

Мирјана Шијачић-Николић¹

UDK 582.47:541.7
582.47:581.162.3

Оригиналан научни рад

ПОЛИМОРФИЗАМ ПРОТЕИНСКИХ МАРКЕРА СЕМЕНА ОМОРИКЕ ДОБИЈЕНОГ СЛОБОДНИМ ОПРАШИВАЊЕМ И САМООПРАШИВАЊЕМ

Извод: У циљу утврђивања генетичког полиморфизма и сличности односно различитости између генотипова-линија оморике у раду је примљена анализа у солима растворљивих протеина семена, при чему смо пошлели од претпоставке да они могу бити довољно информативни генетички маркери и у испитивањима оморике. Имајући у виду чињеницу да је разноликост унутар линија велики резервоар генетике варијабилности, који је условљен просечном хетерозиготношћу родитеља и системом опрашивања, обављена истраживања вршена су на семени добијеном слободним опрашивањем и самоопрашивањем. Утврђени степен полиморфизма, евидентирано укрштање у сродству, међулинијска диференцијација и релативно висок степен хетерозиготности говоре о отвореном рекомбинационом систему, ограниченог карактера, који се остварује унутар генеративне семенске плантаже оморике у Годовику.

Кључне речи: оморика, полиморфизам, протеински маркери

POLYMORPHISM OF PROTEIN MARKERS OF SERBIAN SPRUCE SEEDS OBTAINED BY CROSS POLLINATION AND SELF-POLLINATION

Abstract: To determine the genetic polymorphism and the similarities i.e. the differences among Serbian spruce genotypes - lines, this study applies the analysis of in the salts soluble proteins of seeds, starting from the hypothesis that they can be sufficiently informative genetic markers also in the research of Serbian spruce.

¹ Мирјана Шијачић-Николић, доцент, Шумарски факултет, Универзитета у Београду, Кнеза Вишеслава 1,
e-mail: sijacic@ptt.yu

Taking into account the fact that intra-line variability is a great store of genetic variability, conditioned by the average parental heterozygosity and by the system of pollination, the study was carried out on the seeds obtained by cross-pollination and self-pollination. The determined degree of polymorphism, the recorded inbreeding, inter-line differentiation and a relatively high degree of heterozygosity, indicate the open recombination system of limited character, realised within the Serbian spruce seed orchard at Godovik.

Key words: Serbian spruce, polymorphism, protein markers

УВОД

Оплемењивање биљака као практична, емпиријска и научна дисциплина, базира се на откривању, идентификовању и мерењу генетичке варијабилности полазног материјала. Утврђивање разноврсности има за циљ очување и усмерено коришћење генофонда са којим располажемо, што данас представља једну од најзначајнијих активности савременог човечанства (Исајев, В., Шијачић-Николић, М. 2003).

За откривање и мерење генетичке варијабилности, унутар или између популација, провенијенција, линија или генотипова, постоје различите методе које су се током времена развијале и мењале у складу са развојем савремене науке. Данас све ове методе можемо поделити у две основне групе: методе класичне генетике и методе молекуларне генетике. Методе класичне генетике базирају се на анализи квантитативних и квалитативних својстава на макроскопском и микроскопском нивоу. Ове методе сваки генотип идентификују и проучавају кроз његов фенотипски ефекат, при чему је варијабилност између организама обично квантитативног, а ређе квалитативног карактера. Међутим, морфолошке карактеристике често могу бити подложне утицају фактора спољашње средине, што умањује експресију самог генотипа. За прецизније проучавање генетичке варијабилности данас се примењују методе молекуларне генетике, познатије као молекуларни (генетички) маркери, помоћу којих се утицај фактора спољашње средине знатно редукује, а посматра се варијабилност која је под директном генетичком контролом. (Исајев, В., Шијачић-Николић, М. 2003).

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОД РАДА

Досадашње процене генетичке варијабилности линија полусродника, односно генотипова унутар линија, које су уграђене у генеративну семенску плантажу оморике у Годовику, обављене су на бази анализе морфометријских карактеристика (Исајев, В. et al 1993, 1995, 1996, 1999; Шијачић-Николић, М. 2001; Шијачић-Николић, М., Исајев, В. 2001, 2003). У циљу утврђивања генетичког полиморфизма и сличности, односно различитости између линија и генотипова унутар линија, у раду је примењена анализа у солима растворљивих протеина семена, при чему смо пошли од претпоставке да они могу бити довољно информативни генетички маркери и у испитивањима оморике.

