

## UPOTREBA TRISOMIKA U LOKALIZACIJI GENA BOBA (*Vicia faba* L.)

Z. ŠATOVIĆ<sup>1</sup>, Ana María TORES<sup>2</sup> i I. KOLAK<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Zavod za oplemenjivanje bilja, genetiku i metodiku istraživanja

<sup>1</sup>Faculty of Agriculture University of Zagreb

Department for Plant Breeding, Genetics and Biometrics

<sup>2</sup>C.I.D.A., Zavod za oplemenjivanje i agronomiju, Córdoba, Španjolska

<sup>2</sup>C.I.D.A., Departamento de Mejora y Agronomía, Córdoba, SPAIN

### SAŽETAK

U radu je dan pregled upotrebe primarnih trisomika u lokalizaciji gena boba (*Vicia faba* L.). Asinaptički se mutanti kod boba koriste kao postojan izbor za dobivanje trisomika. Dane su teoretske osnove potrebne za upotrebu primarnih trisomika u lokalizaciji gena i raspravljeni dosad dobiveni rezultati na tom području.

Ključne riječi: bob, *Vicia faba* L., trisomici, asinaptici, lokalizacija gena

### UVOD

Trisomija je jedan od slučajeva aneuploidije pri kojem dolazi do pojave jednog kromosoma u suvišku tako da trisomici imaju diploidni broj kromosoma  $2n+1$ . Trisomici se obično klasificiraju u primarne (kromosom u suvišku je potpun), sekundarne (kromosom u suvišku je izokromosom tj. ima dva ista kraka) i tercijarne (kromosom u suvišku ima krakove od dva različita kromosoma). Također su zabilježeni i dvostruki trisomici ( $2n+1+1$ ) koji imaju dva različita kromosoma u suvišku, te mono-trisomici ( $2n-1+1$ ). Trisomike su prvi zabilježili Blakeslee i Avery (1915. prema Borojević, 1976) kod *Datura stramonium*, a kasnije su otkriveni i u mnogim drugim biljnim vrstama kao što su kukuruz, pšenica, raž, ječam, rajčica i dr.

Izvori trisomika mogu biti raznovrsni: (1) normalni diploidi (disomici) - pojava u prirodnim populacijama ili nakon tretiranja mutagenim sredstvima, (2) poliploidi (naročito triploidi), (3) haploidi, (4) tetrasomici, (5) heterozigotne translokacije, te (6) asinaptični mutanti.

Trisomici su općenito vrlo zanimljivi za citogenetska istraživanja, a najveću važnost za genetiku i oplemenjivanje bilja imaju zbog mogućnosti njihove upotrebe u lokalizaciji gena na pojedinim kromosomima.

## DOBIVANJE TRISOMIKA BOBA

Bob (*Vicia faba* L.) jednogodišnja je mahunarka. Nije je moguće križati niti s najrodnijim i morfološki najbližijim vrstama kao što su *V. narbonensis* L., *V. galilea* Plit. and Zoh. i *V. johannis* Tomamsch. (Ladizinsky, 1975; Cubero, 1982; Ramsay i Pickersgill, 1984). Klasifikaciju unutar vrste uspostavila je Muratova (1931. prema Lawes et al., 1983), Hanelt (1972) i Cubero (1974). Imajući na umu preporuke Harlana i de Weta (1971) da se sve kultivirane forme određene vrste klasificiraju u podvrstu A, dok je podvrsta B rezervirana za divlje forme iste vrste, Cubero (1974) uspostavlja podvrstu *Vicia faba faba* u kojoj postoji samo jedna kulturna vrsta (*Vicia faba* L.). Unutar navedene podvrste možemo razlikovati četiri botanička varijeteta koji se međusobno lako križaju i razlikuju se prvenstveno prema veličini sjemena, a to su *faba*, *equina*, *minor* i *paucijuga*. Divlje forme boba koje bi bile klasificirane u podvrstu B nisu poznate. Isto vrijedi i za divlje srodnika kultiviranog boba.

Diploidan broj kromosoma boba je  $2n=12$ . Malen broj i veliki sadržaj DNK čine kromosome boba lako uočljivima, te vrlo prikladnima u citogenetskim istraživanjima. Kariotip boba sastoji se od metacentričnog kromosoma (1), tri subtelocentrična kromosoma (2, 3, i 4), te dva akrocentrična (5 i 6) (Šatović et al., 1995). Metacentrični kromosom je dvaput duži od ostalih, te posjeduje sekundarno suženje na kojem se nalazi nukleolarni organizator.

Prvi trisomici kod boba otkriveni su u potomstvu *po-1* mutanata dobivenih radijacijom X-zrakama. Sjödin (1970) je primijetio da se tako dobiveni mutanti razlikuju od normalnih biljaka po obliku peludovog zrnca i imaju znatno nižu fertilnost. U potomstvu *po-1* mutanata pronađeni su tetraploidi ( $2n=24$ ), heksamitski tetraploidi ( $2n=26$ ), te trisomici ( $2n=13$ ) (Poulsen i Martín, 1977). Svi otkriveni trisomici imali su kromosom 6 u suvišku, te nije bilo moguće dobiti potpunu seriju trisomika (Martín i Barceló, 1984).

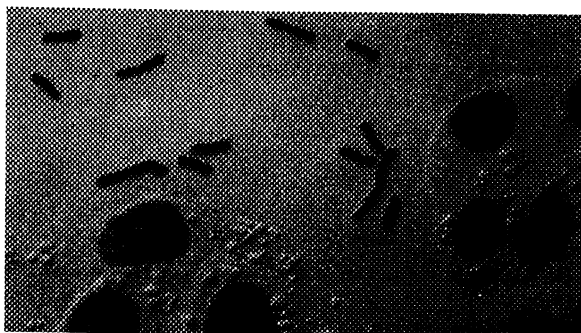
Križanja tetraploidnih biljaka s diploidima u oba pravca nisu rezultirala dobivanjem trisomika niti triploida (González et al., 1981).

Sljedeća mogućnost dobivanja trisomika, koja se pokazala i najuspješnijom, bila je upotreba asinaptičnih mutanata. Asinapsis je jedna od genetski kontroliranih mejotičkih nepravilnosti. Pri tom u zigotenu prve mejotičke diobe ne dolazi do potpunog sparivanja homolognih kromosoma (Sl. 1). Kao rezultat se uz gamete s normalnim haploidnim brojem kromosoma pojavljuju i desekvilibrirane gamete koje su u većini slučajeva nefunkcionalne. Gamete s jednim kromosomom u suvišku ( $n+1$ ) mogu obaviti oplodnju i time postaju izvor trisomije.

