

Isajev V., Mladenović-Drinić S., Lučić A. 2008. *The use of molecular markers in the improvement of conifer tree species*. Bulletin of the Faculty of Forestry 98: 7-24.

Василије Исајев
Снежана Младеновић-Дринић
Александар Лучић

UDK: 630*165:582.47
Прегледни рад

ПРИМЕНА МОЛЕКУЛАРНИХ МАРКЕРА У ОПЛЕМЕЊИВАЊУ ЧЕТИНАРА

Извод: У раду је дат преглед резултата примене молекуларних маркера при оплемењивању четинарских врста дрвећа. Презентовани резултати су добијени применом биохемијских и молекуларних маркера у анализама које су спроведене на нивоу одабраних популација и индивидуа различитих провенијенција четинарских врста дрвећа. Бројна истраживања спроведена последњих година потврдила су оправданост примене молекуларних маркера у конзервационој и популационој генетици четинара, посебно при тумачењу значаја праваца реколонијације у формирању генетског и географског диверзитета, као и за утврђивање значаја утацаја величине популације на флукутацију гена. Добијени резултати су од значаја за израду стратегије конзервације, али су недовољни за потпуно разумевање модела адаптације. На пољу конзервационе генетике молекуларни маркери имају посебан значај у активностима при *ex situ* и *in situ* заштити и очувању генофонда врста четинара.

Кључне речи: молекуларни маркери, шумско дрвеће, четинари

THE USE OF MOLECULAR MARKERS IN THE IMPROVEMENT OF CONIFER TREE SPECIES

Abstract: The paper reviews the study results of the use of molecular markers in coniferous tree species improvement. The results are based on presentation of the experience in the application of biochemical and molecular analyses at the level of the selected populations and individuals from different provenances of coniferous tree species. Many studies performed during the last years demonstrated the usefulness of neutral molecular markers in the field of conservation and population genetics of conifers, in particular to understand the importance of migration patterns in shaping current genetic and geographic diversity and to measure important

др Василије Исајев, ред. професор, Универзитет у Београду - Шумарски факултет, Београд
др Снежана Младеновић-Дринић, Институт за кукуруз „Земун Поље“, Београд
др Александар Лучић, Институт за шумарство, Београд

parameters such as effective population size, past bottlenecks and gene flow. This is relevant to design conservation strategies but is of little value to understand the adaptability patterns. In the specific field of the conservation genetics, molecular markers can be extremely useful in both *ex situ* and *in situ* gene pool conservation of coniferous trees.

Key words: molecular markers, forest trees, conifers

1. УВОД

Поред конвенционалних метода шумарске генетике и оплемењивања шумских врста дрвећа, у анализама интер и интра популационе варијабилности четинара, примењују се генетички и биохемијски маркери који омогућују поуздано проучавање индивидуалног и групног генетског диверзитета. Примена молекуларних маркера обухвата групе метода које су битне за поуздане анализе природе биодиверзитета шумских врста дрвећа и жбуња, које су полазна основа процеса конзервације, селекције и хибридизације. Општи циљеви, у програмима усмереног коришћења генетичког диверзитета дрвећа, у различитим фазама онтогенезе, су: повећање наследног капацитета приноса и прираста, унапређење генетичке основе квалитативних својстава и генетичке основе толерантности према неповољном биотичком и абиотичком стресу - толерантност на болести и штеточине, недостатак влаге, екстремне температуре, неповољне хемијске и физичке карактеристике и контаминације земљишта, аерозагађење и др. Универзалност њихове биолошке основе и поузданост добијених резултата, условили су да примена генетичких маркера постане једна од основних група метода које су укључене у реализацију наведених програма.

Манипулација молекуларним маркерима омогућује детаљније и прецизније упознавање природе грађе и могућности усмеравања функције гена. У свету су прихваћена открића која су усмерила истраживања од гена ка особинама, уместо од фенотипа ка генима. Према King-у генетички маркер је ген, или регион ДНК са лако препознатљивом фенотипском експресијом, који може поуздано да се користи у идентификацији ћелија носиоца генетичког маркера у организму, или као проба за обележавање једра, хромозома или локуса (Иванишевић-Милованић *et al.*, 2000).

У анализама индивидуалног и популационог генетичког диверзитета дрвећа, користе се две класе генетичких маркера - морфолошки и молекуларни маркери. Молекуларни „биохемијски“ маркери обухватају: 1. терпене, 2. полифеноле, 3. изозими, алозими, протеински комплекс, 4. ДНК маркере.

Основне карактеристике ових маркера су неутрална фенотипска експресија, кододоминантност и одсуство епистатичке интеракције између локуса који се користе као маркери (Младеновић-Дринић, 1995). Молекуларни маркери се углавном примењују у оплемењивању дрвећа, при идентификацији, локализацији, изолацији

и манипулацији гена, као и при испитивању квантитативних својстава, отпорности на болести и стресне услове.

2. РАЗВОЈ ПРИМЕНЕ МАРКЕРА У ОПЛЕМЕЊИВАЊУ ЧЕТИНАРА

У првој половини двадесетог века, у анализама варијабилности четинара, методе класичне генетике заснивале су се на анализама квантитативних и квалитативних својстава, на микроскопском и макроскопском нивоу. Највећи број морфолошких маркера откривен је проучавањем фенотипских карактеристика и опсега варирања димензија и облика вегетативних органа изданка (стабла), четина, корена, као и генеративних органа - стробила, шишарица, семена итд. Ове методе су сваки генотип идентификовале и проучавале кроз његов фенотипски ефекат, при чему је евидентирана варијабилност између индивидуа обично била квантитативног, ређе квалитативног карактера. Већина морфолошких особина код дрвећа је, као и код других организама, контролисана великим бројем гена, услед чега, није довољно поуздана као генетички маркер. На пример, висина и пречник стабала зависе од многих гена и под великим су утицајем станишта. У начелу, код дрвећа, морфолошки маркери који приказују Менделово наслеђивање су ретки. Чињеница да су морфолошке карактеристике изузетно подложне утицају фактора спољашње средине, чиме се „маскира” природа експресије самог генотипа, релативизовале су резултате обављаних анализа. При истраживањима у шумарској генетици поузданост примене морфолошких маркера је ограничена што је условило развој и примену других врста маркера, чије коришћење обезбеђује много поузданије резултате. Резултати бројних проучавања полиморфизма протеина методом електрофоретских анализа, која су у почетку вршена на генетски добро проученим врстама, као што је винска мушица *Drosophila melanogaster* и кукуруз *Zea mays*, временом су се почела обимно примењивати и код других организама, међу којима су бројне врсте шумског дрвећа. Релативно једноставан методски поступак спровођења електрофоретских анализа условили су да се генетски полиморфизам различитих група изоензима користи за проучавање и у процени генетског варијабилитета у популацијама различитих врста дрвећа.

