

UDK: 575.2: 633.11

DETEKCIJA ALELNE VARIJABILNOSTI U LOKUSIMA PŠENICE ZNAČAJNIM ZA OTPORNOST NA *Fusarium* ssp. PRIMENOM MOLEKULARNIH MARKERA - MIKROSATELITA

KAČAVENDA DRAGANA i KOBILJSKI B.¹

IZVOD: *Analizirana je alelna varijabilnost lokusa heksaploidne pšenice značajnih za otpornost na fuzarijum primenom dva mikrosatelitska markera: GWM533 (bromozom 3B) i GWM156 (bromozom 5A), sa ciljem iznalaženja mogućnosti primene molekularnih markera - mikrosatelita pri selekciji materijala za navedeno svojstvo. Pri detekciji alelnog polimorfizma, kao standardi korišćene su najpoznatije sorte izvori otpornosti: Sumai 3, Frontana i Amigo. Kod 23 francuska i 25 novosaadskih genotipova pšenice utvrđeno je prisustvo 5 alela (GWM533) i 6 alela (GWM156). Utvrđene su i PIC (Polymorphism information content) vrednosti za ispitivane markere, koje su iznosile 0,783 (GWM533) i 0,747 (GWM156). U lokusu GWM533 kod 15 genotipova ustanovljeno je prisustvo istog alela koji je registrovan i kod neke od standardnih sorti, a u lokusu GWM156 kod 10 ispitivanih genotipova.*

Ključne reči: *Fusarium* ssp., pšenica (*Triticum aestivum* L.), mikrosatelitski markeri

UVOD: Poslednjih nekoliko decenija, u mnogim regionima sveta, fuzarioza klasa se javljala kao jedan od značajnih uzročnika smanjenog prinosa žitarica. To je naročito bio slučaj u predelima gde se faza cvetanja biljaka odvijala u uslovima povišene vlažnosti i temperature, pogodnim za razvoj gljiva iz roda *Fusarium*. Najčešći uzročnik fuzarioze klasa je *Fusarium graminearum* Schwabe koji dovodi do značajnog smanjenja prinosa i kvaliteta proizvoda, a naročito se ističe štetan uticaj miktoksina, kao što su deoksinivalenol (DON), 3-acetildeoksinivalenol (3A-DON) i nivalenol (NIV) (Gang et al., 1998), koji se nakupljaju u zrnima. Primenom fungicida u određenoj meri mogu se smanjiti gubici. Međutim, njihova upotreba često nije dovoljno ekonomična i štetna je sa ekološke tačke gledišta, tako da se stvaranje sorti otpornih na fuzarijum smatra jednim od najefikasnijih rešenja u suzbijanju ove bolesti.

Mesterházy et al. (1995) navode pet različitih tipova otpornosti na *Fusarium* ssp., od kojih je drugi tip - otpornost na širenje zaraze unutar klasa, najviše proučavan. Do danas je

izdvojen određen broj sorti heksaploidne pšenice kod kojih je uočen visok nivo rezistentnosti, kao što su: Sumai 3, Ning 8343, Wuhan #1 (Kina), Nobeokabozu (Japan), Frontana (Brazil), Praag 8 (Češka), Novokrumka (Rusija) i Amigo (SAD) (Snijders, 1994), s tim da se Sumai 3 najčešće koristi u oplemenjivačkim programima za ovo svojstvo. Evaluacija otpornosti novostvorenih genotipova u polju može biti dugotrajan, neekonomičan i mukotrpan proces, te se upotreba molekularnih markera, tesno vezanih za gene tolerantnosti na fuzarijum, razmatra kao jedno od mogućih rešenja pri njihovoj determinaciji (Bai et al., 2003).

Mikrosateliti ili jednostavne ponavljajuće sekvence (SSRs - Simple Sequence Repeats) (Tautz et al., 1986), zahvaljujući visokom nivou polimorfizma, smatraju se veoma pogodnim za utvrđivanje varijabilnosti genotipova unutar vrste, naročito kod samooplodnih biljaka, kao što je pšenica (Rêr et al., 1998). Primenom mikrosatelitskih markera kod Sumai 3 i srodnih sorti, na hromozomima 3B, 5A, 6A i 6B determinisan je određen broj

Originalni naučni rad (Original scientific paper)

¹ BORISLAV KOBILJSKI, Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, DRAGANA KAČAVENDA, Stipendista Ministarstva nauke i zaštite životne sredine, Republike Srbije.

