

UDC: 575.21:633.15

ZNAČAJ PROVERE I KOREKCIJE U PROCESU FENOTIPSE KARAKTERIZACIJE GENOTIPOVA KUKURUZA PO PRINCIPIMA UPOV-OG DESKRIPTORA

VOJKA BABIĆ, JELENA SRDIĆ, BABIĆ M., DELIĆ N.¹

IZVOD: Zaštita prava oplemenjivača daje mogućnost da se obezbedi jedno pouzdano ekskluzivno pravo koje će poboljšati šanse da se u ovoj oblasti omogući zaštita intelektualne svojine i samim tim da se poveća šansa za akumulaciju potrebnih sredstava za dalje investicije u ovoj oblasti. U svrhu ove zaštite UPOV ustanovljava detaljna uputstva za sprovođenje DUS testova za više od 170 biljnih vrsta. Najveći broj svojstava neke individue je kontrolisan većim brojem gena i u stalnoj su interakciji sa spoljašnjom sredinom. Sa druge strane uvek je prisutan subjektivni ljudski faktor. Iako su precizno ustanovljeni stadijumi ekspresije svojstava u Vodičima za testiranje, kao i što su i jasno definisani eksperimentalni i statistički dizajni greške su uvek moguće. Veoma je važno u toku samog eksperimenta obezbediti pravovremeno otkrivanje pogrešne ocene i njenu proveru i korekciju kako bi se izbegle greške u karakterizaciji genotipa i oceni njegove različitosti, uniformnosti i stabilnosti.

Ključne reči: *pogrešna ocena, kukuruz, UPOV deskriptor*

UVOD: Svedoci smo da se u svetu u novije vreme sve više govori o zaštiti intelektualne svojine uopšte. Grade se modeli za procenu njene vrednosti, koji mogu biti veoma važni kako u kupoprodajnim procesima, gde se dešava da je intelektualna svojina zapravo jedina svojina malih istraživačkih kompanija, tako i u procesima licenciranja, prodaje licenci i slično. Odavno se shvatilo da istraživački rad u poljoprivredi, pogotovu onaj deo koji se tiče stvaranja novih sorti, sadrži mnoge specifičnosti. Oplemenjivanje je rad koji zahteva dugogodišnja ulaganja ne samo u materijalnom smislu već i u smislu investicija u pogledu stručnosti, resursa izvornog materijala i vremena. Zaštita prava oplemenjivača daje mogućnost da se obezbedi jedno pouzdano ekskluzivno pravo koje će poboljšati šanse da se u ovoj oblasti omogući zaštita intelektualne svojine i samim tim da se poveća šansa za akumulaciju potrebnih sredstava za dalje investicije u ovoj oblasti. U odsustvu zaštite ovo je teško postići kao i što je teško sprečiti druge, koji nisu stvaraoci sorte, da

umnožavaju seme ili reprodukcioni materijal u komercijalne svrhe (UPOV publication 2000).

Namena UPOV-e konvencije je da obezbedi oplemenjivačima uslove da ostvare svoje oplemenjivačko pravo na osnovu uniformnih i jasno definisanih principa. Pravo obuhvata i kontrolu od neovlašćenog korišćenja i zloupotreba. U svrhu ove zaštite UPOV ustanovljava detaljna uputstva za sprovođenje DUS testova za više od 170 biljnih vrsta. Vodič za testiranje predstavlja jedan usaglašen i dogovoren pristup za ispitivanje novih varijeteta i u saglasnosti je sa principima sadržanim u Generalnom uputstvu za DUS test (TG/1/3). Za one biljne vrste za koje nije ustanovljen Vodič za testiranje ispitivanja mogu da budu sprovedena u skladu sa principima Generalnog uputstva. U Vodičima za testiranje determinisan je eksperimentalni dizajn kao i osobine na osnovu kojih se sprovode testovi različitosti uniformnosti i stabilnosti.

