

## Utvrdjivanje filogenetskih odnosa u porodici Rosaceae na osnovu količine kvercetina

---

U ovom radu testirana je hipoteza da se na osnovu sadržaja flavonoida kvercetina mogu odrediti filogenetske veze u porodici Rosaceae. Hipoteza je proverena na pet vrsta iz porodice Rosaceae: *Spiraea chamaedryfolia* L., *Pyrus communis* Med., *Cotoneaster horizontalis* Decne, *Prunus domestica* L. i *Prunus avium* L., a kao kontrolni uzorak i uslov prihvatanja hipoteze (outgroup) uzet je *Quercus rubra* L. Koncentracije flavonoida kvercetina su određivane Christ-Müller metodom. Prosečna koncentracija kvercetina u ispitivanim Rosaceae je  $7 \pm 3\%$ . Klaster analizom (UPGMA metodom) na osnovu koncentracije kvercetina, zaključeno je da su u najbližem srodstvu rodovi *Pyrus*, *Cotoneaster* i *Prunus*. Zaključeno je da se sadržaj kvercetina može koristiti kao sredstvo za utvrđivanje filogenetskih odnosa.

---

### Uvod

Uobičajeni taksonomski karakteri vezani za familiju ruža (Rosaceae) su morfološki, a prilikom klasifikacije se koriste boja cvetova, morfologija semena i broj hromozoma (Grossi *et al.* 1998). Problem u taksonomiji familije ruža je uočen onda kada se pokazalo da nijedna karakteristika ne može objasniti u dovoljno pouzdanoj meri tok evolucije u familiji čija je sistematika zasnovana na tipu ploda. Stoga se kao dodatni taksonomski karakteri koriste polimorfizmi DNK, proteina i polifenolskih produkata.

Porodica Rosaceae podeljena je na četiri potfamilije: Spiraeoideae, Rosoideae, Amygdaloideae i Maloideae. Nemogućnost preciznog definisanja lokacije potfamilije Maloideae u filogenetskom

stablu predstavlja osnovni problem sistematike porodice ruža. Na osnovu rezultata molekularne sistematike, potfamilije Amygdaloideae i Maloideae su monofiletske, Rosoideae polifiletske, dok je Spiraeoideae predačka i parafiletska grupa (Olmstead 2007). Na slici 1 prikazano je filogenetsko stablo Rosaceae (prema Benson *et al.* 2004).

Vodeći karakter u savremenoj klasifikaciji ovih taksona, osnovni broj hromozoma  $x$ , varira u potfamilijama porodice ruža. Postoje dve prihvaćene hipoteze o filogeniji Maloideae ( $x = 17$ ):

1) broj hromozoma je rezultat alotetraploidizacije, koja je posledica hibridizacije između predaka iz Amygdaloideae ( $x = 8$ ) i Spiraeoideae ( $x = 9$ ) (tzv. hipoteza o nastanku Maloideae širokom hibridizacijom) (Sax 1933);

2) broj hromozoma  $x = 17$  u Maloideae nastao je duplikacijom  $x = 9$  spiroidnog pretka, praćenom aneuploidnim gubitkom jednog hromozoma (Goldblatt 1976).