Изозими су први пут идентификовани око 1950. године, када су, због наведених ограничавајућих фактора при примени морфолошких маркера, представљали велики напредак у студијама генетичких карактеристика популација шумског дрвећа. Изозими су вишеструке молекуларне форме ензима са сличном или идентичном каталитичком активношћу. Различите индивидуе и/или популације исте врсте могу поседовати различиту молекуларну структуру, која може бити, бар делимично, детектована помоћу гел електрофорезе. Изозими су ефикасни молекуларни маркери, са једним ограничењем, број изозимских локуса који може бити идентификовани веома је ограничен, јер се испитивања ензима генерално изводе на скробном гелу, систему ниске резолуције. Предност изозима је у томе што су они кодоминантни у природи.

Од раних 70-их година прошлог века, када су Bartles (1971) и Bergmann (1971) развили ензимску електрофорезу за смрчу, ензими, као директни производи ДНК, су врло брзо нашли широку примену и код других врста шумског дрвећа.

Применом изоензима прецизирани су миграциони процеси у пост-гласијалном периоду, код смрче *Picea abies*, јеле *Abies alba*, црног бора *Pinus nigra*, (Н и колић, 1982.). Прве студије којима је циљ била процена параметара система размножавања дрвећа, биле су реализоване коришћењем изозима. Добијени резултати су показали да дрвенасте врсте имају високе стопе укрштања ван сродства, нпр. више од 90% код смрче и код букве. Природа наслеђивања свих проучаваних изозимских локуса претходно је утврђена анализирањем хаплоидног ткива материнског мегаспорофила четинара или код full- и half-sib фамилија код скривеносеменица.

Најобухватнији преглед литературе о биљним изоензимима, који омогућују прецизно и детаљно сагледавање популационе структуре и система оплемењивања дрвећа приредили су Hamrick и Godt (1990). За израду овог прегледа, аутори су користили податке за око 322 таксона дрвећа, с циљем утврђивања интерспецијског генетског диверзитета. Карактеристике ареала врсте, (континуиран или дисконтинуиран), његове опште географске одлике као и величине локалних популација коришћени су као полазни критеријуми за утврђивање укупних генетичких варијација на нивоу врста. Дрвенасте биљке са великим природним арелима - дисконтинуирним дистрибуцијама локалних популација, системом размножавања у удаљеном сродству и механизмима дисперзије полена и семена путем ветра или животиња, одликују се вишим нивоом диверзитета у поређењу са врстама које не поседују наведене комбинације особина.

Поред примене изоензима, код дрвенастих биљака, све више се користе и биохемијски маркери, феноли, и терпени за испитивање индивидуалне и популационе варијабилности, идентификацију клона или хибрида, испитивања отпорности на различите агенсе и слично (Stevanović-Janežić *et al.*, 1993, 1994, Бојовић, 1997, Исајев, 2004, итд.). Покушаји, да се варијабилност релативне или апсолутне количине монотерпена у смоли четинара (анализиране и мерене применом гасне хроматографије) користи као генетички маркери, показали су се недовољно поузданим углавном, због потешкоћа у детерминисању начина наслеђивања и због, велике зависности њихове експресије од променљивих услова животне средине, посебно изражених при нападу патогена или при климатском стресу. Основни недостаци ових маркера су утицај станишне варијабилности, индивидуална варијабилност и комплексност.

Од почетка примене технологије рекомбинантне ДНК средином 1980-их, у анализама унутар и међу популацијом диверзитета дрвенастих биљака, број генетских маркера, за истраживања шумских врста дрвећа, растао је динамично. Софистициране методе засноване на коришћењу ДНК секвенци су супериорније у односу на протеинске или морфолошке маркере. Данас постоји велики број метода које су развијене коришћењем ДНК маркера (табела 1).

Табела 1. Неке од метода засноване на коришћењу ДНК маркера

Table 1. Some of the methods based on DNA markers

RFLP	“Restriction fragment length polymorphism”
VNTR	“Variable Number of Tandem Repeats”
RAPD	“Random Amplified Polymorphism”
DAMD	“Minisatellite-region DNA”
AP-PCR	“Arbitrary Primed PCR”
ISSR	“Inter-simple sequence repeat amplification”
DAF	“DNA Amplification Fingerprinting”
SPAR	“Single Primer Amplification Reaction”
MAAP	“Multiple arbitrarily primed PCR techniques”
AFLP	“Amplified Fragment Length Polymorphism”
SAMPLE	“A technique using micro satellite primers in conjunction with AFLP”
TGGE	“Thermal Gradient Gel Electrophoresis”
DGGE	“Denaturing Gradient Gel Electrophoresis”
CAPS	“Cleaved Amplified Polymorphic Sequence”
SSCP	“Single Strand Conformational Polymorphism”
STMS	“Sequence-tagged microsatellites”
SSR	“Simple Sequence Repeats”

Примарни услов за поузданост података добијених испитивањем структуре и функције генома коришћењем ДНК маркера је квалитет и количина нативне геномске ДНК или ДНК органела.

3. МЕТОДЕ КОРИШЋЕЊА ДНК МАРКЕРА

Међу првим методама коришћења молекуларних ДНК маркера је полиморфизам дужине рестрикционих фрагмената ДНК - RFLP. Овај метод се заснива на коришћењу генских или геномских проба познате или непознате структуре, функције и позиције у геному, комплементарних испитиваној ДНК. RFLP маркер је одређен хибридизацијом пробе и ензим специфичном дигестијом ДНК. Користе се за генетичку идентификацију генотипа, локализацију гена на хромозомима, конструкцију генетичке мапе, анализу квантитативних особина, одређивање удела генотипа родитеља у потомству и др. Мали број информација о ДНК секвенцама за већину дрвенастих врста је доступан, али је развијен већи број маркера који не захтевају знање о ДНК секвенцама.