Имајући у виду чињеницу да је разноликост унутар линија велики резервоар генетике варијабилности, који је условљен просечном хетерозиготношћу родитеља и системом опрашивања, обављена истраживања вршена су на семену добијеном слободним опрашивањем и самоопрашивањем (Шијачић-Николић, М. 2000; Шијачић-Николић, М. et al 2000; Шијачић-Николић, М, Исајев, В.2003).

Полиморфизам протеинских маркера линија полусродника утврђен је на основу три одабрана генотипа унутар четири линије полусродника (C2; C4; B1 и D1) које припадају различитим фенотиповима: С-варијетет "serbica"; В-варијетет "semidihotomy" и D-варијетет "нана". Анализа NaCl растворљивих протеина семена оморике обављена је методом СДС-полиакриламид-гел електрофорезе, према Leamli-у (1970). За анализу добијених гелова коришћен је компјутерски програм "Analist" којим су добијени електрофореграми, на основу којих је израчунат степен (индекс) сличности, како унутар тако и између линија полусродника по формули Sheena,1972 (Младеновић-Дринић, С. 1995):

$$IS = \frac{\text{парови сличних трака}}{\text{парови сличних трака} + \text{парови различитих трака}} \cdot h \cdot 100$$

У циљу утврђивања генетичке блискости, односно удаљености између анализираних индивиду-линија полусродника, урађена је Кластер анализа на основу протеинских маркера семена индивиду из слободног опрашивања и самооплодних индивиду.

РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА СА ДИСКУСИЈОМ

На основу добијених електрофореграма може се констатовати да сви анализирани узорци имају специфичну протеинску слику. Упоредивањем броја и распореда протеинских фракција-трака, утврђен је коефицијент сличности између индивидуа из слободног опрашивања, табела 1 и самооплодних индивидуа, табела 2, на основу којих је израчунат индекс сличности унутар и између анализираних линија полусродника, табела 3 и 4.

Табела 1. Индекс сличности између индивидуа из слободног опрашивања
Table 1. Index of similarity between individuals from cross-pollination

	C2-A	C2-B	C2-C	C4-A	C4-B	C4-C	B1-A	B1-B	B1-C	D1-A	D1-B	D1-C
C2-A		54.28	69.23	73.33	67.75	73.33	41.67	45.94	42.00	61.11	54.29	57.15
C2-B			45.45	44.12	42.86	45.46	53.13	51.52	53.13	52.78	47.36	51.42
C2-C				95.83	75.00	87.50	40.63	39.39	51.52	57.57	48.57	53.13
C4-A					70.00	91.66	43.75	37.14	52.94	54.54	53.33	54.54
C4-B						85.18	34.28	40.45	50.00	58.80	52.94	50.00
C4-C							46.15	42.85	52.94	55.88	51.52	54.55
B1-A								81.48	47.05	44.44	40.00	42.86
B1-B									52.94	52.77	48.57	51.52
B1-C										83.87	80.00	83.33
D1-A											83.33	86.66
D1-B												85.42
D1-C												

Табела 2. Индекс сличности између самооплодних индивидуа
Table 2. Index of similarity between self-fertilised individuals

	1C2/A	1C2/B	1C2/C	1C4/A	1C4/B	1C4/C	1B1/A	1B1/B	1B1/C	1D1/A	1D1/B	1D1/C
C2/A	100	61,53	54,54	30,00	32,25	40,75	50,00	65,22	56,52	26,92	36,00	32,00
C2/B		100	41,37	50,00	46,67	51,85	52,17	48,15	40,00	40,00	37,04	40,74
C2/C			100	26,67	21,88	33,33	37,93	54,55	50,00	20,59	25,00	25,00
C4/A				100	66,67	32,14	36,67	29,63	31,03	40,90	31,82	52,38
C4/B					100	30,00	48,27	25,81	37,93	30,77	34,62	28,57
C4/C						100	48,15	33,33	27,59	34,78	30,77	32,00
B1/A							100	37,93	46,43	25,00	28,57	19,35
B1/B								100	48,00	24,00	33,00	26,92
B1/C									100	28,00	22,22	30,77
D1/A										100	50,00	40,00
D1/B											100	38,10
D1/C												100

