

*Stručni prilog*

*Savić S.<sup>1</sup>*

**IDENTIFIKACIJA KULTIVARA VINOVE LOZE RFLP METODOM  
VINE CULTIVAR IDENTIFICATION BY RFLP METHOD**

**Izvod**

Tradicionalno, kultivari vinove loze se identifikuju najčešće na bazi morfoloških karakteristika vrha mladog lastara, razvijenog lista, grozda, bobice i sjemenke. Kad kultivar potiče iz spontanog ili vještačkog ukrštanja, veoma je vjerovatno da će se morfološke karakteristike koje nose roditelji biti izmijenjene kod potomstva, što dodatno otežava njihovu identifikaciju.

U ovom radu opisana je RFLP (restriction fragment length polymorphism) metoda, jedna od novijih dostignuća u identifikaciji kultivara vinove loze zasnovana na molekularnim markerima.

**Ključne riječi:** vinova loza, morfološke karakteristike, RFLP, molekularni markeri.

**Abstract**

Traditionally, vine cultivars are mainly identified on the base of morphological features of tip of young shoot, developed leaf, bunch of grape, berry and seed. If cultivar derived from native or artificial breeding, it would be doubtless that morphological features would transfigure from parents to progeny. This additionally aggravate identification of these cultivars.

RFLP method described in this work is one of the newest achievement in vine cultivar identification, which relies on molecular markers.

**Key words:** grape vine, morphological features, RFLP, molecular markers.

**UVOD**

Činjenica je da komplikovani putevi porijekla kultivara vinove loze uslovljavaju morfološku komparaciju, zasnovanu na ampelografskim

---

<sup>1</sup>Dr Svetozar Savić, AK "13. jul", AD "Plantaže", Podgorica

karakteristikama, korisnom jedino kada kultivari potiču od zajedničkog pretka. Opsežna baza podataka ampelografskih karakteristika, sakupljena za veliki broj kultivara, pomaže u identifikaciji i proučavanju porijekla kultivara vinove loze (Silvestroni et al., 1996).

Kako su morfološke karakteristike kultivara vinove loze razičite u određenom dobu razvoja vinove loze i isto tako podložne promjenama pod uticajem spoljašnjih faktora, to se one ne mogu sa velikom sigurnošću koristiti u identifikaciji, naročito onih kultivara koji su nastali ukrštanjem. Metode koje analiziraju genetski diverzitet direktno na DNA nivou, uzrokovalé su revoluciju u identifikaciji i rasvjetljavanju porijekla kultivara vinove loze.

U ovom radu opisana je tzv. RFLP (restriction fragment length polymorphism) metoda, koja koristi molekularne markere za identifikaciju kultivara vinove loze.

### **OPIS METODE I MATERIJALA KOJI SE KORISTI**

RFLP metoda omogućava razvoj velikog broja neutralnih i kodominantnih genetičkih markera (Tanksley et al., 1989) zasnovanih na DNA fragmentima koji su dobijeni izdvajanjem DNA iz određenog organa vinove loze uz pomoć restrikcioni enzima koji prepoznaju određene DNA sekvence kod ispitivanog kultivara. Dobijeni fragmenti se putem elektroforeze razdvajaju na agaroznom ili poliakrilamidnom gelu. Detekcija razlika u sekvencama DNA moguća je na osnovu dužine samih fragmenata koji su specifični za svaki kultivar.

