

Izoenzimski polimorfizam sorti šljive

Dragan Nikolić, Dragan Milatović, Vera Rakonjac, Dejan Đurović, Boban Đorđević

Poljoprivredni fakultet, 11080 Zemun, Nemanjina 6, Srbija
E-mail: nikolicd@agrif.bg.ac.rs

Primljeno: 8. marta, 2009; prihvaćeno: 1. jula, 2009.

Rezime. Proučavan je polimorfizam izoenzima kod 43 standardne i 9 autohtonih sorti koje pripadaju grupi heksaploidnih šljiva (*Prunus domestica* L. i *Prunus insititia* L.). Analizirano je pet enzimskih sistema: kisele fosfataze (ACP), alkohol dehidrogenaze (ADH), glutamat oksaloacetat transaminaze (GOT), menadion reduktaze (MNR) i peroksidaze (PRX) metodom vertikalne elektroforeze na poliakrilamidnom gelu. Polimorfizam je utvrđen za četiri enzimska sistema (ACP, ADH, GOT i PRX) kod kojih je izdvojeno šest polimorfni lokusa. Od proučavanih sorti 19 je imalo unikatne zimograme, dok su preostale 33 sorte bile podeljene u 12 grupa. Primenom klaster analize dobijen je dendrogram na kome se mogu izdvojiti tri grupe srodnih sorti. Dobijeni rezultati pokazuju da proučavani enzimski sistemi mogu biti korisni za identifikaciju sorti šljive. Veća efikasnost u razdvajanju dobijena je kod autohtonih u odnosu na standardne sorte. Među ispitivanim izoenzimima najveći uticaj na razdvajanje sorti šljive su imale peroksidaze.

Gljučne reči: *Prunus domestica*, *Prunus insititia*, sorta, izoenzimi, poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE), klaster analiza

Uvod

Karakterizacija i identifikacija vrsta i sorti roda *Prunus* često je zasnovana na morfološkim i fiziološkim osobinama (Martínez-Gómez et al., 2003). Zbog teškoća koje se javljaju u radu sa biljkama koje imaju dug juvenilni period, velike dimenzije i heterozigotnu prirodu, ove osobine nisu uvek pouzdani pokazatelji. Pored toga, na neke od tih osobina veliki uticaj imaju i faktori spoljašnje sredine. Ovi problemi mogu se prevazići korišćenjem različitih vrsta molekularnih markera, a upravo izoenzimi su bili jedni od prvih genetičkih markera u pomologiji i oplemenjivanju voćaka (Peirce i Brewbaker, 1973; Torres, 1989).

Zahvaljujući svojim osobinama kao što su monogeno nasleđivanje, kodominantna ekspresija, odsustvo interakcija među genima, mogućnost analize u

različitim biljnim organima i tkivima i relativno jednostavna analitička procedura izoenzimima su široko korišćeni u genetici i oplemenjivanju biljaka (Weeden i Wendel, 1989; Bretting i Widrlechner, 1995). Primenu su našli u: karakterizaciji i identifikaciji sorti i podloga, identifikaciji međuvrskih hibrida, određivanju filogenetskih odnosa među vrstama, verifikaciji roditeljskih parova, markiranju gena, analizi genetičke varijabilnosti u prirodnim populacijama i kreiranju genskih mapa (Torres, 1989; Martínez - Gómez et al., 2003). Proučavanjem izoenzimskog polimorfizma kod četiri vrste roda *Prunus*, Byrne (1989) je utvrdio da je on bio najveći kod japanske šljive i badema, koje su stranopodne vrste, zatim kod kajsijske, dok je varijabilnost bila najmanja kod breskve kao izrazito samoopodne vrste.

Izoenzimski polimorfizam kod šljive je relativno malo proučavan, a većina istraživanja je obavljena kod

diploidnih šljiva. Byrne i Littleton (1988) su utvrdili da su sorte japanske šljive pokazale visok izoenzimski polimorfizam jer je šest od osam proučavanih enzimskih sistema bilo varijabilno. Bošković (1990) je ispitivao izoenzimski polimorfizam kod autohtonih šljiva belog ploda uporedo sa sortama *P. domestica* i *P. insititia* i na osnovu dobijenih rezultata je zaključio da belošljive predstavljaju heterogenu grupu, u kojoj većina proučavanih genotipova ima veću srodnost sa trnošljivom, nego sa domaćom šljivom. Byrne i Littleton (1989) su proučavali šest izoenzima sa ciljem pronalazjenja najpogodnijih markera za ranu identifikaciju „plumcot“ hibrida (*P. salicina* x *P. armeniaca*), a najpogodniji od njih su bile PRX. Kao dobre markere za identifikaciju „plumcot“ hibrida Manganaris et al. (1999) navode PRX, ACP i SKD. Pashkoulov et al. (1995) su analizirali sedam enzimskih sistema kod sorti i hibrida domaće šljive (*P. domestica*) i uočili su varijabilnost samo kod PRX.

