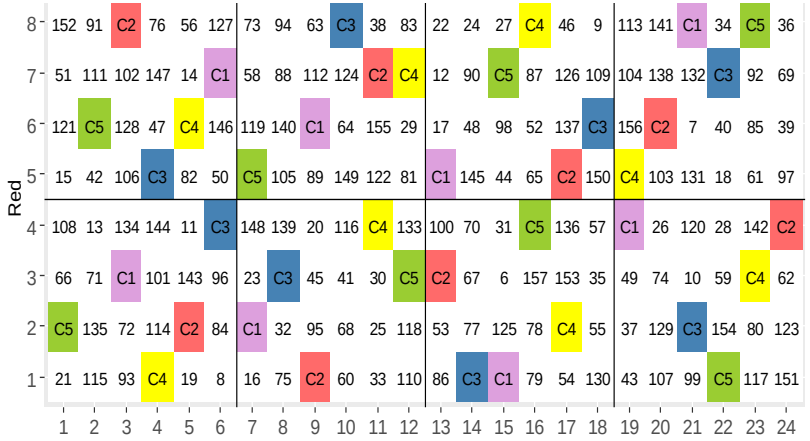
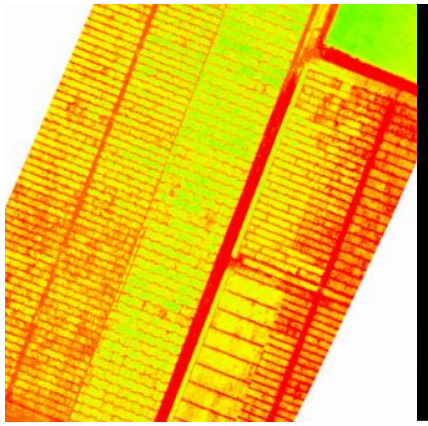
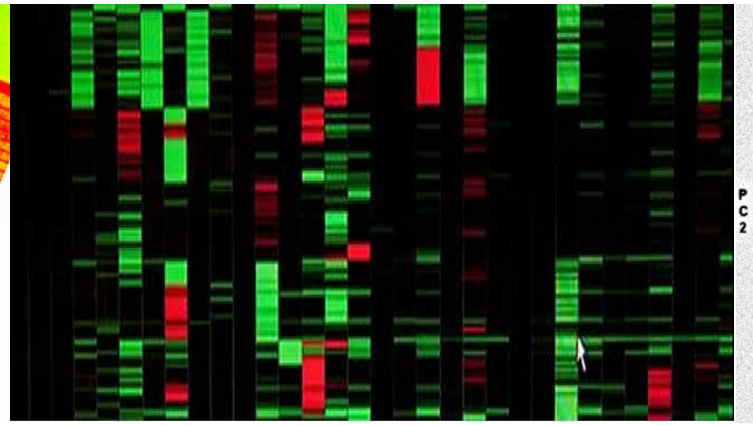
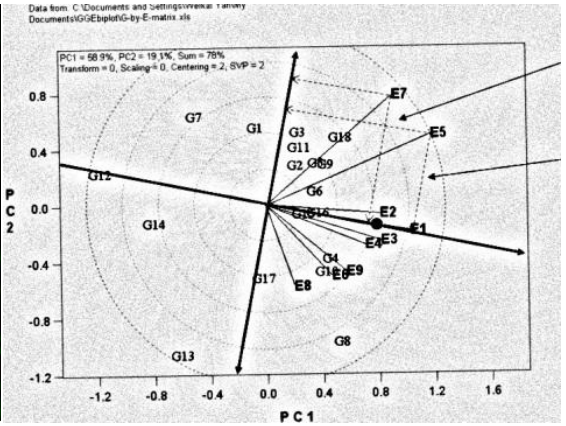
Inovativni pristup u stvaranju hibrida kukuruza

Bojan Mitrović



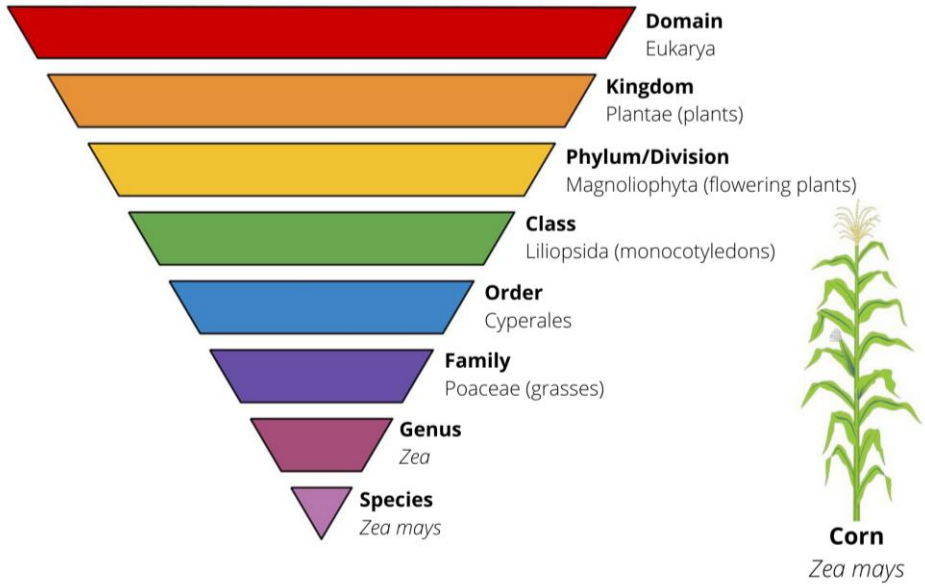




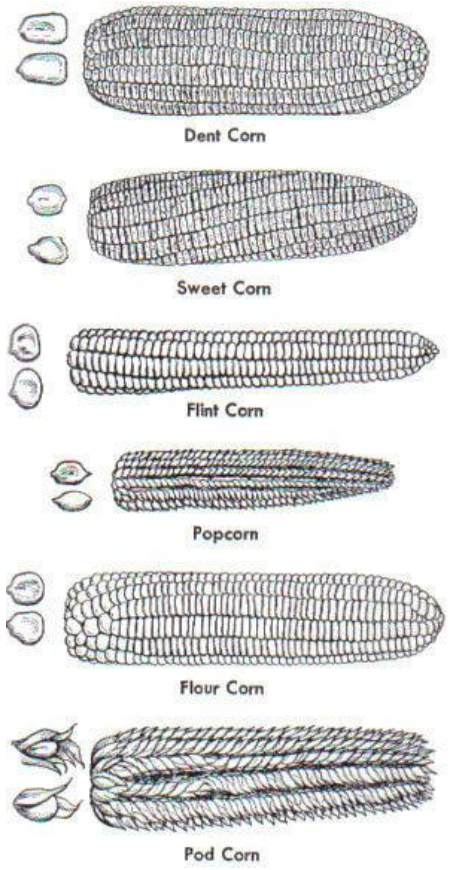


Botanička klasifikacija i diverzitet kukuruza

Taksonomska klasifikacija



Podvrste kukuruza





Više od 30.000 različitih formi

Morfološke osobine biljke kukuruza

- Jednodoma (monoecijska) biljka sa razdvojenim cvastima
- Muška cvast je metlica , a ženska cvast je klip sa svilom koja predstavlja produžetak žiga tučka

