

UDK: 577.2: 633.15

DETEKCIJA QTL-OVA ZA TOLERANTNOST NA SUŠU KOMPOZITNIH POPULACIJA KUKURUZA (*Zea mays* L.)

IGNJATOVIĆ-MIČIĆ DRAGANA¹, MARKOVIĆ KSENIJA¹, LAZIĆ-JANČIĆ VESNA¹

IZVOD: Najznačajniji QTL-ovi za sadržaj ABA u listu i neke karakteristike korenovog sistema se, prema podacima iz literature, nalaze na hromozomima 1 (bin 1.06) i 2 (bin 2.04). Pretpostavljajući da isti QTL-ovi mogu biti prisutni u različitim genotipovima, cilj ovog rada je bio da se utvrdi da li QTL-vi sa major efektom u jednom genotipu mogu biti detektovani u različitim genetičkim okruženjima, koristeći molekularne markere datog hromozomskog regiona. Takođe, analiza grupnih uzoraka 10 tolerantnih i 10 osetljivih populacija na sušu je urađena da bi se proverila ispravnost ovog pristupa u identifikaciji informativnih markera. Probama umc1601, umc1776, bnlg2248, dupSSR27 i bnlg2246 detektovana je razlika u frekvenciji alela između tolerantnih i osetljivih populacija veća od 14%, što ukazuje na moguću povezanost markera i svojstva od interesa, mada je za konačan zaključak neophodno uraditi analizu pojedinačnih biljaka grupnih uzoraka.

Ključne reči: suša, analiza grupnih uzoraka, SSR markeri

UVOD: Značajne klimatske promene, najverovatnije uslovljene globalnim zagrevanjem, naglasile su potrebu za poboljšanjem onih svojstava gajenih kultura koja doprinose stabilnosti prinosa, naročito u uslovima vodnog deficita. Samim tim poboljšanje tolerantnosti na abiotičke stresove, naročito sušu, predstavlja primarni cilj u stabilizaciji prinosa (Landi et al., 2001). Tolerantnost na sušu je kompleksno svojstvo kukuruza, čije su značajne komponente sadržaj abscisinske kiseline u listu (L-ABA) i karakteristike korenovog sistema. ABA ima ključnu ulogu u različitim molekularnim i morfo-fiziološkim procesima uključenim u adaptivni odgovor useva na vodni deficit (Tuberosa et al., 1994; Sharp et al., 2004). Značaj korenovog sistema se ogleda u njegovoj sposobnosti efikasnog usvajanje vode, odnosno uticaja na vodni balans biljke, kao i usvajanja hranjivih materija i ukorenjavanja biljke u zemljište (Tuberosa et al., 2002). Do danas je objavljeno više radova koji se odnose na identifikaciju QTL (lokusi kvantitativnih svojstava - *quantitative trait loci*) za sadržaj L-ABA i karakteristike korenovog

sistema kukuruza (Lebreton et al., 1995; Tuberosa et al., 1998; Tuberosa et al., 2003). Kao najznačajniji izdvojili su se QTL na hromozomu 2 (bin 2.04), koji istovremeno ima major efekat na ispoljavanje oba svojstva i QTL na hromozomu 1 (bin 1.06) sa major efektom na prečnik, dužinu i masu primarnog korena.

Polazeći od pretpostavke da se QTL-ovi, koji značajno doprinose fenotipskoj varijabilnosti ispitivanog svojstva, mogu detektovati u različitim genetičkim okruženjima, u ovom radu je urađena analiza grupnih uzoraka tolerantnih i osetljivih populacija kukuruza na sušu SSR (simple sequence repeats) markerima koji se nalaze na hromozomima 1 (bin1.05/1.06) i 2 (bin2.03/2.04). Analiza grupnih uzoraka se zasniva na objedinjavanju DNK reprezentativnog broja individua populacija sa ekstremnim fenotipskim ekspresijama, čime se znatno smanjuje broj uzoraka neophodnih za marker analizu (Quarrie et al., 1999). Ovakav pristup omogućava efikasnije testiranje biljnog materijala sa velikim brojem markera, tj. ubrzava izbor informativnih mar-

Originalni naučni rad (Original scientific paper)

¹ Dr DRAGANA IGNJATOVIĆ-MIČIĆ, naučni saradnik, dr KSENIJA MARKOVIĆ, naučni saradnik, dr VESNA LAZIĆ-JANČIĆ, naučni savetnik; Institut za kukuruz "Zemun Polje", S. Bajića 1, 11185 Beograd

kera koji će se koristiti za precizno mapiranje datog svojstva.

