

VARIJABILNOST MIKROSATELITNE DNK U POPULACIJAMA DIVLJE TREŠNJE (*Prunus avium* L.) IZ SREDIŠNJE BOSNE

MICROSATELLITE DNA VARIABILITY OF
POPULATIONS OF WILD CHERRY
(*Prunus Avium* L.) FROM CENTRAL BOSNIA

Dalibor BALLIAN¹

SAŽETAK: U radu je istraživana mikrosatelitna DNK varijabilnost populacija divlje trešnje (*Prunus avium* L.) iz središnje Bosne (Mrkovići, Ilijaš i Kakanj), a za kontrolu je iskorištena domaća sorta trešnje (cv. Alica). Za ekstrakciju DNK korištena je modifikirana Rogers-ova (1997) procedura za ekstrakciju genomske DNK iz embriona. Genetička varijabilnost populacija procijenjena je uz pomoć visoko ponavljajućih DNK molekula (simple sequence repeats – SSR). Potvrđeni su rezultati ranijih istraživanja u kojima je registrirana relativno mala genetička varijabilnost trešnje (*Prunus avium* L.), uz korištenje određene grupe mikrosatelita.

Ključne riječi: *Prunus avium* L., DNK, ekstrakcija, mikrosateliti.

UVOD

U suvremenim istraživanjima polimorfizma, kod vrsta šumskog drveća, sve značajnije mjesto zauzima analiza varijabilnosti molekule DNK. Ova suvremena metoda analize doprinosi novim spoznajama u sistematici biljaka. Dolazi se do novih spoznaja, na temelju kojih se pretpostavlja da će stara shvaćanja o vrstama biti revidirana i da će mnoge opisane vrste dobiti status podvrsta, varijeteta ili ekotipova.

Molekularne metode do sada su našle daleko veću primjenu u poljoprivredi nego u šumarstvu. Ipak ima mnogo istraživanja na šumskim vrstama drveća, posebice hrastovima, jasenima, bukvi, crnom boru, itd. Na razini Europe pokrenut je čitav niz značajnih projekata u cilju izučavanja DNK, kartiranja gena kod ekonomski značajnih vrsta drveća.

Do sada provedena istraživanja na DNK divlje trešnje (*Prunus avium* L.) objavljena su u više radova o ekstrakciji DNK (Saiki 1990, Lefort i Douglas 1999). Ostala istraživanja koja su tretirala DNK trešnje, odnose se na domaće sorte trešanja značajne u voćarskoj proizvodnji, te su najznačajniji radovi Gerla-

cha i Strossera (1997, 1998), Gerlacha i sur. (1998). Među tim radovima interesantan je rad koji se bavi mogućnostima rane selekcije kultivara trešnje, od Hormaza (1999). Značajni su i drugi radovi koji se odnose na pitanja osnovnih fundamentalnih istraživanja kod raznih vrsta drveća, a između ostalog i roda *Prunus*, a odnose se djelomično na divlju i domaću trešnju (Lezzoni i sur. 1996, Levi i sur. 1993, Malusa 1993, Malusa i Marchesini 1993, Malusa i Sansavini 1993 i 1995).

Cilj rada bio je procijeniti stupanj unutarpopulacijske i međupopulacijske varijabilnosti divlje trešnje u središnjoj Bosni, te ove rezultate usporediti s rezultatima koji su do sada publicirani. Djelomična usporedba može se izvršiti s radom Ciprianija i sur. (1999).

Dobiveni rezultati omogućili bi da se uoče razlike između populacija, te da se utvrdi da li se divlja trešnja značajno razlikuje na molekularnom razini od domaće sorte trešnje koja je najzatupljenija u području istraživanih populacija. Rezultati bi nas usmjerili na pravi put iznalaženja optimalne metode za determinaciju čiste divlje trešnje, te olakšalo poslove na očuvanju genetičke raznolikosti ove vrste.

¹ Dr. sc. Dalibor Ballian, Šumarski fakultet u Sarajevu

MATERIJAL I METODA RADA

Tijekom 1999. godine sakupljeno je sjeme divlje trešnje iz tri populacije na području središnje Bosne. Populacije se nalaze u različitim ekološkim nišama, a udaljene su jedna od druge 30 km. Sjeme je sakupljeno sa 69 stabala (populacija Mrkovići 31 stablo, Ilijaš 15, Kakanj 23), a za kontrolu je korišteno sjeme ubrano s jednog stabla domaće trešnje, poznate autohtone sorte "Alica". Inače, ova je sorta najviše zastupljena u voćnjacima gornjeg i srednjeg toka rijeke Bosne, gdje je i sabiran materijal za istraživanje. Fenologija cvjetanja kultivara poklapa se sa cvjetanjem divlje trešnje, kao i vrijeme sazrijevanja plodova. Za ekstrakciju DNK korišten je embrij koji je izvađen iz sjemena mehaničkim putem. Njegova veličina i masa zavisila je od veličine sjemena, a masa se kretala oko 0,0005 g kod divlje trešnje, do 0,0008 g kod domaće trešnje.

