

"Zbornik radova", Sveska 36, 2002.

Pregledni rad - Review

***MOLEKULARNI MARKERI I OPLEMENJIVANJE PŠENICE
I) TEORIJSKI ASPEKTI***

Kobiljski, B. ¹

Kratak pregled dosadašnjeg rada na molekularnim markerima u svetu

Istraživanja na molekularnim markerima su započeta 80-tih godina XX veka, a prva mapa gena (na paradajzu) je objavljena 1986 godine. U proteklih 15-tak godina ova oblast je doživela svoju "revoluciju" i metode su se redale jedna za drugom: RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPDs (Random-Amplified Polymorphic DNAs), SCARs (Sequence Characterized Amplified Regions), STS (Sequence Tagged Site), AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms), SSRs (Simple Sequence Repeats - poznati i kao "mikrosateliti"), najnovije: SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) i ESNPs (Electric Single Nucleotide Polymorphisms) i druge. Samo od 1996 do danas je, iz ove oblasti, objavljeno više od 1500 naučnih radova. Ogromna suma znanja, rada i finansijskih sredstava je na globalnom nivou izdvojena i izdvaja se za ovu vrstu istraživanja, a rezultati su manje ili više detaljne marker-mape za sve najznačajnije biljne vrste. Trenutno, u svetu je objavljeno (a time i slobodno dostupno) oko 1500 SSR markera na pirinču, 1500 na pšenici, oko 800 na ječmu itd.

Čini se da su ovi rezultati i informacije dovoljne da oplemenjivanje biljaka od tzv. "field breeders" ili oplemenjivača u polju preuzmu tzv. "Gel breeders" (gel oplemenjivači - , oplemenjivači u laboratorijama). Da li je tako?

Većina dosadašnjih istraživanja se bavila određivanjem lokacije sekvenci odgovornih za važna agronomska svojstva (bolesti, otpornost na niske i visoke temperature, stresne uslove sredine itd.), a koje su samo delovi složene slagalice povećanja prinosa i kvaliteta poljoprivrednog bilja. Međutim, zbog činjenice da su ova svojstva, u većini slučajeva uslovljena velikim brojem gena (minor geni ili poligeni), rezultati su više simbolični nego revolucionarni. Nema sumnje da su molekularni markeri izuzetno moćno sredstvo u determinaciji svojstava uslovljenih pojedinačnim (major) genima npr. Rht geni (visina stabljike), Ppd geni (fotoperiodska reakcija), Glu geni (gluteninske subjednice) itd. kod

1 Dr Borislav Kobiljski, naučni saradnik, Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

pšenice, i da će u prvo vreme upravo ovo biti aspekti njihove primene. Konačno, sasvim je izvesno da je već i sama ideja o mogućnosti selekcije na bazi detekcije i izbora poželjnih sekvenci (gena) za sve oplemenjivače biljaka u svetu izuzetno atraktivna.

Molekularni markeri i pšenica

Oplemenjivanje pšenice je, istorijski gledano, imalo više razvojnih faza, ali je posebno interesantan period od poslednjih 40 godina. Ovaj je period doneo novo poglavlje u oplemenjivanju biljaka - poglavlje o biotehnologiji. Razvoj i primena citogenetskih istraživanja, kulture tkiva, indukovananih mutacija, itd. su bili brzi i relativno uspešni. Rezultati dobijeni ovim metodama nisu ispunili očekivanja, ali su one ipak omogućile da se dostigne "kritična masa znanja i iskustava" na kojima je 1990-tih godina razvijen - genetski inženjering.

Početak značajnije primene molekularnih markera na pšenici se smatraju 1990-te godine. Zašto tek poslednjih 10-tak godina? Razlog je jednostavan - nijedna metoda do tada nije bila u stanju da pruži dovoljnu informativnost i da ustanovi polimorfizam na nivou gena (sekvenci) sorti, linija i genotipova pšenice u oplemenjivačkim i eksperimentalnim programima širom sveta. Drugim rečima, informacije dobijene klasičnim metodama populacione genetike i genetike kvalitativnih svojstava, načinima nasleđivanja, determinaciji genskih efekata itd. nisu bile ni dovoljno brze, ni dovoljno detaljne i informativne da bi se značajnije ubrzao napredak u oplemenjivanju pšenice.

