

## Izoenzimska analiza genotipova kupusa (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)

- Originalan naučni rad -

Zorica NIKOLIĆ<sup>1</sup>, Mirjana MILOŠEVIĆ<sup>1</sup>, Janko ČERVENSKI<sup>2</sup> i  
Đura GVOZDENOVIC<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Nacionalna laboratorija za ispitivanje semena, Novi Sad

<sup>2</sup>Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad

**Izvod:** U radu je proučeno 12 genotipova kupusa, osam eksperimentalnih linija i četiri sorte, Zavoda za povrtarstvo, Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad. Metodom horizontalne elektroforeze, na skrobnom gelu, analizirani su enzimski sistemi: malat dehidrogenaza (MDH), fosfoheksozo izomeraza (PHI), fosfoglukozo dehidrogenaza (PGD), fosfoglukomutaza (PGM) i alkohol dehidrogenaza (ADH). Enzimi PHI i PGD su bili polimorfni. Dobijeni su različite alelne varijante u sortama i genetička ujednačenost linija kupusa.

Ovi rezultati imaju praktičnu primenu u procesu oplemenjivanja, tj. u odabiru roditeljskih kombinacija u procesu stvaranju hibrida kupusa. Na osnovu rezultata istraživanja izoenzima u eksperimentalnom materijalu i sortama kupusa, polimorfizam enzima se može koristiti za ocenu genetičke čistoće linija i hibridnog semena.

**Ključne reči:** Genetička čistoća, izoenzimi, kupus, polimorfizam.

### Uvod

U procesu oplemenjivanja i komercijalnoj proizvodnji vrsta roda *Brassica* uobičajeno je korišćenje F<sub>1</sub> hibrida. Jedna od faza u toku stvaranja hibrida je i upoređenje svojstava eksperimentalnih sa gajenim hibridima. Prema rezultatima *Gowers-a*, 2000, glavni akcenat kod kupusnjača se mora staviti na visok stepen ujednačenosti ispitivanih svojstava. Zbog toga, testiranja traju više godina, tokom kojih se ocenjuje kako kvalitet tako i kvantitet svojstava, ocena vrednosti linijskog materijala u svrhu hibridizacije, odnosno odabir najpogodnijih kombinacija roditeljskih linija za buduće hibride, *Červenski i sar.*, 2006.

*J. Sci. Agric. Research/Arh. poljopr. nauke* 68, 243 (2007/3), 77-83

Za unapređenje proizvodnje od neposrednog značaja je genetička čistoća semena, kao specifično svojstvo kvaliteta. Prisustvo stranih individua negativno utiče na prinos, ujednačenost i kvalitet proizvoda. U proizvodnji hibridnog semena, njegova genetička kontaminacija može biti različitog porekla, rezultat samooplodnje ili oplodnje van kontrole, pri doradi semena i dr. Po pravilu, za samooplodne biljne vrste i vrste kod kojih se proizvodnja zasniva na sorti, ova čistoća je od manjeg ekonomskog značaja. Međutim, ukoliko se primese jako razlikuju po kvalitetu, vremenu sazrevanja i drugim važnim agronomskim svojstvima od osnovne sorte, to će se odraziti na prinos, *Nikolić i sar.*, 2007.

Potencijal molekularnih tehnika, zasnovanih na polimorfizmu DNK, i proteinskih markera, izoenzima i rezervnih proteina semena, u identifikaciji sorti i hibrida je proučavan od strane velikog broja autora. Izoenzimi su korišćeni za otkrivanje hibrida i u vrstama roda *Brassicaceae*, *Heath i Earle*, 1996, *Meng i sar.*, 1998, a *Yu i sar.*, 2005, u oceni genetičke divergentnosti. Prednost ovih analiza je u tome što se informacije dobijaju relativno brzo, otkrivaju se razlike koje vizualno nisu uočljive na biljkama, a spoljašnja sredina nema uticaj na njihovu ekspresiju. Izoenzimi su naročito pogodni u rešavanju problema u semenarstvu kao npr. mešanje semena hibrida, linija ili nepotpuna oplodnja kukuruza, greške za vreme umnožavanja, rukovanja ili dorade semena, *Gerić i sar.*, 1989, *Zlokolica i sar.*, 1999. Prema *Zlokolici i sar.*, 1996, polimorfizam enzima je dobar sistem za identifikaciju i ocenu povrtarskih biljnih vrsta (kupusa, karfiola, krastavaca, paradajza i paprike).