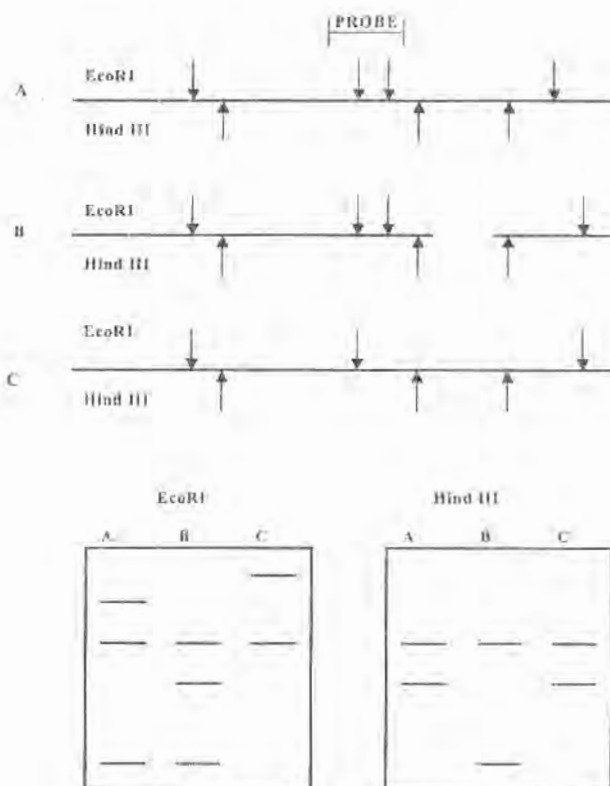
#### **Ekstrakcija DNA**

Ekstrakcija DNA iz biljnih ćelija odvija se destrukcijom zidova ćelija u tečnom azotu. Neophodna količina DNA za analizu je između 2-10 µg, i nije neophodno da bude visoko prečišćena. Sama koncentracija i stanje izolovane DNA se najbolje determiniše spektrofotometrijom, fluorometrijom ili u komparaciji sa DNA standardima (Dellaporta et al., 1983).

#### **Restrikcija**

Restrikcioni enzimi prepoznaju i kidaju određenu DNA sekvencu koju registruju u lancu DNA. Različiti enzimi prepoznaju različite sekvence. Distribucija ovih sekvenci, koje su prepoznate od strane enzima, slučajna je u genomu biljnog organizma. Kraće sekvence se lakše i brže pronalaze duž lanca DNA i na taj način se dobija više fragmenata DNA koji omogućavaju bolju i lakšu identifikaciju. Obično se koriste enzimi koji prepoznaju šest parova baza i ovakvi enzimi nose naziv: «six-cutters» (u daljem tekstu 6 c).

Na slici 1. prikazan je hipotetički primjer korišćenja dva enzima (EcoRI i Hind III) na istoj DNA koja se mijenja izbacivanjem ili promjenom baza u njoj. Strelice iznad i ispod svake linije indiciraju mjesta prepoznavanja od strane korišćenih enzima duž lanca DNA. Ovi enzimi imaju različita mjesta za prepoznavanje na DNA, koja se ne podudaraju. Kod B lanca odvajanje velikog fragmenta javlja se na desnoj strani sekvence, dok je kod C lanca promjena u sekvencama veoma mala. Najvjerojatnije je došlo do izmjene jedne baze, koja je pomjerila jedno mjesto prepoznavanja enzima EcoRI, što je rezultiralo različitim kalupom za ovaj enzim, dok promjene na kalupu enzima Hind III nisu uočene



Sl. 1. Shematski prikaz korišćenja dva restrikciona enzima i kalupa koje proizvode kada se koriste na istom lancu DNA (Potter et al., 1991)

Fig. 1. Schematic representation of the use of two different restriction enzymes and the patterns they produce when used on the same stretch of DNA (Potter et al., 1991)

Prilikom određivanja i grupisanja 37 različitih kultivara vinove loze i tipova šećerne repe (Hallden and Tuveesson, 1991) korišćena su tri različita enzima i 69 različitih proba, dok je kod krompira (Potter and Jones, 1991) korišćen jedan enzim i jedna proba u identifikaciji 11 sorti.

### **Elektroforeza**

Korišćenje enzima 6c rezultuje fragmentima reda veličine 200-20000 bp, što omogućava dobru rezoluciju genoma i dozvoljava korišćenje agaroznog gela. Ako se želi finija rezolucija, koriste se tzv. four cutters restrikcioni enzimi (u daljem tekstu 4 c), koji prepoznaju i kidaju sekvence od četiri baze na ispitivanoj DNA. Dobijeni fragmenti se odvajaju na poliakrilamidnom gelu koji može razdvojiti i fragmente koji se razlikuju međusobno u jednoj bazi. Međutim, ovaj gel ne može efikasno razdvojiti fragmente veće od 1500-2000 baza. Većina istraživača pri primjeni ove tehnologije koriste 6c enzime i agarozni gel.