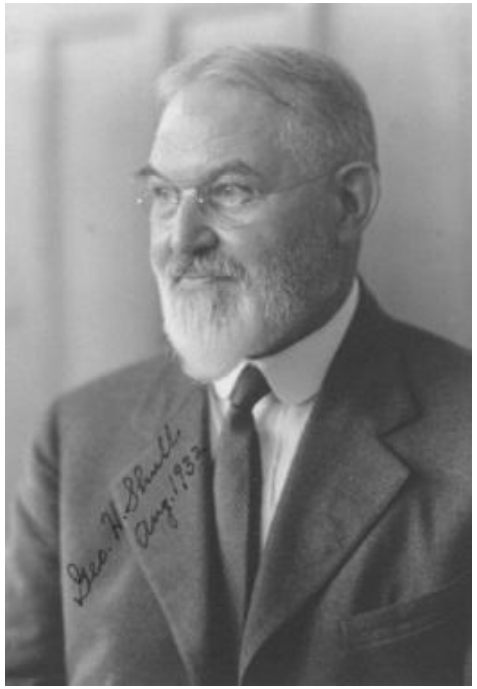






Inbriding – hibridizacija
Početak naučno utemeljenog oplemenjivanja kukuruza

- Otkriće heterozisa i inbridinga u prvim nezavisnim istraživanjima naučnika *G.H. Shull-a* (1908, 1909) и *E.M. East-a* (1909)
- Kao početni material, za razvoj inbred linija, korišćene su lokalne sorte i populacije slobodne oplodnje
- Četvorolinijski hibridi *D.F. Jones*, (1918)
- Dvolinijski hibridi od kraja 1950-ih



George H.Shull



Edward M.East

Efekat heterozisa i primena u oplemenjivanju kukuruza



B73 F1 Mo17

B73 x Mo17



B73 F1 Mo17

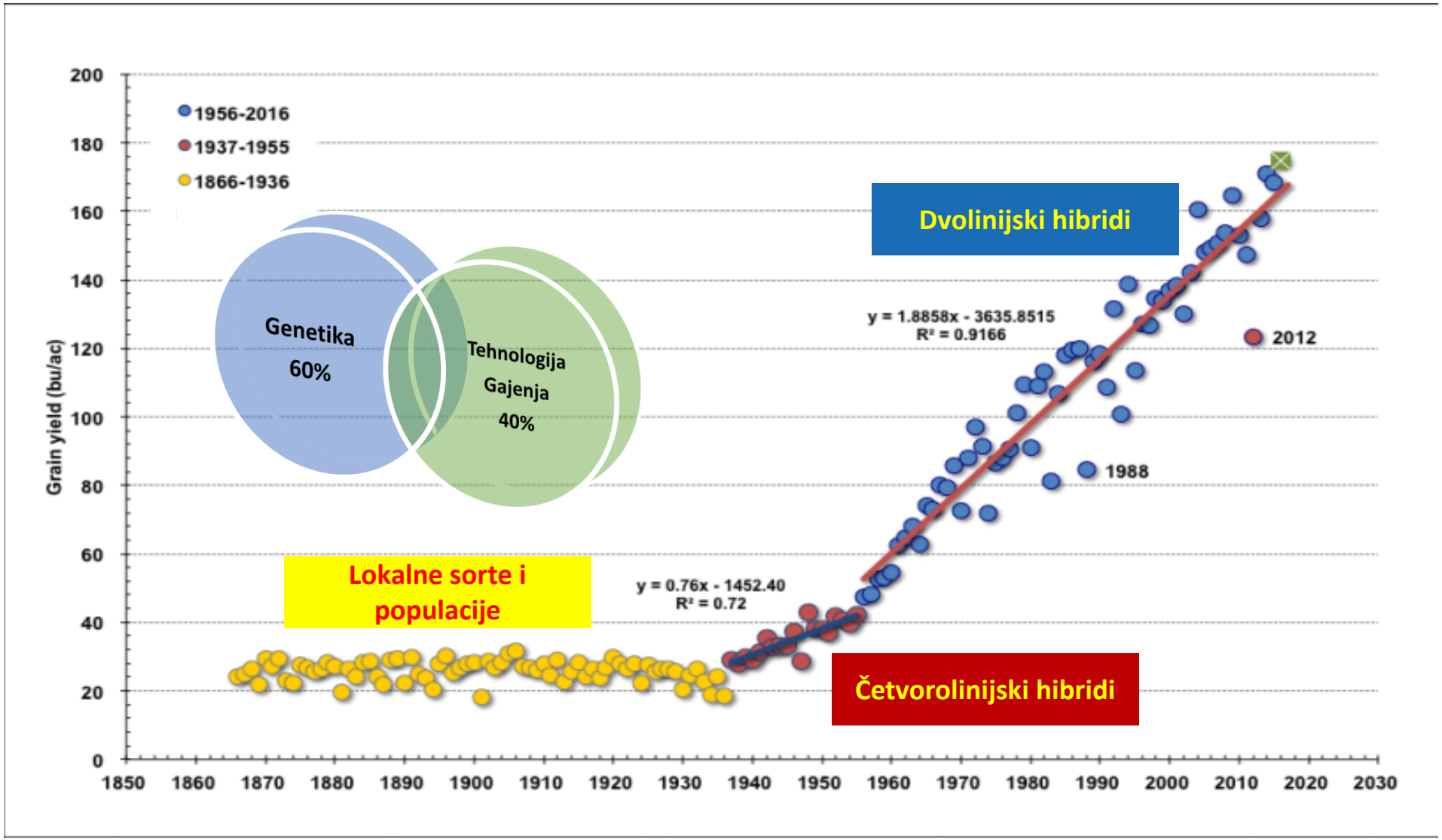
B73 x Mo17

Grupa jugoslovenskih naučnika na usavršavanju u Sjedinjenim Američkim Državama (Univerzitet Champaign Illinois, 1953)



- Nakon ove posete, u Jugoslaviji počinje rad na stvaranju prvo četvorolinijskih, a nedugo zatim i dvolinijskih hibrida kukuruza

Prinosi kukuruza u SAD



Smith et al, 2014

Osobine od interesa u oplemenjivanju kukuruza



- U svakom oplemenjivačkom programu neophodan je jasno definisan cilj
- Najčešće se u tu namenu kreira profil sorte/proizvoda (*product profile*)