Asinaptički mutanti dobiveni su induciranim mutacijama i to upotrebom različitih mutagena kao što su EMS, EMS<sup>++</sup>Cu<sup>++</sup>, neutroni i g-zrake (Sjödin, 1970). Iako Sjödin nije otkrio aneuploide u F<sub>2</sub> generacijama nakon križanja asinaptičkih mutanata i normalnih diploida, nakon izbora linija s najvećim stupnjem asinapsisa i njihovim križanjem s diploidima González i Martín (1983) uspjeli su dobiti trisomike i to u relativno visokom postotku.

Na ovaj je način moguće dobiti trisomike za sve subtelucentrične i akrocentrične kromosome (Barceló, 1987; Barceló i Martín, 1990; Cabrera, 1988; Torres et al., 1995; Šatović et al., 1996; Torres et al., 1996). Martín (1994, neobjavljeni rezultati - osobna komunikacija) uspio je dobiti i trisomik za metacentrični kromosom (1), no bio je potpuno sterilan tako da ga nije bilo moguće očuvati. Predpostavlja se da nazočnost metacentričnog kromosoma dovodi do prevelike genske neravnoteže uzrokovane velikom količinom DNK koju sadrži, te je stoga njegova životna sposobnost znatno smanjena.

Slika 1. Nepravilna metafaza I mejoze asinaptičke biljke: Kromosomi se ne sparuu  
Figure 1. Irregular meiotic metaphase I of an asynaptic plant: Chromosomes do not pair



#### TRANSMISIJA TRISOMIJE

Transmisiju trisomije možemo proučavati na tri razine prateći (1) postotak  $n+1$  gameta (posebno ženskih odnosno muških), (2) postotak  $2n+1$   $F_1$  križanaca nakon križanja asinaptičke linije s normalnim diploidom, te (3) postotak  $2n+1$  biljaka u  $F_2$  biljaka u  $F_2$  generaciji nakon samooplodnje trisomičnih  $F_1$  biljaka.

U slučaju boba se kromosom u suvišku nikada ne prenosi muškim gametama. González (1985) je pokazao da križanjem diploida s trisomikom koristeći trisomik kao ženskog roditelja uvijek dovodi do pojave trisomičnih i diploidnih  $F_1$  križanaca dok se u protivnom slučaju (trisomik kao muški roditelj) javljaju isključivo diploidni  $F_1$  križanci. Isto je dokazao koristeći asinaptičke mutante kao roditelje umjesto trisomika. Zanimljivo je istaknuti da do tvorbe muških  $n+1$  gameta ipak dolazi, ali one zbog određenih fizioloških svojstava ne mogu izdržati suparništvo s normalnim  $n$  gametama te nikada ne uspijevaju izvršiti oplodnju (kasne s tvorbom, slabije su životne sposobnosti, nepravilnog su oblika, peludova cjevčica sporije raste kroz plodnicu itd.).

Uspoređujući dva moguća izvora trisomije Cabrera (1988) je dobila 8,82 % trisomičnih križanaca križajući asinaptike s diploidima, te 27,87 % križajući

trisomike s diploidima. Iako je potonji pokus dao znatno više trisomika dokazala je upotreba asinaptika puno prikladnije iz dva razloga:

- asinaptici se lakše održavaju u čistoj liniji, povoljne su fertilitnosti i lako se križaju,
- križanjem asinaptika s diploidima mogu se dobiti trisomici za sve kromosome osim metacentričnog tako da je potrebno održavati samo jednu asinaptičnu liniju (u slučaju upotrebe trisomika kao roditelja potrebno je održavati pet linija od kojih bi svaka bila trisomik za drugi kromosom),
- trisomici dobiveni križanjem asinaptika s diploidima imaju veći vigor i fertilitniji su od onih dobivenih križanjem trisomika s diploidima.

Šatović (1995) je dobio 13%  $F_1$  trisomika od ukupno 178  $F_1$  križanaca. Najčešći su bili trisomici za kromosome 6, 5, i 4. Ovo navodi na pomisao da postoji obrnuto proporcionalan odnos između veličine kromosoma i vjerojatnosti njegove transmisije u suvišku, no, svakako, potrebna su daljnja istraživanja u svrhu dokazivanja ovakove hipoteze.

Budući da je transmisija trisomije muškim gametama jednaka nuli postotak  $2n+1$  biljaka u  $F_2$  generaciji nakon samooplodnje  $F_1$  trisomika daje nam uvid u transmisiju trisomije ženskim gametama. Iako bi se teoretski mogao očekivati isti broj trisomika i diploida u  $F_2$  generaciji to u praksi nikada nije tako iz više razloga (González, 1985): (1) gubitak kromosoma u suvišku u mejozi, (2) smanjena životna sposobnost  $n+1$  gameta, (3) abnormalan razvoj  $2n+1$  zigote, (4) snižena klijavost i energija klijanja  $2n+1$  sjemenke, idr.

Cabrera (1988) kao srednju vrijednost transmisije trisomije tijekom trogodišnjeg istraživanja navodi  $f=0,22$ . Šatović (1995) je dobio vrijednost  $f=0,19$  što je vrlo sličan rezultat. Fertilitnost trisomika znatno ovisila o kromosomu u suvišku. Trisomici za kromosom 4, 5, i 6 imali su sličnu fertilitnost, oni za kromosom 3 nešto nižu dok su trisomici za kromosom 2 bili znatno snižene fertilitnosti. Bilo kako bilo, postotak trisomika u  $F_2$  generaciji nije značajno ovisio o tome o kojem se kromosomu u suvišku radilo.

#### MORFOLOŠKE I CITOGENETSKE OSOBINE TRISOMIKA BOBA

$F_1$  križanci između asinaptika (majke) i normalnih diploidnih biljaka (očevi) mogu biti trisomici ili pak normalni diploidi.

Identifikaciju trisomika lako je sprovesti jer se trisomici jasno razlikuju po morfološkim svojstvima kao što su to dokazali Barceló (1987) i Barceló i Martín (1990) pomoću translokacijskih linija. Pri tom su najznačajnija razlikovna svojstva morfologija lista i opći izgled biljke:

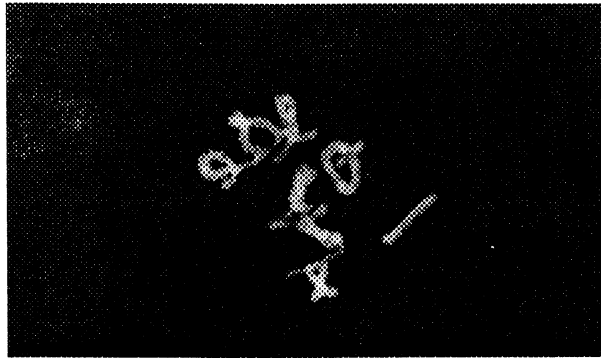
- trisomici za kromosom 2 su slabija razvijeni od diploida, stabljika i grane su polegale, a lišće je svijetlo zeleno i pomalo smežurano,

- trisomici za kromosom 3 imaju jaču stabljiku od diploida, list im je gladak, zašiljen i s manje žila,
- trisomici za kromosom 4 imaju ravne, ovalne listove, tamnije zelene od diploida.
- trisomici za kromosom 5 imaju nižu stabljiku od diploida, kraće internodije, te male i okrugle listove,
- trisomici za kromosom 6 jasno se razlikuju po tome što su im rubovi listova okrenuti nadolje što listovima daje konveksan oblik.