Gel sa koncentracijom agara od 0,8 % je u većini slučajeva koristan pri upotrebi 6c enzima. Ova koncentracija može biti niža do 0,4 % za fragmente do 30 kb, dok veće koncentracije pomažu pri raspoznavanju manjih fragmenata.

Elektroforeza se izvodi u agaroznom gelu i buferu neutralne pH, sa voltažom ispod 5 V/cm. Na kraju elektroforeze gel se boji sa etidium bromidom u koncentraciji od 0,5 µg/ml i radi lakše uočljivosti i pregleda obojenih fragmenata fotografiše pod UV svjetlom kratke talasne dužine.

### **Transfer DNA na filter**

Prije vizuelizacije fragmenata u gelu sa etidium bromidom, isti se prebacuje na čvrstu membranu ili filter, koji su obično napravljeni od najlona i radioaktivno ispitani. Ova procedura se zove «southern blotting». Filter se priprema pečenjem na 80<sup>o</sup> C ili zračenjem pod UV svjetlom tako da se DNA ireverzibilno vezuje na njemu. Ovako pripremljeni filteri mogu se skladištiti na duži period. Proces transfera DNA na filter zasniva se na kapilarnom protoku, struji ili vakuumu od kojih se zadnja dva metoda koriste češće.

### **Priprema «probe» i obilježavanje (lejbelling)**

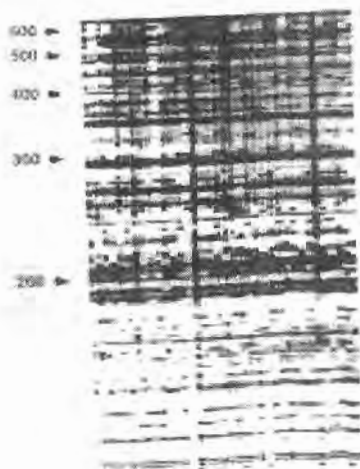
Radioaktivno obilježenom probom vizualizuju se različiti fragmenti dobijenih korišćenjem restrikcioni enzima. Obilježeni mogu biti fragmenti nuklearne DNA ili cDNA klonovi. Ako se koristi nuklearna DNA, ona neće pomoći u utvrđivanju malih promjena ali omogućuje pokrivanje velikog dijela genoma. Klonovi cDNA daju finiju rezoluciju fragmenata ali ne pokrivaju veliki dio genoma.

Materijal koji se ispituje obično se rastvori korišćenjem jednog ili više enzima. Svaki restrikcioni enzim stvara različit obrazac ili kalup koji može pomoći u identifikaciji.

Da bi se proba obilježila, DNA se mora sintetizovati u prisustvu radioaktivnog izotopa, obično  $^{32}\text{P}$ . Idvojeni fragmenti na gelu se zatim bojavu etidijum bromidom. Segmenti gela koji sadrži željene fragmente se izdvajaju i kuvaju u maloj količini destilovane vode i skladište na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Hibridizacija

Ovo je faza u kojoj se obilježena proba vezuje za komplementarnu DNA koja je na filteru. Hibridizacija se javlja između pojedinačnih lanaca DNA. Tako je DNA denaturisana u gelu prije transfera na filter. Proba je tekođe denaturisana prije postavljanja na filter na duži period do pojave hibridizacije. Nespecifična hibridizacija se uobičajno spira povećanjem temperature.



Sl.2. RFLP analiza 35 kultivara vinove loze korišćenjem EcoRI. Strelice ukazuju na poziciju i veličinu markera (Cervera, 2000)

*Fig.2. RFLP analysis of 35 grapevine cultivars generated with EcoRI. The arrows indicate the size marker positions (Cervera, 2000).*

Proba koja se veže za fragmente vizualizuje se putem autoradiografije. Ovo se postiže postavljanjem filma osjetljivog na X zrake preko filtera na 1-2

dana, nakon čega se razvija. Pozicije obilježenih fragmenata na filmu prepoznaju se kao zatamnjene površine (slika 2).