Materijal i metode

Deset tolerantnih (TP) i deset osetljivih (OP) populacija kukuruza prema suši analizirano je korišćenjem 12 SSR prajmer kombinacija - dve na bin1.05/1.06, a 10 na bin2.03/2.04 (tabela 1). Primenjena je metoda grupnih uzoraka, pri čemu je svaka ispitivana populacija predstavljena sa po 30 biljaka, gajenih u kontrolisanim uslovima do faze tri lista. Od svake biljke je uzet 0.1 gram lista za grupni uzorak. Izolacija DNK je rađena po modifikovanoj metodi Sanghai-Marooft et al. (1984), korišćenjem CTAB pufera. PCR reakciona smeša je sadržala 1x pufer za enzim, 2.4mM

MgCl₂, 200μM dNTPs, 0.5μM prajmere, 1xBSA, 1U *Taq* plimeraze, 200ng DNK uzorka i sterilne bidestilovane vode do finalne zapremine od 25μl/reakciji. SSR amplifikacija je rađena po sledećem programu: 1. 95°C/5min, 2. 95°C/30sek, 3. 63.5°C/1min (-0.5°C/ciklusu), 4. 72°C/1min, 5. 95°C/30sek, 6. 56°C/1min, 7. 72°C/1min. Koraci 2 - 4 su ponovljeni u 15 ciklusa, a nakon toga koraci 5 - 7 u 22 ciklusa. Elektroforetsko razdvajanje amplifikovanih fragmenata je rađeno na 6% denaturišućim poliakrilamidnim gelovima, koji su zatim bojeni srebro-nitratom, po metodi Bassam et al. (1991). Analizom elektroforegrama, na osnovu prisustva/odsustva traka, izračunata je razlika u zastupljenosti alela kod tolerantnih i osetljivih populacija kukuruza.

Tab. 1. Karakteristike proba i rezultati SSR analize tolerantnih i osetljivih kompozitnih populacija kukuruza na sušu

Proba	Bin	Veličina fragmenta (bp)	Broj traka (alela)	Ukupan broj alela		Prosečan broj alela/populaciji	
				Tolerantne populacije	Osetljive populacije	Tolerantne populacije	Osetljive populacije
umc1601	1.05	140-170	7	32	22	3.2	2.2
umc1709	1.06	140	4	21	19	2.1	1.9
bnlg2248	2.03	200-250	7	16	17	1.6	1.7
bnlg2246	2.03	120-150	7	30	23	3	2.3
umc1776	2.03	130-150	5	34	12	3.4	2.3
mmc0231	2.03	-	-	-	-	-	-
dupSSR27	2.03	90-160		13	15	1.3	1.5
umc2193	2.03	90-130	4	28	22	2.8	2.2
bnlg125	2.03	-	-	-	-	-	-
umc2030	2.04	80-130	4	19	19	1.9	1.9
bnlg381	2.04	150-240	8	29	24	2.9	2.4
phi083	2.04	120-160	4	32	27	3.2	2.7

Rezultati

Od 12 SSR prajmer kombinacija dve nisu dale čitljiv signal: mmc0231 (bin2.03) i bnlg125 (bin2.03). Kod ostalih 10 prajmer kombinacija broj detektovanih traka (alela) se kretao od 4 do 8, a prosečan broj alela po populaciji od 1.6 do 3.4. Sedam SSR prajmer kombinacija je dalo veći ukupan broj alela kod populacija tolerantnih prema suši. Sa probama bnlg2248 i dupSSR27 detektovano je jedan, odnosno dva alela više kod osetljivih populacija, dok je sa umc2030 detektovan isti broj alela kod obe grupe populacija. Ovi rezultati su prikazani u tabeli 1. Na slici 1 je

prikazan elektroforegram dobijen pomoću prajmera bnlg2248.