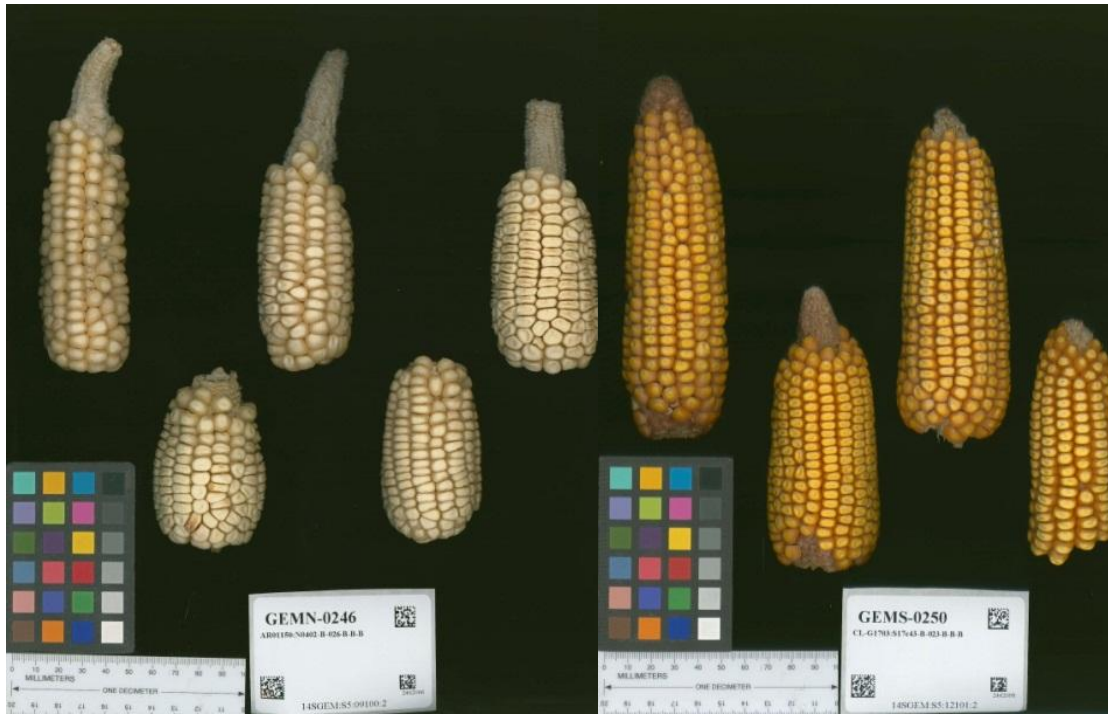
- U oplemenjivačkim programima koji imaju za cilj stvaranje hibrida kukuruza standardnog kvaliteta zrna selekcija je najčešće usmerena na sledeće osobine:

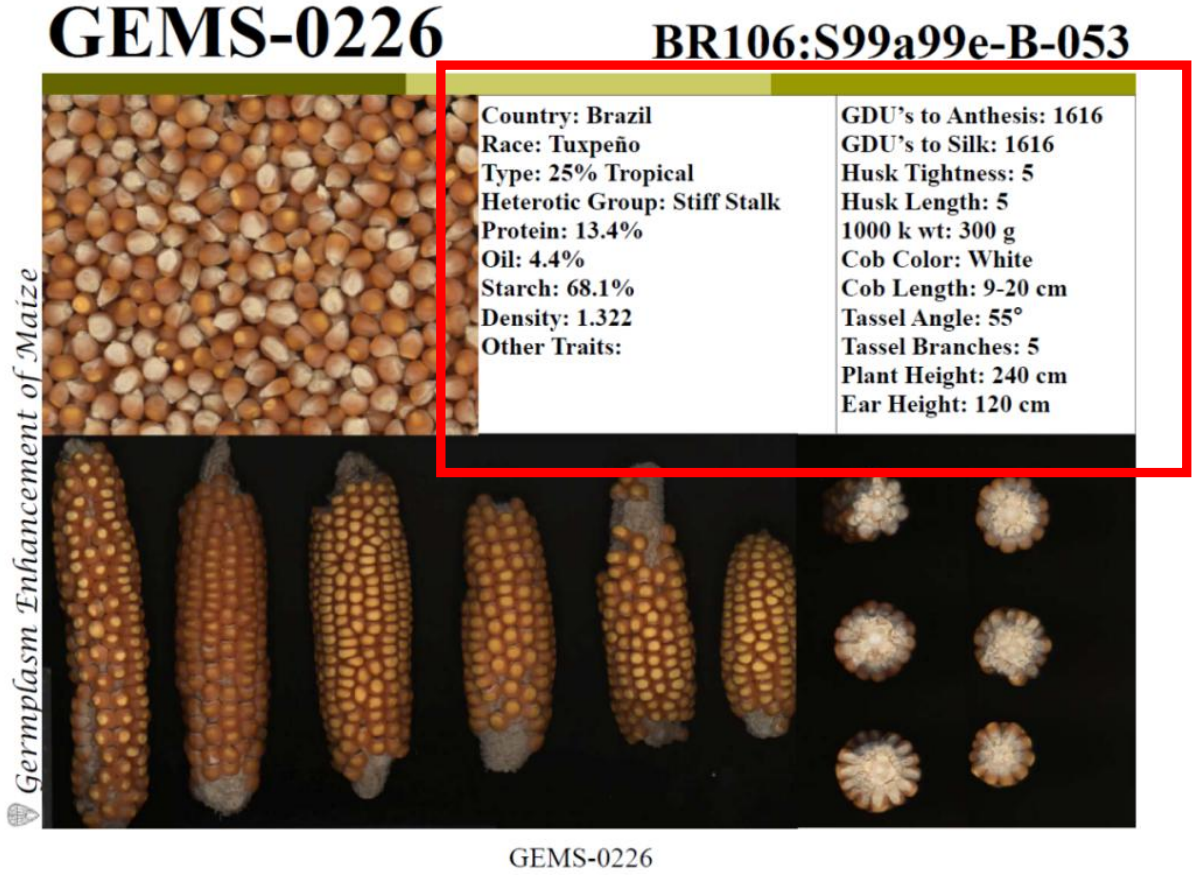
- Prinos zrna
- Brzina otpuštanja vlage iz zrna
- Tolerantnost na bolesti i štetočine
- Tolerantnost na sušu i toplotni stres
- Adaptabilnost i stabilnost
- Tolerantnost na herbicide
- Kvalitet zrna