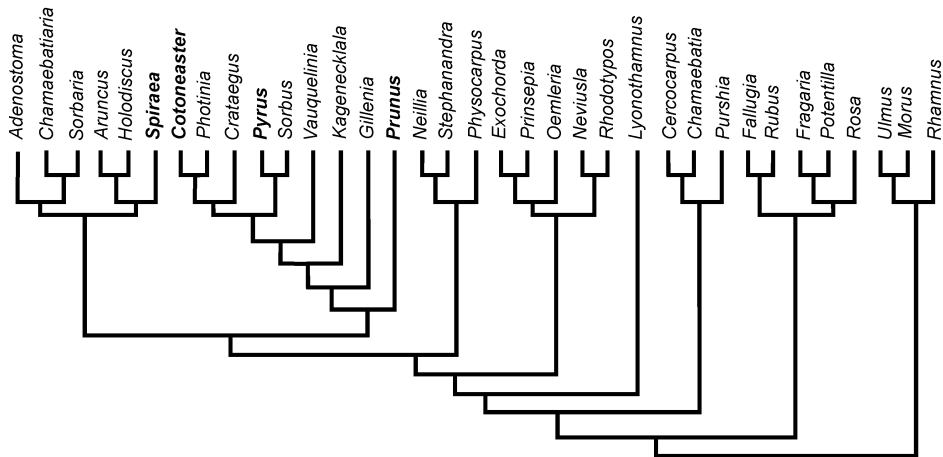
Korišćenjem podataka o metabolizmu polifenola (flavonoida), rešen je problem filogenije familije Lemnaceae (Les *et al.* 2002), kao i pojedinih sekcija u rodu *Rosa* (Grossi *et al.* 1998; Mikanagi *et al.* 1995). Na osnovu rezultata ovih istraživanja pretpostavljeno je da postoji povezanost između sadržaja flavonoida i filogenije porodice Rosaceae.

Flavonoidi su polifenolska jedinjenja, čiju osnovnu strukturu čini C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> niz. Obavljaju niz funkcija: deluju kao antioksidansi, antimikrobni agensi, predstavljaju pigmente biljaka značajne za privlačenje oprašivača, učestvuju u interakcijama polena i stigmi tučkova i medijaciji između biljaka i mikorizalnih gljiva, regulišu hormonalne aktivnosti, smanjuju efekat štetnog UV zračenja (Rausher 2006).

---

Saša Šviković (1990), Kostolac, Partizanska 23, učenik 2. razreda Požarevačke gimnazije

MENTOR: Vladimir Jovanović, dipl. biolog, ISP



Slika 1. Filogenetsko stablo porodice Rosaceae po Benson *et al.* (2004)

Figure 1. Phylogeny of Rosaceae according to Benson *et al.* (2004)

Flavonoidi i ključni enzimi za njihovu sintezu (flavonol sintaze, flavonoid-3',5'-hidroksilaza) nisu prisutni kod zelenih algi, već isključivo u kopnenim biljkama (Embryophyta), što ukazuje na to da je primarna funkcija flavonoida bila zaštita od UV zračenja (Rausher 2006). Plejotropija gena za sintezu flavonoida utiče na njihovu adaptaciju i evolucionu promenu. Prisutne su i duplikacija i divergencija regulatornih gena flavonoida. Zahvaljujući tome, ne postoje letalne kombinacije regulatornih gena flavonoida, što praktično omogućava postojanje neograničenog broja različitih vrsta flavonoida (Rausher 2006; Chopra *et al.* 2006).

Cilj istraživanja je provera da li se i na osnovu količine flavonoida mogu odrediti filogenetski odnosi, tako što bi se analizirao sadržaj kvercetina u biljkama porodice Rosaceae i utvrdile paralele sa savremenim viđenjem filogenetskih veza među njima.

## Materijal i metode

Flavonoid kvercetin ekstrahovan je iz vrsta koje se klasifikuju u tri potfamilije: *Spiraea chamaedryfolia* L. (potfam. Spiraeoideae), *Pyrus communis* Med., *Cotoneaster horizontalis* Decne (potfam. Maloideae), *Prunus domestica* L. i *Prunus avium* L. (potfam. Amygaloideae). Sadržaj kvercetina nije ispitan u vrstama potfamilije Rosoideae, zbog česte hibridizacije između velikog broja vrsta i jed-

inki, koja može uticati na koncentraciju kvercetina (Mikanagi *et al.* 1995). Kao kontrolni uzorak uzet je *Quercus rubra* L., koji pouzdano sadrži veliku količinu flavonoida (Jovanović, usmena informacija). Pošto *Q. rubra* pripada familiji Fagaceae, u ovom radu predstavlja i outgroup (takson za koju se zna da ne može biti u bliskom srodstvu sa ispitivanim vrstama) u kladističkoj analizi, a na taj način ujedno je služio i kao uslov prihvatanja hipoteze. Kvercetin je ekstrahovan iz listova biljaka, koji su uzorkovani sa prostora Istraživačke stanice Petnica 28. i 29. jula 2007. godine, da bi razlike u njihovoj količini uslovljene različitim svetlosnim užitkom biljaka bile minimalne. Ekstrakcija i analiza flavonoida iz listova urađena je po Christ-Müller metodi (Vuković *et al.* 2007), koja se zasniva na ekstrakciji acetonom i kiseloj hidrolizi flavonoidnih heterozida.