Hlebna pšenica je aloheksaploid sa tri genoma i to: A, B i D, pri čemu svaki genom potiče od različitih divljih srodnika (trava) i svaki ima po 7 parova hromozoma, čineći hromozomski "set" pšenice od 42 hromozoma. Ovakva hromozomska struktura predstavlja veliki problem u genetskim istraživanjima, jer se većina genetskih informacija nalazi u trostrukoj "dozi". Prisustvo 3 slična ili homeologna genoma, dozvoljava mogućnost da pšenica toleriše nedostatak ili višak hromozoma na način kako to nije moguće kod diploidnih biljnih vrsta (ječam, kukuruz itd.). Ako se gore navedenom doda da se veličina genetskog koda pšenice, u haploidnom stanju, procenjuje na 16 milijardi baznih parova (što je za oko 5 puta veći broj baznih parova nego kod čoveka), da se broj pojedinačnih gena procenjuje na 25-30.000 (Devos i Gale, 1993; Snape, 1998), da je procenjeni prosečan broj baznih parova po hromozomu oko 810 miliona baza (Gupta i sar., 1999), i da su po broju baznih parova 3 hromozoma pšenice po veličini približna kompletnom haploidnom genomu kukuruza (Gupta i sar., 1999) sasvim je jasno koliko je genetski (sekvencni) sistem pšenice složen i koliko je teško na ovakvom sistemu raditi.

Napredak biotehnologije u oblasti primene molekularnih DNK markera danas omogućava detaljne genetske analize velikog broja svojstava, i to uz pomoć poređenja alelne varijabilnosti u pojedinim lokusima sa fenotipskom varijabilnošću analiziranih svojstava. Za kratko vreme, urađene su genetske mape pšenice, sa velikim brojem mapiranih major gena ali i QTL (Quantitative Trait Loci) tj. lokusa koji u manjoj ili većoj meri uslovljavaju ekspresiju kvantitativnih svojstava (poligeno nasleđivanje). Trenutno, najveći broj istraživanja na pšenici

se, u ovoj oblasti, radi primenom SSR ili tehnike mikrosatelita, jer se, u odnosu na druge metode molekularnih markera (RFLP, RAPD, AFLP, itd.), ovom tehnikom dobijaju najinformativniji rezultati (Gupta i sar., 1996; Roder i sar., 1998). Princip rada sa mikrosatelitima je zasnovan na bliskoj vezi (oko 1cM) između tačno definisane sekvence baza mikrosatelita i sekvence (gena) koja ima efekta na neko svojstvo.

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. Zbog polimorfizma, informativnosti i trenutnog značaja koji mikrosateliti imaju kao metoda u oplemenjivanju pšenice, ali i zaštiti autorskih prava itd., najveća pažnja će u ovom radu biti posvećena upravo njima.

Mikrosateliti i oplemenjivanje pšenice

Osnovni cilj oplemenjivanja biljaka je stvaranje i fiksiranje nove genetske varijabilnosti usmerene na postizanje što je moguće većeg prinosa i kvaliteta. Tačku na kraju predhodne rečenice bi bilo bolje zameniti sa tri tačke, jer ovaj cilj nikada neće biti do kraja dostignut. Napredak u oplemenjivanju može biti vezan za namerno ili slučajno unošenje čitavog kompleksa gena (sekvenci), ali i "malih" segmenata DNK, koji presudno mogu uticati na povećanje prinosa i kvaliteta. Koliko i male promene (na nivou pojedinačnih gena) mogu biti revolucionarne pokazuje i primer povećanja prinosa pšenice u Engleskoj od oko 50%, u poslednjih 30 godina. Smatra se da je ovo povećanje prinosa u najznačajnijoj meri bilo uslovljeno unošenjem gena reduktora visine *Rht1* i *Rht2*, kao i pšenično-ražene translokacije *1BL/1RS* u nove sorte (Bill Angus, Nickerson Plant Breeders, Engleska, 2001, lična komunikacija). Kada se zna da danas postoje markeri za ove gene, ali i mnoge druge, sigurno je da korišćenje molekularnih markera, a naročito mikrosatelita, ima ogroman potencijal kao glavna-pomoćna metoda u oplemenjivačkim programima pšenice u svetu. Međutim, implementacija molekularnih markera u oplemenjivanje, ili selekcija na bazi markera tzv. MAS (Marker Assisted Selection) nije ni jednostavna ni laka. Kao ilustracija koliko je ovo pitanje kompleksno može poslužiti sledeći primer. Jedna od najvećih multinacionalnih kompanija na svetu "DuPont" je izvršila analizu 175.000 sekvenci pšenice, a primena MAS-a u stvaranju novih sorti je još uvek u razvojnoj fazi (Barbara Mazur, DuPont Agric. Products Exp. Station, USA, lična komunikacija, 2001).

