

Primena molekularnih markera u analizi sadržaja ulja u zrnju grupnih uzoraka sintetičkih populacija kukuruza (*Zea mays* L.)

- Originalan naučni rad -

Ksenija MARKOVIĆ, Dragana IGNJATOVIĆ-MIČIĆ, Goran SARATLIĆ i
Vesna LAZIĆ-JANČIĆ
Institut za kukuruz "Zemun Polje", Beograd-Zemun

Izvod: RFLP lokusi, potencijalni indikatori povećanog sadržaja ulja u zrnju, identifikovani su analizom grupnih uzoraka (*Bulk Segregant Analysis* - BSA) C0 i C9 ciklusa selekcije dve domaće sintetičke populacije kukuruza - DS7u i YuSSSu. Sadržaj ulja u zrnju biljaka ispitivanih ciklusa selekcije obe populacije utvrđen je NMR spektroskopijom. Analiza genoma grupnih uzoraka početnog (C0) i krajnjeg (C9) ciklusa selekcije DS7u i YuSSSu urađena je pomoću 57 RFLP markera UMC *core set*. Na osnovu promena u frekvenciji alela u grupnim uzorcima u toku procesa selekcije analiziranih populacija utvrđene su informativne probe - probe potencijalno blisko vezane za QTL uključene u kontrolu povećanog sadržaja ulja u zrnju kukuruza. Identifikovana su četiri zajednička RFLP lokusa u obe analizirane populacije, s tim što je u populaciji DS7u identifikovano još četiri RFLP lokusa potencijalnih indikatora povećanog sadržaja ulja u zrnju kukuruza.

Ključne reči: Analiza grupnih uzoraka, kukuruz, RFLP, sadržaj ulja u zrnju.

Uvod

Kukuruzno ulje, bogato linoleinskom i polinezasićenim masnim kiselinama, predstavlja izuzetan izvor energije u ishrani ljudi i životinja. Kukuruz sa povećanim sadržajem ulja se uglavnom koristi u ishrani domaćih životinja, **Lambert i sar.**, 1998. Najznačajnija potencijalna prednost visokouljnih genotipova kukuruza je veća energetska gustina zrna podesna u ishrani životinja koje zahtevaju visoko-energetske obroke, kao što su tovna i mlečna stoka, brojleri i pilići, **Dale i Whittle**, 1991, **Adams i sar.**, 1994. Kao donja granica za visokouljane tipove kukuruza određen je nivo od 6% ulja u zrnju, jer zrnje sa manjim sadržajem ulja, u poređenju sa

zrnom standardnog kvaliteta, ne daje vidljive poželjne efekte u ishrani domaćih životinja, **Dumanović**, 1995.

Tokom prošlog veka razvijeno je nekoliko programa selekcije na visok sadržaj ulja, **Woodworth i sar.**, 1952, **Jugenheimer**, 1958, **Alexander**, 1977. Selekcija kukuruza na povećan sadržaj ulja u zrnu u našoj zemlji započeta je krajem pedesetih godina prošlog veka, **Dumanović** i **Mišović**, 1961. U Institutu za kukuruz "Zemun Polje" stvoren je veći broj visokouljanih hibrida i linija. Uporedo sa stvaranjem linija i hibrida stvoreno je i nekoliko visokouljanih sintetičkih populacija. Sintetička populacija DS7u je nastala rekombinovanjem jugoslovenskih, kanadskih i američkih linija i hibrida, dok sintetička populacija YuSSSu vodi poreklo iz američkog sintetika Iowa Stiff Stalk Syntetic - BSSS(R)C5. Tokom devet ciklusa selekcije sadržaj ulja je povećan za 8,52 ili prosečno 0,94 apsolutnih procenata po ciklusu u populaciji DS7u, a u sintetičkoj populaciji YuSSSu ukupno povećanje je iznosilo 8,18 ili prosečno 0,91 apsolutnih procenata po ciklusu. Nakon devet ciklusa selekcije zaključeno je da se kod ispitivanih populacija zadržala zadovoljavajuća varijabilnost u pogledu sadržaja ulja u zrnu i da se u narednim ciklusima selekcije može očekivati dalje povećanje sadržaja ulja, **Mišević i sar.**, 1985, **Dumanović**, 1995, **Saralić**, 1994, 1995.