Analizom metafaze I majčinskih stanica peluda može se pratiti ponašanje krisomika u mejozi. Pri tom se jasno može vidjeti tvorba trivalenata (konfiguracija: 5II+1III) ili pak univalenata (konfiguracija: 6II+1I) (Sl. 2).

Sl. 2. Nepravilna metafaza I mejoze trisomične biljke: Tvorba šest bivalenata i jednog univalenta (kromosom u sivušku)

Fig. 2. Irregular meiotic metaphase I of a trisomic plant: Formation of six bivalents and a univalent (extra chromosome)



#### LOKALIZACIJA GENA POMOĆU TRISOMIKA: TEORIJA

Lokalizacija gena pomoću trisomika moguća je stoga što se razdvajanje svojstva uvjetovanog genom koji se nalazi na kromosomu u suvišku različito od normalnog diploidnog mendelijanskog razdvajanja.

U svrhu uspostave očekivanog modela trisomičnog razdvajanja svojstava moramo imati na umu slijedeće činjenice:

##### 1. Generacija koja se ispituje

U svrhu lokalizacije gena najčešće se ispituje  $F_2$  generacija dobivena samooplodnjom  $F_1$  trisomika ili pak generacija povratnog križanja  $F_1$  trisomika s diploidnim roditeljem. U generacijama povratnog križanja razlika između očekivanog trisomičnog i diploidnog razdvajanja je manja, te je potreban veći uzorak u svrhu dokazivanja statističke opravdanosti dobivenih razlika. Kod boba se gotovo uvijek koristi  $F_2$  generacija jer biljka, iako djelomično stranooplodna, dobro podnosi samooplodnju.

## 2. Način razdvajanja svojstava

U slučaju mnogih morfoloških svojstava kao i RAPD markera razdvajanje je dominantno (heterozigoti se ne razlikuju od dominantnih homozigota), dok je kod izoenzima i RFLP markera kao i nekih morfoloških svojstava kodominantno. Isto tako, moguće je uspostaviti model za svojstva koja se ne nasljeđuju monogenski tj. koja su uvjetovana s dva ili čak i više gena uključujući epistatičke, komplementarne ili inhibitorne odnose među njima.

## 3. Dominantni roditelj

Ukoliko je majčinska linija nositelj dominantnog alela određenog gena, genotip  $F_1$  trisomika bit će AAa za razliku od genotipa Aaa koji se očekuje u slučaju da je očinska linija dominantni homozigot.

## 4. Transmisija trisomije

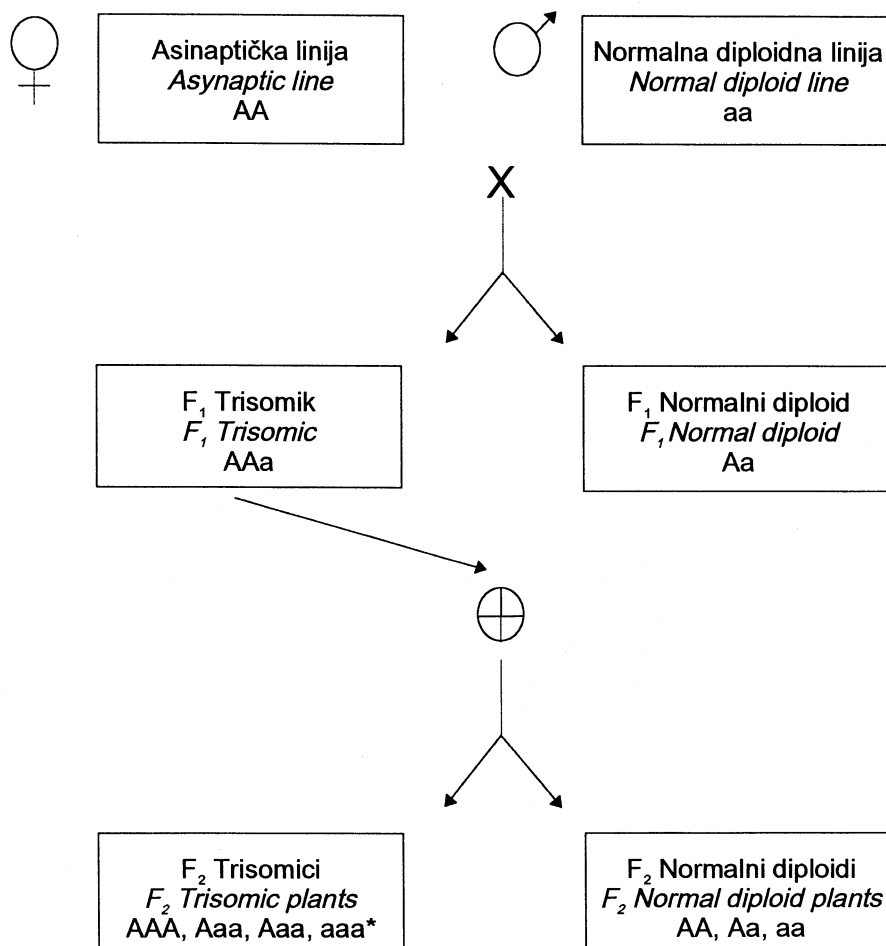
Budući da se kod boba trisomici jasno mogu razlikovati od disomika (odnosno diploida) razdvajanje određenog svojstva može se pratiti odvojeno u grupi diploidnih i u grupi trisomičnih biljaka. Kao što je to pokazao Hermsen (1970) ovakvim se postupkom razdvajanje analizira dva puta, te je stoga pouzdanije. Kod onih vrsta kod kojih je nemoguće lako razlikovati trisomike od diploida u računski model trisomičnog razdvajanja uvodimo određeni postotak transmisije trisomije. Navedeni je postotak poznat za mnoge biljne vrste iako moramo imati na umu njegovo variranje uslijed različitih kako genetskih tako i okolišnih čimbenika.

