

UDK

PRIMENA MOLEKULARNIH MARKERA U OPLEMENJIVANJU PŠENICE. REALNOST ILI ZABLUDA?

KOBILJSKI B., DENČIĆ, S.¹

IZVOD: U konvencionalnom (klasičnom) oplemenjivanju se za identifikaciju važnih agronomskih svojstava koriste morfološki i/ili fenotipski markeri. Oplemenjivači i naučnici stalno pokušavaju da razviju nove tehnike, koje se mogu koristiti za brže i tačnije unošenje poželjnih svojstava u biljke. U poslednjih nekoliko godina, učinjen je značajan napredak u primeni molekularnih markera u oplemenjivačkim programima na različitim biljnim vrstama. Do danas, utvrđeni polimorfizam i količina informacija dobijena različitim metodama molekularnih markera korišćena u MAS (Marker Assisted Selection - oplemenjivanje uz pomoć markera) istraživanjima (RFLP, AFLP i dr.) ili nisu opravdale njihovo korišćenje, ili su bile veoma skupe i opasne po zdravlje. Na sreću oplemenjivača pšenice (ali svih drugih biljnih vrsta), molekularni markeri - mikrosateliti, su odskora potvrdili da su najmoćnije sredstvo za MAS. Ali, usled nedovoljnog znanja, iskustva, nedostatka validnih informacija pa čak i tradicije i navika, mnogi oplemenjivači imaju negativan i odbojan stav prema uvođenju MAS u oplemenjivačke programe. U ovom radu, komentarisane su relevantne činjenice vezane za implementaciju MAS u oplemenjivačke programe, a posebno u oplemenjivačke programe pšenice, sa ciljem da se suniraju prednosti i ograničenja MAS selekcije bazirane na korišćenju mikrosatelita.

Ključne reči: MAS, molekularni markeri, mikrosateliti, oplemenjivanje, pšenica.

Kratak pregled razvoja molekularnih markera

Molekularni markeri predstavljaju tzv. "novu genetiku" koja snažno i brzo prožima sve oblasti moderne biologije, sistematike, ekologije, fiziologije, genomike, biologije rasta i razvika, transgenih organizama, a naročito oplemenjivanja organizama (Neil i sar., 1997). Pre više od dvadeset godina Botstein i sar. (1980) su opisali prvu DNK tehniku - RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), otvarajući novo poglavlje u "neograničenom izvoru genetskog polimorfizma za oplemenjivačke svrhe" (Kocbner, 2001). Tada su definisane i 3 potencijalno najkorisnije oblasti primene molekularnih markera: 1) Identifikacija sorti i/ili linija; 2) Identifikacija lokusa koji utiču na pojedina svojstva i 3) Evaluacija genetskih resursa, poboljšanje sorti i hibrida, selekcija unutar populacije itd. Na

početku novog veka, molekularni markeri ne samo da su ispunili ova očekivanja, nego su i proširili mogućnosti za njihovu primenu. Mnogi se autori slažu da skoro nema oblasti (sem kompjuterskih tehnologija) koja je više i brže napredovala nego moderna biotehnologija. Tehnike su se redale kao na pokretnoj traci (Tab.1), tek što je jedna zaživela, druga se metoda već pojavila, neke su brzo zaboravljene i napuštene, a neke su dale izuzetan doprinos razvoju ove oblasti (RFLP, AFLP, SSR, SNP...).

Lee (1995), je analizirao stavove genetičara i oplemenjivača biljaka o perspektivama primene molekularnih markera, anketom distribuiranom na 80 adresa širom sveta. Na anketu je odgovorilo 55 naučnika i stručnjaka (Nemačka-2, Engleska-1, Meksiko-2, SAD-46, Švajcarska-1, Francuska-1, Brazil-1 i Argentina-1). Na osnovu rezultata prikazanih u

Pregledni rad (Review paper)

¹ Dr BORISLAV KOBILJSKI, viši naučni saradnik, dr SRBISLAV DENČIĆ, naučni savetnik, Naučni Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad.