Najznačajniji doprinos koji molekularni markeri mogu dati oplemenjivanju pšenice je u izboru roditelja za ukrštanje, selekciji na bazi veze marker-svojstvo i zaštiti autorskih prava. Iz tog razloga posebno će biti analizirana ova tri segmenta oplemenjivačkog rada.

Izbor roditelja za ukrštanje

Pri izboru roditelja za ukrštanje mora se voditi računa da bar jedan od roditelja poseduje gen/gene koje želimo rekombinovati u novoj liniji ili hibridu. Poznato je da npr. dva roditelja nezadovoljavajućeg tehnološkog kvaliteta i neotporna na bolesti nikako ne mogu dati zdravo i sa aspekta tehnološkog kvaliteta - kvalitetno potomstvo. Selekcija iz materijala koji u sebi ne poseduje potencijal da se rekombinacijom može dobiti nešto novo i poželjno je nemoguć, te je zato izbor roditelja od presudne važnosti u oplemenjivanju. Izbor roditeljskih parova za ukrštanje zavisi od cilja tj. od ideotipa sorte koju želimo stvoriti. Ovaj izbor je u konvencionalnom oplemenjivanju zasnovan na poznavanju svojstava koje se, najprostije rečeno, mogu videti i izmeriti. Drugim rečima, izbor roditelja za ukrštanje je zasnovan na fenotipskoj evaluaciji i karakterizaciji genotipova koji se nalaze u raznim kolekcijama oplemenjivačkih kuća koji rade na stvaranju sorti i/ili hibrida.

Međutim, većina važnih karakteristika u oplemenjivanju pšenice na prinos i kvalitet ne pripada grupi vidljivih i/ili merljivih svojstava. To su npr. svojstva koja su uslovljena prisustvom ili odsustvom različitih major i/ili minor gena za fotoperiodsku reakciju (osetljivost na dužinu dana), zahteve za dužinom perioda jarovizacije, različite parametre tehnološkog kvaliteta, otpornosti na stresne uslove sredine (sušni i temperaturni stres, zaslanjena i kisela zemljišta) itd. Izbor roditelja na bazi poznavanja genetske osnove (sekvenca, gen) je do pre nekoliko godina bio samo želja, a danas sa pojavom mikrosatelita kod pšenice postao i stvarnost. Koliko mikrosateliti mogu biti informativni i korisni može da pokaže sledeći primer. U oplemenjivačkom programu pšenice u Institutu za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad je nesvesno vršena selekcija protiv prisustva gena reduktora visine *Rht 1* i *Rht 2*, dok je favorizovan *Rht 8* gen (Petrović i sar., 1998; Kobiljski, 2000, Denčić, 2001). Razlog je verovatno u pozitivnom plejotropnom efektu koji *Rht 8* gen, zajedno sa bliskom vezanim (13 cM) genom za fotoperiodsku reakciju *Ppd 1* (povećava ranostasnost za oko 7 dana), ima na glavne komponente prinosa u agroekološkim uslovima Jugoslavije (Worland i sar., 1990; Borner i sar., 1993). Značaj ovoga, sa stanovišta oplemenjivanja pšenice u našim agroekološkim uslovima je utome, da se oplemenjivačima konačno pruža mogućnost da primenom mikrosatelita *WMS 261* tačno i nedvosmisleno utvrde koji genotipovi iz kolekcije od oko 5000 genotipova imaju a koji nemaju *Rht 8* (*Ppd1*) gen (rastojanje između *WMS 261* i *Rht 8* lokusa je svega 0,6 cM), pa čak i da se utvrdi alelni polimorfizam unutar samog *WMS 261* lokusa (Korzun i sar., 1998). Na ovaj bi se način postigla znatno veća efikasnost ukrštanja i ne bi se vršila ukrštanja genotipova koji ovaj/ove gene ne poseduju. Ako bi se kao sledeći parametar za izbor roditelja uzelo prisustvo gluteninskih subjedinica velikih molekularskih masa, i to onih koje uslovljavaju odličan tehnološki kvalitet pšenice u našim agroekološkim uslovima, i to 2*, 7+9, 5+10 u lokusima *Glu-A1*, *Glu-B1* i *Glu-D1* respektive, a za koji su markeri (mikrosateliti) poznati, još bi se više smanjio broj poželjnih roditelja za ukrštanje. Dalje formiranje tzv. "piramidalne strukture", tj. analiza drugih svojstava (bolesti, otpornost na stresne uslove sredine, ...) bi još više doprinelo kvalitetnom izboru roditelja za ukrštanje.