## 5. Model trisomičnog razdvajanja

Dosad su opisana tri teoretski moguća modela razdvajanja kod trisomika: (1) Model slučajnog kromosomskog sparivanja (Random Chromosome Association Model), (2) Model slučajnog kromatidnog sparivanja (Random Complete Chromatid Association Model), te (3) Model teoretski najvećeg razdvajanja (Equational Maximum Segregation Model).

Razliku između ova tri modela pokazat ćemo na primjeru boba. Predpostaviti ćemo da se ispituje razdvajanje svojstava  $F_2$  generacije nastale samooplodnjom trisomičnog  $F_1$  križanca između asinaptika (majka) i diploida (Sl. 3). Morfološka svojstva asinaptičke linije možemo smatrati uobičajenima odnosno standardnima kod boba, dok se kao očinske linije koriste različiti zanimljivi morfološki, fiziološki i dr. mutanti. Kao što smo već istakli, transmisija trisomije putem muških gameta jednaka je nuli.

Slika 3. Dobivanje trisomika kod boba (*Vicia faba* L.)  
 Fig. 3. Scheme of trisomic production in faba bean (*Vicia faba* L.)



\* aaa genotip se ne pojavljuje ako pretpostavimo Model slučajnog kromosomskog sparivanja  
 \* The Random Chromosome Association Model does not permit the formation of aaa individuals

### 1. MODEL SLUČAJNOG KROMOSOMSKOG SPARIVANJA

Predpostavljajući model Slučajnog kromosomskog sparivanja (Muller, 1914. prema González, 1985) razdvajanje gena u F<sub>2</sub> generaciji nakon samooplodnje F<sub>1</sub> biljke genotipa Aaa bit će kao što je prikazano u Tab. 1.

Tablica 1. Model slučajnog kromosomskog sparivanja: Samooplodnja AAa F, trisomica  
Table 1. Random Chromosome Association Model: Selfing of AAa F, trisomic plant

Muške gamete Male gametes		Ženske gamete - Female gametes	
		n	
		2a	1a
n+1	1 AA	2 AAA	1 Aaa
	2 Aa	4 Aaa	2 Aaa
n	2 A	4 aa	2 Aa
	1 a	2 Aa	1 aa

Stoga, u F<sub>2</sub> generaciji naići ćemo na slijedeće genotipove:

- trisomici: 2/9 AAA: 5/9 AAa : 2/9 Aaa
- diploidi: 4/9 AA : 4/9 Aa : 1/9 Aa

Prema ovom modelu ne nastaju gamete aa niti trisomici aaa genotipa. No, u istraživanjima su se takve individue ipak pojavljivale iako u vrlo niskoj frekvenciji. Da bi se pojava aa gameta objasnila uspostavljen je Model slučajnog kromatidnog sparivanja.

## 2. MODEL SLUČAJNOG KROMATIDNOG SPARIVANJA

Ovaj model predpostavlja da se istraživani lokus nalazi beskonačno daleko od centromere tako da između njega i centromere može doći do beskonačnog broja crossing overa (Haldane, 1930. prema González, 1985). Tako postoji jednaka vjerojatnost da se u gameti n+1 nađu bilo koja dva od šest mogućih alela (dva A, dva A' i dva a; A i A' su identični aleli). Razdvajanje je prikazano u Tab. 2.

Tablica 2. Model slučajnog kromatidnog sparivanja: Samooplodnja AAa F, trisomica  
Table 2. Random Complete Chromatid Association Model: Selfing of AAa F, trisomic plant

Ženske gamete Female gametes		Muške gamete - Male gametes	
		n	
		2a	1a
n+1	6 AA	12 AAA	6 AAa
	8 Aa	16 AAa	8 Aaa
n	1 aa	2 aaa	1 aaa
	2 A	4 aa	2 Aa
	1 a	2 Aa	1 aa

Pritom ćemo u F<sub>2</sub> generaciji naići na sljedeće genotipove.

- trisomici: 12/45 AAA: 22/45 Aaa : 10/45 Aaa : 1/45 aaa
- diploidi: 4/9 AA : 4/9 Aa : 1/9 Aa

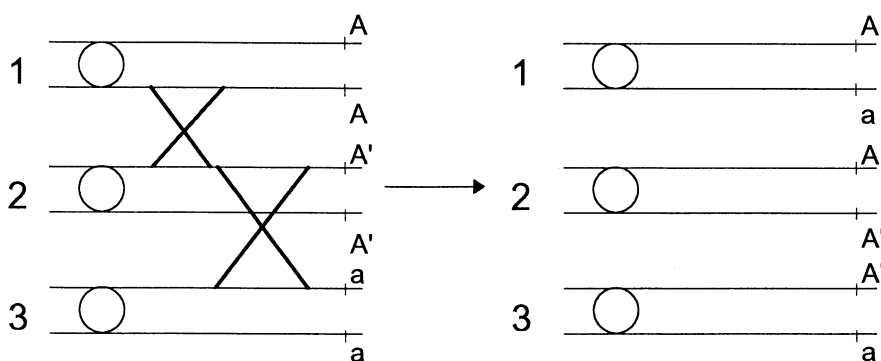


### 3. MODEL TEORETSKI NAJVEĆEG RAZDVAJANJA

Burnham (1962. prema González, 1985) je dokazao da Model slučajnog kromatidnog sparivanja ne daje teoretski najveću moguću objašnjivu frekvenciju aa gameta.

Ako se tri kromosoma noseći alele A, A' i a sparuju u trivalente, kijazme koje se tvore između lokusa i centromere uključuju sva tri kromosoma odjednom (Sl. 4; a i A' su identični aleli).

Slika 4. Tvorba kijazmi kod trivalenta tijekom prve mejotičke diobe  
 Fig. 4. Chiasmata formation in trivalents during first meiotic division