Cilj ovog rada je bio da se ispita polimorfizam izoenzima kod većeg broja sorti šljive i oceni njegov značaj za identifikaciju sorti.

Materijal i metode

Proučavane su 43 standardne i 9 autohtonih sorti koje pripadaju grupi heksaploidnih šljiva (*Prunus domestica* L. i *Prunus insititia* L.). Sorte se nalaze u kolekcionim zasadima šljive Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu i Instituta za voćarstvo u Čačku. Analizirano je pet enzimskih sistema: kisele fosfataze (ACP), alkohol dehidrogenaze (ADH), glutamat oksaloacetat transaminaze (GOT), menadion reduktaze (MNR) i peroksidaze (PRX).

Za ekstrakciju je korišćena unutrašnja kora jednogodišnjih grančica. Priprema uzoraka je izvršena u skladu sa protokolom koji su dali Bošković et al. (1994) za koštičave vrste voćaka. Analiza izoenzima je obavljena metodom vertikalne elektroforeze na aparatu „Hofer 600 SE“. U radu su korišćeni poliakrilamidni gelovi čija je koncentracija bila 8%, osim kod analize GOT, gde su korišćeni gelovi koncentracije 6%, što je omogućilo bolje razdvajanje izoformi ovog enzima. Elektroforeza se sastojala od tri faze. Prva je bila preelektroforeza u trajanju 45 minuta na 100 V. Nakon toga je obavljeno nanošenje uzoraka sa enzimskim ekstraktima u količini od 20 – 30 µl. Dru-

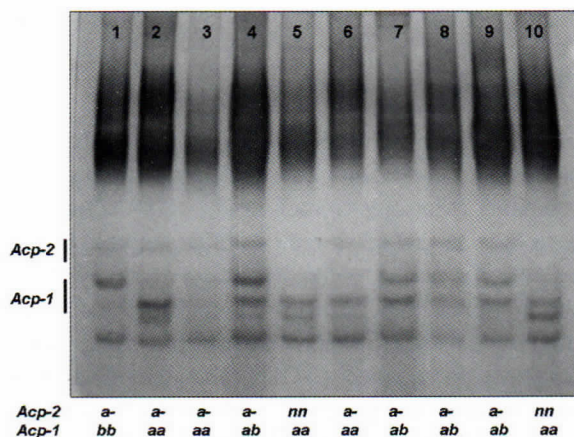
ga faza je trajala 45 minuta na 100 V. Treća faza se obavljala pri naponu od 300 – 400 V. Ona je trajala od 3 do 4 sata u zavisnosti od pokretljivosti traka analiziranih enzima. Bojenje je obavljeno prema protokolu koji su dali Bošković et al. (1994).

Za regione koji su pripisani polimorfnim lokusima predložena je genetička interpretacija. Izoenzimski aleli i lokusi su označeni u skladu sa preporukama koje su dali Weeden (1988) i Tobutt (1993). Podaci dobijeni analizom polimorfnih lokusa transformisani su u 0/1 kod i obrađeni metodom UPGA (unweighted pair group average) klaster analize i konstruisan je dendrogram. Statistička analiza je obavljena primenom programa „Statistica“ (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

Rezultati i diskusija

Od pet proučavanih enzimskih sistema polimorfizam je utvrđen za četiri (ACP, ADH, GOT i PRX), dok je enzim MNR bio monomorfan. Izdvojeno je ukupno šest polimorfnih lokusa sa devet alela. Predložene genetičke interpretacije za polimorfne lokuse treba smatrati uslovnim, obzirom da nisu praćene ukrštanjem i analizom razdvajanja u potomstvu.