Sadržaj ulja u zrnu se smatra kvantitativnom osobinom, koju kontroliše veći broj gena sa malim efektom, **Dudley**, 1977. Primenom metoda kvantitativne genetike i proteinskih markera bilo je moguće proceniti broj gena i promene u frekvenciji alela. U objavljenim radovima broj gena, utvrđen navedenim metodama, se kretao od 20 do 69, **Sprague i Brimhall**, 1949, **Dudley** i **Lambert**, 1992. Tek sa razvojem molekularnih markera otkriveni su i hromozomski regioni uključeni u kontrolu ekspresije ulja u zrnu kukuruza. Primenom RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) nađeni su potencijalni geni uključeni u kontrolu sadržaja ulja na različitim hromozomima, u zavisnosti od analiziranog materijala i ciklusa selekcije, **Sughrue** i **Rocheford**, 1994, **Goldman i sar.**, 1994, **Berke** i **Rocheford**, 1995. **Damon** i **Roshford**, 2001, su pomoću SSR (*simple sequence repeats*) markera identifikovali ciljne hromozomske regione na prvom, šestom, sedmom, osmom i desetom hromozomu, dok su **Cai i sar.**, 2001 korišćenjem AFLP (*amplified fragment length polymorphism*), SSR i RFLP identifikovali regione na prvom i četvrtom hromozomu.

Cilj ovog rada je identifikacija hromozomskih regiona, potencijalnih nosioca gena koji kontrolišu povećan sadržaj ulja u zrnu dve domaće, visokouljane sintetičke populacije kukuruza - DS7u i YuSSSu, primenom metode analize grupnih uzoraka (BSA - *bulk segregant analysis*). Ova metoda je komplementarna analizi segregirajuće populacije i zasniva se na objedinjavanju DNK individualnih biljaka sa ekstremnim fenotipskim ekspresijama, **Wang** i **Paterson**, 1994. Paralelna analiza dve populacije je rađena radi poređenja identifikovanih hromozomskih regiona u materijalu različite genetičke osnove.

Materijal i metode

Biljni materijal. - Po 200 biljaka početnog (C0) i devetog (C9) ciklusa selekcije visokouljanih populacija DS7u i YuSSSu je gajeno u polju tokom dve godine. Biljke su samooplođene i odgajane do kraja vegetativnog ciklusa radi analize sadržaja ulja u zrnu. Grupni uzorci za RFLP analizu su formirani od listova 50 biljaka početnog (C0), odnosno 50 biljaka devetog (C9) selekcije ispitivanih populacija.

Određivanje sadržaja ulja. - Po 30 zrna iz srednjeg dela klipa pojedinačnih biljaka (koje su izabrane za formiranje grupnih uzoraka) sušeno je u vakuum sušnici na 40-45°C tokom 17-18 sati, tj. dok sadržaj vlage u zrnu nije sveden na oko 5%. Sadržaj ulja u zrnu je određen nedestruktivnom NMR (Nuklearna Magnetna Rezonanca) metodom po *Alexander i sar.*, 1974. Statistička obrada podataka izvedena je pomoću kompjuterskog programa microsoft Excel. Da bi se utvrdila značajnost razlika u sadržaju ulja između C0 i C9 ciklusa analiziranih populacija primenjen je Studentov t-test.

RFLP analiza. - Grupni uzorci su formirani tako što je od svake od 50 izabranih biljaka isečeno i izmereno oko 0,07g lista (ukupna masa uzorka je iznosila između 3,5 i 4 g). Izolacija DNK iz ovako dobijenih uzoraka je rađena modifikovanom CTAB metodom po *Saghai-Marooft i sar.*, 1984.