U radu su prikazani rezultati istraživanja izoenzima u eksperimentalnom materijalu i sortama kupusa, kao i ocena njihove genetičke čistoće na osnovu polimorfizma enzimskih sistema.

### Materijal i metode

U radu je proučeno 12 genotipova kupusa, (osam eksperimentalnih linija i četiri sorte), Zavoda za povrtarstvo, Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad (Tabela 1).

Za izoenzimsku analizu korišćeno je tkivo stabaceta, klijanaca starih pet dana, koje je homogenizovano u 50mMTrisHCl, pH 6,8 u koji je dodat 1% merkaptetoetanol. Iz svakog genotipa je analizirano po 30 klijanaca. Metodom horizontalne elektroforeze, na 12% skrobnom gelu, ispitan je polimorfizam enzimskih sistema: malat dehidrogenaza (MDH, E.C.1.1.1.37), fosfoheksozo izomeraza (PHI, E.C.5.3.1.9), fosfoglukozo dehidrogenaza (PGDH, E.C. 1.1.1.44), fosfoglukomutaza (PGM, E.C.5.4.2.2.), alkohol dehidrogenaza (ADH, E.C.1.1.1.1), prema protokolu *Stuber-a i sar.*, 1988. Elektroforeza je izvedena u pufernom sistemu 0,065M L-histidin/0,007M limunska kiselina pri konstantnoj snazi od 15W, u trajanju od oko tri sata. Identifikovanje i obeležavanje alela je izvršeno prema *Arus-u i sar.*, 1991. Različiti aleli za pojedine lokuse su obeleženi brojevima: broj jedan najbliži anodi, nešto sporiji dva itd.

Tabela 1. Genotipovi kupusa (poreklo) - Cabbage Genotypes (Origin)

Red. br. O. No.	Oznaka/Genotip Designation/Genotype	Poreklo/opis Origin/description
1.	L 1 - Sorta NS-14 L 1 - Variety NS-14	sorta, heterozigot, slobodna oplodnja variety, heterozygote, open pollination
2.	L 2 - Linija iz L1 L 2 - Line fom L1	sorta, heterozigot, nastala familijskom selekcija iz L1 variety, heterozygote, derived by a family selection from L1
3.	L 3 - Futoški SE	sorta, heterozigot, slobodna oplodnja, viša kategorija od L4 variety, heterozygote, open pollination, category higher than L4
4.	L 4 - Futoški I SR	sorta, heterozigot, slobodna oplodnja niža kategorija od L3 variety, heterozygote, open pollination, category lower than L3
5.	L 5 - Linija iz L3/L4 L 5 - Line fom L3/L4	linija, homozigot, inbreeding-samooplodnja, I-13 line, homozygote, inbreeding-open pollination, I-13
6.	L 6 - Linija iz L3/L4 L 6 - Linija iz L3/L4	linija, homozigot, inbreeding-samooplodnja, I-13 line, homozygote, inbreeding-open pollination, I-13
7.	L 7 - Linija iz L3/L4 L 7 - Line fom L3/L4	linija, homozigot, inbreeding-samooplodnja, I-12 line, homozygote, inbreeding-open pollination, I-12
8.	L 8 - Linija iz L3/L4 L 8 - Line fom L3/L4	linija, homozigot, inbreeding-samooplodnja, I-12 line, homozygote, inbreeding-open pollination, I-12
9.	L 9 - Linija iz L3/L4 L 9 - Line fom L3/L4	linija, homozigot, inbreeding-samooplodnja, I-9 line, homozygote, inbreeding-open pollination, I-9
10.	L 10 - Muška sterilnost L 10 - Male sterility	linija, homozigot, inbreeding-samooplodnja, I-7 line, homozygote, inbreeding-open pollination, I-7
11.	L 11 - Linija iz Ditmara L 11 - Line fom Ditmar	linija, homozigot, inbreeding-samooplodnja, I-8 line, homozygote, inbreeding-open pollination, I-8
12.	L 12 - Linija iz Bugarske L 12 - Line fom Bulgaria	linija, homozigot, inbreeding-samooplodnja, I-2 line, homozygote, inbreeding-open pollination, I-2

