



## Asocijativna analiza između mikrosatelitskih markera i agronomski važnih svojstava pšenice

Ljiljana Brbaklić · Ankica Kondić-Špika · Dragana Trkulja · Borislav Kobiljski

primljeno / received: 19.04.2010. prihvaćeno / accepted: 05.05.2010.  
© 2010 IFVC

**Izvod:** Asocijativna analiza predstavlja najnoviji pristup u genetičkim istraživanjima pšenice koji omogućava uspješniju implementaciju marker asistiranu selekciju (MAS) u oplemenjivačke programe. U cilju utvrđivanja veze marker-svojstvo, u radu je izvršena dvogodišnja fenotipska evaluacija 96 genotipova heksaploidne pšenice, kao i molekularna analiza primenom mikrosatelitskih markera (Simple Sequence Repeat - SSR). Na osnovu podataka molekularne analize, u četiri ispitivana mikrosatelitska lokusa (*Xgwm11*, *Xgwm428*, *Xpsp3200*, *Xpsp3071*), detektovana je ukupno 31 alelna forma. Asocijativnom analizom su utvrđene četiri statistički značajne veze ispitivanjem važnih agronomskih svojstava i mikrosatelitskih markera. Markeri *GWM428* i *GWM11* imali su značajan uticaj na fenotipsku varijabilnost vremena klasanja i vremena cvetanja u toku obe ispitivane godine, što ih čini pogodnim za praktičnu primenu u MAS.

**Cljučne reči:** agronomska svojstva, asocijativna veza, polimorfnost, pšenica, SSR

### Uvod

Značajan broj agronomski važnih svojstava pšenice, kao što su prinos, kvalitet i drugo, determinisan je većim brojem gena, tzv. QTL-a (Quantitative Trait Loci), što proces oplemenjivanja čini veoma kompleksnim (Sorrells 2008, Neumann et al. 2010). U poslednjih nekoliko decenija, primenom različitih molekularnih markera, detektovani su QTL-ovi povezani sa važnim agronomskim svojstvima, i to najčešće u populacijama nastalim ukrštanjem dva roditelja kao što su rekombinantne inbred linije, dvostruki haploidi, itd. Detektovani QTL-ovi iz ovih biparentalnih populacija validni su samo u odnosu na dve alelne forme koje nose, po jednu od svakog roditelja, što značajno ograničava mogućnost za njihovu praktičnu primenu. S druge strane, ispitivanja veze između genetičkih i fenotipskih podataka primenom asocijativne analize direktno na oplemenjivačkom materijalu (sorte, linije i genotipovi) pružaju znatno više informacija o polimorfnosti markera i varijabilnosti fenotipskih svojstava, što je od velikog značaja za njihovu praktičnu primenu putem MAS (Kobiljski et al. 2007). U poslednjih nekoliko godina intenzivirana su asocijativna istraživanja, pre svega asocijativnog mapiranja kompleksnog genoma pšenice, čime je povećana dostupnost

informacija korisnih u procesu oplemenjivanja (Breseghello & Sorrells 2006, Neumann et al. 2010).

Cilj rada bila je identifikacija genetičke polimorfnosti mikrosatelitskih lokusa pšenice i utvrđivanje moguće veze ispitivanih markera i pojedinih važnih agronomskih svojstava u našim agrokološkim uslovima, kao i mogućnost praktične primene utvrđenih asocijacija u oplemenjivačkim programima pšenice.