Za proučavanje unutarpopulacijske varijabilnosti slučajnim izborom uzeta su tri stabla iz populacije Mr-

kovići, sa po osam sjemenki (ukupno 24 ekstrakcije), dva stabla iz populacije Ilijaš (16 ekstrakcija) i dva stabla iz populacije Kakanj (16 ekstrakcija). Također je rađena ekstrakcija i za domaću trešnju sorte "Alica" koja je služila kao kontrola, jer je najčešća u području istraživanih populacija (osam ekstrakcija). Za istraživanje međupopulacijske varijabilnosti slučajnim je izborom uzet po jedan embrion od svakog stabla, na kojem je izvršena ekstrakcija (70 ekstrakcija). Po završenoj ekstrakciji za preparate je primijenjena standardna je PCR procedura, a potom analiza na gelu.

Varijabilnost između stabala i populacija procijenjena je uz primjenu X^2 -testa, testiranjem dobivenih distribucija u populacijama. Primjenom Hardy-Wainbergovog zakona izračunat je broj heterozigota u populacijama za sve tri populacije.

Izolacija genomske DNK

Izolacija je izvršena za genomsku (cjelokupnu staničnu) DNK (Rogers 1997). Mala veličina embriona otežavala je ekstrakciju, ali je metoda uspješno prilagođena količini embriona u prvim etapama izolacije na način kako slijedi.

Embrioni su držani u tubama na temperaturi od $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, najmanje 24 sata. Po njihovom vađenju iz frižidera, odmah je vršena maceracija specijalno konstru-

iranom alatkom, uz dodavanje 2 x CTAB buffera (2 % CTAB, 100 mM Tris, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl) u prilagođenoj količini od 50 μl , što se pokazalo sasvim dovoljnim za veličinu embriona. Sva daljnja procedura odvijala se uz manje preinake Rogersovog (1997) protokola, prema količini materijala koji je služio za ekstrakciju. Modifikacija je rezultirala dovoljnom količinom DNK na kraju procesa izolacije genomske DNK.

PCR-procedura i elektroforetska analiza

Korištene su početnice sa 18-22 baze, proizvođača "Genosys biotechnologies – Cambridge (UK)" (Tab. 1.). Unatoč različitim temperaturama nalijeganja (T_A)

u istraživanju je za sve početnice uspješno korištena $T_A = 58\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tablica 1. Osnovni podaci o parovima početnica (Genosys biotechnologies – Cambridge).

Table 1 Basic details of the primers (Genosys biotechnologies – Cambridge).

Redni broj No.	Početnice Primers	Broj baza No. of bases	Sekvenca (5'-3') Sequence (5'-3')	Temperatura topljenja Melting temperature (T_m)	Temperatura nalijeganja Annealing temperature (T_A)*
1	UDP96-003F	20	TTGCTCAAAAGTGTGCGTTGC	63,9	58
	UDP96-003R	20	ACACGTAGTGCAACACTGGC	63,9	62
2	UDP96-018F	20	TTCTAATCTGGGCTATGGCG	63,8	60
	UDP96-018R	22	GAAGTTCACATTTACGCAGGG	62,2	64
3	UDP97-402F	22	TCCATAACCAAAAAAACACC	63,3	60
	UDP97-402R	20	TGGAGAAGGGTGGGTACTTG	63,8	62
4	UDP98-407F	20	AGCGGCAGGCTAAATATCAA	63,4	58
	UDP98-407R	19	AATCGCCGATCAAAGCAAC	65,0	56

$$T_A^* = 4(\#G + \#C) + 2(\#A + \#T)$$

(#G + #C) – ukupan broj baza G i C koje se nalaze u početnici

(#A + #T) – ukupan broj baza A i T koje se nalaze u početnici

Za PCR djelovanje učinjen je reakcijski volumen od 20 μ l za par početnica i prikazan u tablici 3, a procedura je trajala kao što je prikazano u tablici 2.

