

## BILJEZI I OSNOVNE MJERE GENETIČKE VARIJABILNOSTI ZNAČAJNE U MOLEKULARNO GENETIČKIM ISTRAŽIVANJIMA

### MARKERS AND BASIC MEASURES OF GENETIC VARIABILITY SIGNIFICANT IN MOLECULAR GENETIC STUDIES

Dalibor BALLIAN\*

*SAŽETAK: U radu je prikazana osnovna primjena molekularno genetičkih biljega koji se koriste u istraživanjima šumskog drveća, odnosno mjere genetičke varijabilnosti koje se mogu dobiti njihovim korištenjem. Dobivene mjere genetičke varijabilnosti omogućavaju pouzdanu procjenu genetičke strukture kako unutar populacije, tako i na međupopulacijskoj razini.*

*Tako sve mjere genetičke varijabilnosti možemo podijeliti na one koji su bitne za procjenu prisutne razine genetičke varijabilnosti unutar populacije i genetičke diferencijacije između populacija.*

*Ključne riječi: biljezi, varijabilnost, diferencijacija, populacija*

#### UVOD – Introduction

Već duži niz godina u Šumarskom listu se pojavljuju znanstveni i stručni članci koji obrađuju problematiku biokemijskih i molekularnih biljega. Nešto više svjetla o toj problematici daju Franjić i Liber (2001) u svom članku, ali se zadržavaju samo na prikazu mogućih tehnika i metoda koje se primjenjuju u molekularnih istraživanja kod šumskog drveća. Uvijek u takvim član-

cima za običnog čitatelja ostaje nedokučeno na koji način se dolazi do parametara varijabilnosti, što oni predstavljaju, odnosno na koji se način može doći do razlika između istraživanih populacija. Kroz ovaj članak pokušat ćemo upoznat čitatelja s osnovnim biljezima, te mjerama varijabilnosti do kojih dolazimo kroz analizu biokemijskih i molekularnih genetičkih biljega.

#### Biljezi – Markers

Istraživanja na molekularno genetičkoj razini u jednoj ili više populacija pretpostavljaju analizu genetičkih biljega. Biljezi se mogu definirati kao nasljedna svojstva koja pokazuju određeni stupanj varijabilnosti između individua jedne populacije, a koji označavaju jednu regiju na kromosomu. Iz toga je vidljivo da biljezi trebaju biti što reprezentativniji unutar genoma, da bi se na taj način dobila vrijednosti genetičke varijabilnosti (Bellati i dr. 2003).

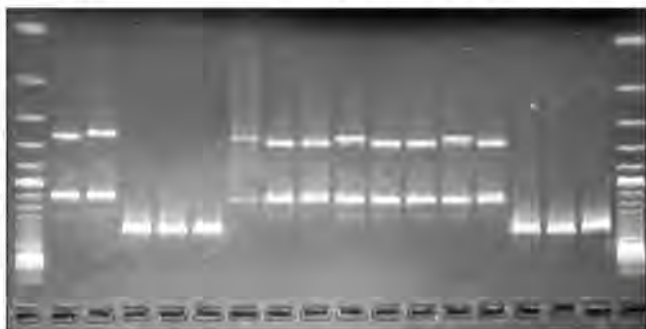
Da bi jedan genetički biljeg omogućio pouzdanu procjenu genetičke varijabilnosti treba pokazati brojna svojstva, a među njima su najvažnija ona s kojima se lako dolazi do podataka o varijabilnosti, uz prihvatljivu

cijena analize (Boscherini i Vendramin, 1992). Osim toga, idealan biljeg treba biti oslobođen od utjecaja ekoloških čimbenika u svom fenotipskom iskazivanju, dakle on treba biti strogo neutralan. Kontrola genetičkih osnova, iako je vrlo jednostavna, jer je u pitanju jedan ili mali broj gena, što olakšava u znatnoj mjeri analiziranje podataka. Sličan odgovor odnosi se na kodominantnost koja omogućava neposredne razlike između heterozigotnih i dominantnih homozigota. I na kraju, biljeg treba predstavljati značajan izvor varijabilnosti između individua u populaciji, pokazati polimorfizam, a njega treba analizirati kroz vremenska ponavljanja, kao i kroz druge metode. Očigledno je da biljeg koji pokazuje na apsolutnoj razini sva svojstva u biti ne postoji, stoga se radi na tome da se izdvoje oni koji mogu bolje poslužiti ovoj vrsti analiza, te se mogu i jednostavno analitički prikazati.