Analizom pojedinačnih alela utvrđena je razlika u njihovoj zastupljenosti između tolerantnih i osetljivih populacija na sušu. Ova razlika se kretala od 0% do 23.5%. Najmanje razlike su detektovane probom umc1709 (0.2%), a najveće probom bnlg2248 (23.5%). Sa pet SSR prajmer kombinacije detektovana je razlika između određenih parova alela TP i OP veća od 14%, pri čemu je istovremeno zastupljenost jednog alela bila veća, a drugog alela manja kod analiziranih populacija. Tako su sa bnlg2248 probom detektovani alel 1, koji je kod TP zastupljeniji

za 15.1% i alel 2, koji nije detektovan kod TP, a čija zastupljenost kod OP iznosi 23.5%. Slični rezultati su dobijeni i sa probama bnlg2246 (alel 2 - 20% kod TP, pri čemu nije detektovan kod OP i alel 4 - za 17.1% zastupljeniji kod OP), dupSSR27 (alel 2 - 20% kod OP, koji nije prisutan kod TP i alel 3 - za 18.4% zastupljeniji kod TP). Sa probom umc1601 detektovane su razlike u zastupljenosti alela 3 (za 14.5% veća

kod TP) i alela 5 (za 16.3% veća kod OP). Umc1776 probom je detektovana razlika u zastupljenosti alela 1 (14% veća kod OP) i alela 4 (16.4% veća kod TP). Sa preostalih pet SSR proba razlike u zastupljenosti pojedinačnih alela su bile manje od 10%, a najčešće manje i od 5%. Rezultati su prikazani u tabeli 2.

Tab. 2. Razlike u zastupljenosti alela između tolerantnih i osetljivih populacija kukuruza na sušu

Proba	Alel	TP	OP	Razlika	Proba	Alel	TP	OP	Razlika
umc1601	1	3.1	9	5.9	dupSSR27	1	30.7	26.6	4.1
	2	31.2	40.9	9.7		2*	0	20	20
	3*	28.1	13.6	14.5		3*	38.4	20	18.4
	4	12.5	4.5	8		4	23.1	13.3	9.8
	5*	18.7	35	16.3		5	0	6.6	6.6
	6	3.1	0	3.1		6	7.6	13.3	5.7
	7	3.1	0	3.1		umc2193	1	35.7	35
umc1709	1	4.7	0	4.7	2		17.8	10	7.8
	2	47.6	47.4	0.2	3		10.7	10	0.7
	3	47.6	47.4	0.2	4		35.7	45	9.3
	4	0	5.2	5.2	umc2030	1	21	21	0
bnlg2248	1*	56.2	41.1	15.1		2	15.7	5.2	10.2
	2*	0	23.5	23.5		3	31.5	36.8	5.3
	3	18.7	17.6	1.1		4	31.5	36.8	5.3
	4	12.5	11.7	0.8	bnlg389	1	17.2	25	7.8
	5	6.2	0	6.2		2	27.5	16.6	10.9
	6	0	11.7	0.8		3	6.9	0	6.9
	7	6.2	11.7	5.5		4	24.1	29.1	5
bnlg2246	1	13.3	17.4	4.1		5	3.4	4.2	0.8
	2*	20	0	20		6	6.9	8.3	1.4
	3	33.3	30.4	2.9		7	3.4	3.4	0
	4*	13.3	30.4	17.1		8	10.3	12.5	2.2
	5	3.3	4.3	1	phi083	1	9.3	0	9.3
	6	10	13.4	3.4		2	31.2	33.3	2.1
	7	0.5	4.3	3.8		3	28.1	33.3	5.2
1*	29.4	43.4	14	4		31.2	33.3	2.1	
umc1776	2	29.4	34.7	5.3					
	3	0	4.3	4.3					
	4*	29.4	13	16.4					
	5	11.7	4.3	7.4					