Добијени подаци на нивоу индивидуа из слободног опрашивања дају врло варијабилне вредности индекса сличности, које се крећу у дијапазону од 34,28% (између индивидуе С4-В и В1-А) до 95,83% (између индивидуе С2-С и С4-А). Индекс сличности између анализираних линија полусродника израчунат на основу индивидуа из слободног опрашивања, креће се у дијапазону од 44,51% до 67,24%. Највећи индекс сличности забележен је између линија С2 и С4 и износи 67,24%, што се може објаснити припадношћу ових линија истој феногрупи. Најмањи индекс сличности забележен је код линије С4 и В1, односно линије С2 и В1 и износи 44,51%, односно 46,55%, што је највероватније последица припадности ових линија различитим феногрупама. Индекс сличности од 54,01% тј. 53,71%, између линија С4 и D1, односно С2 и D1, који се може сматрати значајним, може се тумачити на два начина: (1) сличном генетичком конституцијом линија феногрупе "С" и "D"; (2) положајем ових линија у семенској плантажи, при чему се оне међусобно граниче, па се може претпоставити да је дошло до међусобног опрашивања на границама ових линија. Израчуната унутарлинијска сличност показује релативно високе вредности и креће се у дијапазону од 61,76% (код линије 1С2) до 85,00% (код линије 1D1). Индекс сличности на нивоу линија, показује највећу унутарлинијску сличност код линија 1С4 и 1D1, код којих индекс сличности износи 80,83%, односно 85,00%, док је индекс сличности унутар линија В1 и С4 нешто мањи и износи 64,26%, односно 61,76%.

Посматрано на нивоу самооплодних индивидуа, најмање вредности индекса сличности констатоване су између индивидуа В1/1 и D1/4 и износе 19,35%. Највеће вредности овог индекса констатоване су између индивидуа исте линије С4/1 и С4/2 (66,67%), С2/1 и С2/2 (61,53%), односно између индивидуа различитих линија С2/1 и В1/3 (65,22%), што је највероватније последица специфичности њихових генетских структура. Израчунато на нивоу линија, индекс сличности између самооплодних стабала унутар линија полусродника има врло уједначене вредности: 42,93% (линија С4), 44,12% (линија В1) и 42,70% (линија D1). Само је код линије С2 забележен индекс сличности који има нешто већу вредност (52,48%). Индекс сличности између линија полусродника, израчунат на основу самооплодних индивидуа, креће се у дијапазону од 26,43%, између линије В1 и D1, до 50,56%, између линија С2 и В1.

Табела 3. Индекс сличности између линија полусродника израчунаји на основу индивидуа из слободног опрашивања

Table 3. Index of similarity among half-sib lines calculated on the basis of cross-pollinated individuals

	1C2	1C4	1B1	1D1
1C2	61,76	67,24	46,54	53,71
1C4		80,83	44,51	54,01
1B1			64,26	58,61
1D1				85,00

Табела 4. Индекс сличности између линија полусродника израчунаји на основу самооплодних индивидуа

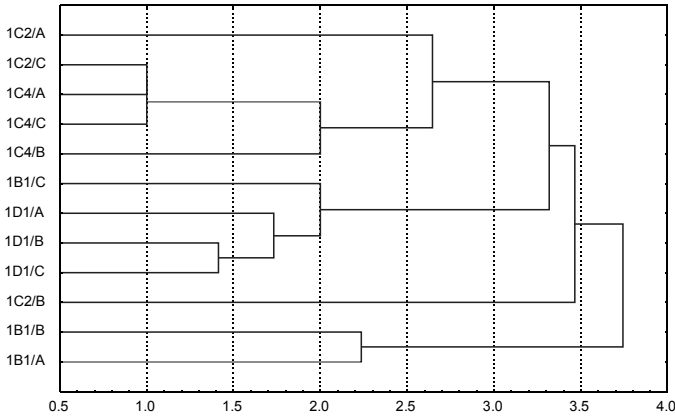
Table 4. Index of similarity among half-sib lines calculated on the basis of self-fertilised individuals

	1C2	1C4	1B1	1D1
1C2	52,48	37,04	50,56	31,47
1C4		42,93	35,37	35,18
1B1			44,12	26,43
1D1				42,70

На основу анализе протеинских маркера семена индивидуа из слободног опрашивања и самооплодних индивидуа, урађена је Кластер анализа у циљу утврђивања генетске блискости-удаљености између анализираних линија полусродника.