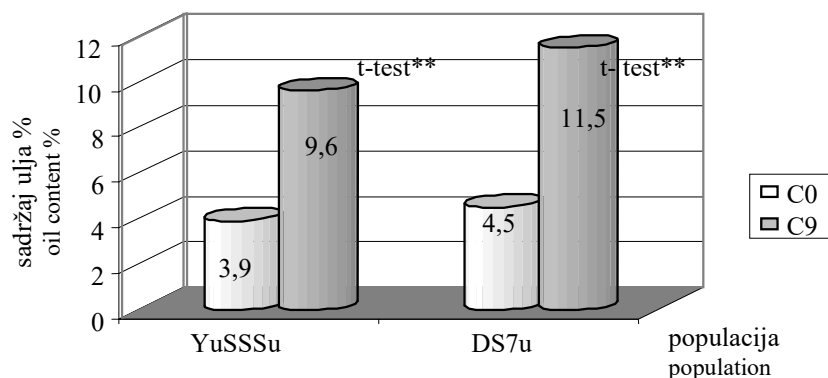
DNK uzorci su digestovani sa tri restrikciona enzima - EcoRI, BamHI i HindIII. Fragmenti dobijeni restrikcijom su zatim razdvojeni na 1% agaroznom gelu i preneti sa gela na pozitivno naelektrisane najlon membrane metodom *Southern Blot*. Membrane su hibridizovane sa 90 RFLP proba UMC *core set*, obeleženih sa dig-11-dUTP pomoću PCR (*polymerase chain reaction*) reakcije. Detekcija hibridizovanih proba je izvršena pomoću hemiluminiscentne reakcije između *Anti-digoxigenin Fab* fragmenata konjugovanih alkalnom fosfatazom i CSPD supstratom, *Mannheim*, 1995.

Dobijeni RFLP filmovi su skenirani i urađena je kvantifikacija traka (alela) pomoću programskog paketa TotalLab v.1.10. Frekvencija alternativnih alela unutar grupnih uzoraka je određena na osnovu vrednosti (*pixel intensity*) očitanih kvantifikacijom pojedinačnih traka na filmu. Frekvencija pojedinačnih alela unutar grupnog uzorka je izražena kao procenat zbira očitanih vrednosti. Razlika u frekvenciji alela predstavlja razliku između dobijenih procenata zastupljenosti istih alela između visoko i nisko uljanih grupnih uzoraka.

Rezultati i diskusija

Statističkom obradom rezultata NMR analize ustanovljene su visoko značajne razlike u sadržaju ulja u zrnu između C0 i C9 ciklusa selekcije YuSSSu i DS7u visokouljanih populacija kukuruza. Na osnovu ustanovljenih razlika potvrđeno je da izabrani ciklusi selekcije predstavljaju reprezentativne uzorke za RFLP analizu.

Srednje vrednosti sadržaja ulja, kao i rezultati statističke analize (t-test) su prikazani na Slici 1.



Slika 1. Sadržaj ulja u zrnu grupnih uzoraka C0 i C9 ciklusa selekcije visokouljanih populacija YuSSSu i DS7u (značajnost: $**P < 0.01$)

Kernel oil content in in bulk samples derived from C0 and C9 selection cycles of high-oil populations YuSSSu and DS7u (significance: $**P < 0.01$)

Od 90 proba UMC core set 29 nije moglo biti korišćeno za RFLP analize, jer se nisu umnožile tokom PCR reakcije ili su bile pogrešne veličine. Preostale probe su detektovale ukupno 171 kombinaciju enzim/proba kojima je identifikovano ukupno 57 hromozomskih regiona.

Obradom rezultata RFLP analize grupnih uzoraka ustanovljeno je osam informativnih proba pomoću kojih je identifikovano povećanje u frekvenciji alela veće od 10% tokom selekcije na visok sadržaj ulja u zrnu. Četiri probe su se pokazale kao informativne na hromozomima 1, 6, 7 i 8 u obe analizirane populacije, dok su u populaciji DS7u identifikovane još četiri informativne probe na hromozomima 4, 9 i 10. Rezultati su prikazani u Tabeli 1.