Naravno, metod "piramide" mora polaziti od najvažnijih svojstava ka manje važnim, pri čemu treba imati na umu da različiti oplemenjivački programi imaju i različite prioritete i ciljeve. Dobro definisana i uspešna strategija izbora roditeljskih parova mora biti zasnovana na kvalitetnoj fenotipskoj (poljskoj i laboratorijskoj) evaluaciji u kombinaciji sa genotipskom (genskom, sekvencnom) evaluacijom genotipova. Samo na ovaj način je moguće u potpunosti sagledati potencijale roditeljskih komponenti za ukrštanje. Sigurno je da bi ovakva detaljna evaluacija bila polazna osnova za značajno podizanje kvaliteta i uspešnosti oplemenjivačkih programa pšenice.

Selekcije na bazi veze marker-svojstvo

Pšenica je samooplodna biljna vrsta, te je proces stvaranja sorte mukotrpan i dugotrajan. Konvencionalni način oplemenjivanja podrazumeva da od ukrštanja do formiranja homozigotne (homogene) linije mora proći 6-10 godina, a do momenta značajnijeg širenja nove sorte u proizvodnji čak 11-13 godina. Svedoci smo da su na globalnom nivou promene u klimi, plodnosti i strukturi zemljišta, tehnologiji gajenja, rasnom sastavu biljnih bolesti itd., postale toliko brze, da se moramo zapitati "koliko je sorta, nastala ukrštanjem roditelja sa poželjnim karakteristikama 13 godina ranije, danas u stanju da u potpunosti realizuje svoj genetski potencijal"? Odgovor bi bio-verovatno znatno manje. Jedino rešenje ovog problema je da se vreme potrebno za stvaranje nove sorte značajno smanji. Alternativni metodi postoje (npr. kultura tkiva), ali su ograničenja izuzetno velika. Tako, ako se u obzir uzme broj ukrštanja prosečnog Evropskog oplemenjivačkog programa pšenice od oko 1000 ukrštanja godišnje, jasno je da je tehnički ovo nemoguće izvesti. Pored dužine perioda potrebnog za stvaranje nove sorte, najveći problem je značajna "neefikasnost" selekcije. Nije tajna, da se i u najboljim (najproduktivnijim) programima oplemenjivanja pšenice u svetu, u oko 80-85% ukrštanja ne dobiju poželjne genske rekombinacije i poželjni fenotip u odnosu na postavljeni ideotip.

Slično kao i kod izbora roditelja za ukrštanje, i kod selekcije u generacijama razdvajanja, se kod pšenice tradicionalno primenjuje selekcija na bazi vidljivih ili merljivih svojstava. Najčešće su to otpornost na niske temperature, visina stabljike, otpornost na prevalentne bolesti i štetočine, gustina sklopa, karakteristike klasa (veličina, oblik, prisustvo-odsustvo osja itd.), forma i položaj listova, otpornost na poleganje itd. Ovakav način selekcije podrazumeva svesno gubljenje poželjne varijabilnosti, i to iz više razloga. Prvo, većina agronomski najvažnijih svojstava je pod velikim uticajem faktora sredine, i povoljniji ili nepovoljniji uslovi sredine favorizuju ili limitiraju ekspresiju nekog svojstva (tehnologija gajenja, stresni uslovi, bolesti, , ...). Da li su oplemenjivači u stanju da u jednoj godini, na bazi fenotipske ocene, selekcionišu samo poželjne genotipove a sve ostale da isključe iz procesa selekcije i time smanje troškove i povećaju ekonomičnost i uspešnost? Naravno da nisu. Neki od svetskih programa oplemenjivanja pšenice ovaj problem rešavaju selekcijom na više lokaliteta (čak i na 10) čime u značajnoj meri eliminišu "rizik" odbacivanja poželjnih genotipova samo na bazi ekspresije fenotipa (genotip + spoljna sredina) u jednoj godini i na