У последњих неколико година из PCR (Polymerase Chain Reaction - ланчана реакција полимеразе) технологије развијени су нови типови маркера: RAPD, SSR,

AFLP, ISSR. Ови маркери имају низ предности као што су: једноставност и брзина саме методе, мала количина геномске ДНК која је потребна и могућност нерadioактивне визуелизације полиморфизма ДНК.

RAPD маркери су полиморфни доминатни генетички маркери, који се наслеђују по Менделовим правилима. Предности у коришћењу ових маркера су: универзални сет прајмера може бити коришћен за све врсте организма, за пренос информација једино је потребна секвенца прајмера, процес може бити аутоматизован. Једино ограничење је то што су доминантни. RAPD се користе за генетичку идентификацију генотипова.

Приликом избора генетичког маркера први услов је дефиниција информације која се тражи. При томе значајно је одабрати праву методу да би се дошло до праве информације. Метода мора бити довољно осетљива да њеним коришћењем може да се утврди жељени ниво варирања. Такође, неопходно је дефинисати да ли су потребне информације о малом или великом броју локуса. Резервни протеини дају информације за мали број локуса, а изоензими имају ограничен ниво информативности (Константинов, Младеновић-Дринић, 2000). Степен полиморфизма и да ли су маркери доминатни односно кодоминатни су важни параметри приликом избора маркера за специфичну примену. Информативност није само питање доминатности и полиморфизма већ и за шта се који подаци користе и њихова повезаност.

Избор генетичког маркера у великој мери зависи и од фазе онтогенезе у којој се врши испитивање структуре и експресије генома. Драстичне алтернативе су ткиво ендосперма и клице. У ендосперму преовладавају угљени хидрати и резервни протеини а у клици липиди и функционални протеини. Особине појединих молекуларних маркера су приказане у табели 2.

Табела 2. Поређење особина неких молекуларних маркера
Table 2. Comparison of characters of some molecular markers

	изозими isozymes	RFLP	SSR	RAPD	AFLP
Доступност	ниска	висока	средња	висока	висока
Степен полиморфизма	ниска	средња	висока	средња	средња
Локус специфичност	да	да	да	не	не
Кодоминантност алела	да	да	да	не	не
Репродуктивност	висока	висока	висока	ниска	висока
Технички захтеви	ниска	висока	средња	ниска	средња
Цена	ниска	висока	средња	ниска	средња
Неопходна количина ДНК	-	висока	ниска	ниска	средња
аутоматизација	не	не	да	да	да

Код шумских врста дрвећа и жбуња, генетички маркери се примењују у истраживањима варијација кодирајућих, некодирајућих и високо варијабилних региона, како код нуклеарних генома тако и код генома органела - хлоропласта, митохондрија. Досадашњи резултати истраживања, као и постигнути ефекти при њиховој примени у шумарској генетици и оплемењивању дрвећа указују на својства која је потребно да поседују маркери.

За проучавање ДНК маркера количина ткива је пресудана за избор маркера, нарочито када се не користи PCR техника. Четине, полен, пупољци и потпуно зрело семе и кора (по могућности делови коре са већим наслагама ксилема) могу се користити за ДНК проучавања. Хербаризовани материјал, такође, може бити коришћен за изолацију ДНК, нарочито ако није био третиран неком од хемикалија из групе формалина. Квалитет ДНК у многоме зависи од старости ткива од кога се узима узорак, тако да се са старошћу количина ткива потребног за узорак повећава. Количина узорка потребна за примену различитих метода дата је у табели 3.

За истраживања генетичке променљивости применом маркера најчешће се користи семе или вегетативна ткива. Под вегетативним ткивима се подразумевају сва ткива која директно претстављају генотип индивидуа са које је ткиво узето, нпр. лист, четине, корен, пупољак, итд.

Молекуларни маркери се примењују у анализама генетичких специфичности популација шумског дрвеће и жбуња и у конзервационој генетици на много начина, као што су:

- опис и мониторинг генетичког диверзитета - инвентаризација диверзитета је претходна етапа рада, пре него што се приступи анализама динамике диверзитета;
- идентификација кључних фактора који обликују генетички диверзитет, проучавајући систем размножавања, ток гена и динамику колонизације;
- мапирање генетске повезаности, QTL анализа (анализа локуса квантитативних особина) и селекција уз помоћ маркера (MAS);
- у сврху издавања сертификата - порекло провинијенције, семенског региона (зоне) и другог репродуктивног материјала дрвећа.

У даљем тексту даје се приказ постигнутих резултата применом генетичких маркера у оплемењивању четинара, који имају посебан значај за шумарство Србије. Део обављених истраживања, приказних у тексту, реализован је у лабораторијама за биотехнологију Института за кукуруз „Земун поље“ у Београду.

Табела 3. Количина узорка потребна за примену различитих метода
Table 3. Quantity of samples needed for the application of methods

Метода Method	Количина изоловане ДНК потребне за узорак Quantity of isolated DNA necessary for the sample
Изоензими	неколико <i>mg</i> ткива
RFLP	2-10 <i>mg</i> ДНК
SSR	10-20 <i>ng</i> ДНК
RADD	2-10 <i>ng</i> ДНК
AFLP	0,2-1 μ g ДНК
STS/EST	10-20 <i>ng</i> ДНК

Анализа у солима растворљивих протеина семена оморике *Picea omorika* / Рапч./Purkyně) обављена је, у лабораторији за Битехнологију Института „Земун поље“ у Земуну, методом SDS-полиакриламид гел-електрофорезе према Leamli-ју, (Шијачић-Николић, 2001). За анализу гелова коришћен је компјутерски програм „Analyst“ и добијени електрофореграми су коришћени за даља проучавања. На основу електрофореграма родитељских индивидуа и њихових хибридних комбинација, израчунат је индекс сличности између мајке и хибрида, оца и хибрида и између родитељских индивидуа. Електрофореграми родитељских индивидуа и хибридни комбинација садржавале су: - траке наслеђене од мајке; - траке наслеђене од оца; - траке специфичне само за хибрид; - траке специфичне само за родитељске индивидуе и - траке заједничке за оба родитеља. Генетичка дистанца између анализираних материјала одређена је на основу кластер-анализе.