Razlike u frekvenciji RFLP alela između C0 i C9 ciklusa selekcije (Tabela 2),

Tabela 1. Identifikovane informativne RFLP probe u populacijama YuSSSu i DS7u
Identified informative RFLP Probes in Populations YuSSSu and DS7u

Proba - Probe	Hrom.zom	Bin	YuSSSu	DS7u
bnl6.32	1	1.12	+	+
umc21	6	6.05	+	+
umc254	7	7.04	+	+
npi268	8	8.07	+	+
umc156	4	4.06	-	+
csu147	9	9.04	-	+
php20075	10	10.01	-	+
umc44	10	10.06	-	+

identifikovane sa sva tri restrikciona enzima, ukazale su na visok stepen informativnosti markera bnl6.32 u populaciji DS7u i markera npi268 u obe ispitivane populacije. Bnl6.32 probom su detektovane promene (povećanje ili smanjenje) frekvencija odgovarajućih alela u opsegu od 13,8% do 49,2% u DS7u populaciji. Istom probom su detektovane i značajne razlike u YuSSSu populaciji, ali samo sa dva restrikciona enzima. U kombinaciji sa BamHI detektovane su dve nove trake (B i C) u C9 ciklusu, a koje nisu detektovane u početnom ciklusu selekcije. Takođe, u kombinaciji sa HindIII detektovano je da je tokom selekcije došlo razlike u YuSSSu populaciji, ali samo sa dva restrikciona enzima. U kombinaciji sa BamHI detektovane su dve nove trake (B i C) u C9 ciklusu, a koje nisu detektovane u početnom ciklusu selekcije. Takođe, u kombinaciji sa HindIII detektovano je da je tokom selekcije došlo do eliminacije jednog alela (označenog sa C), tj. u ciklusu C0 njegova frekvencija je iznosila 28,8%, dok u ciklusu C9 nije detektovan. Istovremeno je došlo do povećanja frekvencije druga dva alela (A i B) za ukupno 28,8%.

Razlike u frekvenciji RFLP alela detektovanih u kombinaciji npi268 probe sa EcoRI i HindIII enzimima u populaciji DS7u su iznosile manje od 20%. Najveće razlike su utvrđene u kombinaciji sa enzimom BamHI, u kojoj je u C9 ciklusu detektovan alel C (47,5%) odsutan u ciklusu C0. Istovremeno je utvrđeno da je tokom selekcije došlo do smanjenja frekvencije alela B za 48,9%. U populaciji YuSSSu najveća promena u frekvenciji alela je detektovana u kombinaciji sa EcoRI (47,4%), a najmanja u kombinaciji sa HindIII (30,6%) enzimima.

Na šestom hromozomu, na marker lokusu umc21, identifikovane su promene frekvencije alela u procesu selekcije kod obe ispitivane populacije u kombinaciji sa enzimima EcoRI i BamHI. U kombinaciji sa HindIII enzimom signal je bio suviše slab da bi se mogla uraditi kvantifikacija traka. U populaciji DS7u najveća promena je detektovana sa BamHI enzimom (59,5%), mada je i promena frekvencije alela sa EcoRI bila značajna (35%). Veće promene su detektovane u populaciji YuSSSu - 52,8% sa EcoRI i 48,4% sa BamHI. Alel C, detektovan sa BamHI u C9 ciklusu obe populacije, nije detektovan u početnim ciklusima selekcije.

Probom umc254 detektovane su razlike u frekvenciji alela samo u kombinaciji sa HindIII u populaciji DS7u, a sa EcoRI i BamHI u populaciji YuSSSu. U DS7u populaciji alel B je detektovan samo u krajnjem ciklusu selekcije (12,8%), dok je razlika u frekvenciji ostalih alela varirala u rasponu od 0,2% do 9,8% između C0 i C9 ciklusa. U populaciji YuSSSu detektovani su novi aleli u C9 ciklusu - alel B (21,1%) u kombinaciji sa EcoRI i alel A (2,8%) u kombinaciji sa BamHI.