Kisele fosfataze (ACP). Izdvojena su dva polimorfna lokusa (Sl. 1). Lokus koji je označen sa *Acp-1* imao je

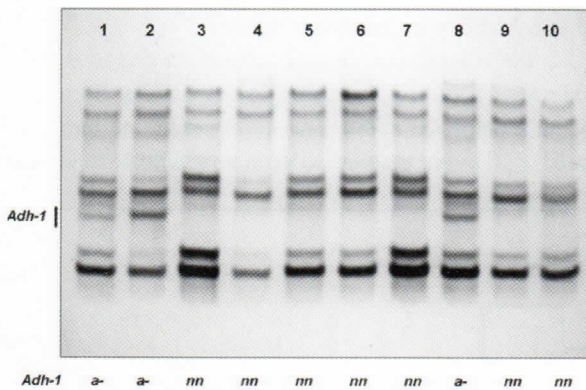


Sl. 1. ACP genotipovi ispitivanih sorti šljive sa predloženom genetičkom interpretacijom: Jojo (1), Boranka (2), Požegača (3), Toper (4), Minerva (5), Tophit (6), Belošljiva (7), Elena (8), Krupna zelena renkloda (9) i Hanita (10)

ACP genotypes of analysed plum cultivars with proposed genetic interpretation

dva alela (*a* i *b*) i tri različita genotipa (*aa*, *bb* i *ab*). Genotip *aa* imalo je 20 sorti, genotip *bb* dve, a genotip *ab* 30 sorti šljive. Lokus *Acp-2* imao je samo dva genotipa: sa prisutnom trakom (*a-*) koji je ustanovljen kod 29 sorti ili odsustvom aktivnosti (*nn*) karakterističnoj za preostale 23 sorte.

Alkohol dehidrogenaze (ADH). Uočene su tri zone aktivnosti (Sl. 2). Iako je u svima zapažen polimorfizam, u dva regiona razlike između sorti nisu mogle biti precizno određene, tako da oni nisu uzeti u razmatranje. Kao polimorfan izdvojen je lokus *Adh-1* sa dva geno-



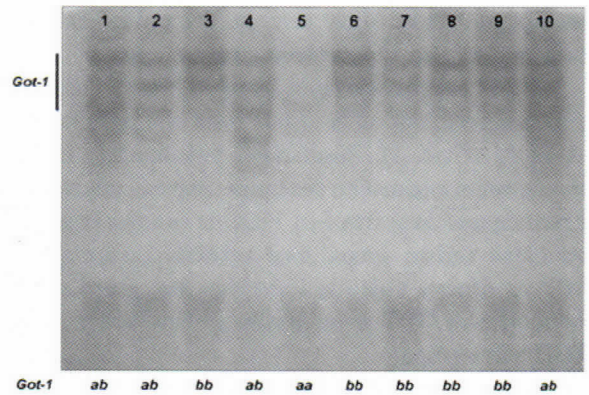
Sl. 2. ADH genotipovi ispitivanih sorti šljive sa predloženom genetičkom interpretacijom: Čačanska rodna (1), Nansijska mirabela (2), Tmovača (3), Ontario (4), Papračanka (5), Valjevka (6), Bardaklija (7), Vangenhajmova (8), Rut Geršteter (9) i Cimerova (10)

ADH genotypes of analysed plum cultivars with proposed genetic interpretation

tipa *a-* (29 sorti) i *nn* (23 sorte).

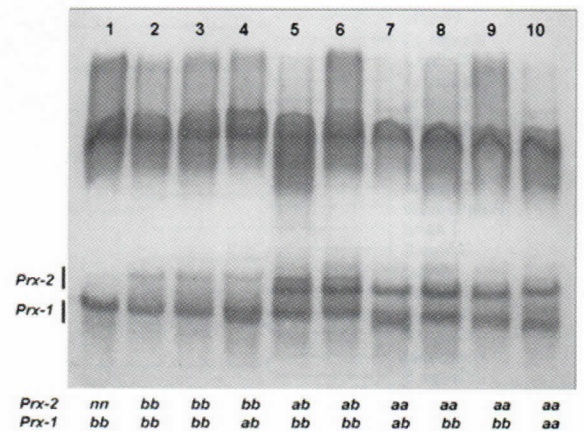
Glutamat oksaloacetat transaminaze (GOT). Uočen je jedan polimorfan region, sa dva homozigotna genotipa (*aa* i *bb*) koji su dali po jednu traku i jednim heterozigotnim genotipom (*ab*) koji je dao tri trake (Sl. 3). Ovakav raspored traka karakterističan je za enzime sa dimernom strukturom. Dimernu strukturu GOT uočili su i Milatović *et al.* (2009) kod kajsije. Najveći broj sorti šljive, njih 43, su bile heterozigotne za ovaj lokus, 8 sorti je bilo homozigotno za alel *a*, a samo jedna sorta je imala genotip *bb*.

