

ANALIZA DNA HIBRIDNIH PLATANA (*Platanus acerifolia* /Aiton/ Willd.) DRVOREDA GRADA SARAJEVA

DNA ANALYSIS OF LONDON PLANETREE OF TREE LINED WALKWAYS OF THE CITY OF SARAJEVO

Emira HUKIĆ¹, Aikaterini DOUNAVI², Dalibor BALLIAN¹

SAŽETAK: U ovom članku prikazano je istraživanje tri skupine stabala hibridne platane (*Platanus acerifolia* /Aiton/ Willd.) iz aleja sa Sarajevskog područja, točnije s lokalitetima: Ilidža, Nedžarići, Dobrinja. Platane su zasađene u različitim razdobljima, početkom 20 stoljeća, potom osamdesetih godina pred Olimpijske igre u Sarajevu, te neposredno nakon domovinskog rata u Bosni i Hercegovini. Kao kontrola u ovom istraživanju uporabljena je istočnjačka platana (*Platanus orientalis* L.) podrijetlom sa Cipra.

Uspoređene su četiri mikrosatelitne (*ccmp3*, *ccmp6*, *ccmp7*, *ccmp10*) i jedna nekodirajuća hloroplastna DNA regija (*trnT-trnL*) te jedna jezgrena (5S) regija. Na temelju dobivenih rezultata nije bilo moguće razlikovati istraživane jedinke.

Cljučne riječi: Hibridna platana (*Platanus x acerifolia*), DNA, mikrosateliti

UVOD – Introduction

Hibridna platana (*Platanus acerifolia* /Aiton/ Willd.) već je dugo zastupljena u bosanskohercegovačkim gradovima kao hortikultura vrsta drveća. Tako je postala tradicionalno i vrlo cijenjeno parkovno drvo. Platana se sadi i njeguje diljem Europe, što ne čudi ukoliko sagledamo njezina svojstva, koja su prikladna u svim gradskim sredinama.

Platana je u Bosni i Hercegovini alohtona vrsta koja ne gradi prirodne populacije, a prvi put se pojavljuje kao unesena vrsta za vrijeme austrougarske vladavine, prije 120 godina. Tada najprije počinje sadnja, oko željezničkih postaja, a kasnije i u parkovima, drvoredima i alejama. Kao materijal za sadnju rabe se jedinke hibridne platane, nastale križanjem između *P. orientalis* L. i *P. occidentalis* L. (*P. x acerifolia*), koje se masovno koriste u Europi sredinom 19. stoljeća.

Danas jedinke koje su sađene tijekom austrougarske vladavine dostižu zavidne dimenzije, kako visinom, tako i promjerom, a kao primjer mogu poslužiti platane u Velikoj aleji na Ilidži, koje su sađene početkom 20. stoljeća (Slika 1). Sadnja platana u Sarajevu i drugim bosanskohercegovačkim mjestima nastavlja se i kasnije, a posebice u razdoblju pred Zimske olimpijske igre u Sarajevu (1983 godine), kao i u vrijeme nakon Domovinskog rata u BiH, tijekom 1996. i 1997. godine.

Najbliže prirodne populacije istočnjačke platane (*P. orientalis* L.) nalaze se u Makedoniji (Jovanović 1971). Ova platana raste na riječnim sprudovima Vardara i njegovim pritokama, do Skopske doline i nizvodno, posebno u toku rijeke Strume i oko Dojranskog jezera, gdje gradi šumsku zajednicu s orahom (*Juglans-Platanetum orientalis* Em et Džek., 1961). Platana u tim prirodnim uvjetima raste na nadmorskim visinama između 100 i 500 m dok se rjeđe penje do 700 m. U tim optimalnim ekološkim uvjetima, između 40. i 50. godine starosti, platane postižu visinu od 40 m i drvnou masu do 1300 m³/ha (Stefanović 1977).

¹ Šumarski fakultet u Sarajevu, Zagrebačka 20, 71000 Sarajevo, Bosna i Hercegovina.

² Forstliche Versuch und Forschungsanstalt Baden-Württemberg, Abteilung Waldökologie, Wonnhaldestraße 4, 79100 Freiburg, Deutschland.