Preostale četiri informativne probe su detektovale razlike u frekvenciji alela samo u populaciji DS7u. Probe umc156, php20075 i umc44 su bile informativne samo u kombinaciji sa HindIII restrikcionim enzimom, a csu147 sa EcoRI i BamHI. Najmanja promena u frekvenciji alela je detektovana sa probom umc156 (alel D 5,2%), iako su rezlike manje od 5% detektovane i na ostalim alelima. Sa probama php20075 i umc44 detektovani su novi aleli - alel B (31,8%), odnosno alel A (28,9%) u C9 ciklusu selekcije. U kombinaciji sa EcoRI probom csu147 9 ciklusu selekcije. U kombinaciji sa EcoRI probom csu147 je da je ustanovljeno je da je došlo do gubitka

Tabela 2. Promene u frekvenciji (+ povećanje, - smanjenje) RFLP alela u populacijama DS7u i YuSSSu tokom selekcije na visok sadržaj ulja
 Changes in Frequencies (+ increase, - decrease) of RFLP Alleles in Populations DS7u and YuSSSu in the Course of Selection for the High Oil Content

Proba Probe	Enzim Enzyme	Ukupan broj traka Total no. of bands	DS7u		Ukupan broj traka Total no. of bands	YuSSSu	
			Alel Allele	Razlika u frekvenciji (%) Differences in frequency		Alel Allele	Razlika u frekvenciji (%) Differences in frequency
bnl6.32	EcoRI	3	A	+18,8	0	-	-
			B	-21,2		-	-
	BamHI	3	A	-17,9	3	A	-19,6
			C	+16,1		B	+7,7
			-	-		C	+11,8
	HindIII	4	A	+13,8	3	A	+12,6
			B	+27,8		B	+16,2
			C	-49,2		C	-28,8
umc156	HindIII	4	D	+7,6	0	-	-
			D	+5,2		-	-
umc21	EcoRI	4	A	+13,0	3	A	-25,6
			B	-10,5		B	-27,2
			C	-35,0		C	+52,8
			D	+32,5		-	-
umc254	BamHI	3	B	-55,9	3	B	-40,2
			C	+59,5		C	+48,4
umc254	EcoRI	0	-	-	6	B	+21,1
			-	-		A	+2,8
			-	-		B	-15,9
			-	-		E	+19,0
npi268	HindIII	5	B	+12,8	0	-	-
			A	+19,0		A	+47,4
	EcoRI	3	B	-15,9	3	B	-33,1
			-	-		C	-14,3
			-	-		A	+41,0
	BamHI	4	B	-48,9	3	B	-29,5
			C	+47,5		C	-11,6
			B	-16,9		A	-32,6
HindIII	5	C	+10,8	4	B	+30,6	
		D	+17,7		-	-	
		A	+13,8		-	-	
csu147	EcoRI	4	B	-39,5	0	-	-
			C	+15,6		-	-
			D	+10,1		-	-
			A	-16,6		-	-
BamHI	4	C	+13,7	0	-	-	
		C	+13,7		-	-	

php20075	HindIII	2	A	-31,8	0	-	-
			B	+31,8		-	-
umc44	HindIII	4	A	+28,9	0	-	-
			B	+21,9		-	-
			C	-13,7		-	-

alela B (-39,5%), odnosno u kombinaciji sa BamHI do gubitka alela A (-16,6%) tokom selekcije na povećan sadržaj ulja u zrnju.

Iako je do sada objavljen mali broj radova o asocijaciji molekularnih markera sa genima uključenim u kontrolu koncentracije ulja u zrnju kukuruza, utvrđeno je da je u ovoj kontroli učestvuje više od 12 gena. Ovaj broj gena otežava efikasnu primenu klasične selekcije u razvoju visokouljanih, a istovremeno i visokoprinosnih hibrida, *Mazur i sar.*, 1999. Međutim, primenom molekularnih markera moguće je identifikovati hromozomske regione i QTL-ve sa značajnim uticajem na sadržaj ulja, što bi moglo predstavljati korisnu informaciju za indirektnu selekciju pomoću molekularnih markera.

Istraživanja prikazana u ovom radu doprinose rasvetljavanju kontrole nasleđivanja sadržaja ulja kod domaćih populacija kukuruza tokom procesa selekcije na navedeno svojstvo. Primena BSA metode je omogućila brzu i efikasnu identifikaciju RFLP markera koji su vezani za specifične gene ili hromozomske regione uključene u kontrolu ekspresije visokog sadržaja ulja u zrnju. Iako je ova metoda prvenstveno razvijena za analizu monogenih i oligogenih osobina, postoje dokazi o njenoj efikasnoj primeni u disekciji kvantitativnih osobina, *Quarrie i sar.*, 1999. U našem radu BSA metodom je omogućeno testiranje velikog broja lokusa u DS7u i YuSSSu populacijama i identifikacija informativnih markera (kod kojih je došlo do promena u frekvenciji alela većim od 10% tokom selekcije) koji će se dalje koristiti za analizu pojedinačnih uzoraka početnog i krajnjeg ciklusa selekcije. Identifikovano je ukupno osam informativnih RFLP proba. Moguće je da bi ovaj broj bio veći da je čitav genom bio ravnomerno pokriven markerima.