Tabeli 2 jasno se vidi da je u godini kada su rezultati analizirani (1995), anketa pokazala da je najveći broj ispitanika imao stav da su sa stanovišta oplemenjivanja različitih biljnih vrsta molekularni markeri, te 1995 godine, relativno važni ili nebitni. Međutim, isti

ispitanici su na pitanje da procene značaj molekularnih markera u sledećih 10 godina (2005), u ogromnoj većini (46 od 55 ispitanika) smatrali da će oni biti izuzetno ili veoma važni (Tab. 2).

Tab. 1. Skraćenica i pun naziv DNK metode molekularnih markera (mod. Koebner, 2001).

Tab. 1. Abbreviation and full names of the DNA molecular markers methods (mod. Koebner, 2001)

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AP-PCR	Arbitrarily primed PCR
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
ASAP	Arbitrary Signatures From Amplification
ASH	Allele-Specific Hybridization
ASLP	Amplified Sequence Length Polymorphism
ASO	Allele Specific Oligonucleotide
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
CAS	Coupled Amplification and Sequencing
DAF	DNA Amplification fingerprint
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
GBA	Genetic Bit Analysis
IRAP	Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism
ISSR	Inter-Simple Sequence Repeats
ISTR	Inverse Sequence -tagged Repeats
MP-PCR	Microsatellite-Primed PCR
OLA	Oligonucleotide Ligation Assay
RAIIM	Randomly Amplified Hybridizing Microsatellites
RAMPO	Randomly Amplified Microsatellite Polymorphisms
RAMPs	Random Amplified Microsatellite Polymorphisms
RAMS	Randomly Amplified Microsatellites
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RBIP	Retrotransposon-Based Insertion Polymorphisms
REF	Restriction Endonuclease Fingerprinting
REMAP	Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SAMPL	Selective Amplification of Polymorphic Loci
SCAR	Sequence Characterised Amplified Regions
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPAR	Single Primer Amplification Reactions
SPLAT	Single Polymorphic Amplification Test
S-SAP	Sequence-Specific Amplification Polymorphisms
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
SSLP	Simple Sequence Length Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeats
STMS	Sequence-Tagged Microsatellite Site
STS	Sequence-Tagged-Site
TGGE	Thermal Gradient Gel Electrophoresis
VNTR	Variable Number Tandem Repeats

Procena većine ispitanika je bila da u datom momentu (1995), nema većih mogućnosti za direktnu primenu molekularnih

markera u oplemenjivanju biljaka (Tab.3). Nasuprot ovome, u proceni mogućnosti primene molekularnih markera za samo 5

godina (2000 godine), velika većina je imala stav da će MAS (Marker Asistirana Selekcija) biti izuzetno ili veoma značajna. Tako, 50 anketiranih je smatralo da će dominantan značaj molekularni markeri imati u transferu pojedinačnih gena iz lokalnih populacija,

divljih srodnika itd., u okviru iste biljne vrste, transferu i detekciji QTL (Quantitative Trait Loci - lokusi za kvantitativna svojstva), transferu pojedinačnih gena iz drugih vrsta i izboru roditelja za hibridizaciju (Tab.3).

Tab. 2. Značaj DNK markera u oplemenjivanju biljaka (Lee, 1995).

Tab. 2. Importance of DNA Markers in Cultivar Development (Lee, 1995)

	Izuzetno važni <i>Very important</i>	Veoma važni <i>Fairly important</i>	Relativno važni <i>Fairly unimportant</i>	Nebitni <i>No impact</i>	Nema stav <i>No opinion</i>	Ukupno Total
1995	1	14	32	8	0	55
2005	15	31	8	0	1	55

Ovi podaci jasno ukazuju da je znanje i realno sagledavanje tadašnjeg stanja ali i budućnosti oplemenjivanja bilo rezultat različne informisanosti i vizionarskog i otvorenog

stava oplemenjivača iz razvijenog sveta po pitanju značaja molekularnih markera i njihove primene u oplemenjivanju.

Tab. 3. Najznačajnije oblasti primene DNK markera u oplemenjivanju biljaka (m. Lee, 1995).