QTL-a (Quantitative trait loci), koji su u tesnoj korelaciji sa otpornošću na *Fusarium ssp.* (Anderson et al., 2001; Buerstmayr et al., 2002; Yang et al., 2003).

Cilj ovog rada bio je da se primenom dva mikrosatelitska markera, GWM533 (3B) i GWM156 (5A), kod 23 francuska i 25 novosadskih genotipova heksaploidne pšenice, analizira alelna varijabilnost lokusa značajnih za otpornost na *Fusarium ssp.*, kako bi se utvrdile mogućnosti primene molekularnih markera - mikrosatelita u oplemenjivanju pšenice na ovo svojstvo.

Tab. 1. Lista analiziranih genotipova

Tab. 1. List of analysed genotypes

Francuski genotipovi				
NSLWW63	Acienda	Sankara	Tsabraaq	Perkato
Rally	Aquila	NSLWW60	Charger	Azimut
Paxyl	Alvarez	Ashley	Raspail	Lanapor
Apache	Quapuor	Alixian	Cophoru	
Eveil	Gaugain	Qrvautis	Dinosaur	
Novosadski genotipovi				
NS252/02	NS60/00	NS40/96	Pesma	Lira
Balada	Lana	Arija	Pobeda	Sofija
Renesansa	NS103/02	Simfonija	Oda	Rusija
Kantata	Evropa90	NS60/01	NS53/03	Mina
Rapsodija	Sonata	NS73/02	NS56/01	NS138/01

Genomska DNK svih ispitivanih genotipova izolovana je iz svežeg mladog biljnog tkiva, prema CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) metodi (Doyle and Doyle, 1990). Za analizu otpornosti pšenice na fuzarijum odabrana su dva mikrosatelitska markera: GWM533 (3B) i GWM156 (5A). Prajmer sekvence za navedene markere i uslovi odvijanja lančane reakcije polimeraze (PCR - Polymerase Chain Reaction) opisani su prema R deret al., (1998). U prvoj fazi ispitivanja izvršena je optimizacija uslova PCR-a i proverena dobijenih produkata na 2% (w/v) agaroznom gelu, a zatim su produkti razdvajani na 6% (w/v) denaturišućem poliakrilamidnom gelu i bojeni pomoću srebrno-nitrata (Sanguinetti et al., 1994). Svaki genotip je analiziran u dva ponavljanja, a oni kod kojih je izostala sinteza produkata u četiri ponavljanja.

Stepen informativnosti mikrosatelitskih lokusa u smislu utvrđivanja varijabilnosti ispitivanih genotipova, poređen je na bazi *PIC* (Polymorphism information content) vrednosti računatoj prema sledećoj formuli:

Materijal i metode

Alelna varijabilnost lokusa heksaploidne pšenice značajnih za otpornost na fuzarijum analizirana je kod 23 francuska (CO. Limagren) i 25 genotipova stvorenih u Zavodu za strna žita, Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu (Tab. 1). Pri detekciji alelnog polimorfizma, kao standardi korišćene su sledeće sorte: Sumai 3 (Kina), Frontana (Brazil) i Amigo (SAD).

$$PIC = 1 - p_i^2$$

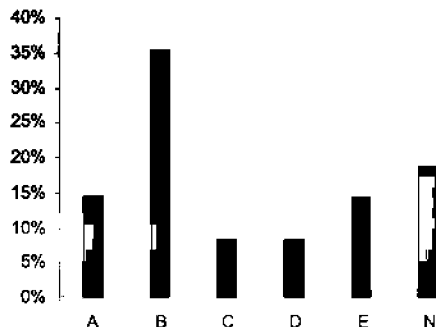
Gde je p_i frekvencija i - tog alela (Anderson et al., 1993).