Slika 1. Aleja platana na Ilidži
Figure 1 The walkway of London planetree ad Ilidža

Južni i jugozapadni dijelovi BiH, osobito dolina rijeke Neretve, odlikuju se mediteranskom i submediteranskom klimom, koja ekološki odgovara istočnjačkoj platani. Na temelju stalnih promatranja na terenu, moguće je zaključiti da se u tom području platana spontano širi. Isti fenomen primjećen je u srednjem toku rijeke Une, te duž rijeke Bosne u uvjetima kontinentalne klime. Dakle, za platanu se može reći da je invazivna vrsta koja nam može poslužiti kao pokazatelj velikih promjena u našem okolišu. Ista tako može odigrati i jako važnu ulogu u šumarstvu, u novonastalim uvjetima globalnog zatopljenja.

U gradskim uvjetima, platana dobro uspijeva te je tolerantna prema stalnim gradskim zagađivačima. Platana se odlikuje snažnim i razvijenim korijenskim sustavom (i dubinskim i površinskim), te može biti značajna za zaštitu od površinskog oticanja vode, zaštitu od erozije i očuvanje vodotoka, a ujedno može biti važan izvor drvene mase.

Istraživane svojte – Studied taxa

Rod *Platanus* je relativno mali rod i jedini je predstavnik porodice *Platanaceae* i javlja se samo na sjevernoj hemisferi.

Istočnjačka platana (*P. orientalis* L.) rasprostranjena je u Makedoniji, Albaniji, Grčkoj, Turskoj, Maloj Aziji, do Perzije, Turkeстана i Avganistana (Jovanović 1971). Raste obično na vlažnim staništa riječnih dolina. Izvan svog prirodnog areala, istočna platana odlično uspijeva u sjevernoj Africi.

Američka platana (*P. occidentalis* L.) nastanjuje istočnu obalu Sjeverne Amerike i drži se dolina rijeka i aluvija, ali ne raste u područjima gdje voda stagnira (Axelrod 1975).

Rod *Platanus* obuhvaća dva podroda, *Castanophyllum* (sa jednim svojim predstavnikom *P. kerri*) i podrodom *Platanus* s ukupno devet svojti (Nixon i Poole 2003). Filogenetska veza između svojti unutar roda utvrđena je molekularnim metodama. Potvrđeno je da se rod može podijeliti u dva podroda, gdje je *P. kerri* jedan jedini predstavnik podroda *Castanophyllum* (Leroy 1982).

U hortikulturi, kao i u proizvodnji drvene mase u mediteranskim zemljama najčešća je javorolisna platana (*P. acerifolia*), dobivena križanjem istočnjačke i zapadnjačke platane. Pretpostavlja se da je hibrid prvi put dobiven u Engleskoj, 1640, a u literaturi se može naći pod imenom londonska platana. Treba istaći da kultivirana stabla javorolisne platane ne čine homogenu skupinu. Ne tako davno, 1991. godine Henry i Flood su radeći sa starim herbarskim materijalima, uz analizu listova i plodova, pokušali rekonstruirati



Slika 2. List zapadnjačke, hibridne i istočnjačke platane (www.aranya.co.uk/planes/text/leaf/photos.html).
Figure 2 American, hibrid and oriental planetree leaves (www.aranya.co.uk/planes/text/leaf/photos.html).

moguću povijest hibrida *P. acerifolia* (Aiton) Willd., nastalog u Oksfordskom Botaničkom vrtu tijekom 17. stoljeća. Od tada do danas, brojne aktivnosti na križa-

njima između platana dovela su do velike raznolikosti među jedinkama javorolisne platane.

Tablica 1. Osnovne morfološke osobine zapadnjačke, istočnjačke platane i njihovog hibrida
Tabel 1 Basic morphological features of American and Oriental planetree and their hybrid

Svojta	Broj režnjeva na listu	Širina, dužina, nazubljenost režnja lista	Broj orašica na osi lista
<i>P. occidentalis</i> , L.	3- (rjeđe) 5	Krupno nazubljeni, nisu dublji od 1/3 dužine žile lista	1-2
<i>P. x acerifolia</i> L.	5	Trouglasti i malo nazubljeni, urezi do 1/3 dužine žile lista	2-4
<i>P. orientalis</i> L.	5 (većih) i 2 (manja)	Urezi dublji od 1/2 dužine žile lista, vrhovi zašiljeni	2-6