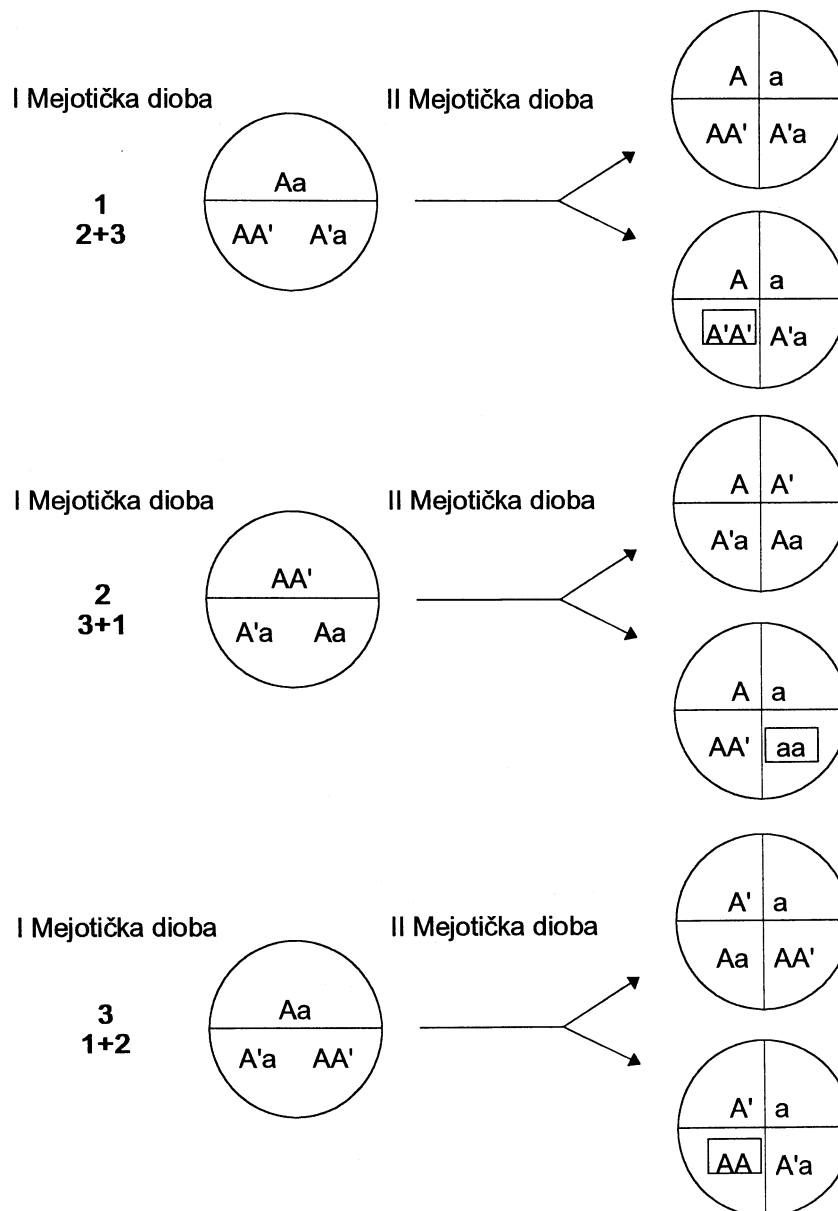


Ako postoji slučajno razdvajanje 2 : 1 (bilo koja dva kromosoma odlaze na jedan pol, a treći kromosom na suprotni), tada se nakon prve mejotičke diobe tvore tri tipa dijada (Sl. 5). Nakon druge mejotičke diobe 1/4 n+1 gameta čine dva kromosoma s istim alelom za dotični gen (AA, A'A' ili aa-uokvirene na Sl. 5). Razdvajanje je prikazano u Tab. 3.

Tabela 3. Model teoretski najvećeg razdvajanja: Samooplodnja AAa F, trisomika  
 Table 3. Equational Maximum Segregation Model: Selfing of AAa F, trisomic plant

Muške gamete Male gametes		Ženske gamete - Female gametes	
		n	n
n+1		2a	1a
5 AA	10 AAA	5 AAa	
6 Aa	12 AAa	6 Aaa	
1 aa	2 aaa	1 aaa	
n		2a	1a
2 A	4 aa	2 Aa	
1 a	2 Aa	1 aa	

Slika 5. Tvorba tetrada nakon druge mejotičke diobe  
 Figure 5. Tetrade formation after second meiotic division



Imajući na umu ovaj model n F<sub>2</sub> generaciji možemo očekivati sljedeće:  
 - trisomici: 10/36 AAA : 17/36 AAa : 8/36 Aaa : 1/36 aaa  
 - diploidi: 4/9 AA : 4/9 Aa : 1/9 Aa

Sumarni prikaz mogućih razdvajanja u  $F_2$  generaciji za kodominantne i dominantne gene koji se nalaze na kromosomu u suvišku predpostavljajući dva moguća genotipa  $F_1$  križanca (AAa i Aaa), te tri moguća modela trisomičnog razdvajanja dan je u Tab. 4. i Tab. 5.

Tabela 4. Očekivane frekvencije genotipova u  $F_2$  generaciji za kodominantne gene koji se nalaze na kromosomu u suvišku

Table 4. Expected frequencies of  $F_2$  genotypes considering codominant genes located on extra chromosome

$F_2$		$F_1$ , AAa Model			$F_1$ , Aaa Model		
		(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
2n	AA	4	4	4	1	1	1
	Aa	4	4	4	4	4	4
	aa	1	1	1	4	4	4
2n+1	AAA	2	12	10	0	1	1
	Aa_	7	32	25	7	32	25
	aaa	0	1	1	2	12	10

Tabela 5. Očekivane frekvencije genotipova u  $F_2$  generaciji za kodominantne gene koji se nalaze na kromosomu u suvišku

Table 5. Expected frequencies of  $F_2$  genotypes considering dominant genes located on extra chromosome

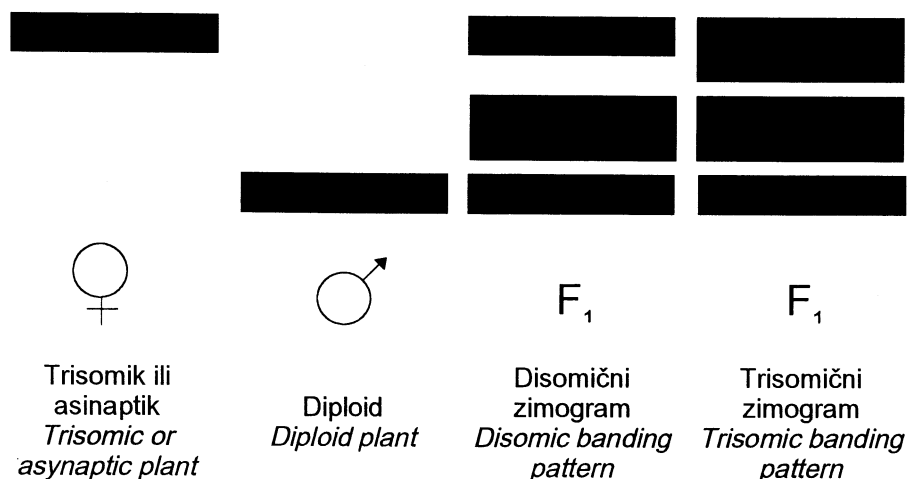
		$F_1$ , AAa Model			$F_1$ , Aaa Model		
		(1)	(2)	(3)	(1)	(2)	(3)
2n	A_	8	8	8	5	5	5
	aa	1	1	1	4	4	4
2n+1	Aa_	1	44	35	7	33	26
	aaa	0	1	1	2	12	10