Peroksidaze (PRX). U zoni aktivnosti bliže anodi uočena su dva polimorfna lokusa *Prx-1* i *Prx-2* (Sl. 4). Za lokus *Prx-1* predložena su tri genotipa i to: *aa* (2 sorte), *bb* (47 sorti) i *ab* (3 sorte), a za lokus *Prx-2* četiri genotipa: *aa* (13 sorti), *bb* (14 sorti), *ab* (24 sorte) i *nn* (1 sorta). Dva lokusa za peroksidaze (*Prx-1* i *Prx-C*)



Sl. 3. GOT genotipovi ispitivanih sorti šljive sa predloženom genetičkom interpretacijom: Boranka (1), Minerva (2), Belošljiva (3), Krupna zelena renkloda (4), Katinka (5), Dragačevka (6), Valerija (7), Požegača (8), Čačanska najbolja (9) i Ekskalibur (10)

GOT genotypes of analysed plum cultivars with proposed genetic interpretation



Sl. 4. PRX genotipovi ispitivanih sorti šljive sa predloženom genetičkom interpretacijom: Petrovača (1), Aženka 707 (2), Avalon (3), Crnošljiva (4), Valerija (5), Čačanska rodna (6), Ontario (7), Valor (8), Kalifornijska plava (9) i Nansijska mirabela (10)

PRX genotypes of analysed plum cultivars with proposed genetic interpretation

kod proučavanih sorti šljive opisali su i Manganaris *et al.* (1999). Prema njihovim rezultatima polimorfizam je uočen u lokusu *Prx-1* dok je *Prx-C* bio monomorfna, što je delimično saglasno rezultatima našeg rada. Nepotpuna podudarnost rezultata može se tumačiti time što su Manganaris *et al.* (1999) proučavali diploidne sorte šljive, dok su sorte šljive proučavane u našem radu heksaploidne. Pashkoulov *et al.* (1995) su kod

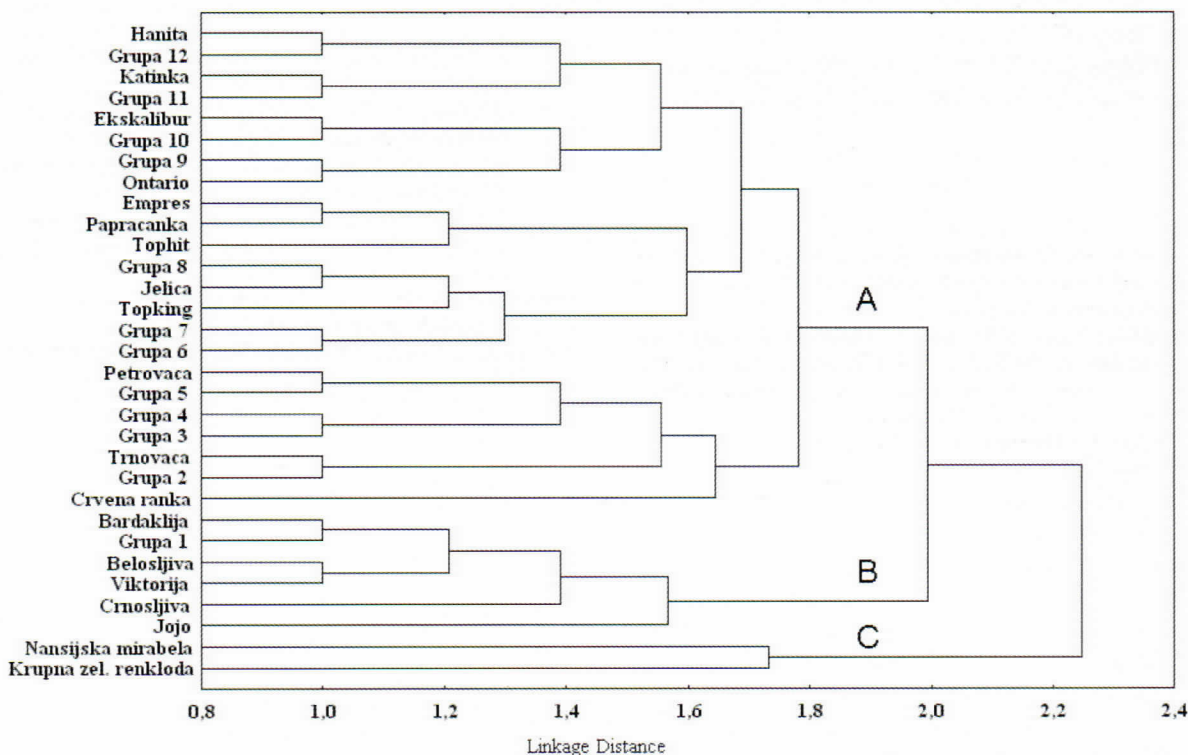
heksaploidnih sorti šljive izdvojili dva polimorfna lokusa za PRX, što je potvrđeno u našem radu.

