

MOLEKULARNA EVALUACIJA GENETIČKE VARIJABILNOSTI ELITNOG OPLEMENJIVAČKOG MATERIJALA PŠENICE

BRBAKLIĆ LJILJANA, KONDIĆ-ŠPIKA ANKICA,
TRKULJA DRAGANA, KOBILJSKI. B.¹

IZVOD: Primenom molekularnih markera, u odnosu na konvencionalne metode, omogućena je efikasnija, detaljnija i tačnija ocena genetičke varijabilnosti, koja se može koristiti u procesu oplemenjivanja pšenice, a sa ciljem daljeg unapređenja proizvodnih i prerađivačkih potencijala ove biljne vrste. U ovom radu su, za procenu genetičke varijabilnosti 96 sorti i linija pšenice, korišćena 4 mikrosatelitska markera (Gwm11, Gwm428, Psp3200, Psp3071). Izabrani markeri su, prema literaturnim podacima, vezani za važna agronomska svojstva pšenice. Za 4 ispitivana lokusa utvrđeno je postojanje 31 alelne varijante, pri čemu je najveći broj alela lociran u lokusu Xgwm11 (11). Najveća vrednost za polimorfnost pojedinačnih lokusa (PIC) utvrđena je u lokusu Xpsp3071 i iznosila je 0,831. Na osnovu analiziranih lokusa, genotipovi su po sličnosti grupisani u tri podpopulacije. Dobijeni rezultati ukazuju na postojanje značajne genetičke varijabilnosti u odabranom materijalu, i mogućnost da se ona, nakon validacije veze marker-svojstvo, uspešno iskoristi za dalji oplemenjivački rad.

Ključne reči: pšenica, genetička varijabilnost, lokusi, mikrosateliti

UVOD: Stvaranje sorti pšenice visokog genetičkog potencijala za prinos, predstavlja najvažniji cilj u svim programima oplemenjivanja pšenice. Postojanje genetičke varijabilnosti u polaznom materijalu, tačnije roditeljima koji se koriste za ukrštanje, je najvažniji preduslov za uspeh u oplemenjivačkom procesu (Reif et al., 2005).

Prednost molekularnih metoda, u odnosu na morfološke i biohemijske

markere, ogleda se u njihovoj nezavisnosti u odnosu na uticaj faktora spoljašnje sredine i mogućnosti njihove primene u toku svih razvojnih stadijuma biljke (Prasad et al., 2000). Razvoj PCR tehnologije u poslednjih 20 godina, omogućio je primenu novih molekularnih markera, kao što su mikrosateliti – SSR (Simple Sequence Repeat). Mikrosateliti pšenice su pretežno genom specifični,

Originalni naučni rad (Original scientific paper)

¹ Dipl. biolog - master LJILJANA BRBAKLIĆ, ljbrbaklic@ifvncs.ns.ac.rs, istraživač pripravnik, dr ANKICA KONDIĆ-ŠPIKA, naučni saradnik, dipl. biolog DRAGANA TRKULJA, istraživač pripravnik, dr BORISLAV KOBILJSKI, naučni savetnik, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

izuzetno polimorfni i kodominantni markeri (Gupta et al., 1999), što zajedno sa automatizacijom procesa, ovim markerima daje prednost pri upotrebi u marker asistiranoj selekciji (MAS). Mikrosateliti su pogodni za utvrđivanje genetičkog profila pšenice, određivanje nivoa diverziteta, analizu veze fenotipske i genetičke varijabilnosti itd. (Ganal and Röder, 2007; Varshney et al., 2005).

Cilj ovoga rada bio je da se, primenom mikrosatelitskih markera, utvrdi genetička varijabilnost elitnog oplemenjivačkog materijala, a koja bi, u slučaju da je zadovoljavajuća, mogla poslužiti kao dobra osnova za

dalji rad na validaciji veze marker-svojtvo za važna agronomska svojstva pšenice.