Izvori genetičke varijabilnosti

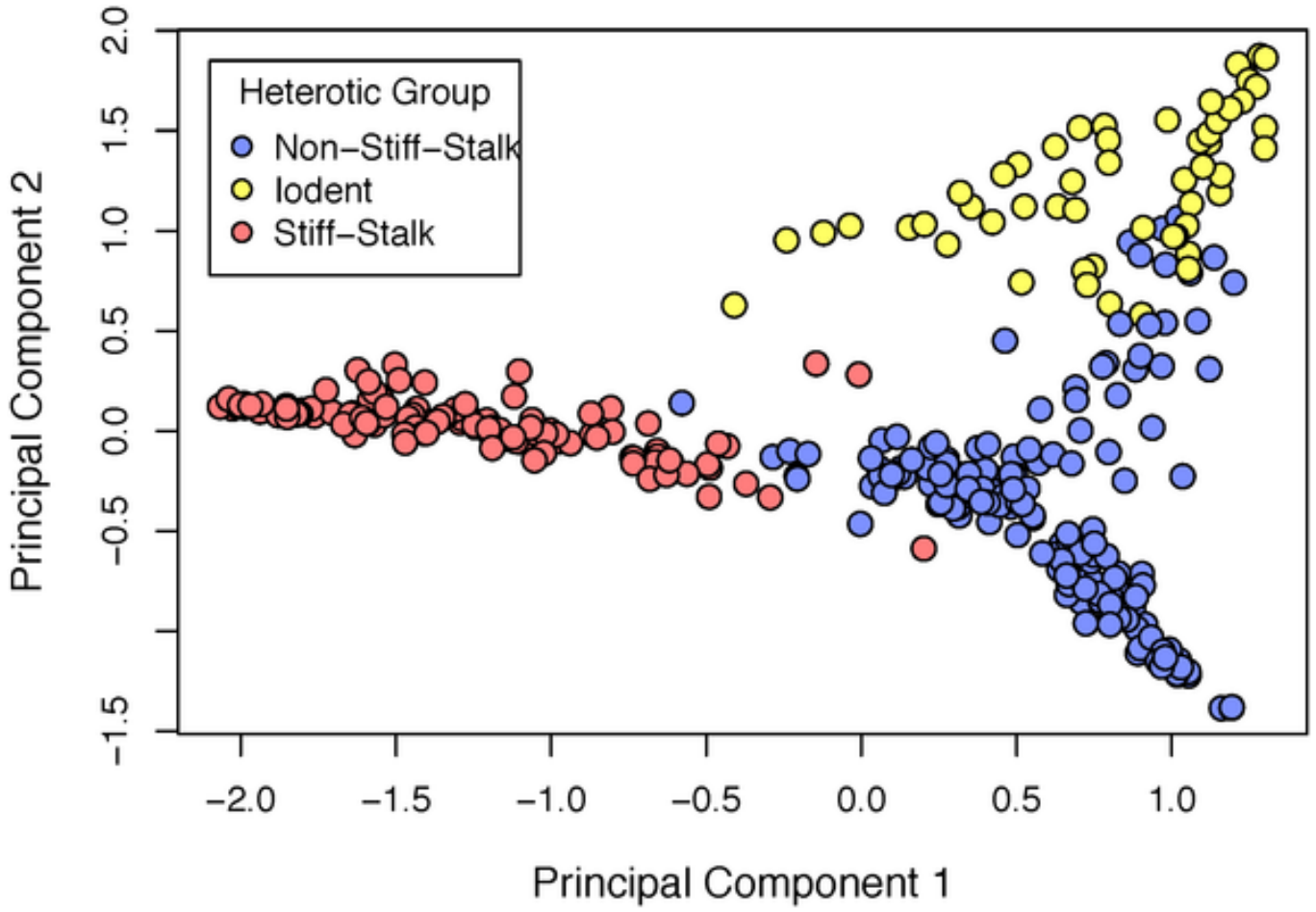
- Uključivanje dostupnog selekcionog materijala u oplemenjivačke programe
- ex PVP inbred linije
- razmena materijala sa drugim institucijama
- inbred linije programa GEM





GEMS-0226

Pojam heterotičnih grupa u oplemenjivanju kukuruza



- Predstavljaju grupe genetički divergentnih inbred linija koje u ukrštanjima sa linijama iz suprotnih grupa ispoljavaju visok heterozis
- Postoji tri osnovne i veliki broj prelaznih grupa, kombinacija grupa itd.
- Umnogome pomažu u organizaciji oplemenjivačkog materijala i doprinose većem uspehu selekcije

Metode selekcije kukuruza

Popravke populacija		Razvoj inbred linija
Intra-	Inter-	
1. Masovna selekcija	1. Half sib-recipročna rekurentna selekcija	1. Pedigre metod
2. Half-sib - klip na red i test ukrštanja	2. Full-sib – recipročna Full sib	2. Metod povratnog ukrštanja
3. Full sib	3. Test ukrštanja	3. SSD
		4. Dvostruki Haploidi

Razvoj inbred linija

Pedigre metod selekcije

- Podrazumeva detaljno poznavanje selekcionog materijala, izbor roditelja za ukrštanje koji poseduju osobine od interesa i bazu podataka gde se čuvaju informacije o potomstvima i njihovoj povezanosti (*Troyer,* 2001).

- Najveći broj novostvorenih elitnih linija stvoren je kratkoročnim programima selekcije iz populacija uske genetičke osnove (biparentalne i backcross populacije)

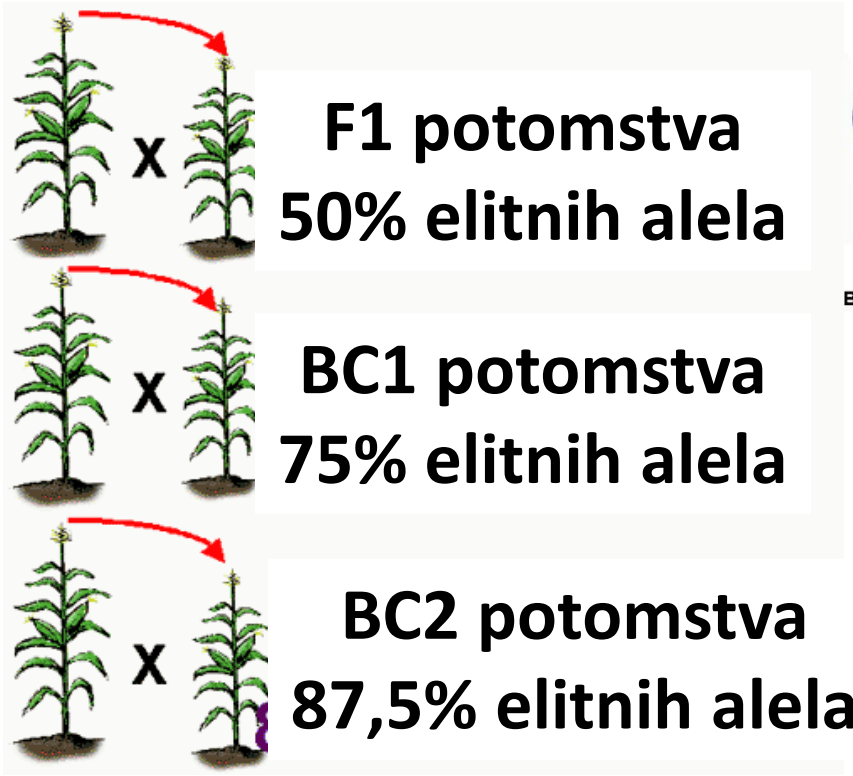
- **Prednost** – veća frekvencija poželjnih alela nego sorata, lokalnih populacija I sintetičkih populacija široke genetičke osnove.