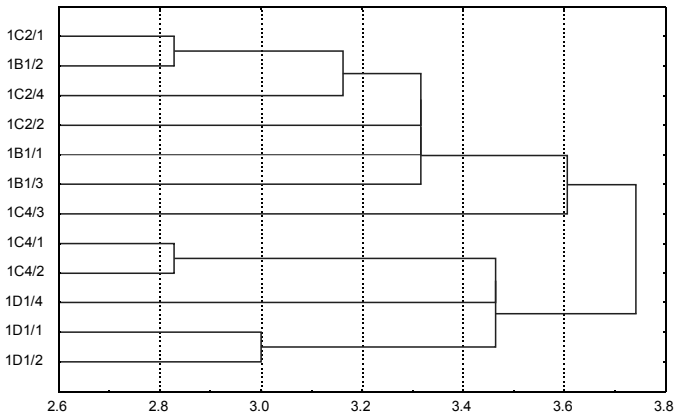
На основу дендрограма Кластер анализе, који је урађен на основу анализе протеинских маркера семена индивидуа из слободног опрашивања, графикон 1, може се констатовати да се анализирани линије полусродника групишу у три хомогене групе. Прву хомогену групу чине индивидуе линије В1, другу индивидуе линије D1, док је трећа хомогена група највећа и чине је индивидуе линије С2 и С4. Овако разврстане индивидуе, по хомогеним групама, које истовремено представљају линије полусродника, говоре у прилог употреби протеинских маркера у циљу утврђивања генетичке дистанце између анализираних материјала.

На основу дендрограма Кластер анализе, који је урађен на бази анализе протеинских маркера семена самооплодних индивидуа, графикон 2, може се констатовати да се самооплодне индивидуе групишу у четири хомогене групе, које у потпуности одговарају анализираним линијама полусродника. На највећој удаљености групишу се самооплодна стабла линије С2 и D1, док се стабла линије В1 и С4 налазе на прелазу између ове две хомогене групе. Изузетак показује једино самооплодно стабло В1/2, које показује већу сличност са стаблима линије 1C2 него са стаблима матичне линије.



Графикон 1. Дендрограм класиџер анализе урађен на основу протеинских маркера, на нивоу индивидуа из слободног оџрацивања

Figure 1. Cluster analysis dendrogram based on protein markers, at the level of cross-pollinated individuals



Графикон 2. Дендрограм Класиџер анализе урађен на основу протеинских маркера, на нивоу самооџлодних индивидуа

Figure 2. Cluster analysis dendrogram based on protein markers at the level of self-fertilised individuals

ЗАКЉУЧАК

Компаративном анализом података, добијених на основу анализе у солима растворљивих протеина семена индивидуа добијених слободним опрашивањем и самоопрашивањем, може се констатовати да на индивидуалном нивоу, индекс сличности показује веће вредности код стабала слободног опрашивања него код самооплодних стабала. Посматрано на нивоу линија полусродника, индекс сличности показује веће вредности уколико је израчунат на основу слободног опрашивања, него код самооплодње.

На основу дендрограма Кластер анализе, може се констатовати да се другачије групише индивидуе добијене слободним опрашивањем од оних добијених самооплодњом. Наиме, код слободног опрашивања и код самоопрашивања анализирани индивидуе се групишу по хомогеним групама које одговарају линијама полусродника, само је разлика у распореду хомогених група тј. линија. Код слободног опрашивања, на највећој генетичкој дистанци се групишу индивидуе линије 1C2 и 1B1, док се индивидуе линије 1C4 и 1D1, налазе на прелазу. Код самоопрашивања ситуација је нешто другачија. На највећој генетичкој дистанци групишу се индивидуе линије 1C2 и 1D1, док се индивидуе линије 1B1 и 1C4 налазе на прелазу. Добијени подаци на основу самоопрашивања дају најбољу слику генетичке блискости, односно удаљености између анализираних стабала-генотипова односно линија, јер су последица генотипа сваке индивидуе. Код слободног опрашивања, просторном изолацијом анализираних стабала добијен је извесан степен укрштања у сродству, који је у сваком случају знатно мањи од инбридинга добијеног самоопрашивањем, па је груписање индивидуа тј. линија одраз не само генотипа, него и карактера опрашивања односно положаја у семенској плантажи. Највећа генетичка дистанца између индивидуа линије 1C2 и 1B1 последица је, не само различитих генотипова ових индивидуа, него и просторне изолације између њих. Линије 1C2, 1C4 и 1D1 су граничне линије, што је могло довести до међулинијског опрашивања, што за последицу има груписање ових индивидуа у непосредној близини.