### Materijal i metod rada

U radu je ispitivano 96 genotipova heksaploidne pšenice poreklom iz jedanaest oplemenjivačkih centara sveta, koji se nalaze u genetičkoj kolekciji Odeljenja za strna žita Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu. Ispitivani oplemenjivački materijal podeljen je na osnovu dugogodišnjih fenotipskih evaluacija prinosa, na linije/genotipove sa visokim i niskim genetskim potencijalom za prinos. U ovom radu su merena i ocenjena četiri agronomski važna svojstva u toku dve vegetacione sezone (2007. i 2008). Ispitivana su sledeća svojstva: vreme klasanja i cvetanja, visina stabljike i dužina klasa, koja su prema UPOV deskriptorima za pšenicu ocenjena na sledeći način:

Ovo istraživanje je deo projekta broj TP -20138: *Povećanje genetičkih i proizvodnih potencijala strnih žita primenom klasične i moderne biotehnologije* (2008-2010) Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije / This research results from the project TP-20138 funded by the Ministry of Science and Technological Development of the Republic of Serbia

Lj. Brbaklić (✉) · A. Kondić-Špika · D. Trkulja · B. Kobiljski  
Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Maksima Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Srbija  
e-mail: ljiljana.brbaklic@ifvens.ns.ac.rs

- vreme klasanja – broj dana od 1. januara do momenta kada je 50% biljaka klasalo
- vreme cvetanja – broj dana od 1. januara do momenta kada je 50% biljaka cvetalo
- visina stabljike (cm) – merena od osnove biljke do osnove klasa
- dužina klasa (cm) – merena od osnove klasa do vrha klasa bez osja

razdvajani su putem kapilarne elektroforeze na četvorokapilarnom sekvenceru 3130 Applied Biosystems - ABI Prism 3130. Fragmentna analiza produkata obavljena je uz pomoć GeneMapper Software Version 4.0 (Applied Biosystems).

Nivo polimorfnosti pojedinačnih lokusa (Polymorphism Index Content - PIC vrednost) utvrđena je prema Anderson et al. (1993). Struktura

Tabela 1. Opis mikrosatelitskih markera

Table 1. Description of microsatellite markers

Prajmeri Primers	Sekvenca ponovka Sequence repeat	Sekvence desnog i levog prajmera Sequences of primer pairs	Hromozom Chromosome	T (C°)
GWM428	(GA)22	5' TTC TCC ACT AGC CCC GC 3' ( <b>NED</b> ) 5' CGA GGC AGC GAG GAT TT 3'	7D	62
GWM11	(TA)6CATA(CA)19(TA)6	5' GTG AAT TGT GTC TTG TAT GCT TCC 3' ( <b>6-FAM</b> ) 5' GGA TAG TCA GAC AAT TCT TGT G 3'	1B	52
PSP3200	(AAG)16	5' GTT CTG AAG ACA TTA CGG ATG 3' ( <b>PET</b> ) 5' GAG AAT AGC TGG TTT TGT GG 3'	6D	62
PSP3071	(TC)14	5' CGT GCC CTA CAC CTC CTT TTC TCT C 3' ( <b>VIC</b> ) 5' TCC GTA CAT ACT CCG GGA GAC C 3'	6A	62

Genotipovi su analizirani pomoću četiri mikrosatelitska markera (Tab. 1), za koje je utvrđena značajna povezanost sa agronomski važnim svojstvima u ranijim istraživanjima (Quarrie et al. 2003, Kuchel et al. 2007, Li et al. 2007).

Izolacija DNK iz klijanaca genotipova izvršena je prema izmenjenoj metodi po Doyle & Doyle (1990). Lančana reakcija polimeraze vršena je prema modifikovanom protokolu Röder et al. (1998). Reakciona PCR smeša zapremine 20 µl sadržala je 25 ng genomske DNK, 1 x pufer za Taq polimerazu, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM svakog dNTP, 2 jedinice Taq polimeraze i po 10 pmol levog i desnog fluorescentnog prajmera. Dobijeni produkti

populacije analizirana je na osnovu molekularnih podataka obrađenih u programu Structure v.2.2. (Pritchard et al. 2000). Asocijativna analiza markera i ispitivanih svojstava testirana je prema opštem linearnom modelu (GLM - General Linear Model) u softverskom programu Tassel v. 2.0.1 (Bradbury et al. 2007).