TP - zastupljenost alela (%) kod tolerantnih populacija

OP-zastupljenost alela (%) kod osetljivih populacija

Razlika - razlika u zastupljenosti alela između TP i OP

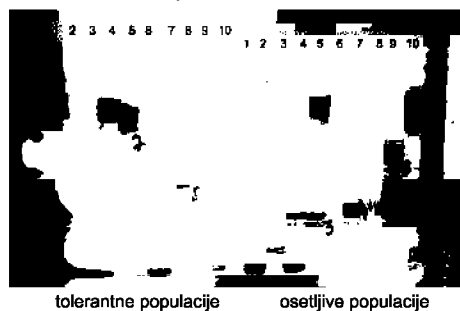
* - aleli kod kojih je detektovana razlika u zastupljenosti između TP i OP veća od 14%

Zastupljenost alela - procentualni odnos datog alela i ukupnog broja alela kod TP, odnosno OP

Razlika u ukupnom broju alela između TP i OP nije pokazala nikakvu pravilnost u odnosu na razliku između pojedinačnih alela TP i OP. Kod proba kojima je detektovana

najveća razlika između pojedinačnih alela, razlika između ukupnog broja alela iznosi jedan (bnlg2248), sedam (bnlg2246) i dva (dupSSR27).

Sl. 1 Elektroforegram dobijen pomoću SSR markera bnlg2248



Diskusija

Analiza grupnih uzoraka u identifikaciji QTL-ova ima ograničavajući značaj, jer je ovim pristupom moguće detektovati samo QTL-ove sa velikim efektom, tj. one koje značajno doprinose fenotipskoj varijabilnosti kvantitativnog svojstva (Wang and Peterson, 1994). U ovom radu je urađena analiza grupnih uzoraka tolerantnih i osetljivih populacija kukuruza na sušu SSR markerima koji se nalaze na hromozomima 1 (bin1.05/1.06) i 2 (bin2.03/2.04). Prema podacima iz literature QTL na hromozomu 2 (bin2.04), detektovan u ukrštanju Os420xLABO78 RFLP probom csu133, je doprinosa sa 32% fenotipskoj varijabilnosti sadržaja ABA u listu (Tuberosa et al., 1998). Isti QTL je detektovan i u ukrštanju Polj17xF2, ali je pored uticaja na sadržaj ABA kontrolisao i neke od karakteristika korena (Lebreton et al., 1995). Slični rezultati su prikazani i u radu Landi et al. (2005). Svi ovi rezultati ukazuju na prisustvo nekoliko blisko vezanih gena ili na jedan gen sa plejotropnim efektom (Giuliani et al., 2005). QTL na hromozomu 1 (bin 1.06), de-

tektovan u ukrštanju Lo964xLo1016 koji je pokazao najveće efekte na prečnik, dužinu i masu primarnog korena (Tuberosa et al., 2003). Isti region je identifikovan i u ukrštanju Ac7643xAc7729 (Ribaut et al. 1996).

Sa pet od deset SSR prajmer kombinacija u ovom radu detektovana razlika u zastupljenosti pojedinačnih alela između tolerantnih i osetljivih populacija na sušu iznosila je između 14% i 20%. Pri tome, probe bnlg2248 i dupSSR27 su pokazale da je tokom selekcije na sušu došlo do eliminacije odgovarajućih alela, a probom bnlg2246 je detektovan alel kod TP (zastupljenost 20%) koji nije bio prisutan kod OP. Ovakav trend povećanja jednog i smanjenja zastupljenosti drugog alela kod TP, ukazuje na potencijalnu povezanost markera i svojstva koje se ispituje i predstavlja prvi pozitivni rezultat u dokazivanju polazne pretpostavke da se QTL-ovi, koji značajno doprinose fenotipskoj varijabilnosti ispitivanog svojstva, mogu detektovati na istim hromozomskim regionima u različitim genetičkim okruženjima, mada je za konačan zaključak neophodno uraditi analizu pojedinačnih uzoraka iz datih populacija.

Zaključak

Dobijeni rezultati sa probama umc1601, umc1776, bnlg2248, dupSSR27 i bnlg2246 ukazuju na ispravnost polazne pretpostavke da se prisustvo QTL-ova sa major efektom može detektovati u različitim genetičkim okruženjima, kao i da analiza grupnih uzoraka omogućava identifikaciju informativnih markera (ukazuju na povezanost markera i ispitivanog svojstva). Ipak, za konačan zaključak je neophodno uraditi analizu pojedinačnih uzoraka iz datih populacija.