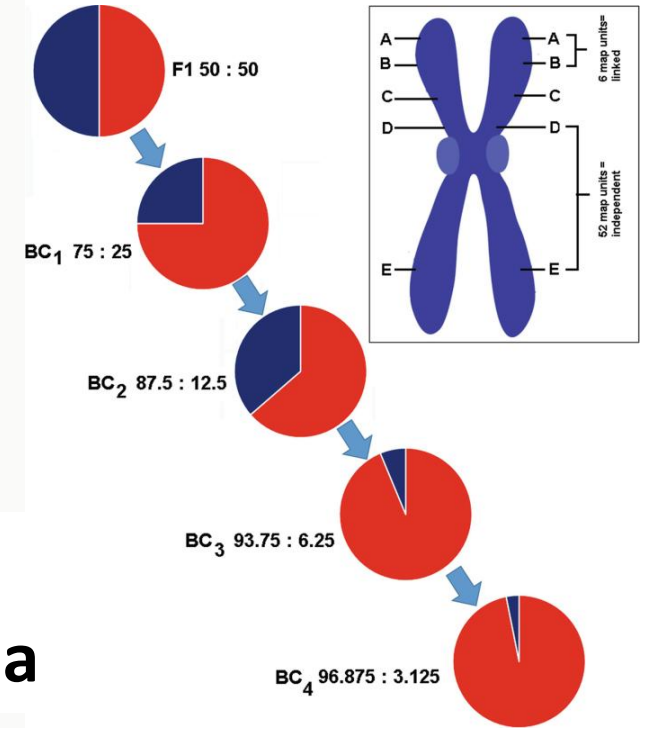
Primer oplemenjivačke baze podataka

ER'21	LINK	PEDIGRE	CODE	HET.GR	S	A/S	NOTES
1	1	F2-F2/F2..	10/3490-1	F2	8		
2	2	F2-F2/F2..	10/3490-1	F2	8		
3	3	POP NSB (C5)/F2..	11/3333-14	F2	8		
4	3	POP NSB (C5)/F2..	11/3333-14	F2	8		
5	5	POP NSB (C5)/F2..	11/3333-22	F2	8		
6	6	POP NSB (C5)/F2..	11/3333-22	F2	8		
7	8	F2Syn11	13/3325-17	F2	8		
8	8	F2Syn11	13/3325-17	F2	8		
9	9	F2Syn11	13/3325-18	F2	8		
10	10	F2Syn11	13/3325-5	F2	8		
11	11	F2Syn11	13/3325-5	F2	8		
12	12	(KWF2)2*F2Syn	14/3422-7	F2	8		
13	13	(KWF2)2*F2Syn	14/3422-7	F2	8		
14	14	14NS	14NS	F2	8		
15	15	14NS	14NS	F2	8		
16	18	POP NSB (C5)	230136/9	F2	8		
17	22	F2*(ND246)2;Co255-220019/F2..	10/3478-4	F2Lc	8		
18	23	F2*(ND246)2;Co255-220019/F2..	10/3478-4	F2Lc	8		
19	2357/19	OPP10*14NS	17/3903-3	F2Lc	4		
20	2357/19	OPP10*14NS	17/3903-3	F2Lc	4		
21	1861	OPP21*14NS	17/3906-5.2	F2Lc	5		
22	1861	OPP21*14NS	17/3906-5.2	F2Lc	5		
23	1862	OPP22*14NS	17/3907-4	F2Lc	5		
24	1862	OPP22*14NS	17/3907-4	F2Lc	5		
25	24	F2(KWS)*(ND246)2;Co255;220019	220070/16	F2Lc	8		
26	25	F2(KWS)*(ND246)2;Co255;220019	220070/16	F2Lc	8		
27	37/19	PHTD5	220072	ID	8		
28	37/19	PHTD5	220072	ID	8		

Metod povratnog ukrštanja (Backcross breeding)

- Koristi se kod ubacivanja (introgresije) željenih osobina iz linije donora u liniju recipijenta
- Cilj je ubaciti željenu osobinu, a zadržati što više karakteristika linije recipijenta
- Može biti potpomognuta molekularnim markerima i zimskom generacijom da bi se proces ubrzao





Dvostruki haploidi (double haploids)

Stvaranje inbred linija procesom samooplodnje

I — A x B → F1 zimska generacija

II — F2

III — S1 → S2 zimska generacija

IV — S3 → S4 zimska generacija

V — S5 → S6 zimska generacija

99,2%

Stvaranje inbred linija metodom dvostrukih haploida

I — A x B

II — F1 x haploid inducer

III — H → tretman kolhicinom → DH zimska generacija

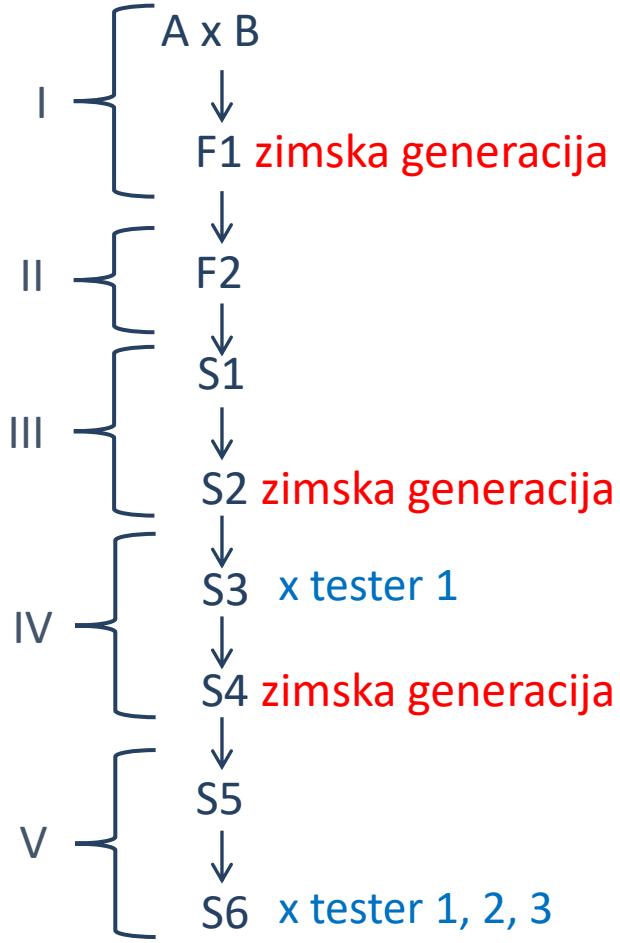
100%



Procena kombinacionih sposobnosti novostvorenih inbred linija

Koncept ranog testiranja inbred linija (S_2 ili S_3 generacija)

- Predloženi od strane *Jenkins,* (1939) i *Sprague,* (1939, 1946)
- **Prednost** – detekcija najprinosnijih genotipova u ranim fazama inbridinga i njihova dalja selekcija pedigre metodom do postizanja homozigotnosti
- **Nedostatak** – promena potencijala za prinos kao posledica segregacije gena u procesu samooplodnje. U kasnijim generacijama samooplodnje, kada je veći broj lokusa fiksiran, dobijaju se precizniji rezultati testiranja (*Troyer,* 2001)
- Razvojem tehnologije **dvostrukih haploida** testiranje se vrši odmah pri formiranju inbred linije pri 100% homozigotnosti.