У циљу ближег упознавања природе генетског варијабилитета црног бора (*Pinus nigra* Arnold), чије се микропопулације и појединачна стабла јављају на литицама клисура и кањона Таре, Сутјеске и Дрине, обављена су истраживања компаративном мултифакторијалном анализом линија полусродника (Матаруга, 2004). У лабораторијама Института за кукуруз „Земун поље“ обављено је више анализа. У циљу упознавања могућности клијања семена при мање доступној количини воде постављен је оглед наклијавања семена на 4% раствору сахарозе. Као показатељ генетичке специфичности испитиваног материјала, на узорку од 25 клијаваца сваког тест стабла, урађене су анализе протеинских маркера по методу Wang-а и сарадника (1994). Висок степен генетске контроле адаптације стабала за раст на оваквим теренима од значаја је за усмерену производњу семена и садног материјала за пошумљавање сувих и ерозијом угрожених терена. Истраживања у лабораторијама за биотехнологију дала су допринос идентификацији молекуларне, биохемијске и екофизиолошке основе генетске разноврсности, селекционисаних генотипова, што је од значаја за унапређење критеријума за селекцију и метода оплемењивања црног бора.

У циљу издвајања семенских зона црног бора у Србији, у лабораторији за Биотехнологију Института „Земун поље“ у Земуну, обављена је анализа протеинског комплекса семена сакупљеног из свих семенских састојина ове врсте у Србији, електрофорезом на РАА гелу (Lučić *et al.*, 2008). Резултати вишемесечне анализе су показали да узорци семена из различитих провенијенција имају различиту протеинску слику. Утврђене су разлике у броју, распореду и интезитету протеинских фракција. На основу добијених електрофореграма одређен је протеински профил семена за сваку од 6 испитиваних провенијенција понаособ, додељена формула (комбинација бројева и слова) и израчунат коефицијент генетичке сличности између испитиваних провенијенција. На основу анализе протеинског комплекса семена узетих са матичних стабала израчуната је генетичка сличност унутар сваке провенијенције (Sokal, Michener, 1958, Jaccard, 1908).

4. ПРИМЕНА БИОХЕМИЈСКЕ И МОЛЕКУЛАРНЕ АНАЛИЗЕ ПРИ УТВРЂИВАЊУ ГЕНЕТИЧКЕ ВАРИЈАБИЛНОСТИ ОМОРИКЕ *PICEA OMORIKА* /РАПЃ./ *PURKYNE* И ВРСТА ИЗ РОДА *PINUS L.*

До сада је обављен велики број радова у којима су представљени резултати истраживања генетске варијабилности четинарских врста применом терпене, полифеноле и изоензиме као маркере. Проучавање принципа популационе генетике треба да буде од великог значаја за стратегију конзервације. Њеним проучавањем и руковођењем, може се повећати добит у генетичким оплемењивачким програмима. Исти аутор указује на потенцијално велики број и широко променљиву разноврсност полиморфизма једарне ДНК која се успешно може користити у шумарској генетици. Приказани резултати су значајно утицали на избор маркера примењених у анализама генетске блискости, односно различитости анализираних провенијенција, популација и стабала у истраживањима у Босни и Србији (Шијакић-Николић *et al.*, 2003, Ballian *et al.*, 2005).

Истражујући 2-D PAGE маркере и RFLP маркере код 4 биљне врсте, гимносперме (приморски бор) и ангиосперме (кукуруз, јечам и грашак) указује се на предност 2-D PAGE маркера, јер су они са генетске тачке гледишта, добри маркери, зато што су моногенетски, кодоминатни, локус специфични и изгледају случајно дистрибуирани у геному. Користећи три класе биохемијских маркера (изоензиме, укупне протеине и терпене) у шест популација приморског бора, Petit и сарадници (2003) покушавају сагледати генетску различитост приморског бора.

Бројни су радови у којима је приказан степен интериндивидуалне или популационе варијабилности, односно генетске различитости, применом молекуларних маркера. Спроведена истраживања су најчешће на популационом или провенијенцијском нивоу за врсте: *Pinus sylvestris* - бели бор (Szmidt, *et al.*, 1996, Sinclair, 1998), *Pinus pinaster* - приморски бор (Plomion, *et al.*, 1996, Mariette, *et al.*, 2001, Vendramin, *et al.*, 1998), *Pinus nigra* - црни бор (Scaltsoyiannes, *et al.*, 1994, Hajdуч, *et al.*, 2001), итд.

Истраживања применом изоелектричног фокусирања и SDS-PAGE електрофорезом Costa, P., *et al.*, (1999), структуре протеина у различитим ткивима четинара, су показала да се 29% и 36% протеинских трака значајно разликује у ксилему и четинама док су остале траке имале идентичну молекуларну масу.

Досадашња истраживања генетичке структуре оморице *Picea omorika* /Рапћ./ *Purkyne*, применом молекуларних маркера су малобројна. Материнско наслеђивање митохондријалне ДНК при међуврсним укрштањима *Picea glauca* (бела смрча) и *Picea omorika*, доказали су David и Keathley (1996). Паралелном анализом изоензимских маркера и квантитативних особина, Kuittinen и сарадници (1991) су спровели истраживања генетичке структуре у једној природној популацији оморице из Столца, подручје Вишеграда (Босна и Херцеговина) и у једној вештачки подигнутој плантажи у арборетуму Пункахарју, у Финској. Резултати ових истраживања указали су на постојање екстремно високог нивоа

генетичке варијабилности, у обе посматране популације. У Босни и Херцеговини су спроведене анализе генетичке варијабилности пет природних популација оморике, анализама 12 ензимских система и 16 ген-локуса (Ballian *et al.*, 2005). Резултати ових истраживања указали су на значајне разлике у генетичкој структури између посматраних популација са подручја Вишеграда. На основу ових резултата, неопходно је семе и шишарице, пре слања на тржиште, декларисати на ниво популација, а не на ниво провенијенције Вишеград што тренутно пракса.