Kod svih RFLP markera, sem kod umc156, uočena je česta pojava novih alela tokom procesa selekcije. Moguće je da je frekvencija ovih alela bila suviše niska u početnom ciklusu da bi mogla biti detektovana BSA metodom i/ili da je broj biljaka u grupnom uzorku bio nedovoljan da adekvatno predstavi frekvencije alela u populaciji. Takođe je uočeno gubljenje pojedinih alela tokom selekcije, što bi mogla biti posledica eliminacije nepoželjnih alela tokom selekcije. Mogući nepoželjni aleli su detektovani kod svih informativnih proba, osim kod umc156, php20075 i umc44 u okviru populacije DS7u.

U svim istraživanjima genetičke kontrole nasleđivanja sadržaja ulja u zrnju kukuruza ističe se značaj hromozoma 6. U radovima *Sughrue i Rocheford*, 1994, i *Goldman i sar.*, 1994, navodi se postojanje regiona na ovom hromozomu, bez precizne identifikacije ciljnih gena, uključenih u kontrolu ekspresije visokog sadržaja ulja u zrnju. *Berke i Rocheford*, 1995, su identifikovali region bin6.04 sa velikim uticajem na ekspresiju sadržaja ulja, a *Alrefai i sar.*, 1995, su na istom regionu

identifikovali QTL za nasleđivanje viših masnih kiselina. **Mikkilineni** i **Rocheford**, 2003, ističu da se u ovom regionu nalazi QTL odgovoran za nasleđivanje oleinske i linoleinske kiseline, a u regionu bin6.05 QTL sa velikim efektom na koncentraciju sadržaja ulja u zrnu. U analizi DS7u i YuSSSu populacija probom umc65 nisu detektovane promene u frekvenciji alela između C0 i C9 ciklusa, što može da se tumači da tokom selekcije na povećan sadržaj ulja u zrnu nije došlo do promene u koncentraciji oleinske i linoleinske kiseline.

Pored regiona identifikovanog na hromozomu 6, poklapanje sa podacima iz literature je utvrđeno i na hromozomskim regionima bin7.04, **Goldman i sar.**, 1994, **Damon i Rocheford**, 2001, i bin8.07, **Alrefai i sar.**, 1995, **Berke i sar.**, 1995, **Damon i Rocheford**, 2001. Takođe, bin6.32 (bin1.12) je prema literaturnim podacima vezan za gen sa overdominantnim efektom na visok nivo palmitinske kiseline u ulju zrna ilinoiskih populacija, **Alrefai i sar.**, 1995. Ovi autori su detektovali i QTL-ovi za visok sadržaj ulja pomoću RFLP markera umc156 i umc44, kojima su identifikovane promene u frekvenciji alela u populaciji DS7u. Poklapanja sa podacima iz literature ukazuju na mogućnost da se radi o hromozomskim regionima nosiocima gena sa major efektima na ispoljavanje visokog sadržaja ulja u zrnu kukuruza, a u isto vreme ukazuje na poreklo i broj genotipova korišćenih u formiranju DS7u i YuSSSu populacija.

Odabiranjem selekcionog materijala na nivou genotipa prevazilaze se mnoge teškoće fenotipske selekcije, kao što su efekat spoljne sredine i niska heritabilnost. Ovo se postiže identifikacijom markera blisko vezanih za gene koji kontrolišu osobine od interesa i selekcijom pomoću njih. Rezultati prikazani u ovom radu bi trebalo da nađu primenu u ovoj oblasti selekcije i oplemenjivanja.