Od 52 proučavane sorte šljive 19 je imalo unikatne zimograme, dok su preostale sorte bile podeljene u 12 grupa (Graf. 1). Posmatrano pojedinačno, među proučavanim enzimskim sistemima najveću efikasnost u razdvajanju sorti imali su PRX na osnovu kojeg je izdvojeno sedam grupa sorti različitih genotipova i ACP na osnovu kojeg je izdvojeno šest grupa sorti. Polimorfizam GOT je omogućio podelu sorti u tri, a ADH u dve grupe.

Uzimajući u obzir istovremeno sve polimorfne lokuse, primenom hijerarhijske klaster analize konstruisan je dendrogram prikazan na grafikonu 1. Proučavane sorte povezane su na različitim hijerarhijskim nivoima. Izdvojene su tri grupe srodnih sorti. Klaster A koji obuhvata najveći broj sorti (42) može se pode-

liti na tri podgrupe. Osam sorti različitih genotipova čini klaster B. Klaster C čine dve sorte (Nansijska mirabela i Krupna zelena renkloda) koje su istovremeno međusobno veoma udaljene ($d = 1,75$), a takođe su sa svim ostalim sortama povezane na najvećem nivou ($d = 2,25$). Kriterijumi klasifikacije i formiranja grupa srodnih sorti ne mogu se jasno definisati jer do formiranja klastera nije došlo u skladu sa poreklom, a takođe ni u skladu sa specifičnostima u genotipu za polimorfne lokuse. Ono što se može uočiti jeste da su veći nivo genetičke varijabilnosti pokazale autohtone u odnosu na standardne sorte, obzirom da su se rasporedile u različite grupe i podgrupe.

Treba istaći da primena izoenzima ima ograničene mogućnosti u determinaciji sorti voćaka. Sorte koje su morfološki slične i genetski srodne ne mogu se razdvojiti ovom metodom. Veće mogućnosti za identi-



Graf. 1. Dendrogram ispitivanih sorti šljive dobijen analizom polimorfnih izoenzimskih lokusa

Dendrogram of studied plum cultivars obtained by the analysis of polymorphic isoenzyme loci

Grupa 1/Group 1 – Toper, Timoćanka, Strinava; Grupa 2/Group 2 – Čačanska rodna, Dragačevka; Grupa 3/Group 3 – Opal, Herman; Grupa 4/Group 4 – Valerija, Mildora, Gabrovska; Grupa 5/Group 5 – Aženka 707, Blufri, Avalon; Grupa /Group 6 – Stenli, Vangenhajmova, Elena; Grupa 7/Group 7 – Italijanka, Valjevka, Ana Špet, Cimerova, Pacifik; Grupa 8/Group 8 – Požegača, Nevena; Grupa 9/Group 9 – Kalifornijska plava, Čačanska lepota, Boranka; Grupa 10/Group 10 – Čačanska najbolja, Altanova renkloda, Valor; Grupa 11/Group 11 – Minerva, Cerovački piskavac; Grupa 12/Group 12 – Rut geršteter, Prezident

fikaciju sorti pružaju metode koje se zasnivaju na upotrebi DNK markera (Milatović, 2005).

Zaključak

Među proučavanim enzimskim sistemima najveću efikasnost u razdvajanju sorti u grupe imali su: PRX – sedam grupa i ACP – šest grupa. Polimorfizam GOT je omogućio podelu sorti u tri, a ADH u dve grupe.

Od 52 proučavane sorte, 19 (što čini 37% od ukupnog broja sorti) se karakterisalo jedinstvenim izoenzimskim fenotipom. Veća efikasnost u razdvajanju dobijena je kod autohtonih u odnosu na standardne sorte. Od devet autohtonih sorti sedam je imalo unikatne zimograme.

Na dendrogramu se mogu izdvojiti tri klastera sa različitim brojem sorti. Klaster A je najveći i sastoji se od 42 sorte. Klaster B čini 8 sorti, a klaster C samo dve sorte (Nansijska mirabela i Krupna zelena renkloda).