Biljni materijal – Plant materijal

Izučavane grupe stabala nalaze se na tri lokaliteta u Sarajevu: Ilidža, Nedžarići, Dobrinja. Kako su drvoreći podizani u različitim razdobljima, odnosno u različitim društvenim okruženjima, vrlo je vjerojatno da je i podrijetlo sadnog materijala različito. Jedinke koje su zasađene na Ilidži (prije 120 godina) podrijetlom su iz Mađarske, jedinke zasađene u naselju Dobrinja podrijetlom su iz Subotice, a drvoreći koji je podignut u Nedžarićima podrijetlom je iz Barcelone. Za razliku od prva dva drvoreća, drvoreći u Nedžarićima nije homogenog sastava te je određeno više tipova hibrida, pa čak i čista vrsta *P. orientalis* (Janjić N., 2006. osobni kontakt) nastala, najvjerojatnije segregacijom iz povratnih križanja. U drvoreću u Dobrinji su i dva specifična kultivara *Cv. globuosa* i *Cv. pyramidalis*.

Istraživane platane čine heterogenu skupinu, nesigurnog genetskog statusa koje nije moguće odrediti na osnovi fenotipskih obilježja. Odrediti hibridne jedinke,

kao i razlikovanje unutarhibridnih vrsta, pomogla bi identifikacija genotipova, koji u specifičnim uvjetima gradske sredine pokazuju najbolja fenotipska svojstva.

Cilj istraživanja bio je analizirati tri skupine stabala hibridnih platana sa Sarajevskog područja i jedinke istočnjačke platane podrijetlom sa Cipra, usporedbom četiri kloroplastne mikrosatelitne regije (*ccmp3*, *ccmp10*, *ccmp6*, *ccmp7*) (Weising i sur. 1999; Deguilloux i sur. 2003), jedne nekodirajuće kloroplastne (*trnT-trnL*) (Taberlet i sur. 1991) i jedne jezgrine (*5S*) regije (Hebel i sur. 2006). Na ovaj način, pokušat će se, na genetičkoj razini razlikovati hibridne platane u drvorećima i alejama. Na temelju toga bi se kasnije mogla izvršiti usporedba sa samoniklim platanama duž gore spomenutih rijeka, u cilju izdvajanja genetički najperspektivnijih jedinaka koje bi mogle poslužiti kod podizanja novih drvoreća, aleja ili energetskih nasada.

MATERIJAL I METODA RADA – Materials and methods

Svježi zeleni listovi, sakupljeni tijekom lipnja 2006., zamotani u plastične vrećice pohranjeni su na temperaturi – 20 °C. Iz svakog drvoreća materijal je sabran slučajnim izborom sa 24 stabla, osim 10 kontrolnih jedinaka istočne platane (*P. orientalis*), podrijetlom sa Cipra dobivenih razmjenom materijala s kolegom koji je s tog otoka, C. Neophytou, a koji trenutno radi na FVA instituta u Frajburgu.

Ukupna stanična DNA je izolirana uz pomoć Dneasy Plant Mini kompleta (Qiagen®), a uspješnost izolacije DNA je provjeravana elektroforezom u 1 % agaroznom gelu.

Dobivena reakcija umnožena je lančanom reakcijom polimerazom sa četiri para mikrosatelitnih početnica *ccmp3*, *ccmp6*, *ccmp7*, *ccmp10*, (Weising i sur. 1999; Deguilloux i sur. 2003), te kloroplastnim početnicama *trnT-trnL* (Taberlet i sur. 1991), kao i sa *5S* početnicom (Hebel i sur. 2006 i Zhan-Lin Liu i sur. 2003).

Umnožavanje *ccmp* mikrosatelitnih regija lančanom reakcijom polimerazom otopina sadržavala je 1x reakcijski pufer, 2,5 mM MgCl₂, 200 μM dNTP, 0,2 μM para početnica, 1U Taq polimeraze i 5-50 ng DNA otopine. Ukupni reakcijski volumen bio je 25 μl.

Umnožavanje spomenutih kloroplastnih mikrosatelitnih regija provedeno je u Thermal Cycler uređaju (Applied Biosystems®) sljedećim temperaturnim profilom 94 °C 2 min, te 30 ciklusa: 94 °C 1 min, 57 °C 1 min i na 72 °C 1 min, a završna elongacija na 72 °C trajala je 10 min. Produkti umnožavanja analizirani su u ABI3100-Avant Genetic Analyser uređaju (Applied Biosistem®).