Tab. 3. Most important applications DNA markers in plant breeding (mod.Lee, 1995)

Primena - Application	1995	2000
Transfer pojedinačnih gena iz lokalnih populacija, divljih srodnika itd. u okviru biljne vrste (npr. <i>Triticum</i>) primenom MAS-e. <i>Transferring single genes from landraces, wild relatives etc. among close relatives (e.g. Triticum) using MAS</i>	12	50
Transfer i detekcija QTL primenom MAS-e. <i>Transferring and detection of QTLs using MAS</i>	7	41
Transfer pojedinačnih gena iz drugih vrsta primenom MAS-e. <i>Transferring single genes from/to different species using MAS</i>	7	47
Selekcija roditelja za ukrstanja primenom MAS-e. <i>Parent selection for hybridization using MAS</i>	5	45
Ostalo (genetska varijabilnost, ...) <i>Other (genetic variability...)</i>	1	6

Najteži zadatak svakog oplemenjivača je - kako da na brz, efikasan i siguran način u nove genotipove inkorporira što više poželjnih gena. Teškoće su različite: dugotrajan proces selekcije, većina najvažnijih svojstava je uslovljena većim brojem gena i pod značajnim je uticajem spoljne sredina (GxE interakcija), nemogućnost selekcije na važna svojstva koja se "ne vide" ili se ne mogu kvantifikovati, itd. Metode tzv. "moderne biotehnologije" omogućavaju da se veći broj ovih ograničavajućih faktora uspešno prevaziđe.

Danas se u naučnim krugovima vodi česta diskusija o tome da li naša nauka treba da se bavi fundamentalnim ili aplikativnim istraživanjima. U Grafiku 1 dat je šematski prikaz postupnosti u dizajniranju, razvoju, validaciji i aplikaciji molekularnih markera. Vrlo je malo verovatno da se u našim uslovima možemo na uspešan način baviti fundamentalnim istra-

živanjima. Pored nedostatka kadrova (odlazak iz zemlje), nedostatak vrhunske opreme je jedan od najznačajnijih limitirajućih faktora za fundamentalna istraživanja. Naravno, oba faktora su u direktnoj vezi sa slabom finansijskom moći naše nauke i struke, pa je iluzorno, bar u nekom doglednom vremenu, govoriti o značajnom razvoju fundamentalnih istraživanja u oblasti molekularnih markera u našoj zemlji. Kao potvrda o ispravnosti ove teze može da posluži cena najnovije opreme III i IV generacije, koju koriste razvijene zemlje (kapilarni sekvencioneri, robotika,...), a čija se pojedinačna vrednost meri stotinama hiljada pa i milionima Evra. Ovaj tip istraživanja je i dugotrajan, te u kombinaciji sa visokim troškovima zasigurno, u ovom momentu, nije primenljiv i moguć u našim uslovima.

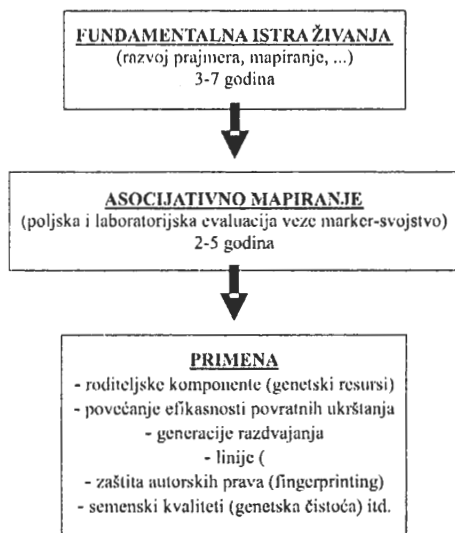
Čini se da naša nauka može dati najčajaniji doprinos u ovoj oblasti radom na tzv. Asocijativnom mapiranju" (Graf.1). Ovaj period, koji traje najčešće 2-5 godina, karakteriše se utvrđivanjem veze između već stvorenih prajmera (markera) i različitih svojstava. Relativno jeftina poljska istraživanja u našoj zemlji (u odnosu na razvijene zemlje) i vrhunska ekspertiza naših oplemenjivača u

tzv. "klasičnom oplemenjivanju" su važni preduslovi za kvalitetan i uspешan rad na utvrđivanju veze marker-svojstvo. Iz ovih razloga, smatramo da u ovom segmentu, postoji realna mogućnost da se na kvalitetan i uspешan način naša zemlja uključi u svetske naučne i istraživačke tokove.