### Rezultati i diskusija

Molekularnom evaluacijom mikrosatelitskih lokusa (*Xgwm11*, *Xgwm428*, *Xpsp3200*, *Xpsp3071*) kod 96 genotipova pšenice detektovana je ukupno 31 alelna forma (Tab. 2.) Prosečan broj alela

Tabela 2. Broj alela po lokusu, veličina alela, PIC vrednost i frekvencija najučestalijeg alela

Table 2. Number of alleles per loci, allelic size, PIC value and frequency

Lokus Locus	Broj alela po lokusu Number of alleles per locus	Veličina alela Size of allele	PIC vrednost PIC value	Frekvencija Frequency
<i>Xgwm428</i>	4	121-135	0,377	0,781
<i>Xpsp3200</i>	6	159-177	0,723	0,417
<i>Xpsp3071</i>	10	148-167	0,831	0,313
<i>Xgwm11</i>	11	186-212, nulti	0,736	0,469
Ukupan broj Total	31		0,667	0,495

po lokusu iznosio je 7,71. Najveći broj alelnih varijanti (11) utvrđen je u lokusu *Xgwm11*, dok je u lokusu *Xgwm428* broj različitih alela bio najmanji (4). Najveća PIC vrednost dobijena je u lokusu *Xpwp3071* (0,831), dok je u lokusu *Xgwm428* (0,377) bila najmanja. Frekvencije najučestalijih alela bile su u intervalu od 0,313 (*Xpwp3071*) do 0,781 (*Xgwm428*).

Sličan broj alelnih formi i relativno visok nivo polimorfnosti po lokusima detektovani su i u drugim radovima (Kobiljski i sar. 2002, Maccaferri et al. 2007), a predstavljaju pokazatelje značajne genetičke varijabilnosti ispitivanog materijala. Pored detektovane molekularne divergentnosti, utvrđena je i značajna fenotipska varijabilnost, koja je prikazana u tabeli 3.

Asocijativnom analizom utvrđene su četiri značajne veze između ispitivanih fenotipskih svojstva i mikrosatelitskih markera. Mikrosatelitski marker *GWM11*, koji se nalazi na hromozomu 1B, pokazao je značajnu vezu sa fenotipskom varijabilnošću QTL-a odgovornog za vreme klasanja u obe ispitivane godine (33,36% i 29,19%) (Tab. 4). Isti marker bio je vezan za fenotipsku varijabilnost perioda cvetanja sa sličnim efektom (oko 32%) u obe godine. Dobijeni rezultati u našem radu u saglasnosti su sa rezultatima Yang et al. (2002), koji su uočili da je marker *GWM11* pokazao značajnu vezu sa QTL-om za dužinu nalivanja zrna, a ova osobina se nalazi u direktnoj vezi sa vremenom stasavanja.

Tabela 3. Osnovni statistički parametri ispitivanih agronomskih svojstava tokom dve godine  
Table 3. Basic statistical parameters of evaluated agronomic traits during two years

Osobine Traits	Prosek Average	Interval poverenja		Min	Max	Std. dev. Std.dev.	Std. greška Std. err.
		-95% Interval conf. -95%	+95% Interval conf. +95%				
Klasanje Heading	125,7	124,57	126,83	102	144	7,9	0,57
Cvetanje Flowering	131	129,89	132,07	111	150	7,5	0,54
Visina stab. Stem height	84,4	82,21	86,71	19	132,3	15,8	1,14
Dužina kl. Spike length	10,1	9,86	10,38	4,3	19,7	1,8	0,13

U cilju eliminacije lažno pozitivnih asocijacija između pojedinih kandidat gena i svojstava, neophodno je utvrditi strukturu ispitivane populacije (Pritchard et al. 2000). Na osnovu podataka dobijenih molekularnom evaluacijom, izvršena je analiza genetičke strukture populacije, a dobijene vrednosti nakon korekcije po Evanno et al. (2005), ukazale su na prisustvo tri subpopulacije (Graf. 1). Ovako divergentan materijal, na osnovu fenotipske i molekularne analize, bio je važan preduslov asocijativne analize.