Dobijeni rezultati pokazuju da proučavani enzimski sistemi mogu biti korisni za identifikaciju sorti šljive.

Literatura

- Bošković R. (1990): Izoenzimski polimorfizam autohtonih šljiva belog ploda i njihovih srodnika. Magistarski rad, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Bošković R., Tobutt K.R., Arús P., Messeguer R. (1994): Isoenzymes. In: 'Methods of molecular marker analysis in Prunus', Messeguer R. (ed.), IRTA, Barcelona, Spain, pp. 4–25.
- Bretting P.K., Widrechner M.P. (1995): Genetic markers and horticultural germplasm management. *HortScience*, 30(7): 1349–1356.
- Byrne D.H. (1989): Electrophoretic variability in four diploid stone fruits. *Acta Horticulturae*, 254: 29–34.
- Byrne D.H., Littleton T.G. (1988): Electrophoretic characterization of diploid plums of the Southeastern United States. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 113(6): 918–924.
- Byrne D.H., Littleton T.G. (1989): Interspecific hybrid verification of plum x apricot hybrids via isozyme analyses. *HortScience*, 24(1): 132–134.
- Manganaris A.G., Mainou A., Goudaras A., Ledbetter C. (1999): Identification of plum x apricot interspecific hybrids using isoenzyme polymorphism. *Acta Horticulturae*, 488: 361–368.
- Martínez-Gómez P., Sozzi G.O., Sánchez-Pérez R., Rubio M., Gradziel T.M. (2003): New approaches to *Prunus* tree crop breeding. *Food Agriculture and Environment*, 1: 52–63.
- Milatović D. (2005): Pomološke osobine i izoenzimski polimorfizam kao elementi za determinaciju sorti kajsije (*Prunus armeniaca* L.). Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Milatović D., Nikolić D., Đurović D., Milivojević J. (2009): Isoenzyme polymorphism in apricot cultivars. *Journal of the American Pomological Society*, 63(1): 14–23.
- Pashkoulov D., Givondov A., Yliev P. (1995): Isozyme variability in plum (*Prunus domestica*), and its use for cultivar and interspecific hybrid identification. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 9: 33–35.
- Peirce L.C., Brewbaker J.L. (1973): Applications of isozyme analysis in horticultural science. *HortScience*, 8(1): 17–22.
- Tobutt K.R. (1993): *Prunus* gene labeling. *Prunus Genetic Resources Newsletter*, 1: 6–8.
- Torres A.M. (1989): Fruit Trees. In: 'Isozymes in plant genetics and breeding, part B', Tanksley S.D., Orton T.J. (eds.), Elsevier, Amsterdam, Holland, pp. 401–421.
- Weeden N.F. (1988): A suggestion for the nomenclature of isozyme loci. *Research Reports*, 20: 44–45.
- Weeden N.F., Wendel J.F. (1989): Genetics of plant isozymes. In: 'Isozymes in plant biology', Soltis D.E., Soltis P.S. (eds.), Dioscorides Press, Portland, Oregon, USA, pp. 46–72.

ISOENZYME POLYMORPHISM IN PLUM CULTIVARS**Dragan Nikolić, Dragan Milatović, Vera Rakonjac, Dejan Đurović, Boban Đorđević***Faculty of Agriculture, 11080 Zemun, Nemanjina 6, Serbia**E-mail: nikolicd@agrif.bg.ac.rs***Abstract**

Isoenzyme polymorphism in 43 standard and 9 autochthonous cultivars which belong to hexaploid plums (*Prunus domestica* L. and *Prunus insititia* L.) were studied to determine the possibility of its application in cultivar determination. Five enzyme systems: acid phosphatase (ACP), alcohol dehydrogenase (ADH), glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), menadiol reductase (MNR) and peroxidase (PRX) were analysed using the method of vertical electrophoresis on polyacrylamide gel. Four systems (ACP, ADH, GOT and PRX) were polymorphic at six loci. Among the studied cultivars, 19 had unique zymograms, while the remaining 33 cultivars were divided into 12 groups.

Cluster analysis was used to construct a dendrogram and on it three clusters with different number of cultivars could be separated. Based on the obtained results it can be concluded that the studied enzymes could be useful in plum cultivar determination. Better efficiency in cultivar separation was obtained in autochthonous than in standard plum cultivars. Among studied enzymes the most useful in plum cultivar identification was peroxidase.

Key words: *Prunus domestica*, *Prunus insititia*, cultivar, isoenzymes, polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), cluster analysis