Izbor testera

- Pod pojmom tester podrazumeva se genotip (inber linija, hibrid, populacija) sa kojom se ukrštaju novostvorene linije u cilju procene njihovih kombinacionih sposobnosti
- Razlikujemo opšte (GCA) I posebne (SCA) kombinacione sposobnosti

- Testeri uske ili široke genetičke osnove
- Testeri koji su u genetičkom smislu srodni ili nesrodni sa linijama koje se testiraju
- Testeri sa većim ili manjim brojem poželjnih alela
- Testeri koji imaju visok ili nizak potencijal za prino***ner se***

  - **Komercijani oplemenjivački programi**

- Elitne linije sa visokom frekvencijom poželjnih alela → Identifikacija najboljih parova ukrštanja (posebne kombinacione sposobnosti)



Testiranje hibridnih kombinacija u multilokacijskim ogledima

Višegodišnji multi-lokacijski ogledi su osnova za pravilan izbor genotipova

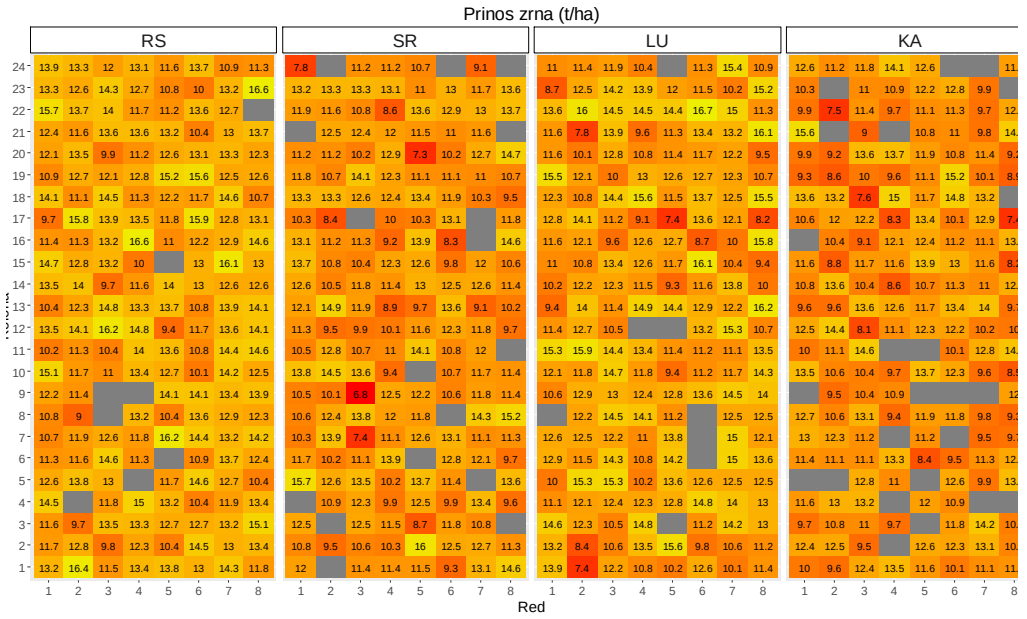
- Plan ogleda – u zavisnosti od faze testiranja (sa ili bez ponavljanja, parcijalna ponavljanja, augmented, red kolona, alfa latis i dr.)
- Analiza podataka – linearni mešoviti modeli (*AsReml*, *R…)*
- ocene vrednosti parcelica u toku vegetacije

- AMMI
- GGE biplot

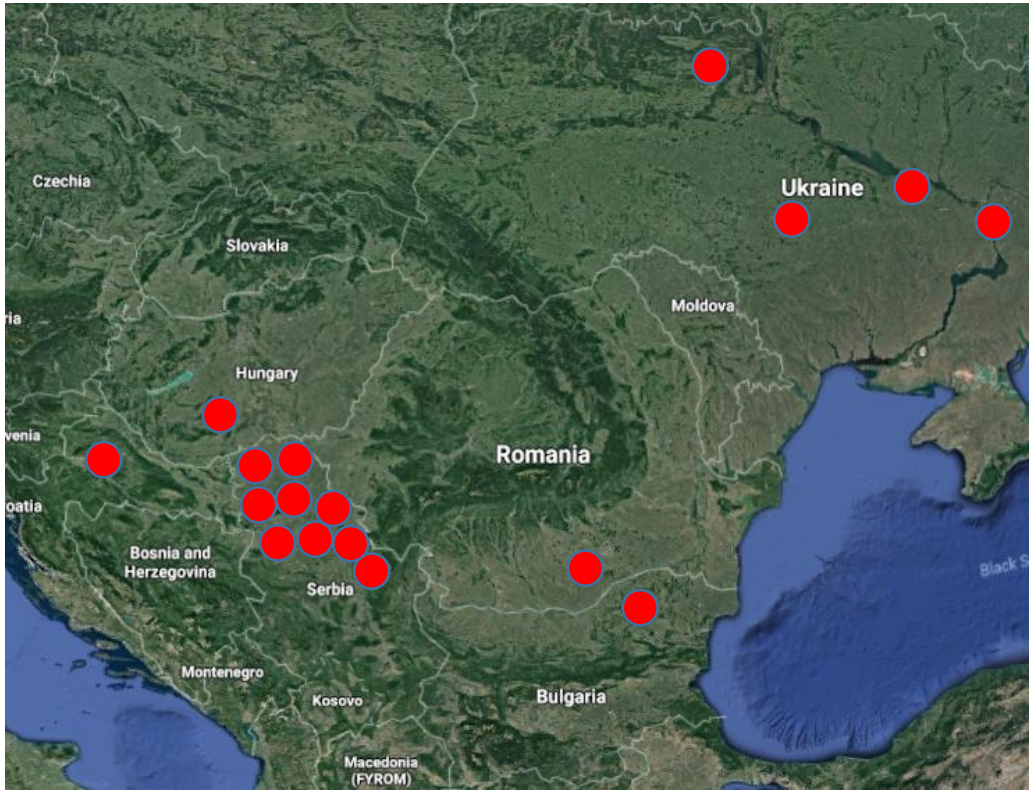
G x E efekti

$$\underset{n\times 1}{y} = \underset{n\times p}{X}\overset{p\times 1}{\tau} + \underset{n\times mt}{Z_{ge}}\overset{mt\times 1}{u_{ge}} + \underset{n\times q}{Z_{p}}\overset{q\times 1}{u_{p}} + \overset{n\times 1}{e}$$