Materijal i metode

U radu je ispitivano 96 genotipova heksaploidne pšenice (Tab. 3) poreklom iz 11 različitih oplemenjivačkih centara sveta. Sorte i linije su deo kolekcije Odeljenja za strna žita Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu. Na osnovu višegodišnje evaluacije prinosa zrna, odabrani materijal, klasifikovan je na genotipove sa visokim i niskim genetskim potencijalom za prinos.

Tab. 1. Osnovne karakteristike korišćenih mikrosatelitskih markera

Tab. 1. Description of used microsatellite markers

Prajme /Primer	Lokus/ Locus	Ponovak/ Repeat	Sekvence desnog i levog prajmera/ Sequences of primer pairs
GWM428	Xgwm428	(GA)22	5' TTC TCC ACT AGC CCC GC 3' (NED) 5' CGA GGC AGC GAG GAT TT 3'
GWM11	Xgwm11	(TA)6CATA(CA)19(TA)6	5' GTG AAT TGT GTC TTG TAT GCT TCC 3' (6-FAM) 5' GGA TAG TCA GAC AAT TCT TGT G 3'
PSP3200	Xpsp3200	(AAG)16	5'GTT CTG AAG ACA TTA CGG ATG 3' (PET) 5' GAG AAT AGC TGG TTT TGT GG 3'
PSP3071	Xpsp3071	(TC)14	5' CGT GCC CTA CAC CTC CTT TTC TCT C 3' (VIC) 5' TCC GTA CAT ACT CCG GGA GAC C 3'

Genomska DNK izolovana je iz 96 klijanaca, pomenutih genotipova pšenice, prema metodi po Doyle & Doyle (1990). Za analizu genetičke varijabilnosti odabran je set od četiri markera: Gwm11, Gwm428, Psp3200, Psp3071 (Tab. 1), a koji su prema literaturnim izvorima, povezani sa važnim agronomskim svojstvima pšenice (Kuchel et al., 2007; Li et al., 2007; Quarrie et al., 2003).

Lančana reakcija polimeraze urađena je pomoću fluorescentno obeleženih prajmera na aparatu Gold 96-Well GeneAmp PCR System 9700

(Applied Biosystems) prema modifikovanom protokolu Röder et al. (1998). Zapremina od 20 l reakcione smeše sadržala je 25 ng genomske DNK, 1x pufera za Taq polimerazu, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 10 pmol-a levog i desnog prajmera i 2 jedinice Taq polimeraze (Applied Biosystems). Posle početne faze na 94°C u trajanju od 5min, usledilo je 47 ciklusa reakcije: denaturacija DNK u trajanju od 30s na 94°C, zatim vezivanje prajmera na specifičnim temperaturama (52°C ili 62°C) u trajanju od 30s i faza ekstenzije u istom intervalu na 72°C.

Završna faza PCR reakcije trajala je 10min na temperaturi od 72°C. Dobijeni produkti razdvajani su putem kapilarne elektroforeze na genetičkom analizatoru 3130 Applied Biosystems - ABI Prism 3130. Fragmentna analiza obavljena je uz pomoć GeneMapper Software Version 4.0 (Applied Biosystems) poređenjem sa GeneScan 500 LIZ Size standardom (Applied Biosystems).

Nivo polimorfnosti pojedinačnih lokusa izračunata je prema Anderson et al. (1993). Grupisanje genotipova prema sličnosti, na osnovu analize mikrosatelitskih lokusa, vršeno je u programu Structure v.2.2 (Pritchard et al., 2000).