Zaključak

Statistički značajne razlike u sadržaju ulja u zrnu između C0 i C9 ciklusa selekcije visokouključanih populacija kukuruza YuSSSu i DS7u su omogućile efikasnu RFLP analizu grupnih uzoraka navedenih populacija. Šest od osam identifikovanih hromozomskih regiona, potencijalnih nosioca gena odgovornih za visok sadržaj ulja u zrnu, takođe su identifikovani kao nosioci QTL-ova uključenih u kontrolu sadržaja ulja ili sadržaja masnih kiselina i u radovima drugih autora. Ovo podudaranje identifikovanih hromozomskih regiona između kukuruza različitog porekla i genetičke osnove, ukazuje na njihov potencijalno visok značaj u regulaciji ekspresije ispitivanog svojstva.

Analiza grupnih uzoraka je omogućila identifikaciju RFLP markera potencijalno blisko vezanih za gen(e) uključene u kontrolu visokog sadržaja ulja u zrnu kukuruza. Da bi se potvrdili rezultati dobijeni u ovom radu, uradiće se i analiza pojedinačnih biljaka. Identifikacijom markera blisko vezanih za gene koji kontrolišu osobinu od interesa i selekcijom pomoću njih, prevazilaze se teškoće fenotipske selekcije, kao što su efekat spoljne sredine i niska heritabilnost. Krajnji cilj naših istraživanja je da dobijeni rezultati nađu primenu upravo u ovoj oblasti selekcije i oplemenjivanja.

Literatura

- Adams, M.H., S.E. Watkins, A.L. Waldrup and P.W. Waldrup** (1994): Utilization of high-oil corn in diets for broiler chickens. *J. Appl. Poult. Res.* **3** (2): 146-156.
- Alexander D.E.** (1977): High oil corn: Current status of breeding and utilization. Book of Proceedings of the 13th Annual Illinois Corn Breeders School, University of Illinois, Urbana-Champaign, USA, pp. 1-9.
- Alexander D.E., L. Silvela, S.F.I. Collins and R.C. Rodgers** (1974): Analysis of oil content of maize by wide-line NMR. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* **44**: 555-558.
- Alrefai, R., T.G. Berke and T.R. Rocheford** (1995): Quantitative trait locus analysis of fatty acid concentrations in maize. *Genome* **38**: 894-901.
- Berke, T.G. and T.R. Rocheford** (1995): Quantitative trait loci for flowering, plant and ear height and kernel traits in maize. *Crop Sci.* **35**:1542-1549.
- Cai, H., N. Yuyama, N. Ogawa and Z. Gao** (2001): QTL analysis of seed oil content in maize. Plant and Animal Genome IX Conference, January 13-17, 2001, San Diego, USA, www.intl-pag.org/9/abstracts/P5_05.html.
- Dale, N. and E. Whittle** (1991): The effect of oil content on true metabolizable energy of yellow corn. *Poult. Sci.* **70** (Supplement 1): 32.
- Damon, S. and T. Rocheford** (2001): QTL and NIL analysis of maize kernel composition and tassel architecture. Book of Abstracts of the 43rd Annual Maize Genetics Conference, March 14-18, 2001, Grand Geneva Resort, Lake Geneva, WI, USA, P139, www.imba.missouri.edu/report/1998_4.php.
- Dudley, J.W.** (1977): Seventy-six generations of selection for oil and protein percentage in maize. Book of Proceedings of the International Conference on Quantitative Genetics, ed. by E. Pollak et al., August 16-21, 1976, Iowa State University Press, Ames, IA, USA. pp. 459-473.
- Dudley, J.W. and R.J. Lambert** (1992): Ninety generations of selection for oil and protein in maize. *Maydica* **37**: 1-7.
- Dumanović, J.** (1995): Visokouljani kukuruz, potencijalni izvor ulja visokog kvaliteta, izd. Institut za kukuruz "Zemun Polje", Beograd-Zemun.
- Dumanović, J. i M. Mišović** (1961): Mogućnosti korišćenja kukuruza za industrijsku proizvodnju ulja. *Savrem. poljopr.* **IX** (12): 1272-1279.
- Goldman, I.L., T.R. Rocheford and J.W. Dudley** (1994): Molecular markers associated with maize kernel oil concentration in an Illinois high protein x Illinois low protein cross. *Crop Sci.* **34**: 908-915.
- Jugenheimer, R.W.** (1958): Hybrid maize breeding and seed production. *FAO Agr. Dev. Paper* **62**: 1-435.
- Lambert R. J., D.E. Alexander and Z.J. Han** (1998): A high oil pollinator enhancement of kernel oil and effects on grain yields of maize hybrids. *Agron. J.* **90** (2): 211-215.
- Mazur B., E. Krebbers and S. Tingey** (1999): Gene discovery and product development for grain quality traits. *Science* **285**: 372-375.

