3
5 dana posle oprašivanja 5 days after pollination	1	18	0	0	0
	2	21	1	1.9	3
	3	21	1	1.8	3
	4	22	1	1.6	3
	5	15	1	1.3	3
	6	22	1	1.5	3
	7	18	1	1.3	3
9 dana posle oprašivanja 9 days after pollination	1	12	0	0	0
	2	18	0	0	0
	3	15	0	0	0
	4	11	0	0	0
	5	18	0	0	0
	6	20	0	0	0
	7	15	0	0	0

**Tab. 2. Komparativni efekti tretmana dikambom na formiranje embriona pšenice**  
**Tab. 2. Comparative effects of dicamba treatments on wheat embryo formation**

Tretman dikambom Dicamba treatment	Prosečan broj kariopsisa u klasu Mean value of caryopses / spike	Prosečan broj embriona u klasu Mean value of embryo / spike	Frekvencija formiranja embriona (%) Embryo formation frequency (%)	Prosečna veličina embriona (mm) Average size of embryos (mm)	Prosečan stadijum razvoja embriona Average development stage of embryo
1 dan pre oprašivanja 1 day before pollination	14.71	0	0	0	0
1 dan posle oprašivanja 1 day after pollination	22.14	1.14	5.16	2.10	3
5 dana posle oprašivanja 5 days after pollination	19.57	0.86	4.38	1.57	3
9 dana posle oprašivanja 9 days after pollination	15.63	0	0	0	0

deobama formirao se embrion od nekoliko ćelija, koji je abortirao zbog dugog odsustva stimulativnog efekta auksina. U kariopsisima klasova ovog tretmana nađeni su embrioni u ranim fazama razvoja koji se nisu bojili aceto-karminom (Sl. 3).

**Sl. 3. Abortiran proembrion u globularnom stadijumu razvoja**

**Fig. 3. Aborted proembryo in globular development stage**



Na osnovu rezultata ovog istraživanja haploidni embrioni su se formirali kada je auksin primenjen 1 i 5 dana posle oprašivanja. U oba tretmana svi izvađeni embrioni bili su potpuno zreli na osnovu ocene njihovog razvojnog stadijuma (3). Jedan tipičan zreli embrion prikazan je na slici 4.

**Sl. 4. Zreli haploidni embrion pšenice**

**Fig. 4. Mature wheat haploid embryo**



Frekvencija dobijenih haploidnih embriona bila je relativno niska u oba uspešna tretmana (Tab. 2). Raniji tretman auksinom dao je nešto veću frekvenciju embriona (5.16 %) u odnosu na kasniji tretman (4.38 %). Embrioni dobijeni korišćenjem dikambe jedan dan posle oprašivanja bili su prosečno krupniji (2.10 mm) od embriona dobijenih korišćenjem dikambe pet dana posle oprašivanja (1.57 mm). Razlika u veličini embriona

verovatno se javlja kao posledica razlika u broju i brzini njihovih ćelijskih deoba. Embrioni koji su stimulirani auksinom započinju intenzivan razvoj, dok embrioni koji nisu stimulirani auksinom imaju usporen razvoj. Nestimulirani embrioni petog dana posle oplodnje nisu abortirali, ali su prošli kroz manji broj deoba.

Veličina embriona značajna je u praktičnom radu oplemenjivača. Haploidni embrioni nalaze se u tačnom rastvoru kariopsisa pšenice. Krupnije haploidne embrione lakše je uočiti, izvađiti i postaviti na hranljivu podlogu nego sitnije.

Broj kariopsisa je veći u klasovima koji su formirali embrione nego u klasovima koji ih nisu formirali (Tab. 2). Uočava se da vreme primene auksina 1 do 5 dana posle oprašivanja utiče pozitivno ne samo na broj formiranih embriona, nego i na broj kariopsisa.

Rezultati ispitivanja uticaja vremena primene auksina na formiranje haploidnih embriona koji su dobijeni u ovom radu, u skladu su sa oplemenjivačkom praksom i rezultatima ispitivanja drugih autora. Mehta i Angra (2000) injektiraju auksin 2,4-D ispod kolenaca pšenice 24 časa posle oprašivanja. Kaushik et al. (2004) upoređujući različite metode konstatuju da se najveća frekvencija haploidnih embriona dobija stavljanjem klasića pšenice u medijum sa auksinom dva dana posle oprašivanja. Verma et al. (1999) tretiraju auksinom klasove pšenice tri dana sukcesivno, počevši od prvog dana posle oprašivanja.