Rezultati i diskusija

U četiri ispitivana mikrosatelitska lokusa detektovana je ukupno 31 alelna forma. Prosečan broj alela po lokusu iznosio je 7,75 (Tab. 2), što ukazuje na zadovoljavajući nivo polimorfnosti (Kobiljski et al., 2002). Relativno veliki broj prisutnih alela otkriven je zbog velike rezolucione moći detekcionog aparata. Najveći broj alela (11) utvrđen je u lokusu

Xgwm11, što je indikacija značajne genetičke varijabilnosti ispitivanog materijala. Veličina alela kretala se od 186bp do 212bp - baznih parova (Tab. 3). U istom lokusu utvrđeno je prisustvo nultih i heterozigotnih alela. Nulti aleli ukazuju na pojavu tačkastih mutacija ili delecija na mestu vezivanja prajmera (Gupta and Varshney, 2000).

U lokusu *Xpsp3200* na hromozomu 6D, determinisano je šest alela, sa najzastupljenijim alelom b (162bp) kod 41,6% genotipova (Graf. 1), dok je *PIC* vrednost iznosila je 0,723. Prema Quarrie et al. (2003), marker *PSP3200* pokazuje visoko značajnu vezu sa vremenom cvetanja. Ovaj region mogao bi imati ulogu u adaptaciji genotipova na specifične uslove sredine. Najveća *PIC* vrednost od 0,831 dobijena je u lokusu *Xpsp3071*, što čini ovaj marker dovoljno informativnim za analizu genetičke varijabilnosti sorti pšenice. Quarrie et al. (2003) su ispitujući identične mikrosatelitske lokuse utvrdili osam (*Xpsp3200*) odnosno devet alela (*Xpsp3071*), što je u skladu sa rezultatima dobijenim u ovom radu.

Tab. 2. Veličina i broj alela, polimorfnost lokusa i frekvencija najučestalijeg alela
Tab. 2. Size and number of alleles per locus, *PIC* value and the highest allele frequency

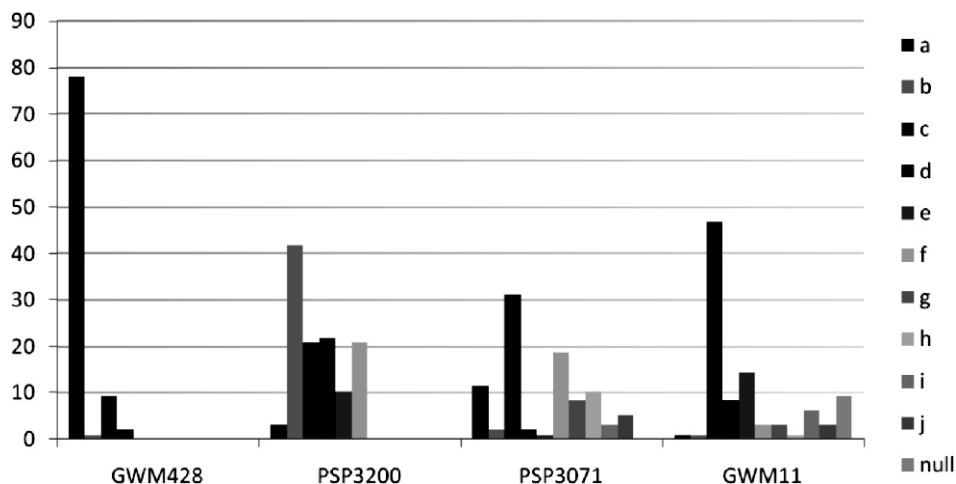
Lokus /Locus	Hromozom/ Chromosome	Broj alela po lokusu / Number of alleles per locus	Veličina alela / Size of allele	<i>PIC</i> vrednost / <i>PIC</i> value	Frekvencija / Frequency
<i>Xgwm428</i>	7D	4	121-135	0,377	0,781
<i>Xpsp3200</i>	6D	6	159-177	0,723	0,417
<i>Xpsp3071</i>	6A	10	148-167	0,831	0,313
<i>Xgwm11</i>	1B	11	186-212, nulti	0,736	0,469
Prosečan broj		7,75		0,667	0,495