Nakon završene PCR procedure, razdvajanje PCR produkta izvršeno je elektroforezom na 1,5 % agarom gelu (Ultra pure DNA grade agarose – Bio Rad). Kako se radi o specifičnim početnicama, nije bilo potrebe da se radi na poliakridamidnom gelu, nego su vrpce izbrajane na agarom gelu. Vrijeme potrebno za rad elektroforeze bilo je u zavisnosti od veličine gela, i kretalo se oko jednog sata pri istosmjernoj struji od 50 ili 100 V.

Tablica 2. PCR procedura

Table 2 PCR procedure

Vrsta temperature <i>Type of the temperature</i>	Temperatura <i>Temperature</i>	Vrijeme <i>Time</i>	Broj krugova <i>No. of circles</i>
početna temperatura	94 °C	2 min	
temperatura denaturacije	94 °C	1 min	35
temperatura hibridizacije	55 °C	1 min	35
temperatura elongacija	72 °C	1 min	35
završna temperatura	72 °C	8 min	
temperatura čekanja	4 °C	-	

Nakon elektroforeze bojenje gela izvršeno je ethidium bromideu koncentracije od 1 μ g/ml, u trajanju od 20 minuta. Potom je izvršeno snimanje gela i izbrajane vrpce.

Tablica 3. PCR standardni protokol

Table 3 PCR standard protocol

Protokol za broj uzoraka	1	7	11	15	19	21
Broj analiza	1	6	10	13	18	20
	u μ l	u μ l	u μ l	u μ l	u μ l	u μ l
H ₂ O	9,92	69,44	109,12	148,80	188,48	208,32
10 x Buffer	2,00	14,00	22,00	30,00	38,00	42,00
10 x dNTP's	2,00	14,00	22,00	30,00	38,00	42,00
Početnica 1	1,00	7,00	11,00	15,00	19,00	21,00
Početnica 2	1,00	7,00	11,00	15,00	19,00	21,00
Taq	0,08	0,56	0,88	1,20	1,52	1,68
Otopina DNA	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Ukupno	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00

REZULTATI ISTRAŽIVANJA I RASPRAVA

Istraživanja su pokazala da od četiri para početnica koji su korišteni u ovim istraživanjima samo jedan par pokazuje polimorfizam (Tab. 4.). U drugih parova početnica nije registrirana varijabilnost, jer su pokazali

monomorfizam, iako je registrirana u ranijim istraživanjima, ali na drugim vrstama iz roda *Prunus* (*P. persica* L.) (Ciprian i sur. 1999).

Tablica 4. Frekvencije alela i heterozigotnost kod svih uzoraka.

Table 4 Frequency of the alleles and heterozygosity in all samples

Početnice <i>Primers</i>	Aleli (bp) <i>Alleles (bp)</i>		Heterozigoti <i>Heterozygosity</i>	Vrpce <i>Band</i>	Broj analiza <i>No. of analysis</i>
	1	2			
UDP96-003	bp.149	0	Nema polimorfizma	Jednostruka	70
	1,00	0			
UDP96-018	bp.240	0	Nema polimorfizma	Jednostruka	70
	1,00	0			
UDP97-402	bp.139	bp.151	0,49	Dvostruka	126
	0,57	0,43			
UDP98-407	bp.136	0	Nema polimorfizma	Jednostruk	70
	1,00	0			

bp. – parova baza

Iz tih je razloga u ovom istraživanju varijabilnosti DNK korištena početnica UDP 97-402, kod koje se

dobila očekivana heterozigotnost. Prosječna heterozigotnost za sve populacije iznosi 0,49 (Tab. 4.). Najveću

unutarpopulacijsku heterozigotnost imala je populacija Kakanj (0,50), dok najmanju pokazuje populacija Ilijaš (0,48) (Tab. 5.).

Kao što je uočena varijabilnost između populacija, tako je zabilježena i varijabilnost u samim populacija-

ma, što se može vidjeti iz tablice 6. Najveću heterozigotnost pokazalo je stablo broj 45 i 58 iz populacija Ilijaš i Kakanj (0,50). Najmanju heterozigotnost ima stablo broj 18 iz populacije Mrkovići.

Tablica 5. Dobivene frekvencije alela i njihova heterozigotnost u populacijama.

Table 5 The frequencies of the alleles and heterozygosity in the populations

Populacija <i>Population</i>	Broj stabala za analizu <i>No. of trees for the analysis</i>	Aleli sa veličinom bp <i>Allels with size bp</i>		Heterozigoti <i>Heterozygoty</i>
		1	2	
		139 bp	151 bp	
Mrkovići	31	0,58	0,42	0,49
Ilijaš	15	0,60	0,40	0,48
Kakanj	23	0,52	0,48	0,50

Tablica 6. Frekvencije i heterozigotnost stabala u populacijama.