## Zaključak

Vreme primene auksina utiče na formiranje haploidnih embriona u ukrštanjima između pšenice i kukuruza. Rani tretman auksinom klasova pšenice pre oprašivanja polenom kukuruza onemogućava formiranje zigota i razvoj embriona. Tretman auksinom posle oprašivanja ne utiče na formiranje zigota. Najbolji rezultati u pogledu broja i veličine embriona dobijaju se primenom auksina jedan dan posle oprašivanja. Primena auksina pet dana posle oprašivanja utiče na smanjenje broja embriona i smanjenje njihove veličine. Primena auksina devet dana posle oprašivanja je zakasnela jer su mladi embrioni već abortirali. Vreme primene auksina utiče i na broj formiranih kariopsisa. Pri preranoj, kao i pri zakasneloj primeni auksina formira se manje kariopsisa.

## LITERATURA

- CAMPBELL, A.W., GRIFFIN, W.B., BURRITT, D.J., CONNER, A.J. (2000): Production of wheat doubled haploids via wide crosses in New Zealand wheat. *New Zealand Journal of Crop and Horticulture Science*, 28, 185-194.
- FISCHER-IGLESIAS, C., SUNDBERG, B., NEUHAUS, G., JONES, A.M. (2001): Auxin distribution and transport during embryonic pattern formation in wheat. *Plant J.*, 26, 115-129.
- INAGAKI, M., TAHIR, M. (1990): Comparison of haploid production frequencies in wheat varieties crossed with *Hordeum bulbosum* L. and maize. *Jap. J. Breed.*, 40, 165-174
- KAUSHIK, N., SIROHI, M., KHANNA, V.K. (2004): Influence of age of the embryo and method of hormone application on haploid embryo formation in wheat x maize crosses. *Proceedings of the 4th International Crop Science Congress. Brisbane, Australia, 26 Sep - 1 Oct 2004* ISBN 1 920842 20 9.
- LAURIE, D. A., BENNETT, M. D. (1986): Wheat x maize hybridization. *Can. J. Genet. Cytol.*, 28, 313-316.
- MEHTA, Y.R., ANGRA, D. C. (2000): Somaclonal variation for disease resistance in wheat and production of dihaploids through wheat x maize hybrids. *Genet. Mol. Biol. (Sao Paulo)*, 23, 617-622.
- ROBER-KLEBER, N., ALBRECHTOVA, J.T.P., FLEIG, S., HUCK, N., MICHALKE, W., WAGNER, E., SPETH, V., NEUHAUS, G., FISHER-IGLESIAS, C. (2003): Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase is involved in auxin-mediated cell elongation during wheat embryo development. *Plant Physiol.*, 131, 1-11.
- SUENAGA, K. (1994): Doubled haploid system using the inter-generic crosses between wheat (*Triticum aestivum* L.) and maize (*Zea mays* L.). *Bull. Natt. Inst. Agrobiol. Resour.*, 9, 83-139.
- VERMA, V., BAINS, N.S., MANGAT, G.S., NANDA, G.S., GOSAL, S.S., SINGH K. (1999): Maize genotypes show striking differences for induction and regeneration of haploid wheat embryos in the wheat x maize system. *Crop Science*, 39, 1722-1727.
- ZENKTELER, M., NITZSCHE, W. (1984): Wide hybridization experiments in cereals. *Theor. Appl. Genet.*, 68, 311-315.

### INFLUENCE OF TIME OF AUXIN APPLICATION ON WHEAT HAPLOID EMBRIO FORMATION

PRODANOVIĆ S., MATZK F., ZORIĆ DRAGICA

#### SUMMARY

A hybrid interspecies zygote appears after crosses between wheat and maize. Zygote derived after usual self-fertilization in wheat is dividing by mitotic divisions into embryo. However, interspecies zygote aborts soon. Auxin treatment is widely used to promote its development. Growth hormones auxins have stimulative or toxic effects on plant tissues in relation to its concentration and the time of application. In this paper the effect of time of auxin dicamba application on embryo in wheat x maize crosses was investigated. Chromosomes of pollen donor parent are eliminated quickly in cells of such embryos and they become haploid. It was concluded that for the production of haploid embryos the best time for auxin application is one day after pollination with maize.

**Key words:** wheat, embryo, auxin, haploid