U ispitivanom radu, mikrosatelitski marker *GWM428* lociran na hromozomu 7D bio je vezan sa varijabilnošću vremena klasanja tokom obe ispitivane godine (14,09% i 10,14%). Slična veza ovoga markera uočena je i za svojstvo varijabilnost cvetanja (14,3% i 10,79%) tokom obe ispitivane godine (Tab. 5)

Groos et al. (2003) su u blizini istog markera identifikovali QTL za masu 1.000 zrna. Ova osobina je u značajnoj korelaciji sa ranostasnošću, što implicira da bi primena ovog mikrosa-



Grafikon 1. Grafički prikaz tri subpopulacije procenjene u programu Structure  
Graph 1. Preview of three subpopulations estimated in programme Structure

Tabela 4. Asocijativna veza markera GWM11 sa vremenom klasanja i cvetanja  
 Table 4. Associations between GWM11 marker and heading and flowering time

Marker Marker	Osobina Trait	Godina Year	P vrednost P value	R <sup>2</sup>
GWM11	Klasanje Heading	2007	0,000205**	33,36
		2008	0,0011**	29,19
	Cvetanje Flowering	2007	0,000398**	32,18
		2008	0,000338**	32,09

\*\* nivo značajnosti / level of significance  $p < 0,01$

telitskog markera u MAS za navedena svojstva mogla biti od značaja u oplemenjivačkom radu.

U radu Cuthbert et al. (2008), koji su ispitivanja vršili na mapirajućoj populaciji od 178 linija, utvrđeni su QTL-ovi za vreme klasanja i sazrevanja, i to u proksimalnim delovima hromozoma 7D i 1B. U odnosu na prethodno definisane linkidž mape, ispitivani mikrosatelitski markeri u našem radu takođe su smešteni u ovim hromozomskim regionima, te se može pretpostaviti da se radi o istim QTL-ovima. Takođe, ovo je potvrda da QTL-ovi identifikovani u mapirajućim

populacijama, mogu veoma uspešno biti detektovani i asocijativnom analizom oplemenjivačkog materijala.

Mikrosatelitski markeri PSP3071 i PSP3200 nisu pokazali vezu sa ispitivanim svojstvima, iako su u prethodnim istraživanjima utvrđene značajne asocijacije (Quarrie et al. 2003), što može biti uslovljeno istraživanjem na malom broju ispitivanih svojstava, potom odabirom oplemenjivačkog materijala, kao i mogućnošću da odabrani QTL-ovi nisu ispoljili efekat u datim uslovima spoljašnje sredine.

Tabela 5. Asocijativna veze markera GWM428 sa vremenom klasanja i cvetanja  
 Table 5. Associations between GWM428 marker and heading and flowering time

Marker Marker	Osobina Trait	Godina Year	P vrednost P value	R <sup>2</sup>
GWM428	Klasanje Heading	2007	0,0055**	14,09
		2008	0,0294*	10,14
	Cvetanje Flowering	2007	0,0053**	14,3
		2008	0,0241*	10,79

\* nivo značajnosti / level of significance  $p < 0,05$

\*\*nivo značajnosti / level of significance  $p < 0,01$

## Zaključak

Odabrani mikrosatelitski markeri su pokazali zadovoljavajući nivo polimorfnosti u analiziranom materijalu. Analizom molekularnih podataka dobijeno je grupisanje genotipova u tri subpopulacije. Asocijativnom analizom između mikrosatelitskih lokusa i fenotipskih svojstava, utvrđena je značajna veza između dva ispitivana markera i vremena klasanja i cvetanja. Sa aspekta oplemenjivanja, markeri GWM428 i GWM11 koji su pokazali značajan uticaj na fenotipsku varijabilnost, mogu se koristiti kao potencijalni kandidat markeri u MAS, dok je za preostala dva markera neophodna dodatna validacija u toku većeg broja godina, na većem broju lokaliteta i na većem broju fenotipski merljivih svojstava.