- Mannheim, B.** (1995): The DIG System User's Guide for Filter Hybridization, ed. Mannheim: Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica 1995: 61-62.
- Mikkilineni, V.** and **T.R. Rocheford** (2003): Sequence variation and genomic organization of fatty acid desaturase-2 (*fad2*) and fatty acid desaturase-6 (*fad6*) cDNAs in maize. *Theor. Appl. Gen.* **106** (7):1326-1332.
- Mišević D., D.E. Alexander, J. Dumanović** and **S. Ratković** (1985): Recurrent selection for percent oil in corn. *Genetika* **17** (2): 97-106.
- Quarrie, A.S., V. Lazić-Jančić, D. Kovačević, A. Steed** and **S. Pekić** (1999): Bulk segregant analysis with molecular markers and its use for improving drought resistance in maize. *J. Exp. Bot.* **50** (337): 1299-1306.
- Saghai-Marooif 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* **81** (24): 8014-8018.
- Saratlić, G.** (1994): Promene u frekvenciji poželjnih alela za sadržaj ulja kao posledica rekurentne selekcije kukuruza (*Zea mays* L.). Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad.
- Saratlić, G.** (1995): Fifteen years of recurrent selection for high oil content in maize (*Zea mays* L.). *Genetika, Supplementum IV*, 111-123.
- Sprague, G.F** and **B. Brimhall** (1949): Quantitative inheritance of oil in the corn kernel. *Agron. J.* **41**: 30-33.
- Sughroue, J.R.** and **T.R. Rocheford** (1994): Restriction fragment length polymorphism differences among Illinois long-term selection oil strains. *Theor. Appl. Genet.* **87** (8): 916-924
- Wang, G.L.** and **A.H. Paterson** (1994): Assessment of DNA pooling strategies for mapping of QTLs. *Theor. Appl. Genet.* **88** (3-4): 355-361.
- Woodworth C.M, E.R. Leng** and **R.W. Jugenheimer** (1952): Fifty generations of selection for oil and protein content in corn. *Agron. J.* **44**: 60-66.

Primljeno: 24.04.2007.

Odobreno: 07.05.2007.

* *
*

The Application of Molecular Markers in the Bulk Segregant Analysis of Kernel Oil Content in Two Maize (*Zea mays* L.) Synthetic Populations

- Original scientific paper -

Ksenija MARKOVIĆ, Dragana IGNJATOVIĆ-MIČIĆ, Goran SARATLIĆ and
Vesna LAZIĆ-JANČIĆ
Maize Research Institute, Zemun Polje, Belgrade-Zemun

S u m m a r y

RFLP loci, potential indicators of kernel high oil content, were identified using bulk segregant analysis (BSA) approach, i.e. bulked samples derived from C0 and C9 selection cycles of two maize synthetic populations - DS7u and YuSSSu. The kernel oil content was determined by the NMR spectroscopy. The genome analysis of bulked samples was carried out with 57 RFLP markers (UMC core set). On the basis of allele frequency differences between cycles of selection, informative RFLP markers (potentially closely linked to QTLs regulating high oil content in maize) were identified. Four common RFLP loci were identified in both DS7u and YuSSSu populations. Additional four RFLPs were identified in DS7u population.

Received: 24/04/2007

Accepted: 07/05/2007

Adresa autora:

Ksenija MARKOVIĆ
Institut za kukuruz "Zemun Polje"
Slobodana Bajića 1
11185 Beograd-Zemun
Srbija
E-mail: kmarkovic@mrizp.co.yu