jednom lokalitetu. Drugo, problem još više dobija na značaju ako se u obzir uzme veliki broj generacija razdvajanja u jednoj godini (F2 do F8, u nekim slučajevima i do F12), broj kombinacija po jednoj generaciji a naročito broj genotipova po kombinaciji (ukrštanju). Teorijskim osnovama oplemenjivanja samooplodnog bilja je definisano da je za ekspresiju rekombinantne varijabilnosti u F2 generaciji potrebno najmanje 5000 biljaka po ukrštanju. To znači da prosečni evropski programi oplemenjivanja pšenice (1000 ukrštanja), samo u F2 generaciji moraju imati 5 milijardi biljaka. Ako se u obzir uzmu i ostale filijalne generacije jasno je da je i teorijski i praktično nemoguće uraditi "savršenu" selekciju na broju biljaka koji se meri milijardama. Među oplemenjivačima pšenice kruži jedno šaljivo pitanje i odgovor na njega: "Ko je najbolji oplemenjivač pšenice na svetu?". Odgovor je: "Onaj ko iz ukupnog oplemenjivačkog materijala izdvoji 5% najboljeg materijala". Svi se slažu da danas takvog nema, ali i da postoji mogućnost da se primenom molekularnih markera (mikrosatelita) uspešnost i ekonomičnost selekcije pšenice značajno poboljša. Koliko je ovaj pristup realan i izvodljiv ?

Kao što je i napred navedeno, najbolji pristup je formiranje "piramidalne strukture" tj. selekcija koja bi bila zasnovana na rezultatima primene mikrosatelita od najvažnijih ka manje važnim svojstvima. Teorijski ovo je najbolji način, ali je ključni problem ogroman broj genotipova, relativno velik broj značajnih svojstava koje treba analizirati i još višestruko uvećano za broj markera koje treba koristiti. Zato je ovakav način finansijski i tehnički - praktično neizvodljiv. Ovo se naročito odnosi na rane generacije razdvajanja (F2 i F3), a koje su za oplemenjivanje i najznačajnije, jer se neadekvatnom individualnom selekcijom poželjni genotipovi nepovratno gube. Problem je i mala količina izvornog genetskog materijala (list, zrno...) koji se može koristiti, jer je u F2 i F3 generaciji skoro svaka biljka rekombinantno specifična i genetski različita. Nadalje, u ranim generacijama razdvajanja heritabilnost je niža nego u kasnijim generacijama, dok je vezani disekvilibrirum najveći (**Falconer, 1981**). Drugim rečima, značajan deo genotipske i fenotipske varijabilnosti može biti "maskiran" i "zamagljen" različitim genetskim faktorima. Problem je i primena adekvatne i pouzdane statističke obrada i interpretacije rezultata, jer po pravilu, u ranim generacijama razdvajanja ne postoje ponavljanja (lokaliteti, godine..). Na osnovu ovoga se može zaključiti da primena molekularnih markera (mikrosatelita) kod pšenice u ranim generacijama razdvajanja nema perspektivu. Jedini izuzetak je determinacija "super važnih" svojstava kao npr. značajno povećanje sadržaja lizina ili proteina, i to na malom broju strogo specifičnih ukrštanja i analizi velikog broja biljaka (genotipova) po ukrštanju. Na primer: **Prasad i sar. (1999)**, su utvrdili postojanje "vezanosti" mikrosatelita-markera *WMC 41* i lokusa (sekvence DNK) koja značajno utiče na povećan sadržaj proteina kod pšenice. Ukrštanjem roditelja sa ostalim poželjnim svojstvom/svojstvima (u ovom slučaju primarno sadržaj proteina, ali i druga za naše agrokološke uslove važna) bi se dobila potomstva koja se mogu analizirati primenom markera *WMC 41*. Naravno, ne sva, nego samo ona koja se po selekcionim kriterijumima ocene kao perspektivna za dalji rad. Na ovaj bi se način izbegla mogućnost isključivanja genotipova (potencijalno retkih), koji bi imali visok sadržaj proteina, ali bi bili i potencijalno dobri izvori za selekcionisanje novih sorti za naše agrokološke uslove.