## Literatura

- Anderson J A, Churchill G A, Autrque J E, Tanksley S D, Sorrells M E (1993): Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36: 181-186
- Bradbury P J, Zhang Z, Kroon D E, Casstevens T M, Ramdoss Y, Buckler E S (2007): TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinforma.* 23: 2633-2635
- Brescghello F, Sorrells M E (2006): Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. *Crop Sci.* 46: 1323-1330
- Cuthbert J L, Somers D J, Brule-Babel A L, Broen P D, Crow GH (2008): Molecular mapping of quantitative trait loci for yield and yield components in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 117: 595-608
- Doyle J J, Doyle J L (1990): Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005): Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611-2620
- Ganal M W, Röder M S (2007): Microsatellite and SNP markers in wheat breeding. In: Varshney R.K. and Tuberosa R. (eds.), *Genomics assisted crop improvement: genomics applications in crops*, Springer, The Netherlands, 2:1-24
- Groos C, Robert N, Bervas E, Charmet G (2003): Genetic analysis of grain protein-content, grain yield and thousand-kernel weight in bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1032-1040
- Kobiljski B, Denčić S, Hristov N, Mladenov N, Quarrie S, Stephenson P, Kirby J (2007): Potential uses of microsatellites in marker-assisted selection for improved grain yield in wheat. In: Buck H T, Nisi J E, Salomón N. (eds.), *Developments in Plant Breeding, Wheat Production in Stressed Environments*, 729-736
- Kobiljski B, Quarrie S, Denčić S, Kirby J, Ives M (2002): Genetic diversity of the Novi Sad wheat core collection revealed by microsatellites. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 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. *Theor. Appl. Genet.* 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. *Mol. Breed.* 20: 167-178
- Maccaferri, M., Stefanelli, S., Rotondo, F., P., Tuberosa, R., Sanguineti, M.C. (2007). Relationships among durum wheat accessions. I. Comparative analysis of SSR, AFLP, and phenotypic data. *Genome* 50: 373-384
- Neumann K, Kobiljski B, Denčić S, Varshney R K, Börner A (2010): Genome-wide association mapping : a case study in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol. Breed.*  
DOI 10.1007/s11032-010-9411-7
- Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genet.* 155: 945-959
- Quarrie S A, Dodig D, Pekić S, Kirby J, Kobiljski B. (2003): Prospects for marker-assisted selection of improved drought responses in wheat. *Bulg. J. Plant. Physiol.* 28: 83-95
- Röder M S, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier M-H, Leroy P, Ganal M W (1998): A microsatellite map of wheat. *Genet.* 194: 2007-2023
- Sorrells M E (2008): Association breeding strategies for improvement of self-pollinated crops. Conventional and molecular breeding of field and vegetable crops, Novi Sad, 24-27 november, 43-46
- Yang J, Sears R G, Gill B S, Paulsen G M (2002): Quantitative and molecular characterization of heat tolerance in hexaploid wheat. *Euphytica* 126: 275-282

## Association Analysis between Microsatellite Markers and Agronomically Important Traits in Wheat

Ljiljana Brbaklić · Ankica Kondić-Špika · Dragana Trkulja · Borislav Kobiljski

Institute of Field and Vegetable Crops, Maksima Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Serbia

**Summary:** Association analysis is a new approach in wheat genetic studies that enables a more successful implementation of marker assisted selection (MAS) in breeding programs. In this paper, 96 hexaploid wheat genotypes were used for phenotype evaluation during two years, and molecular analysis using four microsatellite markers (Simple Sequence Repeat - SSR), aiming at establishing association between marker and trait. Based on molecular data at four analyzed microsatellite loci (*Xgwm11*, *Xgwm428*, *Xpsp3200*, *Xpsp3071*), a total of 31 allelic forms were detected. The results of association analysis have indicated four statistically significant associations. Markers GWM428 and GWM11 had significant effects on the phenotypic variability of heading and flowering time during both years, which enables their practical application through MAS.

**Key words:** agronomic traits, association analysis, SSR, polymorphism, wheat