Stručni rad (Technical paper)

¹ Dipl. inž. VOJKA BABIĆ, referent, JELENA SRDIĆ, istraživač-saradnik, dr. MILOSAV BABIĆ, naučni saradnik, dr. NENAD DELIĆ, naučni saradnik, Maize Research Institute, Zemun Polje, Belgrade

Da bi jedno svojstvo moglo da se koristi za DUS testiranje mora da zadovolji odeređene uslove. Mora da bude rezultat genotipa, da je u dovoljnoj meri konzistentno i ponovljivo u određenj sredini, da se može jasno definisati i prepoznati, da ispoljava dovoljnu varijaciju između varijeteta da bi bilo moguće ustanoviti različite stepene ekspresije i time i različitost između varijeteta i da omogućava jasne zahteve u pogledu stabilnosti u smislu da obezbeđuje konzistentne i ponovljive rezultate posle svakog novog ciklusa umnožavanja.

Da bi se omogućila pravilna upotreba određenog svojstva u testiranju potrebno je razumeti različite načine njihovog ispoljavanja. Različiti su tipovi ekspresije svojstava i njihova primena u DUS testiranju. Tako imamo tri tipa osobina: kvalitativne, kvantitativne i pseudo kvalitativne. Različiti nivoi ekspresije svojstava su podeljeni u stadijume i označeni određenim brojem-ocenom. U Vodičima za testiranje takođe su predloženi i varijeteti određene biljne vrste kao reperi za dato svojstvo.

Kvalitativna svojstva su ona koja se ispoljavaju u diskontinuiranim stadijumima (pol biljke). Kod ovakvih osobina stadijumi su sami po sebi jasni i nezavisni. Po pravilu, ove karakteristike nisu pod uticajem sredine.

Kvantitativne karakteristike su one čija se ekspresija proteže kontinuirano od jednog do drugog ekstrema. Ekspresija se rangira u određeni broj stadijuma u zavisnosti od osobina i uz to ide određena ocena. Na primer visina biljke: 1-veoma nisko, 3-nisko, 5-srednje, 7-visoko, 9-veoma visoko. Stadijum ekspresije bi svakako trebao da ima puno značenje za DUS procenu mada Vodiči za testiranje ne preciziraju razliku potrebnu za različitost.

Postoje još i pseudo kvalitativna svojstva, to su ona koja se u krajnjoj meri ispoljavaju kontinuirano ali variraju od jednog do drugog oblika (oblik lista: ovalan-zašiljen, oblik klipa: koničan-cilindričan) i ne mogu da budu definisana sa dve krajnje pozicije. Tako su ocene klipa: koničan-1, konično cilindričan-2 i cilindričan-3.

Otkrivanje pogrešne ocene, provera i korekcija

U Institutu za kukuruz-Zemun Polje od samog početka bavljena selekcionim radom prati se i ocenjuje veliki broj svojstava linija i hibrida, kako u procesu selekcije, tako i kroz

proces semenarstva i proizvodnje. Kako postoje nagoveštaji da će i naša zemlja postati potpisnica UPOV-e konvencije javila se potreba da se brojna zapažanja, koja se i inače redovno sprovode na našem elitnom materijalu, standardizuju u tom pravcu. Stoga je ustanovljen sistem gde se u momentu kada određeni hibrid ulazi u proces priznavanja u Saveznu sortnu komisiju, kako sam hibrid, tako i njegove komponente opisuju po standardima testiranja koje je ustanovio UPOV. Pored seta od tridesetak komercijalnih hibrida i njihovih roditeljskih linija, od 2002. godine pa do danas, urađena je fenotipska karakterizacija i oko sto hibrida i njihovih komponenti u trajanju od tri godine.