\* Dr. sci. Dalibor Ballian, Šumarski fakultet u Sarajevu, Zagrebačka 20, 71 000 Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Genetički biljezi mogu se svesti na četiri velike kategorije: morfološke, fiziološke, biokemijske i molekularne.

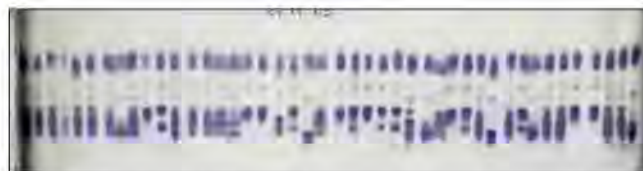
Morfološki biljezi odnose se na svojstva vezana uz fenotip individua (oblik i boja listova, cvijetova, češe-



Slika 1. Biljeg jezgrina genoma: Mikrosatelitna DNK, trnF regija, kod roda *Populus*. (Ljubaznošću kolega iz Šumarskog instituta u Teisendorfu, ASP).

Figure 1 Marker of the nuclear genome: Microsatellite DNA, trnF region, in the genus *Populus*. (With the kindness of the colleagues from the Institute of Teisendorf, Faculty of Forestry, ASP).

ra, sjemena i sl.) i stoga nalaze sve manju uporabu u suvremenim šumarskim istraživanjima, posebice zbog toga što su u znatnoj mjeri pod utjecajem okolišnih čimbenika na fenotipsku ekspresiju, kao i zbog nepoznavanja tipa nasljeđivanja istraživanih svojstava, te velikog obima posla oko mjerenja i obrade podataka. Ipak ova istraživanja su i dalje aktualna, i nisu izgubila na svom značenju razvojem i uporabom novih statističkih metoda.



Slika 2. Biokemijski biljeg: Izoenzim, enzimski sustav 6-phosphoglucomatedehydrogenase kod običnog bora. (Ljubaznošću kolega iz Šumarskog instituta u Teisendorfu, ASP).

Figure 2 Biochemical marker: Isoenzyme, enzyme system 6-phosphoglucomatedehydrogenase in common fir. (With the kindness of the colleagues from the Institute of Teisendorf, Faculty of Forestry, ASP).

Tablica 1. Svojstva biokemijskih i molekularnih biljega koji se koriste u istraživanjima šumskog drveća  
Table 1 Traits of biochemical and molecular markers used in studies of forest trees

Tip biljega	Način nasljeđivanja		Razina genetičke varijabilnosti	Funkcija
	Način iskazivanja	Način ekspresije gena		
AFLP RAPD	Diploidna jezgra, mnogo lokusa, nepoznat broj alela po lokusu	Dominantnost kod nekih lokusa, ostali su kodominantni	Jako velika varijabilnost, svaka individua ima svojstvene vrpce	Nepoznata
Jezgrini mikrosateliti	Diploidna jezgra, nekoliko lokusa, mnogo alela po lokusu	Kodominantnost, sa posebnim bezvrijednim alelima u nekim lokusima	Velika varijabilnost unutar populacija, niska diferenciranost među populacijama	Ne kodira, možda doprinosi genomskoj stabilnosti
Kloroplastni mikrosateliti (cpDNK)	Haploid. (majčinski kod angiospermi, očev kod četinjača) Pojava pseudohaplotipa, jednostruki lokus, mnogo alela po lokusu	Svaki citotip je iskazan	Niska varijabilnost unutar populacija, visoka diferenciranost među populacijama	Ne kodira
Mitohondrijalni biljezi (mDNK)	Haploidan (majčinski) pseudohaplotip, jednostruki lokus, mnogo alela po lokusu	Svaki citotip je iskazan	Niska varijabilnost unutar populacija, visoka diferenciranost među regijama	Ne kodira
ITS kod ribosomalne DNK (rDNK)	Diploidna jezgra, nekoliko lokusa, nekoliko alela po lokusu	Kodominantnost	Visoka varijabilnost, jednaka među pojedinim individuama	Ne kodira
cDNK biljezi	Diploidna jezgra, jedan do nekoliko lokusa, nekoliko alela po lokusu	Kodominantnost	Niska varijabilnost unutar populacija, niska diferenciranost među populacijama	Funkcionalna diferenciranost moguća između alela kod lokusu
Izoenzimi	Diploid, 1-5 lokusa, 1-7 alela po lokusu	Kodominantnost, s posebnim bezvrijednim alelima u nekim lokusima	Niska do srednja varijabilnost unutar populacija, niska diferenciranost među populacijama	Funkcionalna diferenciranost moguća između alela kod lokusu