PCR otopina za umnožavanje *trnT-trnL* regije bila je ista kao otopina za umnožavanje *ccmp* mikrosatelitnih regija, osim što je koncentracija MgCl₂ bila 2,0 μM.

Umnožavanje DNA lančanom reakcijom polimerazom provedeno je pod sljedećim uvjetima: 95 °C 3 min

i 39 ciklusa na 94 °C 1 min, 62 °C 2 min, 72 °C 4 min, te završnom temperaturom 72 °C 7 min.

Za razliku od ostalih istraživanih regija za umnožavanje 5S jezgrene regije bilo je potrebno povećati koncentraciju MgCl₂ na 2,5 μM. Uvjeti umnožavanja bili su: 94 °C 1 min i 34 ciklusa 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min.

Restrikcija umnoženih regija izvršena je s *Pst* I, *Hinf* I, *Xba* I i Bam HI restrikcijским enzimima (Bajrović i sur. 2005), u termostatu na temperaturi od 35 °C, trajanju od 12 sati (preko noći). Pri naponu 100 V, kroz 4 do 5 sati, restrikcijски DNA fragmenati razdvojeni su u 1,5 % agaroznom gelu.



Slika 3. Elektroforetsko razdvajanje restrikcijских DNA fragmenata istraživanih regija na 1,5 % agaroznom gelu
Figure 3. Electrophoretic splitting of DNA restriction fragments of explored regions in 1,5 % agar gel

REZULTATI ISTRAŽIVANJA – Results of research

Analizirano je ukupno 72 stabla platana, sa tri lokacije u Sarajevu: Ilidža, Dobrinja s jednom hibridnom skupinom, Nedžarići s prilično nehomogenim sastavom i deset stabala čiste istočnjačke platane podrijetlom sa Cipra, kao kontrolnom skupinom.

Sve analizirane DNA sekvence imale su jednake dužine. Sve kloroplastne mikrosatelitne regije imale su

samo po jedan alel sa sljedećim dužinama: 103 bp *ccmp3*, 92 bp *ccmp6*, 116 bp *ccmp7* i 114 bp za *ccmp10*.

Sve istraživane DNA regije bez obzira na uporabljenu metodu bile su u potpunosti jednake kod istraživanih jedinki.

RASPRAVA – Discussion

Četiri analizirane kloroplastne DNA mikrosatelitne oblasti, s jednakim dužinama sekvenci kod svih promatranih jedinki istočnjačke i javorolisne platane upućuju na to da su, analizirani dijelovi dominantni u procesima nasljeđivanja, a što je i poznato s obzirom da ovaj tip analiza determinira samo dominantnu regiju.

Nepostojanje polimorfizma na analiziranim kloroplastnim DNA sekvencama *P. acerifolia*, i čiste vrste *P. orientalis*, očigledno upućuju na nasljeđivanje dominantnog gena od majčinske jedinike *P. orientalis*.

Treba istaći da uporabljene početnice u istraživanju platane nisu dovoljno informativne za pronalaženje značajne različitosti između analiziranih grupa, kao ni među jedinkama čiste platane i njegovih hibrida. Da bi se razlikovale i lakše odredile jedinice različitog podrijetla i pripadnosti hibridnih skupina, a koje uspijevaju u različitim ekološkim uvjetima, neophodno je pronaći nove informativnije sekvence koje bi dale raznolikost.

ZAKLJUČAK – Conclusion

Uporabom dvije metode kod istraživanja haplotipova četiri mikrosatelitne regije, *trnT-trnL* unutargenskog prostora, kao i 5S jezgrene DNA, nije dobijen željeni polimorfizam između jedinki ispitivanih skupina javorolisne platane.

Može se zaključiti, da s navedenim kloroplastnim i jezgrinim početnicama nije moguće razlikovati hibridne jedinice od čiste vrste (*P. orientalis* međusobno), kao ni hibridne jedinice međusobno, te na kraju da u

ovom istraživanju izabrane DNA regije i metode ne odgovaraju zadanom cilju istraživanja.

Kako bi se upoznali s genetičkom strukturom iste, i razotkrili polimorfizam između hibrida i čistih svojti, neophodno je nastaviti s daljnjim istraživanjima DNA sekvenci.