Митохондријална ДНК представља најчешће коришћени молекуларни маркер за филогеографска истраживања. До сада је успешно коришћена при филогеографским и популационим истраживањима код животиња и у хуманој популацији (Avise, 1994, Seilstad *et al.*, 1998, Taberlet *et al.*, 1998, Hewitt, 1999). Митохондријална ДНК се наслеђује искључиво матерински, што значи да се различите варијанте mtDNK преносе само преко женског гамета, без утицаја полена. Истраживањем полиморфизма митохондријалних гена ствара се добра основа за упознавање процеса миграције и географске диференцијације популација врсте (Sperisen *et al.*, 2001). Примена mtDNK маркера код четинара је оправдана, јер се хлоропластна ДНК код њих наслеђује патернално. У великом броју истраживања, применом митохондријалне ДНК, утврђени су релевантни фактори који детерминишу актуелну дистрибуцију унутар и између врста, као што су: а) локација глацијалних рефугијума у Италији, на Арапском и Балканском полуострву и утицај миграционих процеса и коридора; б) улога историјских чинилаца (посебно механизма дисперзије семена и полена); и ц) утицај човека на различите врсте. У раду Petit-а и сарадника (2003), обављена је анализа заједничке историје миграције различитих врста шумског дрвећа и утврђен је њихов филогеографски распоред.

У експериментима са генетички дефинисаним материјалом (клонови, провенијенције, линије полусродника), утврђивање степена генетичке контроле фенотипских карактеристика може бити извршено, директно, фенотипском диференцијацијом демова (малих субпопулација) у оквиру добро испланираног експеримента, уколико је сав материјал био изложен истим условима средине и третманима (Hatterer, Ziehe, 1997). Шема садње биљака у генеративној семенској плантажи оморике у Годовику испуњава наведене критеријуме, што указује на оправданост спровођења генетичких истраживања у оквиру овог објекта *ex situ* конзервације.

Велики део генетског варијабилитета и потенцијала природних популација оморике, уграђен је у антропогене популације-културе у Западној Србији, којим путем је он постао знатно приступачнији за истраживачки рад и будућа коришћења. Интензивна истраживања у оквиру ових култура започета су сврставањем стабала у феногрупе за које се сматрало да имају одређени значај за шумарство и хортикултуру, (Исајев, 1987, 1991, Isajev *et al.*, 1999). У њима је издвојено пет феногрупа оморике: „А“ - варијетет „*borealis*“, Б“ - варијетет „*semiduhotomy*“, „Ц“ - варијетет „*serbica*“, „Д“ - варијетет „*nana*“, „Ф“ - тип „*argentea*“. Од семена 50 материнских стабала која припадају наведеним феногрупама произведен је садни

материјал на нивоу линија полусродника од којих је основана генеративна семенску плантажу у селу Годовику код Пожеге. Може се сматрати да су феногрупе оморике под генетичком контролом, јер је њихова појава евидентирана и код спонтаних популација које се јављају на стаништима са различитим еколошким условима.

Применом генетичких маркера преко 12 ензимских система: PX, GDH, PGM, SkDh, GOT, NADH, MDH, FEST, DIA, PGI, IDH и LAP, анализом полиморфизма митохондријалног над1 гена, према предлогу из ранијих истраживања на обичној смрчи, ближе је дефинисан степен генетичке контроле фенотипске експресије оморике и утврђена основа карактера трајних промена, које дефинишу поједине феногрупе, (Миловановић, 2007).

Истраживања генетичке структуре оморике и појединачних феногрупа, уграђених у генеративну семенску плантажу у Годовику, представљају основу за:

- утврђивање могућности примене биохемијских маркера, у анализи генетичке варијабилности оморике, а који су до сада успешно апликовани у истраживањима везаним за обичну смрчу;
- утврђивање степена генетичке контроле фенотипске експресије код оморике;
- утврђивање модела унутарврсне диференцијације врсте у постгласијалном периоду;
- дефинисање оптималног модела контролисане хибридизације различитих феногрупа у циљу синтезе нових култивара, побољшане еколошке пластичности, продукције биомасе или декоративности;
- утврђивање модела унутарврсне диференцијације врсте у постгласијалном периоду.

Фенотипске карактеристике, које су наведене као кључне за издвајање ових варијетета и типова, донекле, указују на еколошке услове којима су мале, изоловане популације биле изложене. Индивиде феногрупе „Ц“ задржале су се на типичним стаништима оморике, стрмим литицама и дубоким клисурама са високим снежним покривачем, те су задржале и карактеристике типичног хабитуса, велику висину, уску, пирамидалну крошњу и кратке гране. Феногрупу „А“ репрезентују стабла широке крошње са гранањем сличним смрчи, што указује на њихово егзистирање у мешовитим састојинама са смрчом, где су се ширењем крошње борила против конкурентских деловања примешане врсте. Двовршност стабала из феногрупе „Б“ може се повезати са некадашњим интензивним деловањем биотичког или абиотичког фактора, који је изазивао пропадање вршног пупољка, те су стабла развила одбрамбени механизам и задржала га и након ишчезавања узрочника. Варијетет „Д“ карактеришу стабла полупатуљци, висине до 1,8 m, што је вероватно последица изузетно лоших услова станишта (дубока засена, висок ниво азота у земљишту), у којима су стабла знатно редуковала висински прираст. Сребрни изглед крошње индивидуа феногрупе „Ф“, који је последица четина рашчешљаних на горе на једногодишњим и двогодишњим гранчицама, највероватније је настао као одговор на велику влагу ваздуха, велику количину падавина и висок снежни

покривач. Највећи број стома, које омогућују транспирацију и проветравање, налази се на доњем епидермису, те је дошло до модификације правца раста четина. На основу резултата анализе алелног полиморфизма над1 гена митохондријалног генома може се закључити да постоји одређен степен генетичке контроле фенотипске експресије код различитих феногрупа оморике. Објашњење настанка овог облика унутарврсне варијабилности треба потражити у адаптивно-еколошким феноменима, чија генетичка детерминација још увек није у потпуности објашњена, али је извесно да постоји. На основу генетичке удаљености од осталих феногрупа, за феногрупу „А” може се претпоставити, да представља међуврсни хибрид оморике и смрче, чиме се отвара ново питање за будућа истраживања унутарврсне варијабилности оморике. Добијени резултати дају допринос ближег упознавању узрока настале постгласијалне унутарврсне диференцијације оморике и настанак ових феногрупа. Добијени резултати су од значаја за даље процесе оплемењивања ове врсте на основама бољег познавања њене генетичке структуре, њено усмерено коришћење и проширење ареала.