### Rezultati i diskusija

Prema *Murphy-u i sar.*, 1990, MDH je dimerni protein koji može, ali i ne mora stvarati heteromernu traku. U svim analiziranim genotipovima dobijen je isti fenotip MDH sa četiri trake.

Enzim ADH je imao dve zone aktivnosti: ADH-1 brža, tj. bliža anodi i sporija ADH-2. U svim analiziranim uzorcima je nađen isti fenotip.

Veliki broj različitih fenotipova dobijen je za PGM. Sorte kupusa (L1-L4) su genetički heterogene (Slika 1). Sorta NS-14 se nalazi u Sortnoj komisiji u procesu priznavanja, dok je L-2 sorta nastala familijskom selekcijom iz L1. Zimogram PGM, odnosno nađene alelne varijante ukazuje na zajedničko poreklo ova dva genotipa.

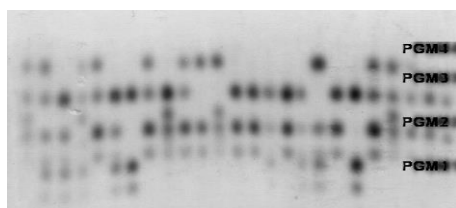
Nađeni su različiti aleli kod sorte Futoški, kako u elitnom materijalu (L3) tako i u prvoj sortnoj reprodukciji (L4). Jedinke nisu genetički ujednačene i varijante ovog enzima bi se mogle koristiti za ocenu genetičke čistoće hibridnog semena. Dobijeni rezultati su u skladu sa rezultatima ispitivanja izoenzima kupusnjača *Arus* i

**Shields**, 1983. Prema ovim autorima izoenzimi PGM su kontrolisani pomoću dva lokusa, oba polimorfna.

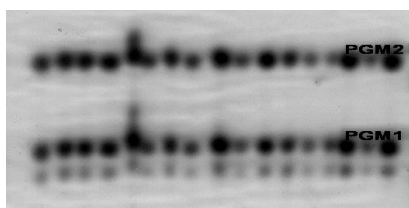
U skladu sa rezultatima **Rahman**-a i **Simonsen**-a, 2006, dobijene su četiri zone aktivnosti za PGM izoenzime: PGM-1, PGM-2, PGM-3 i PGM-4 (Slika 1). Rezultati u radu potvrđuju hipotezu koju su izneli navedeni autori da diploidi često imaju dve trake za PGM-1, gde je brža traka slabije aktivna u odnosu na sporije migrirajuću.

Linije L5-9, nastale odabirom i samooplodnjom iz sorte Futoški, su ujednačene i imaju samo jedan fenotip (Slika 2). Ove linije imaju preko 10 samooplodnji, čime su genetički praktično homozigotne, pa se mogu i razlikovati od sorte iz koje su nastale.