Tab. 3. Veličina produkata (bp) kod 96 genotipova pšenice u četiri mikrosatelitska lokusa
 Tab. 3. Alelic size (bp) of 96 wheat genotypes at four microsatellite loci

Br./No.	Genotip/Genotype	GWM428	PSP3200	PSP3071	GWM11
<i>linije sa niskim potencijalom za prinos / lines with low yield potential</i>					
1	NS 71/02	121	162	161	192
2	NS 3/05	121	162	151	192
3	NS 2/06	121	168	159	194
4	NS 7/06	121	162	153	192
5	NS 91/05	121	162	153	192
6	NS 18/06	133	162	153	206
7	NS 31/06	121	171	159	192
8	NS 32/06	133	168	153	206
9	NS 39/06	121	174	159	194
10	NS 41/06	121	168	161	192
11	NS 165/05	121	162	153	196
12	NS 166/05	121	162	153	196
13	NS 171/05	121/135	162	153	196
14	NS 172/05	121/135	162	153/148	196
15	NS 174/05	121	162	148	212
16	NS 180/05	121	162	148	186
17	NS 181/05	121	162	153	196
18	NS 182/05	121	168	163	null
19	NS 183/05	121	162	153	192
20	NS 184/05	121/135	162	153	196
<i>linije sa visokim potencijalom za prinos / lines with high yield potential</i>					
21	NS 19/06	121	171	153	198
22	NS 26/07	121	162	153	194
23	NS 144/05	121/133	162	153	198/192
24	NS 150/05	121/133	162	153	194
25	NS 160/05	121	171	148	192
26	NS 42/07	121	162	148	null
27	NS 46/07	121	162	153/148	192
28	NS 47/07	121	162	153	null
29	NS 50/07	121	162	153	192
30	NS 52/07	121	168	153	192
31	NS 55/07	121	159	167	192
32	NS 56/07	133/121	168	163	196
33	NS 67/07	133	168	153	196
34	NS 75/07	121	168	167	196
35	NS 76/07	121	168	153	202
36	NS 77/07	121	168	153	188
37	NS 78/07	121	168	148	192
38	NS 80/07	121	168	159/151	null
39	NS 81/07	121	171	151	192

Br./No.	Genotip/ <i>Genotype</i>	GWM428	PSP3200	PSP3071	GWM11
40	NS 84/07	121	171	163/148	192
gen. sa niskim pot. za prinos / genotypes with low yield potential					
41	L-1	121	171	148	192
42	Purdue/Loras	121	171	167	192
43	Helios	135	162	163	192
44	Purdue 39120	121	162	148	192
45	Al-kan-tzao	121	174	167	200
46	Saitama 27	121	174	159	null
47	Ai Bian	121	174	159	196
48	ZG 987/3	121	168	163	212
Br./No.	Genotip/ <i>Genotype</i>	GWM428	PSP3200	PSP3071	GWM11
49	Norin 10	121	162	157	192
50	Tr. compactum	121	162	163	192
51	Timson	121	162	153	192
52	INTRO 615	121	177	148	196
53	Magnif 41	121	159	163	192
54	Tibet Dwarf	121	174	148	null
55	ZG K 238/82	121	168	167	206
56	L 1A/91	121	168	155	192
57	L1/91	121	168	155	192
58	Tr. spherococcum	121	174	163	null
59	Min Dwarf.	121	168	163	192
genotipovi sa visokim potencijalom za prinos / genotypes with high yield potential					
60	Tom Thumb	121	168	153	198
61	NS 66/92	121	162	163/148	192
62	NS 79/90	121	171	159/153	192
63	Mina	121	171	159	200/192
64	NS 559	121	162	148	192
65	Centurk	121	162	161	192
66	Pobeda	121/135	162	159	200
67	BCD 1302/83	121	159	161	192
68	NS 33/90	121	174	153	198
69	Ana	121	177	161	192
70	NS 55-25	121	174	159	200
71	NS 46/90	121	162	163	192
72	Sofija	121	171	163	212
73	UC 65680	121	162	153	192
74	Slavija	121	162	153	192
75	Sava	121	162	153	192
76	Nizija	121	162	161	192
77	Renesansa	135	171	159	206
78	Triple Dirk B	121/131	171	159	192
79	Nova Banatka	121	171	153	192