#### Lokalizacija izoenzimskih lokusa pomoću trisomika u $f_1$ generaciji

Posebna metoda lokalizacije izoenzimskih lokusa pomoću trisomika ispitivanje alelnih doza u trisomičnom  $F_1$  križancu (Tanksley, 1983). Ova se metoda temelji na činjenici da su aleli većine izoenzimskih gena kodominantni, te da se relativne količine enzima koje proizvodi svaki od alela mogu mjeriti kvantitativno. Prednost ove metode je što nije potrebno uzgojiti  $F_2$  generacija, tako da je i broj biljaka na kojima se vrši ispitivanje puno manji.  $F_1$  trisomik za kromosom na kojem se nalazi određeni izoenzimski lokus jasno se razlikuje po izoenzimskom fenotipu od diploidnog križanca odnosno trisomika za neki drugi kromosom (Sl. 6). Budući da kritični trisomik ima dva majčinska i jedan očinski alel majčinska i hibridna (u slučaju dimernog izoenzimskog lokusa kakav je prikazan na Sl. 6) traka bit će deblje i vidljivije od očinske. Ukoliko se izoenzimski lokus ne nalazi na kromosomu u suvišku hibridna će traka biti jače izražena od majčinske i očinske.

Slika 6. Primjer lokalizacije izoenzimskog lokusa pomoću trisomika u  $F_1$  generaciji: Razlika između disomičnog i trisomičnog zimograma

Fig. 6. An example of isoenzyme locus localization using trisomic  $F_1$  plants: Differences between disomic and trisomic banding patterns



#### LOKALIZACIJA GENA POMOĆU TRISOMIKA: PRAKSA

Lokalizaciju gena na određenom kromosomu možemo pokazati na primjeru izoenzimskog markera *Sod-1* (Torres et al., 1995). Asinaptička linija (majka) bila je homozigotna za "brzi" alel izoenzima *Sod-1* (AA), dok je diploidna linija bila homozigotna za "spori" (aa). Genotip  $F_1$  trisomika stoga je Aaa.  $F_2$  generacija sastojala se od 28 diploidnih biljaka i 10 trisomika. Biljke su razvrstane po fenotipu (=genotip) i uspoređene s teoretskim vrijednostima pretpostavljajući diploidno odnosno trisomično razdvajanje.  $\chi^2$  test možemo provesti na podacima o diploidnim i trisomičnim biljkama odvojeno ili pak zajedno. U slučaju diploidnog razdvajanja relevantan je podatak dobiven testiranjem svih podataka zajedno jer ukoliko se radi o diploidnom razdvajanju (tj. gen se ne nalazi na kromosomu u suvišku) nema razloga odvajati diploidne biljke od trisomičnih. U Tab. 6. možemo vidjeti da se dobivene vrijednosti signifikantno razlikuju od teoretskih za diploidno razdvajanje ( $\chi^2$  14,421\*\* df 2). U slučaju trisomičnog razdvajanja podatke o diploidnim i trisomičnim biljkama potrebno je testirati odvojeno i utvrditi ima li signifikantnog otklona od teoretski očekivanog trisomičnog razdvajanja. Budući da nije otkriven niti jedan trisomični recesivni homozigot (aaa) možemo upotrijebiti Model slučajnog kromosomskog sparivanja koji ne pretpostavlja tvorbu takvog individuuma. Kao što se vidi iz Tab. 6.

dobiveni su nesignifikantni  $\chi^2$  kako u slučaju diploidne grupe biljaka ( $\chi^2$  1,009 df 2) tako i u slučaju trisomične ( $\chi^2$  1,829 df 1). Možemo zaključiti da se marker *Sod-1* nalazi na kromosomu 6 boba.

Ukoliko se tijekom istraživanja nekog svojstva otkrije trisomični homozigot očinskog fenotipa (aaa ako otac aaa odnosno AAA ako je otac AA) Model slučajnog kromosomskog sparivanja ne može se koristiti već se koriste druga dva modela.

#### *Omjer između vjerojatnosti diploidnog i trisomičnog razdvajanja*

Ukoliko dobiveno razdvajanje zbog nedovoljnog broja  $F_2$  individua nije signifikantno različito niti od diploidnog niti od trisomičnog razdvajanja  $\chi^2$  testom ne možemo doći do zaključka da li se navedeni gen nalazi na kromosomu u suvišku ili ne.

U ovakvom se slučaju može izračunati omjer između vjerojatnosti da je do razdvajanja određenog svojstva došlo pod pretpostavkom diploidnog odnosno trisomičnog razdvajanja.

$$\frac{P(2n+1)}{P(2n)} = \sum_{i=1}^c a_i \cdot \log \frac{f_i(2n+1)}{f_i(2n)} \quad [1]$$

gdje je,

$P(2n+1)$  - vjerojatnost da je razdvajanje određenog svojstva trisomično,

$P(2n)$  - vjerojatnost da je razdvajanje određenog svojstva diploidno,

$i$  - genotipska klasa,

$c$  - broj klasa,

$a_i$  - broj individua u klasi  $i$ ,

$f_i(2n+1)$  - očekivana učestalost klase  $i$  pod pretpostavkom trisomičnog razdvajanja,

$f_i(2n)$  - očekivana učestalost klase  $i$  pod pretpostavkom diploidnog razdvajanja.

Kritični omjer između dvije hipoteze koji dokazuje da je jedna od njih signifikantno vjerojatnija od druge može se dobiti pomoću sljedeće formule (Morton, 1956):

$$P\{p(H_1) / p(H_0) > A | H_0\} < 1/A \quad [2]$$

Iz navedene formule proizlazi da ukoliko želimo s 95% sigurnošću utvrditi da je hipoteza o trisomičnom razdvajanju signifikantno vjerojatnija ( $P < 0,05$ ), omjer između dvaju vjerojatnosti mora biti najmanje 20 : 1 u korist trisomičnog razdvajanja ( $A = 1 / 0,05 = 20$ ).