Tab.4. Mogućnosti, ciljevi, dostignuća i ograničenja primene DNK markera u oplemenjivanju
Tab. 4. Possibilities, targets, achievements and limitations in application of DNA markers in breeding

Mogućnost	Cilj	Postignuto	Ograničenja
Osnovna znanja	<ul style="list-style-type: none"> Razumevanje genetske kontrole željenih svojstava za poboljšanje prinosa, kvaliteta, otp. na bolesti i abiotske stresove, ... 	<ul style="list-style-type: none"> Genetska kontrola mnogih svojstava je razjašnjena Napravljene su genetske mape tzv. "mapirajućih populacija". 	<ul style="list-style-type: none"> Izrada kompletnih genetskih mapa je izuzetno skupa i dugotrajna.
Marker Asistirana Selekcija (MAS)	<ul style="list-style-type: none"> Napraviti DNK markere za poboljšan kvalitet, otp. na bolesti i abiotske stresove.... Potvrditi pouzdanost i primeniti ih. Napraviti molekularne probe za identifikaciju specifičnih patogena Napraviti DNK markere za identifikaciju poželjnih i nepoželjnih "blokova" gena ili delova hromoz. DNK markeri moraju biti tzv. "User-friendly" tipa. Uključiti DNK markere u klasične oplemenjivačke programe na najefikasniji mogući način. Intenzivno i efikasno korišćenje DNK markera. 	<ul style="list-style-type: none"> DNK markeri za velik broj svojstava (kod pšenice: za velik broj majora gena otpornosti na bolesti - Pm, Lr, Sr, Fus, BYDV...; kvalitet - %Prot, Glu i Gli geni, PHS...; visina i fotoperiodska reakcija - Rht i Ppd geni; niske T - Fr; Elementi- B, Al, Mn, Zn, Cu...). Velik broj DNK markera je kreiran, i u toku je potvrda njihovog značaja i pouzdanosti. 	<ul style="list-style-type: none"> Nedostatak informativnih DNK markera za najvažnija svojstva (prinos). Analiza mora biti jeftina i pouzdana. Problem analize ogromne količine podataka. Problem definisanja oplemenjivačke strategije koja će u potpunosti iskoristiti mogućnosti DNK markera. Nedovoljno znanje tzv. klasičnih oplemenjivača o mogućnostima novih tehnologija.
Softver	<ul style="list-style-type: none"> Softveri prilagođeni oplemenjivačima, za brzo i tačno donošenje odluka, kao i dugoročno planiranje korišćenja i analize podataka dobijenih primenom DNK markera. Jednostavnost korišćenja 	<ul style="list-style-type: none"> Softveri: <ul style="list-style-type: none"> - za simulaciju exp. - grafičko predstavljanje rezultata - predviđanje kvaliteta na osnovu Glu alela. 	<ul style="list-style-type: none"> Nedostatak programa za "kumulativnu bazu" fenotipskih, genotipskih i pedigre informacija. Mnogo podataka Razvoj novog softvera je skup.
Obrazovanje	<ul style="list-style-type: none"> Iskusni oplemenjivači i istraživači sposobni da iskoriste sve prednosti DNK markera u sprezi sa tzv. klasičnim oplemenjivanjem. Edukacija naučnog i stručnog kadra radi realnog sagledavanja mogućnosti i primene DNK markera (multidiscipl. timovi) sa ciljem podizanja nivoa oplemenjivačkog rada. 	<ul style="list-style-type: none"> Edukacija na redovnim studijama Edukacija na postdiplomskim studijama iz oblasti molekularne biologije i oplemenjivanja. Seminari i kursevi za postojeće oplemenjivače. Praktična obuka u postojećim laboratorijama. 	<ul style="list-style-type: none"> Podcenjivanje važnosti poljoprivrede i oplemenjivanja (u našoj zemlji). Nedostatak kvalitetnih studenata zainteresovanih za oplemenjivanje. Nedostatak specifično obrazovanog kadra sposobnog da kvalitetno edukuje zainteresovane.