Br./No.	Genotip/ <i>Genotype</i>	GWM428	PSP3200	PSP3071	GWM11
80	Rusalka	131	162	165	194
Sorte / Cultivars					
81	Evropa 90	121	171	159	null
82	NS Rana 5	121	171	159	null
83	Rusija	121	162	153	192
84	Prima	121/135	168	159	194
85	Pesma	121	162	148	192
86	Zlatka	121	162	161	192
87	Ljiljana	133	171	165	194
88	Arija	121	171	153	192
89	Rapsodija	121	162	161	192
90	Simonida	133	171	159	194
91	Cipovka	121	171	165	192
92	Dragana	133	168	159	206
93	NS 40S	121	171	159	206
94	Nevesinjka	133	171	153	196
95	Venera	133	174	159	196
96	Nataša	133	174	159	196



Graf. 1. Frekvencija alela u ispitivanim lokusima
Graph. 1. Frequency of alleles at analyzed loci

Najmanji nivo polimorfnosti uočen je u lokusu *Xgwm428* usled visoke učestalosti alela od 121bp. Od ukupnog broja ispitivanih genotipova 78,1% posedovalo je ovu alelnu formu. Dominantna prisutnost ovog alela može biti rezultat velikog selek-

cionog pritiska. Najmanja polimorfnost ovog lokusa u skladu je sa ranijim ispitivanjima, koja ukazuju na visok stepen konzerviranosti velikog dela D genoma (Stachel et al., 2000).

Na osnovu ispitivanih lokusa, genotipovi su analizirani u programu

Structure. Ispitivani elitni materijal grupisan je prema genetičkoj sličnosti. Dobijena su tri klastera sa ravnomernom preraspodelom genotipova (Graf. 2). U prvoj subpopulaciji nalazilo se 32, u drugoj 27, dok je u trećoj dobijeno 28 genotipova. Preostalih devet odnosno 9,4% analiziranih genotipova nije raspoređeno u odgovarajuće subpopulacije, jer kod

njih nije utvrđen molekularni polimorfizam dovoljan za grupisanje u bilo koju od 3 navedene grupe. Visok stepen genetičke varijabilnosti oplemenjivačkog materijala i struktuiranost populacije ukazuju na odgovarajući odabir genotipova, kao i na mogućnost njihovog daljeg korišćenja za utvrđivanje veze između markera i agronomski važnih svojstava.



Graf. 2. Grafički prikaz tri subpopulacije procenjene u programu *Structure*
Graph. 2. Preview of three subpopulations estimated in *Structure*

Zaključak

U odabranom oplemenjivačkom materijalu uočen je zadovoljavajući nivo polimorfnosti (PIC), sa prosečnom vrednošću od 0,667. Analizom ispitanih mikrosatelitskih lokusa, genotipovi su razvrstani u tri subpo-

pulacije, na osnovu genetičke sličnosti. Elitni oplemenjivački materijal bio bi koristan za dalja ispitivanja sa odabranim „kandidat“ markerima, indirektno vezanim za pojedina važna agronomska svojstva.

LITERATURA

- ANDERSON, J.A., CHURCHILL, G.A., AUTRQUE, J.E., TANKSLEY, S.D., SORRELLS, M. E. (1993): Optimizing parental selection for selection for genetic maps. *Genome* 36:181-186.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. (1990): Isolation of Plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15
- GANAL, M.W., RÖDER, M.S. (2007): Microsatellite and SNP markers in wheat breeding. In: *Genomics assisted crop improvement*, Varshney R.K. and Tuberosa R. (Eds.). *Genomics applications in crops* 2:1-24.
- GUPTA, P.K., VARSHNEY, R.K. (2000): The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113:163-185.
- GUPTA, P.K., VARSHNEY, R.K., SHARMA, P.C., RAMESH, B. (1999): Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breeding* 118:369-390.