Table 6 Frequencies of the allels and heterozygoty in the trees.alleles

Populacija <i>Population</i>	Broj i šifra stabla <i>No. trees</i>	Broj analiziranih embriona <i>No. of trees for the embrion</i>	Aleli sa veličinom bp <i>Allels with size bp</i>		Heterozigoti <i>Heterozygoty</i>
			1	2	
			139 (bp)	151 (bp)	
Mrkovići	Stablo 1. (8)	8	0,57	0,43	0,49
	Stablo 2. (18)	8	0,62	0,38	0,35
	Stablo 3. (28)	8	0,75	0,25	0,38
Ilijaš	Stablo 1. (38)	8	0,75	0,25	0,38
	Stablo 2. (45)	8	0,50	0,50	0,50
Kakanj	Stablo 1. (58)	8	0,50	0,50	0,50
	Stablo 2. (68)	8	0,37	0,63	0,47
Domaća trešnja	Stablo 1. (70)	8	0,37	0,63	0,47

Ekološka valencija vrste nasljedna je karakteristika, odnosno njezina je sposobnost prilagodbe određena nasljednom osnovom ili genomom biljke.

Pomoću prikazanih genetičkih parametara, razlike između populacija ili unutar populacija obično bivaju vidljive i jasne, ali u ovom slučaju su male. Mogući su uzroci tih malih različitosti, osim prirodne selekcije i antropogena djelovanja te razvojni čimbenici ili procesi prilagođavanja na određene ekološke uvjete.

To proizlazi iz činjenice da je područje središnjih Dinarida vrlo specifično kada su posrijedi uvjeti okoliša, jer na vrlo malom prostoru postoji velika varijabilnost klimatskih, edafskih, orografskih i drugih čimbenika koji izravno utječu na diferencijaciju različitih ekotipova. Iako stručnjaci smatraju da vrste šumskog drveća s područja Dinarida pokazuju veliku varijabilnost, u usporedbi s istim vrstama sa sjevera, u slučaju divlje trešnje nismo mogli to zaključiti.

Dobivena mala varijabilnost dobivena je samo srednju Bosnu, dok u drugim područjima nije izvršeno slično istraživanje.

Može se izvesti zaključak da postoje male razlike između populacija iz različitih ekoloških niša, odnosno

da razlike u ekologiji staništa uvjetuju genetičku diferencijaciju među populacijama, a da se te razlike ne mogu dobro registrirati pomoću korištenih genetičkih markera (mikrosatelita). Za razliku od molekularnih analiza, rezultati koje je na morfološkoj razini dobio Ballian (2000, 2002) pokazuju postojanje razlika unutar i između populacija.

Pomoću postupka mikrosatelitske DNK analize možemo vidjeti samo mali dio populacijske genetičke informacije, a velik dio ostaje nedostupan. Ovo nas upućuje da je potrebno usmjeriti istraživanja ka iznalaženju novih početnica.

Ostaje ipak i problem da li jedinke divlje trešnje stupaju u križanje s domaćom trešnjom, i na koji način, ili je to pak ta povezanost uvjetovana njihovim ranijim križanjima.

Broj biljaka koje predstavljaju populaciju ipak ostaje upitan, jer se pojavljuje problem subjektivnosti pri uzimanju uzorka, odnosno u broju biljaka koje predstavljaju populaciju. Međutim, samo to povećanje broja uzoraka zahtijevalo bi smanjenje broja populacija, jer se uvijek postavljaju limitirajući čimbenici, kao što je vrijeme potrebno za istraživanje i laboratorijski kapacitet.

ZAKLJUČCI

1. Modifikacijom originalnog recepta za ekstrakciju DNK naspram veličini embriona postignut je dobar rezultat u ekstrakciji, tako da je ova modifikacija uspješna za ekstrakciju DNK iz embrija u sjemenu.
2. U ovom istraživanju samo je jedan par početnica iskazao polimorfizam, i na tom marker lokusu bila su samo dva alela. Kod primjene početnice UDP97-402 (F i R) registrirali smo samo dva alela, s veličinom od 139 i 151 parova baza (pb), kao što je dobiveno i u ranijim istraživanjima.
3. Divlja trešnja, kao i sorta domaće trešnje "Alica" nisu pokazale značajnu varijabilnost, što se slaže s rezultatima ranijih istraživanja.
4. Rezultati istraživanja ukazuju da između populacija divlje i pitome trešnje (cv. "Alica") ne postoji velika razlika u strukturi mikrosatelitske DNK.
5. Mala genetička varijabilnost, kako unutarpopulacijska tako i međupopulacijska mogu nam olakšati aktivnosti na poslovima zaštite i očuvanja genofonda divlje trešnje.
6. Buduće aktivnosti na molekularnoj razini treba usmjeriti ka iznalaženju pogodnijih mikrosatelita, za istraživanje genetičke varijabilnosti divlje trešnje, s obzirom da kod morfoloških istraživanja pokazuje veliki unutarpopulacijski varijabilitet.