Graf.1. Razvoj i primena molekularnih markera



Tek nakon potvrde postojanja veze između svojstva koje je od značaja i određenog markera, možemo pristupiti poslednjoj fazi a to je njihova primena. Primena molekularnih markera u oplemenjivanju pšenice (ali i drugih vrsta) ima velike mogućnosti a najvažnije su: izbor roditelja za ukrštanja, povećanje efikasnosti povratnih ukrštanja, selekcija na bazi veze marker-svojstvo (posebno ona koja nisu fenotipski vidljiva), identifikacija genotipova sa retkim i važnim svojstvima (naročito u ranim generacijama razdvajanja), detekcija gena iz drugih vrsta, utvrđivanje stabilnosti genetske kompozicije sorti i linija u vremenu i prostoru, zaštita autorskih prava itd (Denčić, 2001; Gupta i sar., 1996, 1999;

Snape, 1998; Roder i sar., 1998; Korzun i sar., 1998; Prasad i sar., 1999; Kobiljski i sar., 2002, Kobiljski i Galović, 2002). Značaj, mogućnosti i teorijski aspekti primene mikrosatelita u oplemenjivanju pšenice u našim uslovima su razmatrani u nekoliko publikovanih radova (Kobiljski, 2002a, 2002b), te ih u ovom radu nećemo dodatno elaborirati.

Mikrosateliti su u oplemenjivačkom radu na pšenici izuzetno važni i u jednom novom svetlu - oplemenjivanju "za" i "u" uslovima globalne promene klime. Od svih metoda moderne biotehnologije, molekularni markeri u selekciji strnina na tolerantnost na sušu najviše obećavaju (Quarrie i sar, 2002a; Quarrie i sar 2002b; Kobiljski i sar., 2004). Za oplemenjivače je izuzetno interesantno da oplemenjivanje za stresne uslove (suša, toplotni udari, topli vetrovi...), uspešno vrše na svojstva koja se fenotipski ne mogu zapaziti (osobine korena, osmotska regulacija, fiziološki parametri...), a upravo u ovoj oblasti su molekularni markeri - mikrosateliti najinformativniji i najkorisniji.

Sumarni pregled mogućnosti, ciljeva, dostignuća i ograničenja primene DNK markera u oplemenjivanju, a sa posebnim osvrtom na naše uslove, pokušali smo da predstavimo u Tab.4.

Danas su konačno i najveći skeptici uvereni da MAS (Marker Asistirana Selekcija) ima svoju budućnost. Istraživački i aplikativni programi su u punom zamahu, novi rezultati se publikuju svakodnevno. Upravo sada je pravi trenutak da se naša nauka i struka okrenu primeni MAS, i da tako smanjimo troškove i značajno povećamo efikasnost oplemenjivačkih programa u našoj zemlji.

LITERATURA

- BOTSTEIN, D., WHITE R.L. SKOLNICK, M. and DAVIS, R.W. (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32, 314-331.
- DENČIĆ, S. (2001): Yugoslav wheat pool. In: "The World Wheat Book. A history of wheat breeding", Ed.: Bonjean, A.P. and Angus, J.A., Lavoisier Publishing Inc., 377-402.
- KOBILJSKI, B. and DENČIĆ, S. (2001): Global climate change - challenge for breeding and seed production of major field crops. *J. Genet. and Breeding*, Vol. 55, 83-90.
- KOBILJSKI, B. (2002a): Molekularni markeri u oplemenjivanju i zaštiti autorskih prava strnih žita - trenutno stanje i perspektive. Zbornik referata Naučnog skupa "Savetovanje o biotehnologiji u Vojvodini". Izd: Srpska Akademija nauka i umetnosti, ogranak u Novom Sadu. 99-106.
- KOBILJSKI, B. (2002b): Molekularni markeri i oplemenjivanje pšenice. I) Teorijski aspekti. *Zbor. rad. Inst. za rat. i pov.*, Novi Sad, Vol.36, 229-239.
- KOBILJSKI, B., QUARRIE, S., DENČIĆ, S., KIRBY, J. and IVEGEŠ, M. (2002): Genetic diversity of the Novi Sad Wheat Core Collection revealed by microsatellites. *Cellular & Molecular Biology Letters*, Vol.7, No.2B, 685-694.