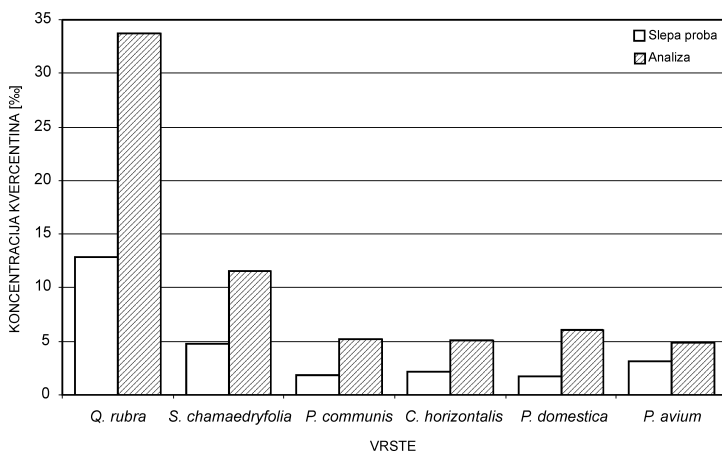
Biljni uzorci su sušeni u sušnici na 80°C tri sata. Nakon toga, uzorci su spraseni tučkom i avanom. Po 600 mg sprasene droge je tretirano sa 20 mL acetonu, 1 mL 0.5% rastvora urotropina (heksametilentetramina) i 2 mL 25% hlorovodonične kiseline. Ekstrakti su zagrevani do ključanja 10 minuta, a zatim filtrirani i pomešani sa acetonom do zapremine od 50 mL. Nakon hlađenja, po 20 mL svakog ekstrakta je pomešano sa 20 mL destilovane vode i 15 mL etil-acetata, a potom je odvajan vodeni sloj u levku za odvajanje. Ovaj tretman je ponovljen tri

puta, sa zapreminom etil-acetata od 10 mL. Nakon izdvajanja, preostala smeša je dopunjena etila-cetatom do zapremine od 50 mL. Ovakav rastvor je korišćen kao slepa proba. Drugi rastvor, kome je naknadno dodat 1 mL aluminijum-hlorid reagensa (2 g aluminijum-hlorida u 100 mL 5% rastvora sirćetne kiseline), korišćen je za određivanje koncentracije flavonoida (analiza). Zatim su rastvori dopunjeni do 25 mL 5% metanolnim rastvorom sirćetne kiseline.

Sadržaj kvercetina određen je spektrofotometrijski. Koncentracije su računane na osnovu absorbanci merenih na 425 nm, po formuli (Vuković *et al.* 2007):

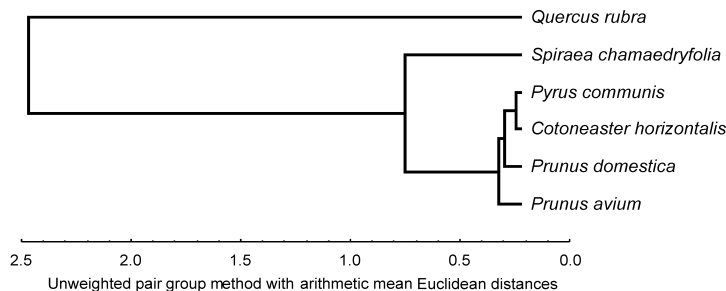
$$c [\%e] = A \times \frac{7.22}{D}$$

gde je *c* koncentracija flavonoida, *A* apsorbanca uzorka na 425 nm, a *D* odmerena količina droge u gramima. Na osnovu koncentracije kvercetina (u slepoj probi i analizi), u programu Statistica 7.0 (StatSoft 2004), metodom UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) urađeni su kladogrami.