Fiziološki biljezi pozivaju se na fenologiju individualna, odnosno na periode vegetativnog kretanja, cvjetanja, sazrijevanja i sl., ali u načelu pokazuju još očitije nedostatke od morfoloških. Izuzetak mogu predstavljati fenološka istraživanja u kontroliranim uvjetima ili u terenskim testovima.

Biokemijski biljezi (tablica 1) su međutim primarni proizvodi transkripcije nasljednog materijala, kao što je DNK i RNK, terpeni, antocijani ili bjelančevine. Među ovim posljednjim, enzimske bjelančevine, poznate kao izoenzimi, općenito se najviše rabe u šumarskim istraživanjima (Möller, 1986; Breitenbach, 1988; Wendel i Weeden, 1989; Konnert, 1996; Ballian 2003). Riječ je o bjelančevinama koje su visoko specijalizirane, a koje kataliziraju brojne kemijske reakcije unutar živih stanica. Pojmom izoenzim preciznije se označavaju razni molekularni oblici jednog te istog enzima, a koji mogu biti različiti po dimenzijama, kemijskoj strukturi i mobilnosti u električnom polju, a koji su sposobni da kataliziraju iste kemijske reakcije (Markert i Moller 1959). Pomoću elektroforetskog razdvajanja, fiziološkog bojenja i identificiranja izoenzima na elektroforetskom gelu, moguće je doći do molekularnog oblika, odnosno genetičke strukture, koja je prisutna u individuama, pa se na taj način može identificirati njihov genotip (Konnert 1999; Belle-

ti i Monteleone 2002). Ipak osnovni nedostatak biokemijskih biljega je niska razina registracije (30 %) genetičke varijabilnosti.

Molekularni biljezi predstavljaju specifične dijelove DNK molekule, koji obično postaju vidljivi nakon izolacije, te procesa amplifikacije, *in vitro* sinteze, kroz primjenu PCR tehnike. Prisustvo ili odsustvo produkata amplifikacije te njihove veličine, omogućavaju da se registrira polimorfizam koji može biti prisutan na razini nasljednog materijala (Glaubitz i Moran 2000). Molekularni biljezi, iako nam pričinjavaju određene teškoće prilikom analitičke obrade, u odnosu na druge tipove biljega, danas se najčešće koriste. Međutim, postoje određena ograničenja u njihovoj uporabi, ponajprije to je često neoptimalna produktivnost tih analiza i odsustvo alelna dominantnosti koja je svojstvena za većinu tih biljega, što će izoenzimske biljege i njihovu analizu činiti još dugo vrlo korisnim.

Analiza populacija šumskog drveća uporabom prikazanih biljega daje nam brojne mjere, genetičke varijabilnosti, koje čine temelj poznavanja genetičke strukture istraživane populacije (Bell et al. dr. 2003). Tako dobivene veličine predstavljaju osnovu za određivanje strategije gospodarenja šumama i održanja njihove genetičke raznolikosti. *Osnovni genetički parametri mogu biti grupirani u sljedeće kategorije:*

### Procjena prisutne razine genetičke varijabilnosti

#### Evaluation of the present genetic variability level

Radi se o procjeni da li i u kojoj mjeri su individue koje grade populaciju genetički različite. Parametar koji najbolje izražava razinu genetičke varijabilnosti je heterozigotnost. Ustvari, što je više prisutno različitih alela u jednom posebnom gen lokusu, tim će biti veća vjerojatnost da im se individui pojavljuju s većom varijabilnošću. Heterozigotnost se može promatrati na dva načina, kao stvarna ( $H_o$ ) ili teorijska ( $H_e$ ) (Nei, 1975). Stvarna se dobiva procjenom izravno iz analiziranog materijala, i to samo u slučaju u kojem rabimo biljege kodominantnog tipa (izoenzimi ili mikrosateliti). Teorijska heterozigotnost međutim se dobiva na temelju proračuna iz dobivenih alelnih frekvencija, uz pretpostavljenu hipotezu da je populacija u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži. Kao primjer imamo, u jednostavnom slučaju, jedan jedini gen lokus s dva alela,  $A$  i  $a$ , a prisutni su u populaciji s učestalošću od  $p$  i  $q$ , teorijska heterozigotnost bit će jednaka  $2pq$ . Drugi parametar koji procjenjuje alelnu vrijednosti je srednji broj alela po lokusu ( $N$ ), koji se dobiva vrlo jednostavno dijeleći na pola totalni broj ustanovljenih lokusa s brojem analiziranih gena:

$$N = \frac{\Sigma \text{ alela } }{\Sigma \text{ lokusa } }$$

Ovaj parametar ili indeks predstavlja veliki problem jer se ne uzima u obzir učestalost s kojom se razni aleli javljaju u populaciji, već relevantan samo njihov

ukupni broj. Stoga je očito da je doprinos svakog pojedinog alela na ukupnoj razini genetičke raznolikosti izravno uvjetovan s njegovom učestalošću.

U populaciji s dva prisutna alela s istom učestalošću ( $p = q = 0,50$ ), teorijska heterozigotnost je 0,50. Ali ako su dva alela jako poremećene ravnoteže ( $p = 0,90$  i  $q = 0,10$ ), heterozigotnost se spušta do 0,18, iako je parametar  $N$  isti u oba slučaja. Ovaj problem u analizi može se prevladati s uporabom efektivnog broja alela po lokusu ( $N_e$ ) (Crow i Kimura, 1970), u kojemu se svaki od alela "mjeri" po funkciji svoje učestalosti. Na poseban način,  $N_e$  postaje jednak u usporedbi s homozigotima svakog lokusa, te je  $N_e = 1/1 - H_e$ . Drugi pokazatelj alelnog bogatstva je postotak polimorfnihih lokusa ( $P$ ), koji izražava učestalost lokusa u kojima je prisutno više od jednog alela u sveukupnom broju analiziranih lokusa. Po običaju jedan lokus smatra se polimorfnim samo ako rijetki alel pokazuje učestalost od minimalno 5 %.  $P$  pokazuje iste granice kao i  $N$ : a to znači da nam ne pokazuje učestalost raznih alela, odnosno ograničuje se da mu prikaže njegovu prisutnost.

## Genetička struktura populacije – Genetic structure of the population

U ovom slučaju procjena se obavlja ako je populacija u skladu s očekivanjima Hardy-Weinbergova zakona, a i u slučaju odstupanja, te se nastoje ustanoviti uzroci neravnoteže. Jedan od najraširenijih parametara koji se rabi za tu svrhu je Wrightov fiksacijski indeks (*Fis*) (Weir i Cockerham, 1984). Indeks predstavlja odnos između razlika teorijske i stvarne heterozigotnosti, a jednadžba glasi:

$$Fis = (He - Ho) / He$$

Ako pak fiksacijski indeks poprimi vrijednost nula ili je neznatno oko vrijednosti nula, to znači da je populacija u ravnoteži, pa je prisutan proces panmiksije u populaciji, što je svojstveno za alogamske vrste, kao što je većinom šumsko drveće u području umjerene klime koje funkcionira na regularan način. Ako međutim, indeks fiksacije ima pozitivne vrijednosti znatno

veće od nule, što je vrlo čest slučaj, to na poseban način obilježava razinu homozigotnosti koja je u tom slučaju superiornija od one predviđene uvjetima ravnoteže. Ovo se može pripisati samooplođnji ili križanju manjeviše srodnih individua (inbriding). Inbriding može proizaći iz male veličine populacije, rijetkog rasporeda individua, slabe distribucije polena ili sjemena, ljudsko djelovanje kroz procese selekcije, posebice ako se djelovanje odnosi na heterozigotne biljke. Tako pozitivna vrijednost fiksacijskog indeksa, predstavlja pravi simptom homozigotnosti koja ostavlja izravne posljedice na kvalitetu sjemena šumskih vrsta drveća. Poznato je kako homozigotnost kod alogamnih vrsta inducira depresivan rast biljaka, a to se može očitovati i kroz povećanu učestalost šturog sjemena i općim slabljenjem potomatka šumskih vrsta.