У семенској плантажи у Годовику спроведена је контролисана хибридизација, по моделу непотпуног диалелног укрштања, са 48 генотипских комбинација. Испитивање дела структуре генома родитељских индивидуа и њихових хибридних комбинација, обављено је применом протеинских маркера, као најчешће коришћених полиморфних маркера на нивоу продуката гена (Шијачић-Николић, 2001). У овим анализама коришћено је семе родитељских индивидуа из слободног опрашивања и њихових хибридних комбинација. На основу електрофореграма родитељских индивидуа, и њихових хибридних комбинација утврђен је коефицијент сличности на нивоу мајка-хибрид, отац-хибрид и мајка-отац. Електрофореграми су приказали постојање различитих врста протеинских фракција-трака, које су код хибрида приказали: траке заједничке за оба родитеља, траке једну од оца другу од мајке (кодминантност експресије родитељских гена у хибриду), траке пореклом од мајке, траке пореклом од оца и траке карактеристичне за хибрид. Хибридне комбинације код којих је констатован хетеротичан ефекат одликовале су се *de novo* синтетисаним протеинским фракцијама. Број синтетисаних протеинских фракција, је у дијапазону од две до шест. *De novo* синтетисане протеинске фракције су од значаја, за даље истраживање и предвиђање хетеротичног ефекта код оморике, као што се то користи код линија кукуруза.

У циљу ближег упознавања природе генетског варијабилитета црног бора, *Pinus nigra* Arnold, чије се микропопулације и појединачна стабла јављају на лицима клисура и кањона Таре, Сутјеске и Дрине, обављене су анализе особина семена, динамике клијања и усвајања воде, и особине клијаваца старих три недеље. Као показатељ генетичке специфичности испитиваног материјала, на узорку од 25 семена и клијаваца сваког тест стабла, урађене су анализе протеинских маркера по методу Wang-а и сарадника (1994).

Анализа, у солима растворљивих протеина семена показала је да сви испитани генотипови поседују специфичу протеинску слику. Констатоване су протеинске

траке које су у свим линијама присутне, као и оне чије постојање зависи од линија слободног опрашивања или провенијенција. Такође је констатован веома мали број случајева идентичног протеинског састава у понављањима исте линије полусродника што указује на велику унутарлинијску варијабилности, која може бити последица утицаја оца, као и хетерозиготности материнских стабала. Кроз анализу структуре протеина у клијавцима добијеним у нормалним и условима суше може се запазити да се поједини протеини јављају, без обзира на услове клијања, код свих линија полусродника, преко оних који постоје или не постоје у зависности од услова клијавања, до оних чије постојање опет у већој мери зависи од линије полусродника, популације или провенијенције. Док се у анализама протеинског састава код семена констатују најзначајније провенијенцијске разлике, на нивоу клијаваца старих 9 дана исклијалих у условима стреса суше и оптималним условима могу се констатовати међулинијске, популационе и провенијенцијске разлике.

Истраживања структуре протеина у семену и клијавцима омогућавају поузданију идентификацију, молекуларне, биохемијске и екофизиолошке основе генетске разноврсности, селекционисаних генотипова црног бора, њихов трансфер у својства семена, те прикладна обележја за програм генетског побољшања. У даљим истраживањима на нивоу молекуларних маркера, а у циљу дефинисања разлика између популација са различитих станишта требало би урадити анализе са истим циљем, али неким од раније споменутих ДНК маркера. Овим маркерима би се могла више обухватити популациону варијабилност, као последица различитих станишних услова.

5. ЗАКЉУЧЦИ

За добијање поузданих информација о природи гена који контролишу раст, развој, еволуционе и адаптивне потенцијале код дрвећа, процене су се дуго базирале на фенотипским карактеристикама. Међутим, због израженог утицаја средине на фенотипска својства добијени резултати често нису поуздани и довољни. Примена молекуларних маркера обухвата групе метода које су битне за поуздане анализе природе биодиверзитета шумских врста дрвећа и жбуња, које су полазна основа процеса конзервације, селекције и хибридизације.

До сада, највише информација о генетској варијабилности популација шумског дрвећа, је добијено у истраживања применом изоензима. Редослед аминокиселина у ензиму у јасном је односу према редоследу база одређених подручја ДНК ланца, тј. гена. Стога се ензими могу употребити за позиционирање гена, због чега се и примењују као генетски маркери.

Од средине 80-их година прошлог века, број генетских маркера, за истраживања шумских врста дрвећа, растао је динамично. Развој ДНК маркера, укључујући RFLP, VNTR, SSR, RAPD, AFLP, SSCP и SNP, створио је основе за унапређење и примену поузданих метода које се користе код дрвенастих биљака. Код шумских

врста дрвећа и жбуња, генетски маркери се примењују у истраживањима варијација кодирајућих, некодирајућих и високо варијабилних региона, како код нуклеарних генома тако и код генома органела - хлоропласта, митохондрија. Применом метода RAPD и AFLP у истраживању могу се идентификовати поједине јединке, односно популације које су значајне за конзервацију или даље усмерено коришћење у процесу оплемењивања. За разлику од једарне ДНК, хлоропластна и митохондријална ДНК, не подлежу процесима рекомбинација, што је од великог значаја за истраживања постгласијалних миграција дрвећа, односно у популационој генетици.

У природим популацијама дрвећа, постоје две фазе кретања гена, прва је преко материнских стабала, тј. путем семена, а друга је преко мушког родитеља или путем полена. Стога гени (геноми) који се наслеђују преко мајке (матрокрино), обично остају унутар популације, што је при спровођењу активности на конзервацији генофонда врло битно. За разлику од ДНК у органелама цитоплазме, једарна ДНК је под снажним утицајем полена и рекомбинација, тако да се генетички материјал може мешати (размењивати) са релативно великих одстојања, чиме су знатно отежане активности при конзервацији шумских популација. Хлоропластна ДНК се код лишћарских врста наслеђује само путем мајке, док се она код четинара наслеђује преко оца, што код истраживања захтева развој посебних метода анализе. Код митохондријалне и рибозомалне ДНК наслеђивање је увек преко мајке, што знатно олакшава анализу и даје велике могућности за популациона истраживања, посебно за праћење миграционих процеса након последње гласијације.