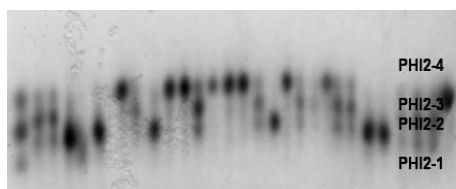
Za PHI su dobijena različiti aleli, odnosno genetička neujednačenost sorti, kao i za PGM (Slika 3). Kod sorte Futoški nađena su čak četiri fenotipa, obrazovana od tri različita alela. Fenotipovi sa tri trake ukazuju na dimerno stanje enzima i heterozigotnost lokusa za ovaj enzim. Prema **Arus**-u i **sar.**, 1983, enzim PHI je takođe pod kontrolom dva lokusa od kojih je jedan monomorfna, a drugi izrazito polimorfna. U muško-sterilnoj liniji (L10), koja je različitog porekla od ostalih linija, nađena su posle sedam generacija samooplodnje dva fenotipa. U cilju dobijanja genetički ujednačene linije kao potencijalne roditeljske komponente za stvaranje hibrida, posebno je nastaviti samooplodnju (Slika 4). Ostale linije su genetički ujednačene.



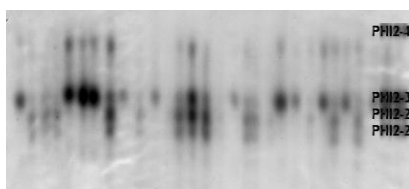
Slika 1. Zimogram PGM Sorta NS-14  
PGM isozyme patterns of NS-14 variety



Slika 2. Zimogram PGM linija 5  
PGM isozyme patterns of line 5



Slika 3. Zimogram PHI Sorta NS-14  
PHI isozyme patterns of NS-14 variety



Slika 4. Zimogram PHI linija 10  
PHI isozyme patterns of line 10

Dva lokusa kontrolišu enzim PGD. Dve zone aktivnosti su nađene za 6PGD izoenzime, 6PGD-1 i 6PGD-2. Aktivnost je bila slaba i difuzna za 6PGD-2, te dobijeni rezultati nisu uzeti u razmatranje.

## Zaključak

U ispitivanim genotipovima kupusa nađen je značajan izoenzimski polimorfizam. Različite alelne varijante nađene su za enzime PGM i PHI. Otuda se može zaključiti da se oni mogu koristiti za analizu genetičke čistoće i identifikaciju sorti kupusa. Eksperimentalne linije imaju visok stepen ujednačenosti i mogu se koristiti za ukrštanja u procesu stvaranja hibrida. Dobijeni zimogrami PGM i PHI za sorte kupusa su pogodni kao jedan od parametara u identifikaciji sorti u cilju njihove zaštite.

Dobijeni rezultati imaju praktičnu primenu u procesu oplemenjivanja, tj. u odabiru roditeljskih kombinacija u procesu stvaranju hibrida kupusa. Planira se dalji rad na primeni molekularnih markera u smislu identifikacije sorti i hibrida, a u cilju njihove zaštite.

## Zahvalnica

Istraživanje je izvedeno u okviru projekta TR-6855 "Stvaranje sorti i razvoj tehnologije proizvodnje kvalitetnog lisnatog povrća za različite namene", koje je sufinansiralo Ministarstvo nauke i zaštite životne sredine Republike Srbije.

## Literatura

- Arus, P., A.M. Chevre, R. Delourme, F. Eber, M.C. Kerlan, E. Margale and C.F. Quiros* (1991): Isozyme nomenclature for eight enzyme systems in three *Brassica* species. Book of Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Rapeseed Congress, July 9-11, 1991, Saskatoon, Canada, 4: 1061-1066.
- Arus, P. and C.R. Shields* (1983): Cole Crops, *Brassica oleracea* L. In: Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part B, S.D.Tanskey and T.J. Orton (Eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, pp. 339-350.
- Červenski J., Đ. Gvozdenović, J. Gvozdanović-Varga, Z. Nikolić i F. Balaž* (2006): Prikaz eksperimentalnih hibrida kupusa (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.). Selekcija i semenarstvo **XIV** (1-2): 101-105.
- Gerić, I., M. Zlokolica i C. Gerić* (1989): Primena izoenzima u kontroli genetske čistoće semena poljoprivrednog bilja. Poljopr. aktual. 3-4: 555-564.
- Gowers, S.* (2000): Preliminary results with a novel method of hybrid production - pair cross hybrids. Acta Hort. 539: 117-121.
- Heath, D.W. and E.D. Earle* (1996): Resynthesis of rapeseed, *Brassica napus* L.: a comparison of sexual versus somatic hybridisation. Plant Breed. **115** (5): 395-401.