## Genetička diferencijacija među populacijama – Inter-population genetic differentiation

U ovom slučaju procjenjuje se da li i koliko se različite populacije koje se istražuju međusobno genetički razlikuju. Ta razlika može biti posljedica mehanizma adaptivne selekcije u posebnim uvjetima okoliša (klima, tlo) ili kao posljedica fenomena genetičkog podrijetla, odnosno mogućeg gubitka alela tijekom postglacijalne migracije i sl. Procjena genetičke diferencijacije se vrši pomoću kalkulacije sveukupnog genetičkog varijabiliteta (*Hr*) koji postoji u skupu individua u svim istraživanim populacijama. *Hr* se može procijeniti i kao srednja heterozigotnost, koja se računa iz srednje alelne učestalosti među istraživanim populacijama ( $(Hr = 1 - (p^2 + q^2))$  u slučaju jednog lokusa sa samo dva alela). Totalna varijabilnost zatim biva rastavljena na svoje komponente unutar pojedinih populacija (*Hs* jednaka je sredini svih heterozigotnosti koje su izračunate za svaku populaciju ponaosob) i među različitim populacijama (*Dsr* se dobiva na temelju diferencijacije

između *Hs* i *Hr*). Tu je i stupanj genetičke diferencijacije (*Gsr*) koji predstavlja postotak ukupne varijabilnosti zbog postojanja razlika između populacija. *Gsr* poprima vrijednosti do 0,20 – 0,25, dok već iznad 0,05 može se utvrditi znatnija genetička varijabilnost. Na osnovi pokazanih parametara i njihovih osnovnih podataka moguće je izračunati genetička odstojanja između populacija i prema tome definirati genetički homogena područja unutar kojih populacije pokazuju značajne genetičke razlike (Nei, 1978). Takva područja mogu predstavljati temelj za pravilno planiranje sjemenske i rasadničke proizvodnje. Tako se unutar tih područja može slobodno raspolagati sjemenskim i sadnim materijalom, a da se izbjegne rizik genetičkog zagađenja lokalnih populacija. U tom slučaju posebnu pozornost treba obratiti na korištenje reprodukcijskog materijala koji dolazi iz drugih područja.

## RASPRAVA – Discussion

Samo se mali dio genetičke informacije biljnog organizma kakvo je šumsko drveće može obuhvatiti ispitivanjem pomoću određenih biokemijskih i molekularnih biljega, ali oni ipak pokazuju svoju superiornost naspram morfoloških i fizioloških genetičkih markera. Problem izbora adekvatnog biljega koji će poslužiti za analizu populacije u izravnoj je vezi s primijenjenom metodom i mogućnošću njihova iznalaženja u biljnom organizmu. Zbog toga se uz pomoć biokemijskih i molekularnih biljega, odnosno njihovim korištenjem i samom analizom mjera koje služe za određivanje genetičke varijabilnosti, promatra samo mali dio ukupne genetičke informacije koja je sadržana u biljnom organizmu kakvo je šumsko drveće, odnosno u njegovoj

populaciji. Iako uz njihovu pomoć možemo promatrati samo mali dio varijabilnosti, biokemijski i molekularni biljezi pokazuju takva svojstva, te su pogodni za istraživanja genetičke varijabilnosti unutar i između populacija. Također biokemijski i molekularni biljezi pokazuju dobra svojstva u ekološkim istraživanjima, posebice kod stresnih situacija (propadanja-sušenja šuma) u kojima nalazimo sve češće šumsko drveće. Sve mjere genetičke varijabilnosti koje su prikazane u ovom radu imaju veliku primjenjivost na dvije razine istraživanja, na unutarpopulacijskoj i međupopulacijskoj.

Prikazane mjere genetičke varijabilnosti, dobivene analizom biokemijskih i molekularnih biljega, imaju veliku primjenu u šumarskoj praksi, jer daju dobru

informaciju o genetičkoj strukturi populacija šumskog drveća. Tako na temelju tih informacija možemo preporučiti potrebne mjere za gospodarenje šumskim re-

sursima, te težiti ka održavanju i popravljanju genetičke strukture šuma.