eksperimentalni efekti

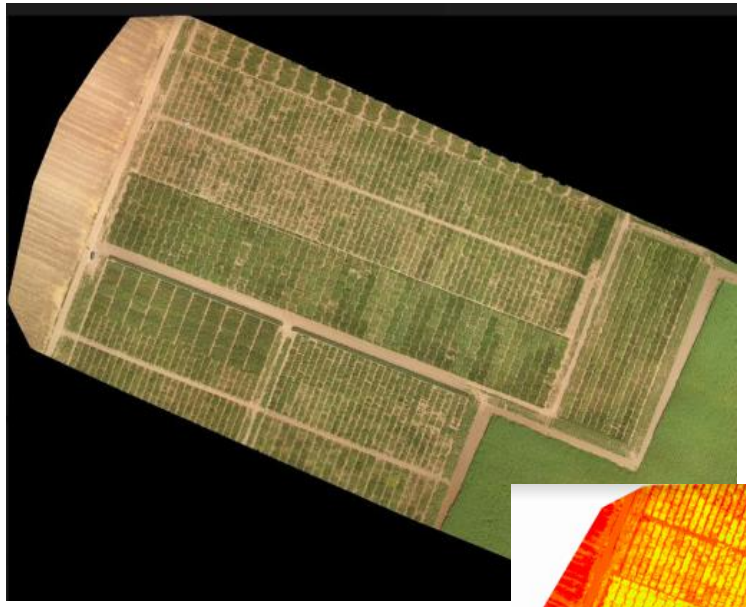


Mreža multi-lokacijskih ogleda



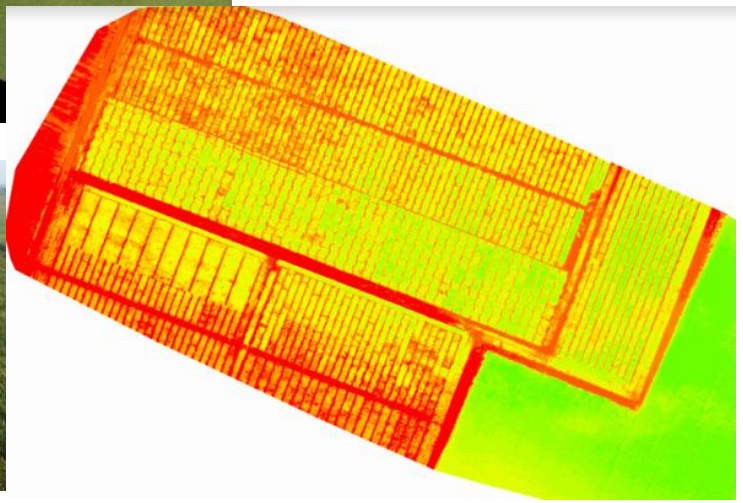
Detekcija mega-sredina / ključ ka racionalizaciji broja lokaliteta za testiranja

Precizna fenotipizacija









Donošenje odluka o izboru hibrida

- Nakon obrade rezultata multilokacijskih ogleda, najčešće nakon drugog kruga testiranja potrebno je doneti odluku koji hibridi će biti poslati u proces registracije
- U Srbiji registracija hibrida traje dve godine pri čemu se vrše testiranja i poređenja sa hibridima standardima
- Da bi bio registrovan, hibrid mora da ostvari prinos za 3% viši u odnosu na prosek hibrida standarda i vlagu nižu za 1% u okviru svoje grupe zrenja
- Nakon registracije neophodno je dodatno testirati registrovane hibride kako bi se odredili kandidati za komercijalizaciju

↑ ↑ ↑

NAJVAŽNIJI KORAK U PROCESU OPLEMENJIVANJA



Oprema modernih oplemenjivačkih stanica

Precizna sejalica za setvu mikroogleda



Kombajn koji omogućava berbu dve parcelice u jednom prohodu





R.T.K.



GPS „Thrimble“



Brojač zrna

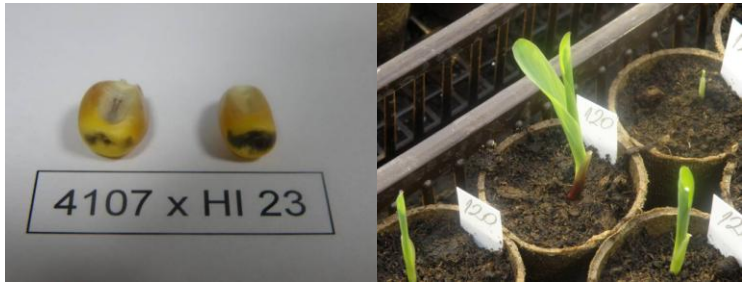
Infrastruktura za razvoj dvostrukih haploida