Kada se izvodi test, greške su uvek moguće. Kako se radi sa živim sistemima pred stučnjake za određenu biljnu vrstu nije postavljen lak zadatak. Bez obzira na dosta precizno ustanovljene stadijume ekspresije svojstava u Vodičima za testiranje, kao i definisane eksperimentalne i statističke dizajne, svojstva su u stalnoj interakciji sa spoljašnjom sredinom. Sa druge strane uvek je prisutan subjektivni ljudski faktor. Veoma je važno u toku samog eksperimenta obezbediti pravovremeno otkrivanje pogrešne ocene i njenu proveru i korekciju. Ocenjivač mora da bude svestan da će nemarna ocena uticati na rezultate testa. Stoga, otkrivanje pogrešne ocene treba da bude jedan kontinuirani proces traganja, u toku samog procesa ispitivanja, za ocenama koje unose veliko variranje u podatke ispitivanja različitosti, uniformnosti i stabilnosti. Provera podataka se sprovodi u toku sezone. Brzina procesa je jako važna da bi bilo moguće ponovo posetiti polje za vreme istog stadijuma razvoja biljke i ako je moguće u istim uslovima spoljne sredine. Razmatranje pogrešne ocene i proveru podataka bi trebalo raditi prema principima procene koji su propisani u Vodiču za generalna uputstva za sprovođenje DUS testa. Kada se barata sa velikim brojem podataka kompjuteri i statistički programi su osnovno sredstvo u procesu provere i detekcije pogrešne ocene (UPOV/DATA/BEI/04/4).

Kod procene uniformnosti varijeteta treba jasno razlikovati dve stvari: veoma atipične biljke i off-type biljke. U Generalnom uputstvu kao i u pojedinačnim Vodičima za testiranje data su odgovarajuća objašnjenja. Jedan broj veoma atipičnih biljaka se može tolerisati i da se nastavi sa testiranjem. Smatra se da takve

biljke ne pripadaju sorti. Kod kukuruza su to takozvani *outcross*-evi i tolerišu se 3 biljke u uzorku od 40 biljaka. Atipičnom biljkom (off-type biljkom) u okviru neke sorte smatra se ona biljka koja po nekoj od osobina varira od ostalih biljaka u uzorku (prisustvo antocijana na svili). Pri utvrđivanju uniformnosti kod inbred linija i single-cross hibrida kukuruza treba primeniti standard populacije od 3% sa verovatnoćom prihvatljivosti od 95% što iznosi za uzorak od 40 biljaka najviše tri off-type biljke (UPOV/DATA/BEI/04/8; TG/2/6).

Različiti metodi mogu biti upotrebljeni za ocenu karakteristika u DUS testu u zavisnosti od tipa varijeteta i osobina koje se ocenjuju. Različiti metodi ocena akumuliraju i različitu količinu podataka i zahtevaju različite metode otkrivanja greške prilikom testiranja. Tako postoji spreadsheet metod i grafički metod. Kod kukuruza se uglavnom primenjuje vizuelna procena opažanja grupe biljaka ili delova biljke pa je za takav vid opažanja spreadsheet metod najjednostavniji i najefikasniji način prikazivanja podataka. Zabeležene ocene se sortiraju po varijetetu, broju elementarne parcele i ponavljanjima.

Razlika između minimalne i maksimalne ocene (min-max) i proseka genotipa se koristi za otkrivanje greške između ponavljanja i mogućih grešaka koje se ispoljavaju između elementarnih parcela (UPOV/DATA/BEI/04/5).

Dešava se da je greška posledica pisanja prilikom ubacivanja podataka u računar. Takva vrsta očigledne greške se ispravlja na licu mesta i nema potrebe za ponovnom posetom polja. Ukoliko je vrednost mini-max razlike jednaka ili veća od 2 ponovna poseta polju se može smatrati potrebnom.

Postoji više razloga zbog čega se može pojaviti greška u ocenjivanju. Ukoliko se podaci sortiraju po ponavljanjima (godinama) i setvenom broju elementarnih parcela može se uočiti da dve susedne parcele imaju veliki mini-max. Ponovnom posetom polja može se ispostaviti da je došlo do zamene ocena dveju susednih parcelica. U osnovi ove greške je ljudski faktor, bilo prilikom ocene u polju bilo prilikom unošenja podataka u računar. Ovakva vrsta greške je uočena prilikom ocene prisustva antocijana na rukavcu prvog lista i oblika oboda prvog lista kod linija ND 246 i ZPPL 285.

Tab. 1. Prisustvo antocijana na rukavcu prvog lista

Tab. 1. Anthocyanin coloration of the first leaf sheath

Genotip	plot		ocena		Min-max	prosek	plot	ocena	Min-max
	I	II	I	II	I i II				
ND 246	2	2	9	5	4	7	III	III	II i III
ZPPL 285	3	3	5	7	2	6	20	7	-

Kako su eksperimentalne parcele ove dve linije bile jedna do druge u prvoj godini došlo je do permutacije ocena prvog lista za osobine

procenat antocijana rukavca i oblik prvog lista. Ocene iz treće godine potvrđuju da je greška na pravi način uočena (Tab. 1 i Tab. 2).