#### LITERATURA – References

- Ballian, D. 2003: Kontrola podrijetla sjemena i sadnog materijala pomoću izoenzimskih markera, Zbornik radova seminara: Stanje i perspektive proizvodnje sadnog materijala u rasadnicima Federacije Bosne i Hercegovine, Šumarski fakultet, Sarajevo, 18. 12. 2003. Sarajevo: 35–44.
- Belletti, P., I. Monteleone, 2002: La biodiversità. In: Caratterizzazione genetica in popolazioni forestali della Lombardia (Regione Lombardia Azienda Regionale delle Foreste ed.), Milano: 7–10.
- Belletti, P., I. Monteleone, F. Ducci, R. Proietti, 2003: Parametri genetici. In: Linee guida per il reperimento e l'impiego dei materiali forestali di base. (F. Ducci ed.), Arezzo, 87–90.
- Boscherini, G., G.G. Vendramin, 1992: Marcatori molecolari nella genetica di popolazioni degli alberi forestali. In: Metodologie innovative per l'analisi genetica (Associazione Genetica Italiana, Società Italiana di Genetica Agraria eds.), Cortina: 69–115.
- Breitenbach, M., 1988: Genetische Charakterisierung von Tannen mit Hilfe von Isoenzymuntersuchungen. Österreichische Forstzeitung, 2: 35.
- Crow, G.F., M. Kimura, 1970: An introduction to population genetic theory. Harper and Row, New York, Evanston, London.
- Franjić, J., Z. Liber, 2001: Molekularna biologija u šumarstvu. Šumarski list, Zagreb, 125 (9/10): 495–500.
- Glaubitz, J.C., G.F. Moran, 2000: Genetic Tools: The use of biochemical and molecular markers. In: Forest Conservation Genetics (A. Young, D. Boshier, T. Boyle eds.), CSIRO Publishing, Collingwood, Australia: 39–62.
- Konnert, M., 1996: Beeinflussen Nutzungen einzelner Bäume die genetische Struktur von Beständen? Die Wald, 23: 1284–1291.
- Konnert, M. 1999: Herkunftsüberprüfung mit biochemisch-genetischen Methoden; Der Weihnachtsbaum, Gudensberg, No 5: 4–9.
- Markert, C.L., F. Møller, 1959: Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 45: 753–763.
- Møller, K., 1986: Genetische Untersuchungen bei der Tanne mit Hilfe von Enzyme Genmarkern. Allgemeine forstzeitung, 97 (3): 60–61.
- Nei, M. 1975: Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70: 3321–3323.
- Nei, M. 1978: Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89: 583–590.
- Weir, B.S., C.C. Cockerham, 1984: Estimating DF-statistic for the analysis of population structure. Evolution 38: 1358–1370.
- Wendel, J.F., N.F. Weeden, 1989: Visualization and Interpretation of Plant Isoenzymes. In: Isozymes in Plant Biology (Soltis, D.E., Soltis, P.S. eds.), London, 5–45.

*SUMMARY: The paper presents basic application of molecular and genetic markers used in studies of forest trees, that is, for measuring of genetic variability, which may be obtained by its usage.*

*Thus, all measures of genetic variability can be divided to those that are important for evaluation of the present level of genetic variability, genetic structure of the population and genetic differentiation between the populations.*

*Even though a small part of genetic information of a plant organism such as forest trees can be included into the studies with biochemical and molecular markers, they show their superiority in comparison to morphologic and physiologic genetic markers. The problem of choice of an adequate marker can serve for analysis of populations, which is in a direct relation with the applied method and the possibility of its presence in a plant organism. Therefore with the means of biochemical and molecular markers, that is, their usage and the*



*analyses of measures that serve to determine the genetic variability itself, we can only obtain a small portion of a total genetic information that is contained in a plant organism such as forest trees, i. e. its population. Even though the markers are the means to view only a smaller part of variability, the biochemical and molecular markers show such traits, and are applicable means for studying genetic variability within and among populations. Also the biochemical and molecular markers show good traits in ecological studies, particularly in stress situations (dilapidation – drying of forests) in which we more frequently come across among forest trees. All measures of genetic variability that are presented in this study have an overall applicability on two levels of investigations, inter and intra population studies.*

*All presented measures of genetic variability obtained by analysis of biochemical and molecular markers have an overall application in forest practice, since they give good information about genetic structure of the forest trees populations. Thus, based on such pieces of information we can suggest necessary measures for managing of forest resources, and strive for maintenance and correcting of the genetic structure of the forests.*