Druga mogućnost je da se primena mikrosatelita "odloži" do kasnijih filijalnih generacija (F4 i nadalje), i da se sekvencna evaluacija uradi na materijalu koji je, u polju, prošao fenotipsku selekciju u prethodnim generacijama. Rizik od gubljenja "superiornih" genotipova je u ovom slučaju veći, ali je tada i frekvencija poželjnih alela znatno veća. Naime, pojačan selekcionni pritisak u ranim generacijama tj. selekcija individualnih biljaka i potomstava zajedno sa dobrom individualnom fenotipskom evaluacijom značajno može povećati frekvenciju poželjnih alela. Čini se da je pravo mesto za implementaciju selekcije na bazi markera (MAS) kod pšenice momenat formiranja i testiranja linija u poljskim mikroogledima (obično F5-F8 generacija). Zašto baš tada ? Prvo, ako se u obzir uzme da prosečan oplemenjivački program od 1000 ukrštanja ima "efikasnost" od oko 15%, sa prosečno dve kreirane linije po ukrštanju, broj potencijalnih kandidata za testiranje markerima je oko 300 linija. To je broj, koji je sa aspekta tehničke osposobljenosti većine laboratorija - optimalan. Drugo, ako se uporede troškovi potrebni izvođenje oglada i detaljnu fenotipsku evaluaciju u poljskim uslovima (priprema, setva, nega, evaluacija i fenotipska karakterizacija, žetva itd.) i laboratorijskim uslovima (parametri tehnološkog kvaliteta, testiranje tolerantnosti na bolesti i štetočine u veštačkim uslovima, različite fiziološke i bihemijske analize itd.) selekcija na bazi markera je, u slučaju manjeg broja genotipova, mnogo ekonomičnija. Tako je npr. za kompletnu analizu tehnološkog kvaliteta 300 linija pšenice je potrebno izdvojiti oko 60.000 DEM., tj oko 200 DEM po uzorku (Jasna Mastilović, Tehnološki fakultet, Novi Sad, novembar 2001, lična komunikacija). Ako bi se na istim linijama uradilo preliminarno testiranje sa 2 markera (**Ahmad, 2000**) na prisustvo samo gluteninske subjedinice 5+10 (1Dx5-1Dy10) u lokusu Glu-D1, cena bi za ovih 300 linija bila oko 2000 DEM. Obzirom da ova gluteninska subjedinica 5+10 u našim agroekološkim uslovima ima, u odnosu na druge subjedinice, najznačajniji efekat na ekspresiju odličnog tehnološkog kvaliteta, na dalju analizu bi se mogli dati samo genotipovi koji ove subjedinice poseduju. Dosadašnji rezultati (**Vapa i sar, 1995**) pokazuju da je kod 134 sorte Naučnog Instituta za ratarstvo i povrtarstvo-Novog Sad, frekvencija pojave subjedinica 5+10 i 2+12 u Glu-D1 lokusu 53% odnosno 47% respektive. Ovo znači da bi primena samo ova dva markera dovela do smanjenja troškova analiza tehnološkog kvaliteta za oko 50%, tj, za oko 30.000 DEM, pri čemu su troškovi analize primenom mikrosatelita oko 2000 DEM. Veoma je važno istaći da rezultati dobijeni primenom markera nisu zavisni od abiotičkih i/ili biotičkih faktora. Tehnološki kvalitet pšenice je takođe, lep primer nestabilnosti i varijabilnosti svojstava. Tako, tehnološki kvalitet u velikoj meri zavisi od niza faktora (đubrenje, klima, zemljište itd), i klasične analize vrlo često mogu dati pogrešne i nevalidne podatke, a na osnovu kojih se mogu dobiti beskorisni ili čak pogrešni podaci. Obzirom da su rezultati dobijeni markerima zasnovani na genetskoj (sekvencnoj) osnovi, isključen je faktor uticaja spoljašnje sredine na ekspresiju ispitivanog svojstva. U slučaju kada se testiranje radi na nivou linija zadovoljeni su i zahtevi da je analizirani materijal genetski "smiren" i stabilizovan, i da je kao takav pogodan za analize. U ovom su slučaju zadovoljeni i zahtevi statistike, jer se linije po pravilu gaje u ponavljanjima, u više godina, na više lokaliteta itd.

Neophodno je istaći da pored "pozitivne selekcije", tj selekcije usmerene na detekciju poželjnih genotipova, postoji i "negativna selekcija". Ova negativna selekcija podrazumeva odbacivanje genotipova na bazi prisustva nepoželjnih gena (sekvenci), i vrlo često njen doprinos može biti isto toliko značajan koliko i doprinos "pozitivne selekcije" (Jones i sar., 1997). Pri primeni molekularnih markera vrlo se često identifikuju sekvence koje nepovoljno utiču na ekspresiju različitih svojstava (osetljivost na bolesti, loš kvalitet, slaba otpornost na niske temperature itd.) pa se na osnovu ovih rezultata može vršiti negativna selekcija već na početku testiranja linija u mikroogledima. Time se značajno smanjuju troškovi izvođenja oglada i povećava efikasnost oplemenjivačkog programa.