Tab. 2. Oblik vrba prvog lista

Tab. 2. First leaf shape of tip

Genotip	plot		ocena		Min-max	prosek	plot	ocena	Min-max
	I	II	I	II	I i II				
ND 246	2	2	4	3	1	3.5	III	III	II i III
ZPPL 285	3	3	3	4	1	3.5	20	4	-

Tab. 3. Prisustvo antocijana na vazдушnim korenovima

Tab. 3. Anthocyanin coloration of brace roots

Genotip	godina		Min-max	prosek I i II	godina	Min-max	prosek II i III	godina
	I	II	I i II		III	II i III		I
Co 220	1	5	4	3	5	-	5	-

Nedostajuća vrednost može takođe uneti zabunu. Važno je nedostajuću ocenu obeležiti kao takvu, a ne kao vrednost nula ili 1 što može navesti na pogrešan rezultat testa različitosti i uniformnosti. Veličina greške zavisi od metode kojom se osobina ispituje. Primer nedostajuće ocene je prisustvo antocijana na vazдушnim korenovima (Tab. 3).

U prvoj godini vazdušni korenovi nisu bili vidljivi u datoj fazi razvoja kada se preporučuje ocenjivanje ove osobine ali je data ocena 1 koja govori da nema prisustva antocijana na vazдушnim korenovima. U naredne dve godine ova osobina se ispoljila na normalan način i nosila je ocenu 5. U četvrtoj godini ispitivanja ponovo se postavilo da je ova osobina teško uočljiva u fazi metličanja biljke kao fazi koja se preporučuje u Vodiču za testiranje. Tek u kasnijoj fazi razvoja biljke vazdušni korenovi postaju neznatno vidljivi i prisustvo antocijana na njima je moguće oceniti.

Postoje i određene specifičnosti nekih genotipova koje nisu predviđene u Vodičima za testiranje. Na primer, jedan broj linija (SIB 25, SIB 1, SIB 11, ZPL 296/25-3...), praši još dok je metlica u rukavcu lista. U tom slučaju ocena metlice ne može da se uradi u fazi kada su antere vidljive na sredini glavne ose, kako je to preporučeno u UPOV-om deskriproru, već u fazi kada su antere prisutne po celoj metlici ili u fazi punog metličanja. Ako bi smo druge genotipove, kod kojih se ovo svojstvo ispoljava na uobičajen način, ocenjivali u fazi sredine ili kraja metličanja, ocene bi veoma često bile sasvim drugačije. Znači, veoma je važno ispoštovati preporučenu fazu razvoja biljke prilikom ocenjivanja jer se često dešava da ocene u kasnijoj fazi razvoja izgledaju drugačije za istu biljku, ali se istovremeno mora voditi računa o specifičnostima nekih genotipova.

Uticao nekih agrotehničkih mera takođe može navesti na pogrešan zaključak. Na primer, prvi list kod kukuruza, na kome se vrši ocena prisustva antocijana na rukavcu i oblik vrha prvog lista, veoma je osetljiv na primenu različitih herbicida u cilju suzbijanja korova nakon nicanja. Tako je kod jednog broja linija, među kojima su ZPPL 233, ZPPL 305 i ZPL 152/7 koje su bile u drugoj i trećoj godini ispitivanja, usled primene herbicida Equip, primećeno je sušenje prvog lista pre nego što je biljka ušla u fazu 2 i 4 lista kada se beleže

ove dve osobine. Stoga su ocene ove dve osobine zabeležene kao nedostajuće u godini kada je primenjen dati herbicid. Kod jednog broja linija kokičara (ZPL 72 11k, ZPPL 126k), kao i kod jednog broja linija kukuruza standardnog kvaliteta (ZPPL 131, ZPPL159, ZPPL 29...) došlo je do sušenja cele bilke. Herbicidi takođe mogu da utiču na intenzitet antocijana na rukavcu prvog lista pa na to treba obratiti pažnju prilikom određivanja različitosti ili prilikom konačnog opisa varijeteta. Znači, ne možemo uvek biti slepo vođeni Vodičem za testiranje jer ipak se radi o živim sistemima koji u određenim uslovima sredine mogu da ispolje neku osobinu genotipa koja se ne može podvesti pod standard. Iskustvo ocenjivača u poznavanju biologije određene biljne brste je od velikog značaja da se ne bi u krajnjoj instanci donela pogrešna odluka.