LITERATURA:

- Ballian, D. (2000): Početna istraživanja varijabilnosti morfoloških svojstava sjemena divlje trešnje (*Prunus avium* L.), Šum. list br. 5–6/2000, str. 271–278, Zagreb.
- Ballian, D. (2002): Variability of characteristics of the wild cherry blossom (*Prunus avium* L.) in the region of central Bosnia, *Annales forestales*, 25/2, 1–19, Zagreb.
- Cipriani, G., G. Lot, W. G. Huang, M. T. Marrazzo, E. Peterlunger, R. Testolin, 1999: AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach (*Prunus persica* L. Batsch.): isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics*. 99: 1–2, 65–72.
- Gerlach, H. K., R. Strosser, (1997): Patterns of random amplified polymorphic DNAs for sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivar identification. *Angewandte Botanik* 71: 5–6, 212–218.
- Gerlach, H. K., R. Strosser, (1998): Chain reactions in fruit cultivation: cultivar identification with the aid of DNA fingerprinting. *Erwerbsobstbau* 40: 4, 103–106.
- Gerlach, H. K., R. Strosser, J. Ystaas, (1998): Sweet cherry cultivar identification using RAPD derived DNA fingerprints. *Acta Horticulturae* 468, 63–69.
- Hormaza, J. I. (1999): Early selection in cherry combining RAPDs with embryo culture. *Scientia Horticulturae* 79: 1–2, 121–126.
- Iezzoni, A. F., A. M. Hancock, C. R. Hampson, R. L. Anderson, R. L. Perry, A. D. Webster (1996): Chloroplast DNA variation in sour cherry. *Acta Horticulturae* No. 410, 115–120.
- Lefort, F., C. G. Douglas, 1999: An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. *Ann. For. Sci.* 56, 259–263.
- Levi, A., L. J. Rowland, J. S. Hartung, (1993): Production of reliable randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers from DNA of woody plants. *Hort. Science*, 28: 12, 1188–1190.
- Malusa, E. (1993): Molecular biology in phylogenetic studies. Evolution and development of cherry species. *Rivista di Frutticoltura e di Ortofloricoltura* 55: 5, 110–112.
- Malusa, E., A. Marchesini, (1993): A new method to study the genetic variation of vegetals for breeding purposes. Note i: study on *Prunus*. *Fitoterapia* 64: 5, 427–432.
- Malusa, E., S. Sansavini, (1993): Investigation on the interspecific relations of cherry species by means of restriction fragment length polymorphism (RFLP) of chloroplast DNA. *Agro Bio Frut*, 203–208.
- Malusa, E., S. Sansavini, (1995): Phylogenetic analysis of *Prunus* species with RAPDs. *Agro Bio Frut – Italia* 6 maggio 1994, 145–149.
- Rogers, S. O. 1997: Molecular biology techniques, EFB 601 laboratory manual. 3rd edition.
- Saiki, R. K. 1990: Amplification of genomic DNA. In: *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Ed. Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sininsky, J.J.; White, T.J. San Diego, Academic Press, 13–20.

SUMMARY: The variability of the populations of the Prunus avium and their relationship with the Prunus avium cv. "Alica" was researched based on the genomic characteristics of the DNA. The material for this research was collected from 69 trees in the Central Bosnia area where 3 populations have been chosen (Mrkovici, Ilijas and Kakanj). For the extraction of the DNA we have used the procedure described by Rogers (1997) but it has been slightly modified based on the size of the embryos. For the PCR analysis the already known microsatellites were used as per Cipriani et al. (1999). For the extraction of DNA from the embryo quite a good result was achieved.

In this research, only one pair of the primers has been acceptable which in turn points to the conclusion that in the research of the DNA of the Prunus avium by the microsatellites further developments are needed in the research of the sources of the acceptable primers.

In the use of the primer UDP 97-402 (F and R) it has been registered that there were only 2 alleles size of which being only 139 and 151 (pb) which was also found in the earlier researches by other authors.

The mentioned research of the both Prunus avium and variety "Alice" haven't shown any substantial interpopulation or for population variability which also agrees with the findings of other authors who have done these researches on the wild cherry.