- KOBILJSKI, B., QUARRIE, S., DENČIĆ, S., KIRBY, J., IVEGEŠ, M. (2002): Genetic diversity of the Novi Sad wheat core collection revealed by microsatellites. *Cellular & Molecular Biology Letters* 7:685–694.
- KUCHEL, H., WILLIAMS, K.J., LANGRIDGE, P., EAGELES, H.A., JEFFERIES, S.P. (2007): Genetic dissection of grain yield in bread wheat. I. QTL analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 115: 1029-1041.
- LI, S., JIA, J., WEI, X., ZHANG, X., LI, L., CHEN, H., FAN, Y., SUN, H., ZHAO, X., LEI, T., XU, Y., JIANG, F., WANG, H., LI, L. (2007): A intervarietal genetic map and QTL analysis for yield traits in wheat. *Molecular Breeding* 20:167-178.
- PRASAD, M., VARSHNEY, R.K., ROY, J.K., BALAYAN, H.S., GUPTA, P.K. (2000): The use of microsatellites for detecting DNK polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 584-592.
- PRITCHARD, J.K., STEPHENS, M., DONNELLY, P. (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- QUARRIE, S.A., DODIG, D., PEKIC, S., KIRBY, J., KOBILJSKI, B. (2003): Prospects for marker-assisted selection of improved drought responses in wheat. *Bulgarian Journal of Plant Physiology, Special Issue*: 83-95.
- REIF, J.C., ZHANG, P., DREISIGACKER, S., WARBURTON, M.L., GINKEL, M., HOISINGTON, D., BOHN, M., MELCHINGER A.E. (2005): Wheat genetic diversity trends during domestication and breeding. *Theoretical and Applied Genetics* 110: 859-864
- RÖDER, M.S., KORZUN, V., WENDEHAKE, K., PLASCHKE, J., TIXIER, M-H., LEROZ, P., GANAL, M.W. (1998): A microsatellite map of wheat. *Genetics* 194: 2007-2023.
- STACHEL, M., LELLEY, T., GRAUSGRUBER, H., VOLLMANN, J. (2000): Application of microsatellites in wheat (*Triticum aestivum* L.) for studying genetic differentiation caused by selection for adaptation and use. *Theoretical and Applied Genetics* 100:242–248.
- VARSHNEY, R.K., GRANER, A., SORRELLS, M.E. (2005): Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology* 23: 48-55.

MOLECULAR EVALUATION OF GENETIC VARIABILITY OF WHEAT ELITE BREEDING MATERIAL

BRBAKLIĆ LJILJANA, KONDIĆ-ŠPIKA ANKICA,
TRKULJA DRAGANA, KOBILJSKI. B.

SUMMARY

Estimation of genetic variability of breeding material is essential for yield improvement in wheat cultivars. Modern techniques based on molecular markers application are more efficient and precise in genetic variability evaluation than conventional methods. Variability of 96 wheat cultivars and lines was analyzed using four microsatellite markers (Gwm11, Gwm428, Psp3200, Psp3071). The markers were chosen according to their potential association with important agronomical traits indicated in the literature. Total of 31 alleles were detected with maximum number of alleles (11) in *Xgwm11* locus. The highest polymorphism information content (PIC) value (0,831) was found in the locus *Xpsp3071*. The genotypes were grouped into three subpopulations based on their similarity in the analyzed loci. The results have indicated wide genetic variability of the studied material and possibility of its application in further breeding process after validation of marker-trait association.

Key words: wheat, genetic diversity, SSR