- KOBILJSKI, B. i GALOVIĆ, V. (2002): Molekularni markeri i oplemenjivanje pšenice. I) Primena. Zbor. Referata XXXVI Seminar Agronoma, Izd.: Institut za rat. i pov., Novi Sad, 195-201.
- KOEBNER, R.M.D. (2001): Contribution of DNA Molecular Marker Technologies to the Genetics and Breeding of Wheat and Barley. Plant Breeding Reviews, Vol.21, Ed. Jules Janick. John Wiley and Sons Inc., 181-220.
- LEE, M. (1995): DNA Markers and Plant Breeding Programs. Advances in Agronomy, Vol.55., 265-344.
- NEIL J., HELEN OUGHAM, HOWARD., T. (1997): Markers and mapping: we are all geneticists now. New Phytol., 137, 165-177.
- QUARRIE SA, D. DODIG, S. PEKIĆ, J. KIRBY, B. KOBILJSKI (2002): Prospects for marker-assisted selection of improved drought responses in wheat, Bulgarian Journal of Plant Physiology, XXVIII, 3-4, 83-95.
- QUARRIE, S., STEED, A., CALESTANI, C., SEMIKHODSKII, A., LEBRETON, C., CHINOY, C., STEELE, N., KIRBY, J., PLJEVLJAKUŠIĆ, D., WEYEN, J., SCHONDELMAIER, J., FARMER, P., SAKER, L., CLARKSON, D., ABUGALIEVA, A., YESSIMBEKOVA, M., TURUSPEKOV, Y., ABUGALIEVA, S., HOLLINGTON, P., ARAGUES, R., ROYO, A., DODIG, D. and KOBILJSKI, B. (2002): Locating QTLs for flowering time in wheat - two strategies compared. Proceeding abstracts of EUCARPIA Cereal Section Meeting From Biodiversity to Genomics, Salsomaggiore, Italy, 21-25 November 2002, 129-130.
- GUPTA, P.K., BALYAN, H.S., SHARMA, P.C. and RAMESH, B. (1996): Microsatellites in plants: a new class of molecular markers. Curr. Sci., 70, 45-54.
- GUPTA, P.K., VARSHNEY, R.K., SHARMA, P.C., RAMESH, B. (1999): Molecular markers and their application in wheat breeding. Plant Breeding, 118, 369-390.
- RODER, 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.
- KORZUN, V., RODER, M.S., GANAL, M.W., WORLAND, A.J. and LAW, C.N. (1998): Genetic analysis of the dwarfing gene (Rht8) in wheat. Part I) Molecular mapping of Rht 8 on the short arm of chromosome 2D of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor. Appl. Genet., 96, 1104-1109
- PRASAD, M., VARSHNEY, R.K., KUMAR, A., BALYAN, H.S., SHARMA, P.C., EDWARDS, K.J., SINGH, H., DHALIWAL, H.S., ROY, J.K. and GUPTA, P.K. (1999): A microsatellite marker associated with QTL for grain protein content on chromosome arm 2DL of bread wheat. Theor. Appl. Genet., 99, 341-345.
- SNAPE J. (1998): Golden calves or white elephants? Biotechnologies for wheat improvement. Euphytica, 100, 207-217.

APPLICATION OF MOLECULAR MARKERS IN WHEAT BREEDING. REALITY OR DELUSION ?

KOBILJSKI B., DENČIĆ, S.

SUMMARY

Conventional plant breeding use morphological and phenotypic markers for the identification of important agronomic traits. Plant breeders and scientists continuously seek to develop new techniques, which can be used for faster and more accurate introgression of desirable traits into plants. Over the last several years there has been significant increase in the application of molecular markers in the breeding programmes of different species. So far, detected level of polymorphism and informativnes of different molecular marker methods applied in MAS (Marker Assisted Selection) studies (RFLP, AFLP, etc.) were insufficient either to validate their further use or there were very expensive and of huge healthy risk. Fortunately for wheat (and other crops) breeders, the new class of molecular markers - microsatellites have prove recently to be most powerfull for MAS. But, due to lack of the knowledge, experiance, valid informations and even tradition and habits, many breeders have either negative or repulsive attitude towards implementation of MAS in breeding programmes. In this paper the relevant facts regarding implementation of MAS in breeding are discussed in general, and for wheat breeding in particular, in order to summarize merits and limitations in application of microsatellites in MAS selection.

Key words: MAS, molecular markers, mikrosatellites, breeding, wheat.