Tab. 6. Razdvajanja *Sod-1* u F2 generaciji koja potječe od F1 trisomika za kromosom 6 boba

Tab. 6. Segregation of *Sod-1* in F2 generation derived from F1 plant trisomic for chromosome 6 of faba bean

1. DIPLOIDNO RAZDVAJANJE / DIPLOID SEGREGATION

Zajedno/Pooled				Odvojeno/Separately			
2n, 2n+1	OBS	EXP	$\chi^2$	2n	OBS	EXP	$\chi^2$
AA	19	9.5	9.500	AA	15	7	9.143
Aa	16	19	0.474	Aa	10	14	1.143
aa	3	9.5	4.447	aa	3	7	2.286
n	38	38	14.421	n1	28		12.571
	$\chi^2$		14.421	2n+1	OBS	EXP	$\chi^2$
	df		2	AAA	4	2.5	0.900
				Aaa ili AAa	6	5	0.200
				aaa	0	2.5	2.500
				n <sup>2</sup>	10		3.600
				n	38		

2. TRISOMIČNA RAZDVAJANJE / TRISOMIC SEGREGATION

A) MODEL SLUČAJNOG KROMOSOMSKOG SPARIVANJA / RANDOM CHROMOSOME ASSOCIATION MODEL

2n, 2n+1	OBS	EXP	$\chi^2$	2n	OBS	EXP	$\chi^2$
AA	19	14.67	1.280	AA	15	12.44	0.525
Aa	16	20.22	0.882	Aa	10	12.44	0.480
aa	3	3.11	0.004	aa	3	3.11	0.004
n	38	38	2.166	n1	28		1.009
	$\chi^2$		14.421	2n+1	OBS	EXP	$\chi^2$
	df		2	AAA	4	2.22	1.422
				Aaa ili AAa	6	7.78	0.406
				n <sup>2</sup>	10		1.829
				n	38		

B) MODEL SLUČAJNOG KROMATIDNOG SPARIVANJA / RANDOM COMPLETE CHROMATID ASSOCIATION MODEL

2n, 2n+1	OBS	EXP	$\chi^2$	2n	OBS	EXP	$\chi^2$
AA	19	15.11	1.001	AA	15	12.44	0.525
Aa	16	19.56	0.646	Aa	10	12.44	0.480
aa	3	3.33	0.033	aa	3	3.11	0.004
n	38	38	1.681	n1	28		1.009
	$\chi^2$		14.421	2n+1	OBS	EXP	$\chi^2$
	df		2	AAA	4	2.67	0.667
				Aaa ili AAa	6	7.11	0.174
				aaa	0	0.22	0.222
				n <sup>2</sup>	10		1.063
				n	38		

C) MODEL TEORETSKI NAJVEĆEG RAZDVAJANJA /EQUATIONAL MAXIMUM SEGREGATION MODEL

2n, 2n+1	OBS	EXP	$\chi^2$	2n	OBS	EXP	$\chi^2$
AA	19	15.22	0.938	AA	15	12.44	0.525
Aa	16	19.93	0.592	Aa	10	12.44	0.480
aa	3	3.39	0.045	aa	3	3.11	0.004
n	38	38	1.575	n1	28		1.009
	$\chi^2$		14.421	2n+1	OBS	EXP	$\chi^2$
	df		2	AAA	4	2.78	0.538
				Aaa ili AAa	6	6.94	0.128
				aaa	0	0.28	0.278
				n <sup>2</sup>	10		0.944
				n	38		

TIP RAZDVAJANJA SEGREGATION TYPE	Zajedno /Pooled		Odvojeno/Separately				
	$\chi^2$	df	$\chi^2$	df	$\chi^2$	df	
1. DIPLOIDNO/DIPLOID	14.421	2	12.571	2	3.600	2	
2. TRISOMIČNO/ TRISOMIC	A)	2.155	2	1.009	2	1.829	1
	B)	1.681	2	1.009	2	1.063	2
	C)	1.575	2	1.009	2	0.944	2

Slična se statistička metoda poznata pod nazivom LOC scoring upotrebljava u analizi vezanosti gena (Lander i Botstein, 1986) koja se također temelji na gore navedenoj formuli.

*Geni boba lokalizirani upotrebom trisomika*

Prvo izvješće o upotrebi trisomika za lokalizaciju gena boba dao je González (1985) koji je testirao relativno mali broj morfoloških svojstava koristeći trisomike za kromosome 2 i 6, te uspio lokalizirati gen koji uvjetuje pojavu crvene mrlje na sjemenki boba na kromosomu 6.

Cabrera et al. (1989) je po prvi put kao izvor trisomije koristila asinaptičku liniju. Istraživala je nasljeđivanje devet gena za morfološka svojstva koristeći trisomike za kromosome 2, 3, 4 i 5. Pritom je uspjela lokalizirati gen za crvenu boju sjemenke na kromosomu 4, te gen koji uvjetuje determinirani rast biljke boba (ti) na kromosmu 5.

Šatović (1995; Šatović et al., 1996) je koristeći asinaptičku liniju dobio trisomike za kromosome 3, 4, 5 i 6 pokušao lokalizirati sedam gena za morfološka svojstva, 13 izoenzimskih gena, te 282 RAPD markera. Lokalizirao je gen za žutu boju cvijeta (*yf*) na kromosomu 5, dok je objedinjujući rezultate Gonzáleza (1985) i Cabrere et al. (1989) dokazao da se gen za patuljasti rast boba (*dw*) kao i gen za ravnomjernu raspodjelu pigmenta na cvijetu (*sdp*) može nalaziti samo na kromosomu 1 boba. Na isti su se način prvi put lokalizirali i

neki izoenzimski lokusi (Šatović, 1995; Torres et al., 1995): esteraza (*Est-2*) na kromosomu 3, fruktokinaza (*Fk-2*) na kromosomu 4, peroksidaza (*Prx-1*) na kromosomu 5, te 6-fosfoglukonat-dehidrogenaza (*Pgd-p*) i superoksid-dismutaza (*Sod-1*) na kromosomu 6. Torres et al. (1996) su daljnjim istraživanjima potvrdili lokalizaciju *Pgd-p* i *Sod-1* na kromosomu 3. Potrebno je istaći da u navedenim istraživanjima također negativni rezultati (tj. na kojem kromosomu se određeni gen ne nalazi) mogu biti od velike koristi za daljnji rad na izradi genske mape boba.

### ZAKLJUČAK

Izrada genske mape određene biljne vrste prvenstveno se sastoji od analize vezanih gena, te lokalizaciji gena odnosno grupe vezanih gena na kromosomima. Jedna od vrlo praktičnih metoda lokalizacije gena je upotreba trisomika. Kod boba (*Vicia faba* L.) je ta metoda naročito pogodna zbog postojanja asinaptičkih linija pomoću kojih je proizvodnja trisomičnih F<sub>1</sub> križanaca dovoljne životne sposobnosti i fertiliteta laka i postojana.

Za razliku od ostalih mahunarki (prvenstveno grašak i soja, a zatim i grah, slanutak i leća) kod kojih genske mape obuhvaćaju već stotine gena, bob je bio predmetom malobrojnih istraživanja. Navedenom će metodom biti moguće u relativno kratkom vremenu lokalizirati mnoge gene boba.