Примена молекуларних маркера, развијених код неких врста шумског дрвећа (нпр. у генима *Picea abies*, *Pinus piraster* и *Pinus halepensis*), има велики значај у истраживањима унутарврсног варијабилитета дрвећа, репродуктивних процеса дрвећа, генетичке природе адаптивних и продуктивних особина врста дрвећа, итд. Велики број студија, реализованих током протеклих година, показују значај и вредност примене молекуларних маркера у истраживањима на пољу конзервационе и популационе генетике шумског дрвећа. Развој типова молекуларних маркера, као и све шира њихова примена у шумарској генетици, унапредила је неопходна знања о следећем:

- а) значају динамике и смера миграционих токова, у постгласијалном периоду, за обликовање садашњег генетичког и географског диверзитета популација дрвећа;
- б) утицају величине популације и селекционог притиска на развој способности адаптације и „пулсирања” популација дрвећа у простору и времену;
- в) моделирању програма при активностима на пољу конзервационе генетике, при очувања генофонда врста дрвећа, *in situ* и *ex situ*.

ЛИТЕРАТУРА

Avise J.C. (1994): *Molecular markers: Natural History and Evolution*, Chapman & Hall, New York

- Ballian D., Gomory D., Longauer R., Микић Т., Paule L. (2005): *Изоензимска анализа укључујући проблем репродукције и конзервације, популација Панчићеве оморике (Пцеа оморика /Панч./Пурк.) са вишеградској подручја*, Гласник Шумарског факултета Универзитета у Бањој Луци. Бања Лука (23-3)
- Bartels H. (1971): *Genetic control of multiple esterases from needles and macro gametophytes of Picea abies*, Planta (Berl) 99 (283-289)
- Bergmann F. (1971): *Genetische Untersuchungen bei Picea abies mit Hilfe der Isoenzym-Identifizierung*, I. Möglichkeiten für genetische Zertifizierung von Forstsaatgut. Allgemeine Forst- und Jagdzeitung 142 (278-280)
- Војовић С. (1997): *Le pin noir et les terpenes*, Bibliothèque Dissertatio, Задужбина Андрејевић, Београд (21-101)
- Vendramin G.G., Anzidei M., Madaghiele A., Bucci G. (1998): *Distribution of genetic diversity in Pinus pinaster Ait. as revealed by chloroplast microsatellites*, Theor. Appl. Genet. 97 (456-463)
- Wang C., Bian H.K., Zhang Z.Z., Wang J. (1994): *Polyacrylamide gel electrophoresis of salt soluble proteins for maize variety identification and genetic purity assessment*, Seed Sci. Tech. 21 (51-70)
- Geburek T., Turok J. (2006): *Conservation and Management of Forest Genetic Resources in Europe*, Arbores Publishers, Zvolen (275-334)
- David A.J., Keathley D.E. (1996): *Inheritance of mitochondrial DNA in interspecific crosses of Picea glauca and Picea omorika*, De Canadian Journal of Forest Research 26 (3). Natal Research Council Canada, Ottawa (428-432)
- Иванишевић-Миловановић О., Ивановић В., Пајовић С., Константинов К., Младеновић-Дринић С. (2000): *Генетички маркери виших биљака*, Савремена биофизика, Биомаркери - детекција, структура и функција, Београд (155-221)
- Исајев В. (1987): *Опелемењивање оморике (Picea omorica /Панч./ Пуркне.) на генетско селекционим основама*, докторка дисертација у рукопису, Универзитет у Београду - Шумарски факултет, Београд (321)
- Isajev V. (1991): *Serbian spruce (Picea omorica /Панч./ Purkyne) Flowering and seed bearing in seed plantations of Western Serbia (Yugoslavia)*, L Arbore. Biologie de Development, Naturalia Monspelienis n.h.s (616-618)
- Исајев В. (2004): *Утврђивање генетичке дистанце одабраних врста рода Picea на основу варијабилности митохондријалне ДНК епитарских уља четинара*, Зборник апстраката III Конгреса генетичара Србије, Суботица (13)
- Isajev V., Dormling I. (1992): *Photoperiodic control of growth and growth cessation in 30 half sib families of serbian spruce seedlings (Picea omorica /Панч./ Purkyne)*, Genetika 3, Vol 24 (209-217)
- Isajev V., Šijačić-Nikolić M., Mataruga M. (1999): *Conservation, Tasting and Utilisation of Tree Species Gene Pool in Specialised Plantations*, Proceeding of the 4th International Conference on The Development Of Wood Science, Wood Technology & Forestry, Missenden Abbey (225-235)
- Jaccard P. (1908): *Nouvelles recherches sur la distribution floral*, Bull. Soc. Vand. Sci. Nat. 44 (223-270)