LITERATURA

- BASSAM B. J., CAETANO-ANOLL S G., GRESSHOFF P.M. (1991): Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196:80-83.
- GIULIANI S., SANGUINETI M. C., TUBEROSA R., BELLOTTI M., SALVI S. and LANDI P. (2005): Root-ABA1, a major constitutive QTL, affects maize root architecture and leaf ABA concentration at different water regimes. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 56, No. 422: 3061-3070.
- LANDI P., SANGUINETI M. C., CONTI S. and TUBEROSA R. (2001): Direct and correlated responses to divergent selection for leaf abscisic acid concentration in two maize populations. *Crop Sci.* 41:335-344.
- LEBRETON C., LAZIĆ-JANČIĆ V., STEED A., PEKIĆ S., QUARRIE S.A. (1995): Identification of QTL for drought responses in maize and their use in testing causal relationships between traits. *Journal of Experimental Botany* 46, 853-865.
- QUARRIE S.A., LAZIĆ-JANČIĆ V., KOVAČEVIĆ D., STEED A., PEKIĆ S. (1999): Bulk segregant analysis with molecular markers and its use for improving drought resistance in

- maize. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 50, No. 337: 1299-1306.
- RIBAULT J.M., HOISINGTON D.A., DEUTSCH J. A., JIANG C. AND GONZALES DE LEON D. (1996): Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. 1. Flowering parameters and the anthesis-silking interval. *Theor. Appl. Genet.* 92: 905-914.
- SAGHAI-MAROOF M., K. SOLIMAN, R. JORGENSEN and R. ALLARD (1984): Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley; mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 91, 8014-8018.
- SHARP R. E., POROYKO V., HEJLEK L., SPOLLEN W. G., SPRINGER G. K., BOHNERT H. J., NGUYEN H. T. (2004): Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of Experimental Botany*, 55: 2343-2351.
- TUBEROSA R., SANGUINETI M. C., LANDI P. (1994): Abscisic acid concentration in the leaf and xylem sap, leaf water potential, and stomatal conductance in drought-stressed maize. *Crop Sci.* 34: 1557-1563.
- TUBEROSA R., SANGUINETI M. C., LANDI P., SALVI S., CASARINI E., CONTI S. (1998): RFLP mapping of quantitative trait loci controlling abscisic acid concentration in leaves of drought-stressed maize (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 97:744-755.
- TUBEROSA R., SANGUINETI M. C., LANDI P. GIULIANI M. M., SALVI S., CONTI S. (2002): Identification of QTLs for root characteristics in maize grown in hydroponics and analysis of their overlap with QTLs for grain yield in the field at two water regimes. *Plant Molecular Biology* 48: 697-712.
- TUBEROSA R., SALVI S., SANGUINETI M. C., MACCAFERRI M., GIULIANI S. and LANDI P. (2003): Searching for quantitative trait loci controlling root traits in maize: a critical appraisal. *Plant and soil*, 255: 35-54.
- WANG G. L., A. H. PATERSON (1994): Assessments of DNA pooling strategies for mapping of QTLs. *Theor. Appl. Genet.* 88: 355-361.

QTL DETECTION FOR DROUGHT TOLERANCE IN COMPOSITE MAIZE POPULATIONS

IGNJATOVIĆ-MIČIĆ DRAGANA, MARKOVIĆ KSENIJA, LAZIĆ-JANČIĆ VESNA

SUMMARY

The most significant QTLs for leaf ABA and root characteristics are shown to be on chromosomes 1 (bin 1.06) and 2 (bin 2.04). Assuming that the same QTLs could be present in different genotypes, the objective of this work was to ascertain if the QTLs with major effect detected in one genotype could be detected in a different genetic background with different molecular markers of that chromosome region. Also, bulk segregant analysis (BSA) of 10 tolerant and 10 susceptible to drought maize populations was performed in order to confirm the potential of this approach in informative marker identification. Probes *umc1601*, *umc1776*, *bnlg2248*, *dupSSR27* and *bnlg2246* detected allele frequency differences between tolerant and susceptible populations of over 14%. It was also shown that BSA can identify informative molecular markers, although marker analysis of individual plants is necessary for final conclusion about linkage of the marker and the trait of interest.

Key words: drought, bulk segregant analysis, SSR molecular markers