Molekularni markeri, pšenica i zaštita autorskih prava

Oplemenjivanje je skup i dugotrajan proces, i to naročito kod samooplodnih biljaka. Značajna finansijska sredstva i znanje su u tom dugotrajnom i skupom procesu usmerena na realizaciju jednog cilja - nove sorte. Logično je da, kao i u drugim oblastima vlasnik patenta (sorte ili hibrida) mora zaštititi sebe i svoj rad.

U Evropskoj Uniji (EU) postoji Zakon po kojem nove sorte poljoprivrednog bilja moraju biti na Nacionalnoj Listi (NL) zemalja članica EU, kako bi slobodno fluktuisale na tržištu. Ovo podrazumeva da nova sorta ili hibrid mora biti različita u odnosu na druge već postojeće sorte ili hibride te biljne vrste. Pre uvođenja na NL nove sorte se testiraju u tzv. DUS ogledima (DUS - Distinctness, Uniformity, Stability) tj. ogledima kojima se određuje njihova različitost, uniformnost i stabilnost. Takođe, DUS ogledi su osnova za utvrđivanje zakonskih prava oplemenjivača (Plant Breeders Rights -PBR). Ovi su ogledi zasnovani na utvrđivanju tačno propisanih, i za svaku biljnu vrstu specifičnih, morfoloških, biohemijskih i fizioloških deskriptora,. Međutim, zbog velikog broja kandidata ali i velikog broja sorti koje se nalaze na listi, dugotrajne procedure testiranja, neobjektivnosti (subjektivnosti) u ocenjivanju, manjeg ili većeg variranja vrednosti (skora) deskriptora u zavisnosti od faktora sredine itd., postoji realna potreba da se ustanove objektivniji i tačniji metodi za utvrđivanje sortne specifičnosti.

Primenom mikrosatelita se kod pšenice dobijaju informativniji podaci nego bilo kojom drugom metodom molekularnih markera. Obzirom na napred izneto, kao i na zahteve koji se postavljaju u odnosu na "idealni" sistem karakterizacije sorti (pouzdanost, brzina, jednostavnost i nezavisnost u odnosu na faktore sredine), čini se da su mikrosateliti pravo rešenje za uzimanje "otiska prsta" (fingerprint) sorti i za zaštitu autorskih prava kod pšenice. Ovo potvrđuje i primer evaluacije 540 evropskih sorti pšenice (među kojima i 40-tak jugoslovenskih), sa 22 mikrosatelita, u periodu 1996-1998 od strane više evropskih vodećih institucija koje se ovom problematikom bave (Victor Korzun, KWS, Germany, 2001, lična komunikacija). Primena ovih 22 markera je pokazala da su za sve analizirane sorte utvrđene razlike na nivou alela. Drugim rečima, primenom 22 markera bilo je moguće izvršiti potpuno razlikovanje svih 540 sorti. Ako se u obzir uzme i multialelna varijabilnost u okviru lokusa (od 2 do čak 23 alela/lokusu), broj potrebnih markera je znatno manji. Vrlo je verovatno da će u bliskoj budućnost, u

zaštitu autorskih prava kod pšenice, pored morfoloških, biohemijskih i fizioloških deskriptora biti uključeni i molekularni markeri (mikrosateliti). Na ovaj način bi se pored unapređenja u domenu zaštite autorskih prava, pružila i mogućnost identifikacije i zaštite tzv. "izvedenih linija", odnosno linija koje su po genetskoj konstituciji skoro identične, ali se po jednom ili nekoliko važnih gena (sekvenci) razlikuju od osnovne sorte. Sadašnji metod identifikacije nije u stanju da na nivou tako malih razlika napravi njihovu pouzdanu distinkciju.

Mikrosateliti - prednosti i nedostaci

Prednosti

Ogroman broj - najčešće se radi o ponovljivim dinukleotidima (AC, AG,...AT-najčešći kod biljaka), trinukleotidima (TCT, TTG...) ili tetra nukleotidima (TATG), i po pravilu manjem broju baznih parova od 6.

Veoma polimorfni i informativni - važno naročito kod pšenice

Kodominantni - omogućena je detekcija heterozigotnosti na nivou lokusa (alela).

Jednostavni i jeftini za primenu - samo u slučaju da se koriste kao "gotovi" proizvodi. Trenutna cena po uzorku od ekstrakcije DNK do fiksiranja gela je oko 3 DEM.

Nisu radioaktivni - nema upotrebe radioaktivnosti (zdravlje, životna sredina..).

Metodološki jednostavni - za oko mesec dana se može izvršiti osnovna obuka za rad.

Brzo dobijanje rezultata - u toku dana se može uraditi kompletna procedura, od ekstrakcije DNK do fiksiranja gela.