Zaključak

Kako se radi o živim sistemima koji su uvek u interakciji sa spoljašnjom sredinom, a same osobine na osnovu kojih se vrši karakterizacija genotipova su najčešće kontrolisane većim brojem gena (kvantitativne i pseudokvantitativne osobine), neophodna je permanentna kontrola i provera dobijenih ocena u toku samog procesa ocenjivanja. Nemaran odnos prema određenim nepravilnostima u toku ispitivanja može dovesti do pogrešne ocene pa se u krajnjem slučaju mogu pojaviti dva tipa greške. Greška tipa jedan se javlja kada odlučimo da je varijetet različit kada je on zapravo identičan, a greška tipa dva kada odlučimo da je varijetet identičan kad je zapravo različit. Grešku prvog tipa je lakše kontrolisati dok je grešku drugog tipa teže kontrolisati jer zavisi od više faktora kao što su: stvarna razlika između varijeteta, varijabilnosti koja proističe iz randoma, standardne greške izabranog eksperimentalnog dizajna, broja ponavljanja i položaja u polju (UPOV/DATA/BEI/04/7).

U svakom slučaju, pravovremena provera dobijenih ocena u toku samog procesa ocenjivanja i otkrivanje pogrešne ocene su jako važni, jer omogućavaju ponovnu posetu polja i ispravljanje greške. Samim tim obezbeđuje se preciznija karakterizacija genotipa i ocena njegove različitosti, uniformnosti i stabilnosti.

LITERATURA

- UPOV, (2002): General introduction to the examination of Distinctness, Uniformity and Stability and the development of Harmonized Descriptions of new Variete of Plants. TG/1/3
- UPOV, (1999): Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability for Maize . TG/2/6+Corr.
- UPOV, (2004): Designing the DUS tests. UPOV/DATA/BEI/04/4
- UPOV, (2004): Statistical methods for testing distinctness. UPOV/DATA/BEI/04/7
- UPOV, (2004): Examining uniformity. UPOV/DATA/BEI/04/8
- UPOV, (2004): Outlier detection and data validation. UPOV/DATA/BEI/04/5
- UPOV, (2000): What it is, what it does. UPOV Publication No.437(E)

THE IMPORTANCE OF THE VERIFYING AND CORRECTIONS IN THE PROCESS OF PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF MAIZE GENOTYPES BY THE PRINCIPLES OF THE UPOV DESCRIPTOR

VOJKA BABIĆ, JELENA SRDIĆ, BABIĆ M., DELIĆ N.

SUMMARY

The protection of breeders rights provides the chance to establish the exclusive right which will enhance the chances for protection of intellectual property and therefore provide the greater accumulation of the necessary funds for the further investments in the area of plant breeding. Concerning this UPOV has established detail guidelines for conduction of DUS tests for more then 170 plant species. Considering that the living systems are in the constant interaction with the environment, and most of the traits are polygenic, mistakes are always possible, regardlles of the very preciselly established procedures for description of traits in the Guidelines. On the other hand the subjectivity of the human factor is allways present. Errors could be the result of the mistakes in writing during the estimation in the field or while transferring the data into the computer. Also errors could occure as the replacenment of the estimates between two nighbouring plots. Specificity of genotype and missing estimate could also enter confusion in the evaluation of traits. Application of some cultural practices, esspecially herbicides applied after seedling emergences, could lead to the false estimate. Assuring the timely detection of the false estimate and its verifying and correction, during the experiment, is of a great importance, so that errors could be avoided in characterization of genotype and in the estimate of its distinctness, uniformity and stability.

Key words: false estimate, maize, UPOV desriptor