Rezultati i diskusija

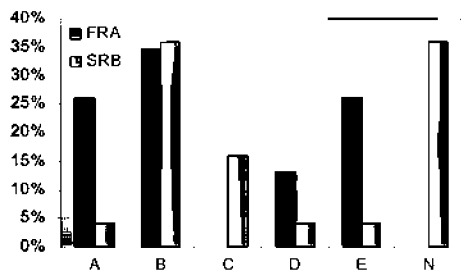
Analizom varijabilnosti mikrosatelitskih lokusa heksaploidne pšenice značajnih za otpornost na *Fusarium ssp.* kod 23 francuska i 25 novosadskih genotipova, u lokusu GWM533 na hromozomu 3B utvrđeno je prisustvo 5 alelnih oblika, čija se veličina kretala od 214 do 238 bp: A (214 bp), B (224 bp), C (227 bp), D (234 bp) i E (238 bp). Najzastupljeniji je bio alel B (35,42 %), dok su C i D imali najmanju frekvenciju (8,33 %). Kod 9 novosadskih genotipova (18,75 % od ukupnog broja ispitivanih genotipova) izostalo je umnožavanje odgovarajućeg lokusa (Graf. 1.). Najveću frekvenciju kod obe grupe genotipova imao je alel B, dok je alel C registrovan samo kod novosadskih genotipova (Graf. 2.). Kod standardnih sorti utvrđeno je prisustvo alela B, a isti je registrovan i kod sledećih genotipova: Rally, Paxyl, Alvarez, Quapuor, Gaugain,

Sankara, Ashley, Lanapor (FRA), NS103/02, Evropa90, NS40/96, Simfonija, NS60/01, NS56/01 i NS138/01 (SCG).

Graf. 1. Frekvencija alela u lokusu GWM533
Graph. 1. Frequency of alleles at loci GWM533



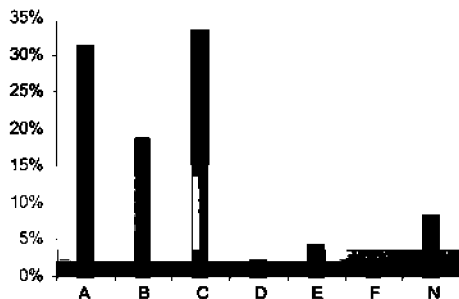
Graf. 2. Frekvencija alela u lokusu GWM533 kod francuskih i novosadskih genotipova
Graph. 2. Frequency of alleles at loci GWM533 In French and Serbian genotypes



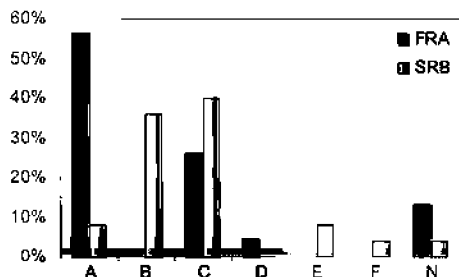
U lokusu GWM156 na hromozomu 5A registrovano je prisustvo 6 alela čija se veličina kretala od 270 do 305 bp: A (270bp), B (280 bp), C (285 bp), D (290 bp), E (295) i F (305 bp). Najveću frekvenciju imao je alel C (33,33 %), zatim alel A (31,25 %), a najmanju D i F (2,08 %). Kod 8,33 % ispitivanih genotipova izostalo je umnožavanje odgovarajućeg lokusa (Graf. 3.). U grupi francuskih genotipova utvrđeno je prisustvo samo tri alelna oblika: A, C i D, dok kod novosadskih genotipova nije registrovan alel D. Najzastupljeniji kod francuskih genotipova bio je alel A (56,52 %), a kod novosadskih C i B (40 %, odnosno 36 %) (Graf. 4.). Kod standardne sorte Frontana u navedenom lokusu utvrđeno je prisustvo alela B, a isti je registrovan i kod sledećih novosadskih genotipova: Balada, Renesansa, Sonata, NS60/01, Pesma, Pobjeda, Oda, NS56/01 i Rusija. Alel D čije je prisustvo ustanovljeno

kod preostale dve standardne sorte, Sumai 3 i Amigo, registrovan je još samo kod francuskog genotipa NSLWW63.

Graf. 3. Frekvencija alela u lokusu GWM156
Graph. 3. Frequency of alleles at loci GWM156



Graf. 4. Frekvencija alela u lokusu GWM156 kod francuskih i novosadskih genotipova
Graph. 4. Frequency of alleles at loci GWM156 In French and Serbian genotypes



PIC vrednosti za ispitivane markere iznosile su 0,783 (GWM533) i 0,747 (GWM156). Samo na osnovu ova dva mikrosatelitska markera 9 genotipova (18,75 %) je bilo moguće razlikovati od ostalih koji su se mogli podeliti u 12 grupa. Najzastupljenije kombinacije alela kod francuskih genotipova bile su B(GWM533)/A(GWM156) i E(GWM533)/A(GWM156) sa po 17,39 %, a u grupi novosadskih B(GWM533)/C(GWM156) sa 20 %.