### ZAKLJUČAK

Opisana metoda, sa modifikacijama ili bez njih, može se koristiti kod mnogih biljnih vrsta kao što su *Vitis*, *Malus*, *Prunus* i *Rubus* (Nybom et al., 1990), *Picea* (Georg et al., 1992), sa različitim stepenom uspjeha, ali u većini slučajeva rezultuje u sigurnoj identifikaciji kultivara.

Za analizu je neophodno 2-10 $\mu$ g DNA koja mora da bude relativno čista.

Metoda zahtijeva radioaktivno obilježenu probu za vizuelizaciju različitih fragmenata proizvedenih korišćenjem restriktivnih enzima.

Metoda je tehnički osrednje teška, visoko pouzdana, relativno skupa zbog čega istraživači treba da vode računa o minimiziranju broja korišćenih enzima i proba.

Ono što čini ovu metodu korisnom je da istraživač teoretski ima neograničen broj lokusa za identifikaciju kultivara.

### LITERATURA

- Cervera, M.T., Cabezas, J. A., Sanchez, E., Cenis, J. L. & Martinez, J. M. (2000): Characterization of genetic variation within table grape varieties based on RFLP markers. *Vit.* 39, 109-114.
- Dellaporta, S. L., Wood, J. & Hicks J. P. (1983): In *Plant Molecular Biology*, Col. Spr. Har. Labor., New York, pp. 36-37.
- Gorg, R., Schachtschabel, U., Ritter, E., Salamini, F. & Gebhardt, C., (1992): Discrimination among 136 tetraploid potato varieties by fingerprint using highly polymorphic DNA markers. *Crop. Sci.* 32: 815-819
- Hallden, C. & Tuveesson, S. (1991): Molecular markers. *Sveriges Utsadesforenings Tidskrift*, 101: 141-145.
- Nybom, H., Rogstad, S. H. & Schal, B. A. (1990): Genetic variation detected by the use of the M13 «DNA fingerprint» probe in *Malus*, *Prunus* and *Rubus*. *Theor. Appl. Genet.* 79: 153-156.
- Potter, R. H. & Jones, M. G. K. (1991): Molecular Analysis of Genetic Stability. In *Vit. Meth. Fo. Cons. Of Pla. Gen. Res.*, pp.71-91. London, UK.
- Silvestroni, O., Intrieri, C. & Domizio, N. D. (1996): Use of plyometric methods to determine some grapevine cultivars grown in Emiglia Romagna. *Riv. Vitic. Enol.* 49, 17-26.

Tanksley, S. D., Young, N. D., Paterson, A. H. & Bonierbale, M. W. (1989): RFLP mapping in plant breeding: new tool for an old science. *Biotechnology*.7: 257-264.

### **VINE CULTIVAR IDENTIFICATION BY RFLP METHOD**

by

*Svetozar Savić,*

*AK "13. jul", AD "Plantaže", Podgorica*

#### **Summary**

Traditionally, vine cultivars are mainly identified on the base of morfological features of tip of young shoot, developed leaf, bunch of grape, berry and seed. If cultivar derived from native or artificial breeding, it would be doubtless that morfological features would transfigure from parents to progeny. Morfological features are not enough for accurately discription and confirmation of vine cultivar pedigree.

It evidentially becomes more and more necessary to rely on molecular markers for cultivar identification. RFLP method provides the means for developing large numbers of neutral and co-dominant genetic markers by relying on the DNA fragments that are produced when the DNA of an organism is cut by restriction enzymes.

Extraction DNA from plant cells is made by grinding the cells in liquid nitrogen. The restriction enzymes recognize and cut specific DNA sequences that are found in the targeted DNA.

Electrophoresis is carried out in agarose gels in buffers near neutral pH at voltage below 5 V/cm. The fragments on the gels cannot be visualised but they have to be transferred on a solid support membrane or filter which is usually made on nylon and the probed with radioactive probes which hybridize to specific sequences.

During hybridization labelled probe binds to complementary DNA which is on the filter. The probe that has bound to the fragments is visualised by autoradiography. The RFLP method has been used on many plants species with varying degrees of success but in most cases it has resulted in clear identification.