Potrebno je malo materijala za analizu - oko 20mg zrna, lista ...itd.

Nedostaci

Skupi za razvoj i istraživanje - troškovi razvoja novih mikrosatelita su veoma veliki.

Zavisnost od proizvođača - po pravilu se naručuju od proizvođača.

Ograničenost primene - samo na one koji su publikovani. Najnoviji se ne stavljaju odmah na uvid javnosti, pa obično prođe 2-3 godine od pronalaska novog do njegove publikacije.

Statistička obrada - detaljnija analiza zahteva autorizovane kompjuterske programe i napredno znanje statističkih metoda, obrade i interpretacije rezultata.

ZAKLJUČAK

Na osnovu svega iznetog se može zaključiti da je, sa pojavom molekularnih markera, a naročito mikrosatelita, oplemenjivanje pšenice dobilo jednu novu selekcionu metodu sa izuzetnom perspektivom. Vrlo je verovatno da u oplemenjivanju pšenice neće biti moguće primeniti bolju metodu molekularnih markera nego što su to mikrosateliti. Ovo iz razloga što, sa jedne strane, ranije metode molekularnih markera (RLFP, AFLP...) nisu bile u stanju da kod pšenice

daju dovoljno polimorfne i informativne rezultate, dok sa druge strane, najnovije metode (npr. SNP, ESNP itd.) su toliko detaljne (praktično se radi o polimorfizmu na nivou pojedinačnih nukleotida) da bi interpretacija i implementacija ovih rezultata, zbog složenosti genetskog i hromozomskog sistema pšenice, bila izuzetno komplikovana.

LITERATURA

- Borner, A., Worland, A.J., Plaschke, J., Erika Schumann and Law, C.N., 1993: Pleiotropic effects of genes for reducing height (Rht) and day length insensitivity (Ppd) on yield and its components for wheat grown in Middle Europe. *Plant Breeding*, 111, 204-206.
- Denčić, S., 2001: Yugoslav wheat pool. In: "The World Wheat Book. A history of wheat breeding", Ed. Bonjean, A.P. and Angus, J.A., 377-402
- Devos, K. and Gale, M., 1993: The genetic maps of wheat and their potential in *Plant Breeding. Outlook on Agriculture*, 22, 2, 93-99.
- Falconer, D.S., 1981: Introduction to quantitative genetics. Longman Group Ltd., Essex.
- 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.
- Jones, N., Ougham, H and Thomas, H., 1997: Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytol.*, 137, 165-177.
- Kobiljski, B., 2000: Nasleđivanje kvantitativnih svojstava u ukrštanjima genotipova pšenice sa različitim Rht genima. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 80 strana
- Korzun, V., Roder, M.S., Ganal, M.W., Worland, A.J. and Law, C.N., 1998: Genetic analysis of the dwarfing gene (Rht 8) 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
- Petrović, S., Denčić, S., Kobiljski, B. i Ivegeš, Mirjana, 1998: Geni reduktori visine stabljike u NS sortama i linijama pšenice. *Savremena poljoprivreda*, 46, 3-4, 23-27
- 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.
- Roder, M.S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M-H., Leroy, P. and Ganal, M.W., 1998: A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149, 2007-2023.
- Snape J., 1998: Golden calves or white elephants? Biotechnologies for wheat improvement. *Euphytica*, 100, 207-217.
- Vapa, Lj., Denčić, S., Šoltes-Rak, E. And Kevrešan, S., 1995: Genetic variation in Glu-1 loci and Bread-Making Quality in Wheat. *Cer. Res. Commun.*, 23, 1-2, 161-166

Worland, A.J., Law, C.N. and Petrović, S., 1990: Height reducing genes and their importance to Yugoslavian winter wheat varieties, *Savremena poljoprivreda*, 38, 245-258

***MOLECULAR MARKERS AND WHEAT BREEDING
1) THEORETICAL ASPECTS***

Kobiljski, B.

Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad

SUMMARY

In recent years, considerable attention has been placed on the development of molecular markers to be used for a variety of objectives. Even though marker-assisted selection (MAS) now plays a prominent role in the field of plant breeding, examples of successful, practical outcomes are rare. In this paper, the overview of the trends and the possibilities for implementation of the molecular markers in general, and microsatellites (SSRs) in particular, in wheat breeding has been discussed. The problems of Intellectual Property Rights (IPR) and Plant Breeders Rights (PBR), has been evaluated as well .

KEY WORDS: breeding, marker assisted selection (MAS), microsatellites, wheat.