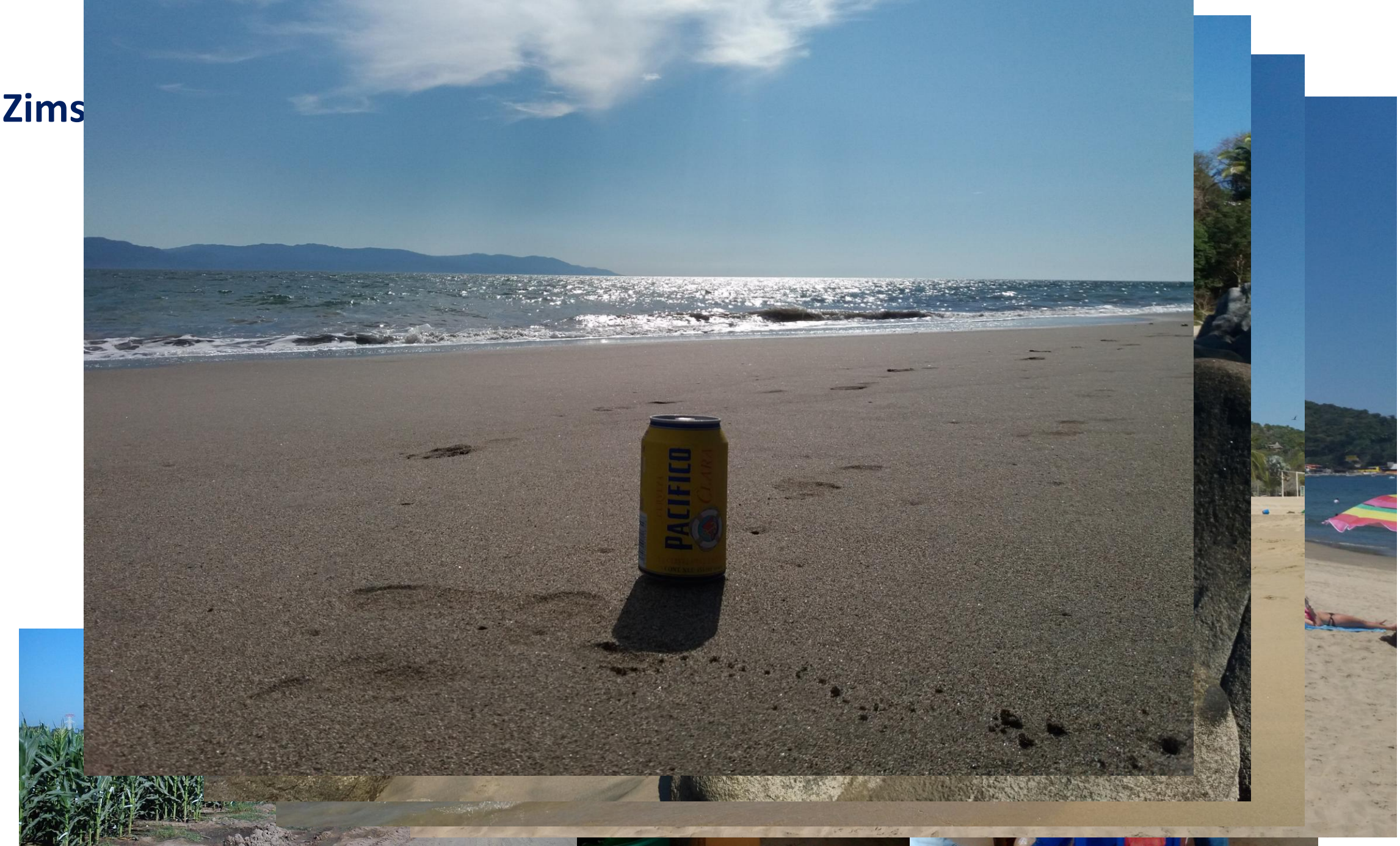








Zims



Inovativni metodi u oplemenjivanju kukuruza

- Oplemenjivačka jednačina

$$R_t = \frac{ir\sigma_A}{y}$$



Rt – genetička dobit od selekcije u jedinici vremena

i – intenzitet selekcije → genomska selekcija

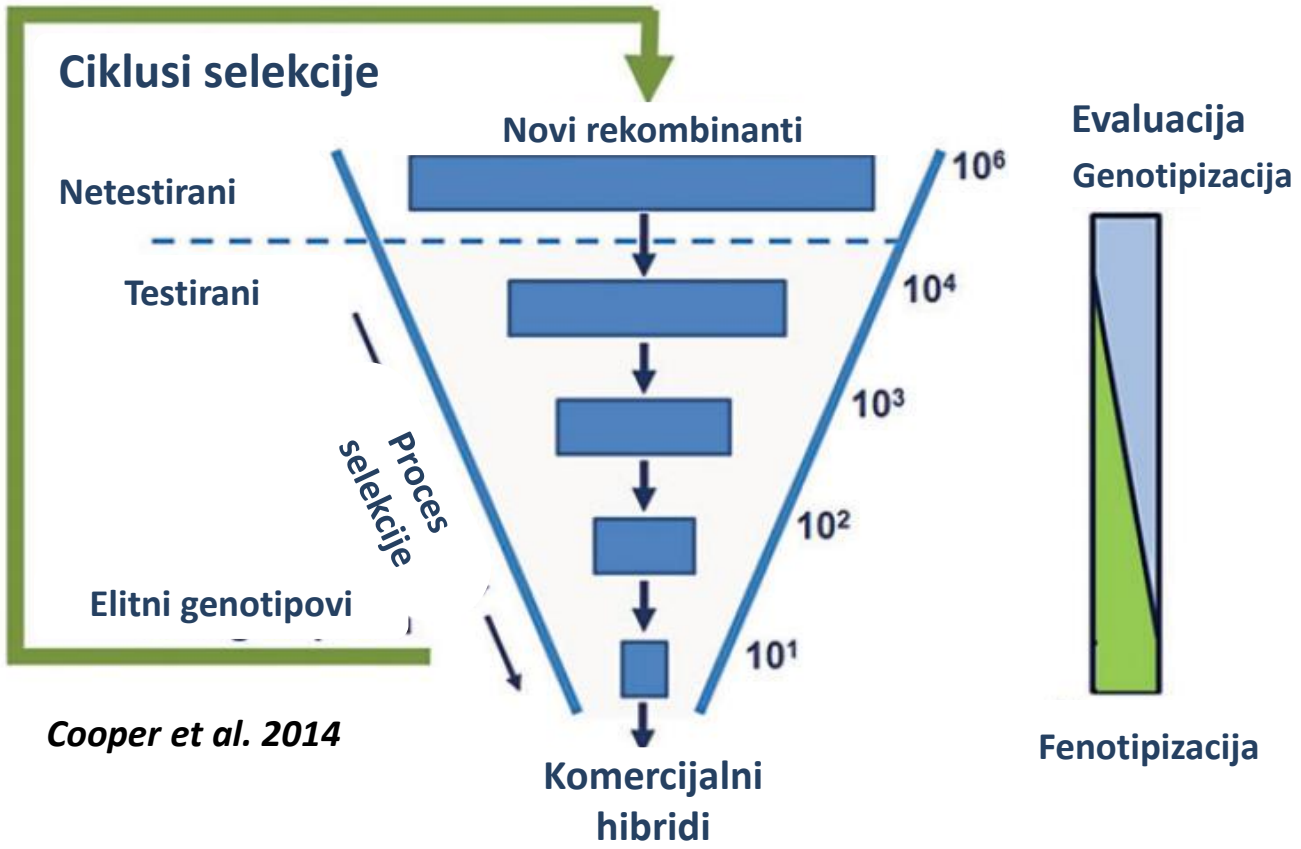
r – preciznost selekcije → kvalitet ogleda

σ_A – genetička varijansa → uključivanje nove varijabilnosti

y – godina/ciklus → DH, zimska generacija

Povećanje intenziteta selekcije - genomska selekcija

- U selekcioni proces uključuje se **višestruko veći broj genotipova** nego kod klasičnog oplemenjivanja
- Oplemenjivačka vrednost im se procenjuje indirektno na osnovu **SNP markera i statističkog modela**
- Nao osnovu dobijenih vrednosti vrši se odabir genotipova za dalji rad (testiranje u ogledima – fenotipizaciju)
- Broj i veličina ogleda može ostati nepromenjena, dok se **intenzitet selekcije** povećava



Cooper et al. 2014

Editovanje gena (*Gene editing*)

- Preciznija forma mutacionog oplemenjivanja
- Editovanje gena odnosi se na ciljane promene u određenoj DNK sekvenci kao što su delecije, substitucije i adicije jedne ili više baza
- Najpoznatiji metod je **CRISPR/Cas** sistem koji se odlikuje visokom efikasnošću, niskom cenom i jednostavnošću upotrebe



DuPont Pioneer's next generation of waxy corn shows the green side of CRISPR-Cas9

February 16, 2017 | Sponsored | Turnstone Communications

- Prema do sada poznatim informacijama I rezultatima, ovaj sistem omogućava promenu svojstava koje su uslovljena efektom major gena ili QTL-ova kao što su tolerantnost na bolesti, vreme cvetanja i sl.
- Do sada nisu utvrđeni efekti na kvantitativna svojstva kao što je prinos zrna

Transgena tehnologija u oplemenjivanju kukuruza

- Prvi transgeni kukuruz, MON 810 komercijalizovan je 1994.
- Danas je više od 90% kukuruza za proizvodnju zrna u USA je GMO
- Najzastupljenija GMO svojstva i tehnologije:

SmartStax® RIB COMPLETE®

Insekti:
Podgrizajuća sovica
Pamukova sovica
Kukuruzna zlatica
Kukuruzni plamenac
Bean cutworm
Fall armyworm

Herbicidi:
Roundup ready
Liberty link

VTDoublePRO® RIB COMPLETE®

Insekti:
Pamukova sovica
Kukuruzni plamenac
Fall armyworm

Herbicidi:
Roundup ready

genuity VT TRIPLE PRO® CORN RIB COMPLETE

Insekti:
Pamukova sovica
Kukuruzna zlatica
Kukuruzni plamenac
Fall armyworm

Herbicidi:
Roundup ready

Roundup Ready® CORN 2

Herbicidi:
Roundup ready

Agrisure® CB/LL/RW

HERCULEX® XTRA Insect Protection HX™

LIBERTY LINK®


Hvala na pažnji!