Slika 2.  
Koncentracije kvercetina u uzorcima

Figure 2.  
Concentrations of quercetin in samples in trial (white) and analysis (grey)



Slika 3.  
Kladogram srodstva među Rosaceae na osnovu koncentracije kvercetina

Figure 3.  
Cladogram of Rosaceae phylogeny based on quercetin content

## Rezultati i diskusija

Koncentracije ekstrahovanog kvercetina iz uzoraka prikazane su na slici 2. Najveća koncentracija izolovana je iz *S. chamaedryfolia* (12‰), dok je najmanja ekstrahovana iz *Prunus avium* (5‰). Količina flavonoida u uzorcima biljaka familije Rosaceae je niska (7±3‰) u poređenju sa kontrolom *Q. rubra* (34‰).

Dvostruko veća koncentracija kvercetina u *S. chamaedryfolia* u odnosu na ostale pripadnike potfamilije Maloideae implicira da Maloideae nisu mogle nastati duplikacijom genetskog materijala spireoidnog pretka – u suprotnom bi koncentracija kvercetina u Maloideae bila dvaput veća u odnosu na Spiraeoideae. Međutim, redukcijom jednog hromozoma, kao i usled izražene plejotropije, moglo je doći do efekta koji inhibira sintezu flavonoida, tako da je nemoguće osporiti hipotezu o nastanku Maloideae duplikacijom osnovnog broja hromozoma spireoidnog pretka samo na osnovu količine kvercetina.

UPGMA analiza sličnosti u sadržaju kvercetina, na nivou vrste, pokazala je da postoji blisko srodstvo

između vrsta *Pyrus communis* i *Cotoneaster horizontalis* (pripadnici iste potfamilije, Maloideae). Sa ovom granom u najbližem srodstvu je *Prunus domestica*. *Spiraea chamaedryfolia* ima bazalni položaj u okviru familije, što se poklapa sa drugim istraživanjima (Benson *et al.* 2004, Olmstead 2007). Kriterijum zadovoljava udaljenost *Quercus rubra* od biljaka Rosaceae (distanca klade je veća od 2.0 jediničnog rastojanja, slika 3), tako da je hipoteza o srodnostima unutar potfamilije prihvatljiva. Kladogram (slika 3) prikazuje filogeniju koja ne odstupa od usvojenog filogenetskog stabla (slika 1).

## Zaključak

Analizom količine flavonoida iz biljnih uzoraka *Pyrus communis*, *Prunus domestica*, *Prunus avium*, *Cotoneaster horizontalis* i *Spiraea chamaedryfolia* zaključeno je da svi pripadnici porodice Rosaceae imaju nisku koncentraciju flavonoida ( $7 \pm 3\%$  kvercetina), u poređenju sa kontrolom, *Quercus rubra*.

Kladogrami dobijeni UPGMA metodom pokazuju bliske srodnosti između vrsta *P. communis*, *P. domestica* i *C. horizontalis*, kao i *Prunus avium* sa ovim kladama. Ovi podaci ne odstupaju od prihvaćenog srodstva između rodova *Pyrus* i *Cotoneaster* (Benson *et al.* 2004).

Koncentracije kvercetina se mogu koristiti kao pokazatelj srodnosti među vrstama familije Rosaceae, ali je potrebno utvrditi u koliko pouzdanosti meri. Uzevši u obzir problematičnost filogenije ruža, potrebno je sprovesti dalja istraživanja, na većem uzorku *in vitro* biljaka i na više rodova, kao i na više polifenolskih jedinjenja da bi se mogao doneti konačni zaključak o povezanosti količine flavonoida i srodnosti.

**Zahvalnost.** Zahvaljujem se Andrei Majoroš, diplomiranom molekularnom biologu, na svim savetima i pomoći, kao i Vladimiru Jovanoviću, diplomiranom biologu.