### THE USE OF TRISOMICS IN GENE LOCALIZATION IN FABA BEAN (*Vicia faba* L.)

#### SUMMARY

The paper reviews the use of primary trisomics in chromosomal localization of genes in faba bean (*Vicia faba* L.). Asynaptic mutants have been used in faba bean as a reliable source for the production of trisomics. An attempt is made to arrange the theoretical information needed for using primary trisomics in localizing genes and to discuss the results of recent studies on this field.

Key words: faba bean, *Vicia faba* L., trisomics, asynaptics, gene localization

#### LITERATURA - REFERENCES

1. Borojević, S. i Borojević, Katarina 1976. Genetika. Univerzitet u Novem Sadu, Novi Sad. str. 252
2. Barceló, Pilar 1987. Identificación de los trisómicos primarios de *Vicia faba* L. Doktorska disertacija. Universidad de Córdoba, Facultad de ciencias, Sección biológicas, Departamento de Genética. Córdoba, Španjolska.
3. Barceló, Pilar i Martín, A. 1990. The identification of faba bean (*Vicia faba* L.) trisomics by translocation tester set. *Euphytica*. 47: 45-48.
4. Cabrera, Adoración 1988. Genética de la pigmentación y del contenido de taninos condensados en *Vicia faba* L. Doktorska disertacija. Universidad de Córdoba, Facultad de Ciencia, Sección biológicas, Departamento de Genética. Córdoba, Španjolska.



Z. Šatović i sur: upotreba trisomika u lokalizaciji gena boba (*Vicia faba* L.)  
Siemenarstvo 13(96)3-4, str. 229-245

5. Cabrera, Adoración., Cubero, J.I. i Martín, A. 1989. Genetic mapping using trisomics in *Vicia faba* L. FABIS Newslett. 23: 5-7.
6. Cubero, J.I. 1974. On the evolution of *Vicia faba* L. Theor. Appl. Genet. 45: 47-51.
7. Cubero, J.I. 1982. Interspecific hybridisation in *Vicia*. En: Faba bean improvement. G. Hawtin y C. Webb (eds.) . Martinus Nijhoff, The Hague, pp. 91-108.
8. González, J.A. 1985. Tetraploidia, aneuploidia y asinapsis en *Vicia faba* L. Doktorska disertacija. Universidad de Córdoba, Facultad de Ciencias, sección Biológicas, Departamento de Genética. Córdoba, Španjolska.
9. González, J.A. i Martín, A. 1983. Development, use and handling of trisomics in *Vicia faba* FABIS Newslett. 6: 10-11.
10. González, J.A., Padilla, J.A. i Martín, A. 1981. Characteristics of *Vicia faba* trisomics FABIS Newslett. 3:30.
11. Hanelt, P. 1972. Zur Geschichte des Anbaues von *Vicia faba* L. und ihrer verschiedenen Formen. Kulturpflanze. 20: 209-223.
12. Harlan, J.r. y de Wet, J.M.J. 1971. Towards a rational classification of cultivated plants. Taxon 20: 509-517.
13. Hermesen, J.G.T. 1970. Basic information for the use of primary trisomics in genetic and breeding research. Euphytica 19: 125-140.
14. Ladizinsky, G. 1975. On the origin of the broad bean *Vicia faba* L. Isr. J. Bot. 24: 80-83.
15. Lander, E.S. y Botstein, D. 1986. Mapping complex genetic traits in humans: New methods using a complete RFLP linkage map. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 49-62.
16. Lawes, D.A., Bond, D.A. i Poulsen, M.H. 1983. Classification, origin, breeding methods and objectives. U: The faba bean (*Vicia faba* L.). P.D. Hebblethwaite (ur.). University Press, Cambridge. str. 23-76.
17. Martín, A. i Barceló, Pilar 1984. The cytology and morphology of *Vicia faba* trisomics. U: Systems for cytogenetic analysis in *Vicia faba* L. G.P. Chapman i S.A. Tarawai (ur.). Martinus Nijhoff / Dr W. Junk Publishers, The Hague. str. 63-76.
18. Morton, N.E. 1956. Sequential tests for the detection of linkage. Am. J. Hum. Genet. 7:277-318.
19. Poulsen, M.H. i Martín, A. 1977. A reproductive tetraploid *Vicia faba* L. Hereditas. 87: 123-126.
20. Ramsey, G. i Pickersgill, Barbara 1984. Interspecific hybridisation in *Vicia faba* : comparison of selfed and hybrid embryo and endosperm. U: Systems for cytogenetic analyses in *Vicia faba* L. G.P. Chapman i S.A. Tarawali (ur.). Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, The Hague, str. 138-140.
21. Sjödin, J. 1970. Induced asynaptic mutants in *Vicia faba* L. Hereditas. 66: 215-232.
22. Šatović, Z. 1995. Mapeo de marcadores morfológicos y moleculares en *Vicia faba* L. aplicado a su mejora genética. Magistarski rad. C.I.H.E.A.M. - I.A.M.Z. Zaragoza, Španjolska.
23. Šatović, Z., Torres, Ana Maria i Cubero, J.I. 1995. The need of standardization in faba bean gene mapping FABIS Newslett. 34/35: 3-6
24. Šatović, Z., Torres, Ana Maria i Cubero, J.I. 1996. Gene mapping of new morphological, isozyme and RAPD markers in *Vicia faba* L. using trisomics. Theoretical and Applied Genetics (u tisku)
25. Tanksley, S.D. 1983. Gene mapping. U: Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A. S.D. Tanksley i T.J. Orton (ur.). Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam. str. 105-138.
26. Torres, Ana María, Šatović, Z., Cánovas, J., Cobos, Susana, Cubero, J.I. 1995. Genetics and mapping of new isozyme loci in *Vicia faba* L. using trisomics. Theor. Appl. Genet. 91: 783-789.
27. Torres, Ana Maria, Vaz Patto, Maria Carlota, Šatović, Z. i Cubero, J.I. 1996. Further genetic analysis and mapping of isozyme loci in faba bean (*Vicia faba* L.) using trisomics. Theoretical and Applied Genetics (poslano za tisak).

**Adresa autora - Authors' address:**

mr. Zlatko Šatović  
prof. dr. Ivan Kolak  
Zavod za oplemenjivanje bilja, genetiku i metodiku istraživanja  
Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu  
Svetošimunska 25  
HR-10000 Zagreb

dr. Ana María Tores  
Departamento de Mejora y Agronomía  
Apartado 4240  
14080 Córdoba  
SPAIN

**Primljeno - Received**

12. 6. 1996