- Meng, J., S. Shi, L. Gan, Z. Li and X. Qu** (1998): The production of yellow-seeded *Brassica napus* (AACC) through crossing interspecific hybrid of *B. campestris* (AA) and *B. carinata* (BBCC) with *B. napus*. *Euphytica* **103** (3): 329-333.
- Nikolić, Z., M. Milošević, K. Taški-Ajduković and M. Vujaković** (2007): Genetic purity as a component of seeds quality. Book of Proceedings of the 42<sup>nd</sup> Croatian and the 2<sup>nd</sup> International Symposium on Agriculture, February 13-16, 2007, Opatija, Croatia, pp. 245-248.
- Rahman, M.H. and V. Simonsen** (2006): Expression and inheritance of isozymes in Brassica species and in their interspecific hybrids. *Acta Agric. Scand.* 56: 47-53.
- Zlokolica, M., M. Milošević, Z. Nikolić, S. Balešević-Tubić, V. Galović i M. Vujaković** (1999): Primena metoda biotehnologije u identifikaciji i genetskoj oceni kvaliteta semena. *Zb. rad. Instituta za ratarstvo i povrtarstvo, Novi sad*, 31: 369-378.
- Zlokolica, M., M. Milošević, Z. Nikolić and M. Graovac** (1996): The use of genetic markers for identification and estimation of vegetable plant species. *Acta Horticulturae* 462: 75-82.
- Yu, C.Y., S.W. Hu, H.X. Zhao, A.G. Guo and G.L. Sun** (2005): Genetic distances revealed by morphological characters, isozymes, protein and RAPD markers and their relationships with hybrid performance in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 110: 511-518.

Primljeno: 24.05.2007.

Odobreno: 15.06.2007.

\* \*  
\*

## **The Isoenzymic Analysis of Cabbage Genotypes (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)**

- Original scientific paper -

Zorica NIKOLIĆ<sup>1</sup>, Mirjana MILOŠEVIĆ<sup>1</sup>, Janko ČERVENSKI<sup>2</sup> and  
Đura GVOZDENOVIĆ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>National Laboratory for Seed Testing, Novi Sad

<sup>2</sup>Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad

### **Summary**

The present study demonstrates the potential of isozymes and their application in marker assisted selection.

Twelve cabbage genotypes, eight experimental lines and four varieties, derived at the Vegetable Department of the Institute of Field and Vegetable Crops, Novi Sad, were studied. The method of horizontal starch-gel electrophoresis was used to analyse enzymic systems: malate dehydrogenase (MDH), phosphohexose isomerase (PHI), phosphoglucoso dehydrogenase (PGD), phosphoglucomutase (PGM) and alcohol dehydrogenase (ADH). PHI and PGD enzymes were polymorphic, with different alleles. Different phenotypes in cabbage varieties and genetic uniformity in lines were obtained.

These results could be practically applied in the process of breeding, i.e. in the selection of a parent line combination relating to the process of the cabbage hybrid development. According to the results obtained in the isoenzymic study of the experimental material and cabbage varieties it can be concluded that enzyme polymorphism can be used for the estimation of genetic purity of both, line and hybrid seeds.

Received: 24/05/2007

Accepted: 15/06/2007

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

*Adresa autora:*

Zorica NIKOLIĆ

Nacionalna laboratorija za ispitivanje semena

Maksima Gorkog 30

21000 Novi Sad

Srbija

E-mail: nikolicz@ifvcns.ns.ac.yu

*J. Sci. Agric. Research/Arh. poljopr. nauke* 68, 243 (2007/3), 77-83