- King R.C., Stansfield W.D. (1990): *A Dictionary of Genetics*, Oxford University Press N.Y, Oxford (128)
- Константинов К., Младеновић-Дринић С. (2000): *Генетички маркери виших биљака*, Савремена биофизика, „Биомаркери - детекција, структура и функција”, Београд (155-221)
- Лучић А., Николић А., Младеновић-Дринић С., Исајев В., Лавадиновић В. (2008): *Genetic characterisation of genotypes of Austrian pine (Pinus nigra Arnold) populations using protein markers*, Genetika 2, Vol. 40 (157-168)
- Mariette S., Chagne D., Lezier C., Pastuszka P., Raffin A., Plomion C., Klemmer A., (2001): *Genetic diversity within and among Pinus pinaster population: comparison between AFLP and microsatellite markers*, Heredity 86 (469-479)
- Матаруга М. (2004): *Генетичко-селекционе основе унапређења производње садница црног бора (Pinus nigra Arnold) различитих нивоенијенција*, докторска дисертација у рукопису, Универзитет у Београду - Шумарски факултет, Београд (1-366)
- Младеновић-Дринић С. (1995): *Молекуларни маркери у предвиђању хетерозиса кукуруза (Zea mays L.)*, докторска дисертација у рукопису, ??? Нови Сад (1-87)
- Николић Ђ. (1982): *Изоензимски полиморфизам црног бора (Pinus nigra Arnold) у Југо-славији и неким другим деловима његове природне распрострањености*, докторска дисертација у рукопису, Београд (43-107)
- Pettit R.J., Aguinagade I., De Beaulieu J.-L., Bittkau C., Brewer S., Cheddadi R., Ennos R., Finechi S., Grivet D., Lascoux M., Mohanty A., Müller-Stark G., Demesure-Musch B., Palmé A., Martin J.P., Rendell S., Vendramin G.G. (2003): *Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity*, Science 300 (1563-1565)
- Seilstad M.T., Minch E., Cavalli-Sforza L. (1998): *Genetic evidence for a higher female migration rate in humans*, Nature Genetics 20 (278-280)
- Szmidt A.E., Wang X.R., Lu M.Y. (1996): *Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in Pinus sylvestris (L.) using haploid tissue analysis*, Heredity 76 (412-420)
- Sinclair T.W., Morman D.J., Ennos A.R. (1998): *Multiple origins for Scots pine (Pinus sylvestris L.) in Scotland: evidence from mitochondrial DNA variation*, Heredity 80 (233-240)
- Sokal R.R., Michener C.D. (1958): *A statistical method for evaluating systematic relationships*, Univ. Kans. Sci. Bull 38 (1409-1438)
- Sperisen C., Buchler U., Gugerli F., Matyas G., Geburek T., Vendramin G.G. (2001): *Tandem repeats in plant mitochondrial genomes: application to the analysis of population differentiation in the conifer Norway spruce*, Molecular Ecology 10, Blackwell Science Ltd. (257-263)
- Stevanović-Janežić T., Isajev V., Lange W. (1994): *Relations of needle oil terpene compositions for selected species from genus Picea*, J. Serb. Chem. Soc. 59(6) (359-365)
- Stevanović-Janežić T., Isajev V., Lange W. (1993): *Needle oil terpenes of serbian spruce from three localities*, Holz als Roh- und Werkstoff 51, Springer-Verlag (283-286)
- Scaltsoyiannes A., Rohr R., Panetsos K. (1994): *Allozyme frequency distribution in five european populations of black pine (Pinus nigra Arnold)*, Silvae genetica 43(1) (20-25)

- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A-G., Cosson J-F. (1998): *Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe*, *Molecular Ecology* 7 (453-464)
- Hajduch M., Nahalkova J., Hrob J., Vookova B., Gemeiner P. (2001): *An electrophoretic analysis of the seed protein body proteins from Pinus nigra Arn*, *Biologia plantarum* 1, vol. 44 (137-140)
- Hattemer H.H., Ziehe M. (1997): *Genetic Control of Phenotypic Traits with Relevance to Gene Conservation in Trees - A Survey of Methods*, *Proceedings of the EUFORGEN Workshop*, Sopron
- Hewitt G.M. (1999): *Post-glacial re-colonization of European biota*, *Biological Journal of the Linnean Society* 68 (87-112)
- Costa P., Pot D., Dubos C., Frigerio J-M., Pionneau C., Bodénès C., Bertocchi E., Cervera M-T., Remington D.L., Plomion C. (2000): *A genetic map of Maritime pine based on AFLP, RAPD and protein markers*, *Theor. Appl. genet* 100 (39-48)
- Šijačić-Nikolić M., Isajev V. (2003): *Genetic distance between parent genotypes of Serbian spruce (Picea omorica /Panc./Purkyne) and their hybrids using protein markers*, *Proceedings of scientific papers 2, Bulgarian Academy of Sciences - Forest Research Institute, Sofia* (49-60)
- Шијачић-Николић М. (2001): *Процена генејтској пошенијала генеративне семенске јлантјаже оморике (Picea omorica /Panc./Purkyne) применом конјролисане хибридизације јолусродника*, докторска дисертација у рукопису, Универзитет у Београду - Шумарски факултет, Београд (1-285)

Vasilije Isajev
Snežana Mladenović-Drinić
Aleksandar Lučić

THE USE OF MOLECULAR MARKERS IN THE IMPROVEMENT OF CONIFER TREE SPECIES

Summary

The paper reviews the use of molecular markers in the improvement of conifer tree species in Europe and Serbia. The results are based on the presentation of the experience in the application of biochemical and molecular analyses at the level of the selected populations and individuals from different provenances of tree conifer tree species. Many studies performed during the last years demonstrated the usefulness of neutral molecular markers in the field of conservation and population genetics of forest trees, in particular to understand the importance of migration patterns in shaping current genetic and geographic diversity and to measure important parameters such as effective population size, past bottlenecks and gene flow. This is relevant to design conservation strategies, but is of little value to understand the adaptability patterns. Phenotype assessment is time consuming and generally very expensive, and is not useful to gather information about variation in the genes controlling adaptive variation. This is why new types of molecular markers are being developed for some forest trees (for example, single nucleotide polymorphisms (SNPs) in candidate genes of *Picea omorika*, *Picea abies*, *Pinus nigra*, *Pinus pinaster* and *Pinus*

halepensis). They may have a great potential in the study of adaptive traits. The use of only neutral genetic markers for the conservation of genetic resources may be questionable. These markers have been and are still useful for characterizing common origins of populations and their post-glacial migration routes and for mating system studies. They have less potential for characterizing genetic diversity in adaptive traits and the adaptive potential of populations. The need should therefore be stressed to bring the two approaches together so that genetic markers can also be used to study the adaptability of populations and the effects of selection. The new type of SNP markers detected in expressed regions of the genome may be the first step in this direction. In any case, there is the need to use both neutral and adaptive approaches. In the face of environmental changes, populations will migrate and/or adapt (or eventually become extinct!). Knowledge of both mechanisms is necessary for gene conservation.

In the specific field of the conservation genetics, molecular markers can be extremely useful in both ex situ and in situ conservation. Ex situ conservation of genetic resources includes the storage of samples in gene banks, which is intended to represent the genetic diversity of the species as much as possible. Gene bank management comprises four major categories of activities, all of which may benefit from the application of molecular genetic markers. These activities include 'acquisition' (development of sampling strategies, identification of populations that need to be preserved), 'maintenance' (quantification of genetic drift, identification of genetic contamination), 'characterization' (genetic evaluation of germplasm) and 'utilization' (molecular markers and functional diversity, molecular markers and genetic improvement).

During the next years, a large amount of data at marker loci or at sequence level is expected to be collected: to complement the high statistical power of these data, an evolutionary perspective is required to evaluate their biological importance.