Odabir mikrosatelitskih markera koji su u ovom radu primenjeni u cilju detekcije alelne varijabilnosti lokusa pšenice značajnih za otpornost na *Fusarium ssp.*, izvršen je na osnovu rezultata ranijih istraživanja na ovom polju. Buerstmayr et al. (2002) su registrovali tri genomski regiona koja su u tesnoj korelaciji sa rezistentnošću na *Fusarium ssp.* Prema njihovim rezultatima oko 60 % fenotipske varijabilnosti za drugi tip rezistentnosti na fuzarijum moglo se objasniti pomoću

QTL-a na kratkom kraku hromozoma 3B (interval *Xgwm533-Xgwm493*). Preostala dva regiona su locirana na hromozomima 5A (interval *Xgwm293-Xgwm156*) i 1B (*XgluB1* - vezan za lokus u kome se nalaze aleli koji kodiraju glutenine velike molekulske mase). Dobijeni rezultati ukazali su da se rezistentnost na fuzarijum nalazi pod kontrolom nekoliko major QTL-a koji su u sprezi sa za sada nepoznatim brojem minor gena. Yang et al. (2003) su potvrdili prethodne nalaze, odnosno najveći značaj u detekciji otpornosti ustanovili su za markere sa 3B hromozoma. Osim toga, utvrđena je i visoko značajna korelacija između varijabilnosti lokusa GWM644 sa 6B hromozoma i tolerantnosti na fuzarijum. Pored navedenih mikrosatelitskih markera, na osnovu dosadašnjih istraživanja ističe se i značaj lokusa GWM674 na 3A (Shen et al., 2003), kao i lokusa GWM539 i GWM608 na 2D hromozomu (Puskas et al., 2004).

Jedan od problema koji se javlja prilikom stvaranja genotipova otpornih na fuzarijum je što su sorte koje su do sada identifikovane kao izvori rezistentnosti uglavnom poreklom iz egzotičnih regiona (Kina, Japan). Pri gajenju u kontinentalnim uslovima Sumai 3 i njoj srodne sorte ispoljile su niz loših agronomskih karakteristika, a pored toga i osetljivost na neka druga oboljenja koja takođe u značajnoj meri utiču na prinose i kvalitet pšenice (Rudd et al., 2001). Iz navedenih razloga, u

poslednje vreme istraživanja se usmeravaju ka pronalazenju novih izvora rezistentnosti, što je bio i jedan od ciljeva ovog rada.

Zaključak

Analizom alelne varijabilnosti lokusa pšenice značajnih za otpornost na *Fusarium ssp.* primenom dva mikrosatelitska markera kod 23 francuska i 25 novosadskih genotipova ustanovljeno je prisustvo 5 alela (GWM533) i 6 alela (GWM156). *PIC* vrednosti za ispitivane markere iznosile su 0,783 (GWM533) i 0,747 (GWM156). Kod 18.75 % ispitivanih genotipova u lokusu GWM533, odnosno 8.33 % u lokusu GWM156 izostala je sinteza odgovarajućeg produkta, a detaljnijim analizama u drugačijim laboratorijskim uslovima trebalo bi da se utvrdi da li se radi o multim alelima. U lokusu GWM533 kod 15 genotipova utvrđeno je prisustvo istog alela koji je registrovan i kod neke od standardnih sorti, a u lokusu GWM156 kod 10 ispitivanih genotipova. Ostaje da se izvrši evaluacija dobijenih rezultata u poljskim uslovima, kako bi se utvrdilo postojanje korelacije između prisustva određenog alela i otpornosti na fuzarijum i ustanovio značaj alela koji nisu registrovani kod standardnih sorti. Ukoliko se ovi nalazi potvrde, ispitivani mikrosatelitski markeri imali bi veliki značaj u selekciji materijala za oplemenjivanje pšenice u pogledu otpornosti na *Fusarium ssp.*