## Literatura

Benson D. R., Vanden Heuvel B. D., Potter D. 2004. Actinorhizal symbioses: diversity and biogeography. U *Plant Microbiology* (ur. M. Gillings i A. Holmes). Oxford: Garland Science/BIOS Scientific Publishers, str. 99-130

Chopra S., Hoshino A., Boddu J., Iida S. 2006. Flavonoid pigments as tools in molecular genetics. U *The Science of Flavonoids* (ur. E. Grothewold). New York: Springer Science+Business Media, str. 147-173

Goldblatt P. 1976. Cytotaxonomic studies in the tribe Quillajeae (Rosaceae). *Ann. Mo. Bot. Gard.*, **63**: 200.

Grossi C., Raymond O., Jay M. 1998. Flavonoid and enzyme polymorphisms and taxonomic organisation of *Rosa* sections: Carolinae, Cinnamomeae, Pimpinellifoliae and Synstylae. *Biochemical Systematics and Ecology*, **26**: 857.

Les D. H., Crawford D. J., Landolt E., Gabel J. D., Kimball R. T. 2002. Phylogeny and Systematics of Lemnaceae, the Duckweed Family. *Systematic Botany*, **27**(2): 221.

Mikanagi Y., Yokoi M., Ueda Y., Saito N. 1995. Flower flavonol and anthocyanin distribution in Subgenus *Rosa*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **23** (2): 183.

Olmstead R. 2007. Lecture notes 1-10. <http://courses.washington.edu/bot113/Spring/>. Preuzeto 19. 09. 2007.

Rauscher M.D. 2006. The evolution of flavonoids and their genes. U *The Science of Flavonoids* (ur. E. Grothewold). New York: Springer Science+Business Media, str. 175-213

Sax K. 1933. The origin of the Pomoideae. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science*, **30**: 147.

Vuković J., Jurić Grubešić R., Kremer D., Vladimir-Knežević S. 2007. Flavonoid Content Assay: Prevalidation and Application on *Plantago L.* Species. *Acta Chim. Slov.*, **54**: 397.

---

Saša Šviković

## Phylogenetic relationships in Rosaceae Family Based on Quercetin Quantities

The taxonomy of the family Rosaceae is based on morphological and genetic characters. The Rosaceae family consists of four subfamilies: Spiraeoideae, Rosoideae, Amygdaloideae, and Maloideae. The most problematic part of understanding Rosaceae phylogeny is the origin of the Maloideae (Apple) subfamily. There are two hy-

potheses: wide hybridization between ancestral Amygdaloideae and Spiraeoideae or the duplicating of the Spiraeoid genome.

The commonly used taxonomic characters cannot be used to reliably explain the Rosaceae phylogeny, so additional characters are used, including the metabolism of flavonoids. Flavonoids are polyphenolic compounds in plants, the functions of which include protection from UV radiation, antioxidant inhibition and hormone regulation. Flavonoids are found only in land plants (Embryophyta). It is presumed that flavonoids can be used in researches of the phylogeny of Rosaceae.

This hypothesis was tested on quantities of flavonoid quercetin in species *Spiraea chamaedryfolia* (subfamily Spiraeoideae), *Pyrus communis*, *Cotoneaster horizontalis* (subfamily Maloideae), *Prunus domestica* and *Prunus avium* (subfamily Amygdaloideae), while *Quercus rubra* was used as a

control group and an outgroup during cluster analysis. Quercetin was extracted using the Christ-Müller method, while cluster analysis was done using the UPGMA method.

The highest quercetin concentration was extracted from *S. chamaedryfolia* (12%). The average of extracted quercetin in Rosaceae plant samples was  $7\pm 3\%$ . Cluster analysis showed close kinship between Maloideae and Amygdaloideae subfamilies. These results can be explained with the hypothesis of the wide hybridization origin of Maloideae. Although there is solid evidence that supports the Spiraeoideae base chromosome duplication hypothesis, if the flavonoid genes are plesiomorphic characters, then the hybridization/duplication would not have a great effect on their expression. Finally, quercetin content can be used as a tool of determining the phylogeny of the Rosaceae family, but it has not yet been determined how confident it is.