LITERATURA – References

- Axelrod, D. I. 1975: Evolution and biogeography of Madreantethyan slerophyll vegetation. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 62: 280–334.
- Bajrović, K., A. Jevrić-Čaušević, R. Hadžiselimović, (eds.) 2005: Uvod u genetičko inženjerstvo i biotehnologiju. INGEB, Sarajevo.
- Besnard, G., A. Tagmount, P. Baradat, A. Vigouroux, A. Berville, 2002: Molecular approach of genetic affinities between wild and ornamental *Platanus*, *Euphytica* 126: 126, 401–412.
- Deguilloux, M. F., S. Dumolin-Lapegue, L. Gielly, D. Grivet i R. J. Petit, 2003: A set of primers for the amplification of chloroplast microsatellites in *Quercus*. *Molecular Ecology Notes* 3(1): 24–25.
- Dewey, R. E., C. S. III Levings, D. H. Timothy, 1986: Novel Recombination in the Maize Mitochondrial Genome Produce a Unique Transcriptional Unit in the Texas Male-Sterile Cytoplasm. *Cell*, Vol. 44, 439–449.
- Hebel, I., R. Haas, A. Dounavi, 2006: Genetic Variation of Common Ash (*Fraxinus excelsior* L.) Population From Provence Regions in Southern Germany by Using Nuclear and Chloroplast Microsatellites, *Silvae Genetica* 55 (1): 38–44.
- Henry, A., M. G. Flood, 1991: The history of London plane (*Platanus acerifolia*). Notes on the genus *Platanus*. *Proc. R. Irish. Acad., Gard. Chron.*, 1856: 282.
- Jovanović, B. 1971: Dendrologija sa osnovama fitocenologije, Beograd.
- Leroy, J. F. 1982: Origine et evolution du genre *Platanus* (*Platanaceae*). *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III*, 295: 251–254.
- Nixon, K. C., J. M. Poole, 2003: Revision of the Mexican and Guatemalan species of *Platanus* (*Platanaceae*). *Lundellia* 6: 103–137.
- Sajal, J., A. Kosova, A. Kormutak, A. Waller, 1998: Ultrastructural and molecular study of plastid inheritance in *Abies alba* and some *Abies* hybrids, *Sexual Plant Reproduction*, 11 (5): 284–291.
- Stefanović, V., 1977: Fitocenologija sa pregledom šumskih fitocenoza Jugoslavije, Sarajevo.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou, J. Bouvet, 1991: Universal primers for amplification of three non non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- Vigouroux, A., G. Besnard, K. Sossey-Alaoui, M. Terasac, A. Berville, 1997: Le statut d'hybride de *Platanus acerifolia* confirmé et celui de *P. densicoma* mis en évidence a l'aide de marqueurs génétiques moléculaires; conséquences, *Acta bot. Gallica*, 144 (2): 243–251.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolff, G. Kahl, 2005: DNA Fingerprinting in Plants, Principles, Methods, and Applications (dodataci referencu do kraja).
- YunFeng, Sang-Hun Oh, P. S. Manos, 2005: Phylogeny and Historical Biogeography of the Genus *Platanus* as Inferred From Nuclear and Chloroplast DNA, *Systematic Botany*, 30 (4): 786–799.
- www.aranya.co.uk/planes/text/leaf/photos.html

SUMMARY: Interspecific hybridization often blurs the species boundaries both in natural and artificial conditions. Thus a verification of identity based on morphological characters only is not sometimes fully reliable. Such an example is the case of Platanus x acerifolia and P. orientalis co-occurring in city tree line, parks and artificial stands. Therefore we carried out an analysis using molecular markers to distinguish tree individuals that could not be assigned either to P. x acerifolia or P. orientalis. The individuals of P. x acerifolia and P. orientalis originated from three mixed groups collected in Sarajevo area and a group of P. orientalis from Cyprus was used as a control group. The four cpDNA microsatellite primers (ccmp3, ccmp6, ccmp7, ccmp10), an ITS sequence of trnT-trnL region and a pair of 5S nDNA primers were used to distinguish Platanus sp. individuals. No polymorphism was detected for any of analyzed DNA sequences and therefore distinction between the plane trees could not be achieved. The lack of polymorphism might be explained by dominant mode of inheritance for targeted sequences that are maternally transferred in hybridization processes.

Key words: London planetree (Platanus x acerifolia), DNA, microsatellite