Утврђени степен полиморфизма, евидентирано укрштање у сродству, међулинијска диференцијација и релативно висок степен хетерозиготности говоре о отвореном рекомбинационом систему, ограниченог карактера, који се остварује унутар генеративне семенске плантаже оморике у Годовику. Особности отвореног рекомбинационог система у коначном утичу на превођење потенцијалне у слободну променљивост, а тиме и на повећање репродуктивности новооснованих културних заједница (Туцовић, А. et al 2003).

ЛИТЕРАТУРА

- Исајев, В., Туцовић, А., Матаруга, М., Шијачић-Николић, М. (1996): Променљивост развоја 50 халф сиб линија оморике (*Picea omorika* /Панс./ Пуркуне) у семенској плантажи на станишту Quercetum frainetto-ceris с.л. 5 Конгрес Еколога, 22-27. септембар Београд.
- Исајев, В., Туцовић, А., Шијачић-Николић, М. (1995): Међуфамилијарни варијабилитет уroda оморике (*Picea omorika* /Панс./ Пуркуне) из семенске плантаже у Годовику. II Симпозијум о флори Србије. 03.06. Врање.
- Исајев, В., Шијачић, М. (1993): Варијабилност биомасе петогодишњих садница полусродника оморике. Зборник радова са III Симпозијум о флори Југоисточне Србије, књига 3. Примењена ботаника Пирот. п.79-89.
- Исајев, В., Шијачић-Николић, М. (1999.): Variability of Flowering Abundance ин Србин Спруце (*Picea omorika* /Панц./ Пуркуне) Plantations Established at Diferent Sites. Book of Abstracts from VIII European Ecological Congress. September 18-23, Halkidiki Greece, 163.
- Исајев, В., Шијачић-Николић, М. (2003): Практикум из генетике са оплемењивањем биљака. Београд-Бања Лука, 1-240
- Leamml, U.K. (1970): Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, p. 227, 680.
- Младеновић-Дринић, С. (1995): Молекуларни маркери у предвиђању хетеротичног ефекта код кукуруза (*Zea mays* L.). Докторска дисертација, Нови Сад, 1-130

- Туцовић, А., Исајев, В., Матаруга, М. (2003): Карактеристике биолошке репродукције у семенским објектима дрвећа. Зборник радова са научног скупа са међународним учешћем: Перспективе развоја шумарства, Бања Лука, 171-182
- Шијачић-Николић, М. (2000): Анализа генетског потенцијала генеративне семенске плантаже оморике (*Picea omorika* /Panc./ Purkyne) применом контролисане хибридизације линија полусуродника. Докторска дисертација, Београд, 1-166
- Шијачић-Николић, М., Исајев, В., Константинов, К., Младеновић-Дринић, С. (2000): Полиморфизам протеинских маркера код халф-сиб линија оморике. Гласник Шумарског факултета, Шумарски факултет, Београд, бр.83, 179-184
- Шијачић-Николић, М., Исајев, В. (2001): Морфолошко-физиолошки параметри полена оморике (*Picea omorika* /Panc./ Purkyne) значајни за блиску хибридизацију. Гласник Шумарског факултета, бр.84, Београд, 85-91
- Sijacic-Nikolic, M., Isajev, V. (2003): Genetic distance between parent genotypes of Serbian spruce (*Picea omorika* /Panc./ Purkyne) and their hybrids using protein markers. Proceedings of scientific papers. Bulgarian Academy of Science. Sofia, 49-53
- Sijacic-Nikolic, M., Isajev, V. (2003): Variability of yield quantity and quality at the level of half-sib lines. Third Balkan Botanical Congress. Book of Abstracts. Sarajevo, Bosnia and Herzegovina.