LITERATURA

- ANDERSON, J., A., CHURCHILL, G.A., AUTRIQUE, J.E., TANKSLEY, S.D. and SORRELLS, M.E., (1993): Optimizing parental selection for genetic maps. *Genome*, 36: 181-186.
- ANDERSON, J., A., STACK, R., W., LIU, S., WALDRON, B.L., FJELD, A.D., COYNE, C., MORENO-SEVILLA, B., MITCHELL FETCH, J., SONG, Q. J., CREGAN, P. B. and FROHBERG, R.C., (2001): DNA markers for fusarium head blight resistance QTLs in two wheat populations. *Theor. Appl. Genet.*, 102, 1164-1168.
- BAI, G., GUO, P. and KOLB, F.L., (2003): Genetic relationships among head blight resistant cultivars of wheat assessed on the basis of molecular markers. *Crop Sci.*, 43: 498-507.
- BUERSTMAYR, H., LEMMENS, M., HARTL, L., DOLDI, L., STEINER, B., STIERSCHNEIDER, M. and RUCKENBAUER, P., (2002): Molecular mapping of QTLs for fusarium head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (Type II resistance). *Theor. Appl. Genet.*, 104, 84-91.
- DOYLE, J.J. and DOYLE J.L., (1990): Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- GANG, G., MIEDANER, T., SCHUHMACHER, U., SCHOLLENBERGER, M. and GEIGER, H.H., (1998): Deoxynivalenol and nivale-nol production by *Fusarium culmorum* isolates differing in aggressiveness toward winter rye. *Phytopathology*, 88, 879-884.
- MESTERHÁZY, A., (1995): Types and components of resistance to fusarium head blight of wheat. *Plant Breed.*, 114: 377-386.
- PUSKAS, K., VIDA, G., VEISZ, O., BUERSTMAYR, H. and BEDO, Z., (2004): Analysis of fusarium head blight resistance QTLs in the "Ning 8331" x "Martonvasari 17" population. In Vollmann, J., Grausgruber, H. &

- Ruckenbauer, P. (Eds.), Genetic Variation for Plant Breeding, pp. 189-193.
- RÖDER M.S., KORZUN, V., WENDEHAKKE, K., PLASCHKE, J., TIXIER, M.H., LEROY, P. and GANAL, M.W., (1998): A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149: 2007-2023.
- RUDD, J.C., HORSLEY, R.D., MCKENDRY, A.L. and ELIAS, E.M., (2001): Host plant resistance genes for fusarium head blight: sources, mechanisms, and utility in conventional breeding systems. *Crop Sci.*, 41: 620-627.
- SANGUINETTI, C.J., NETO, E.D. and SIMPSON, A.J.G., (1994): Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrilamide gels. *Biotechniques*, 17: 915-918.
- SHEN, X., ITTU, M. and OHM, H.W., (2003): Quantitative trait loci conditioning resistance to fusarium head blight in wheat line F201R. *Crop Sci.*, 43, 850-857.
- SNIJEDERS, C. H. A., (1994): Breeding for resistance to *Fusarium* in wheat and corn. Mycotoxins in grain-compounds other than aflatoxin. In: Miller, J.D., Trenholm, H.L. (Eds.), Eagan Press, St. Paul, USA, pp. 37-58.
- TAUTZ, D., TRICK, M. AND DOVER, G.A., (1986): Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature*, 322: 652-656.
- YANG, Z.P., GILBERT, J., SOMERS, D.J., FEDAK, G., PROCUNIER, J.D. AND MCKENZIE, I.H., (2003): Marker assisted selection of Fusarium head blight resistance genes in two doubled haploid populations of wheat. *Molecular Breeding*, 12, 309-317.

DETECTION OF ALLELIC VARIABILITY AT WHEAT LOCI ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO *Fusarium ssp.* USING MOLECULAR MARKERS - MICROSATELLITES

KAČAVENDA DRAGANA and KOBILJSKI B.

SUMMARY

Fusarium head blight (FHB), caused primarily by *Fusarium graminearum*, is one of the most important fungal diseases of wheat. It may cause severe yield and quality losses in humid and warm conditions. However, the most important concern is the mycotoxin contamination of grain. Breeding of cultivars resistant to FHB is the best way to control the disease. In order to examine possibilities for application molecular markers - microsatellites in selecting for resistance to FHB, allelic variability at wheat loci associated with resistance to *Fusarium ssp.* was studied using two microsatellite markers: GWM533 (chromosome 3B) and GWM156 (chromosome 5A). Detection of the allelic polymorphism was conducted compared to the cultivars Sumai 3, Frontana and Amigo which are widely used as FHB resistance sources. In 23 French genotypes and 25 genotypes developed at the Institute of Field and Vegetable Crops in Novi Sad, 5 alleles (GWM533) and 6 alleles (GWM156) were detected. In 15 genotypes at loci GWM533 and 10 genotypes at loci GWM156 same allele was detected as in some of standard cultivars. Obtained results should be evaluated at field experiments in order to confirm correlation between presence of specific allele and resistance to fusarium head blight and in order to examine importance of alleles that are not detected in standard cultivars.

Key words: *Fusarium ssp.*, wheat (*Triticum aestivum* L.), microsatellites