

**ZBIGNIEW BRODA**<sup>1</sup>**AGNIESZKA DOBRZYCKA**<sup>1, \*</sup>**JAN BOCIANOWSKI**<sup>2</sup><sup>1</sup> Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu<sup>2</sup> Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

## Podobieństwo genetyczne różnych populacji lucerny siewnej (*Medicago sativa* L. sl.) a ich potencjał plonowania

### Genetic similarity of various populations of alfalfa (*Medicago sativa* L. sl.) and their seed yield potential

Dla 16 zróżnicowanych genotypowo populacji lucerny siewnej przeprowadzono obserwacje wybranych cech składających się na plon nasion, takich jak liczba strąków w owocostanie, liczba nasion w strąku, plon nasion z owocostanu oraz płodność. Dla tych samych 16 populacji wykonano w dwóch powtórzeniach analizę podobieństwa genetycznego z wykorzystaniem markerów RAPD. Do analiz użyto DNA izolowanego dwiema metodami (pierwsza — metoda Thomsona-Henry'ego oraz druga — metoda kolumnkowa) w celu zaobserwowania różnic w wynikach obu analiz. Dendrogramy podobieństwa otrzymane w wyniku obu analiz wyraźnie się różniły. W pierwszej serii markerów RAPD na dendrogramie podobieństwa wyróżniono 4 grupy, a w drugiej 5 grup podobieństwa genetycznego. Następnie wykonano analizę wariancji w celu sprawdzenia, czy zmienność obserwowanych cech jest większa pomiędzy, czy w obrębie grup podobieństwa.

**Słowa kluczowe:** lucerna, plon nasion, RAPD-PCR

Several traits affecting seed yield were observed in 16 genetically differentiated populations of alfalfa. The analyzed traits included number of pods per infrutescence, number of seeds per pod, seed yield per infrutescence and fertility. An analysis of genetic similarity was carried out for the populations using RAPD markers, in two series. For the first series the DNA was isolated using the Thomson-Henry's method and for the other series – with the column method. The dendrograms of genetic similarity varied for both methods and included four and five groups of similarity, respectively. Variability of the observed traits was compared between and within the similarity groups using analysis of variance.

**Key words:** alfalfa, RAPD-PCR, seed yield

---

\* Autor jest stypendystą w ramach działania 8.2 PO KL współfinansowanego z Europejskiego Funduszu Społecznego Unii Europejskiej i z budżetu Państwa

## WSTĘP

Lucerna siewna jest rośliną, z której można otrzymać duży plon zielonej masy o bardzo wysokiej zawartości białka i dużej zawartości witamin. Brak nasion produkcji krajowej uniemożliwia szersze rozpowszechnienie upraw lucerny. Szacuje się, że zaledwie 5% zapotrzebowania na nasiona pokrywa produkcja krajowa, pozostałe 95% pochodzi z importu. Przyczyną małego zainteresowania krajowym materiałem jest złe wiązanie strąków i nasion mogące wynikać z lokalnych warunków pogodowych: stosunkowo niskiej temperatury, słabego nasłonecznienia, a także niekorzystnego rozkładu opadów w okresie kwitnienia. Słabe wiązanie strąków i nasion może być także spowodowane właściwościami danego genotypu lucerny (Julier i in., 1995). Hodowlę nasienną tego gatunku utrudnia poligeniczny charakter cech ilościowych, mających wpływ na plonowanie lucerny oraz ich silna zależność od czynników środowiskowych (Volenec i in., 2002).

W niniejszej pracy do oceny podobieństwa genetycznego badanych populacji lucerny siewnej wykorzystano markery RAPD. Celem pracy była ocena zależności pomiędzy cechami fenotypowymi a podobieństwem genetycznym badanych populacji lucerny siewnej, tzn. czy w wyróżnionych na podstawie dendrogramu grupach podobieństwa genetycznego znajdują się obiekty o podobnych wartościach danej cechy, przy równoczesnych istotnych statystycznie różnicach pomiędzy grupami. Porównanie podobieństwa obserwowanego na poziomie genotypu oraz fenotypu pozwala na ocenę modyfikującego wpływu środowiska na ekspresję informacji genetycznej zawartej w DNA rośliny.

## MATERIAŁ I METODY

Materiałem roślinnym było 16 populacji lucerny siewnej (*Medicago sativa* L. sl.), pochodzących z kolekcji Katedry Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Obiektami badań były: 2 ekotypy (27, 212); 4 odmiany (Radius, Du Puits, Sitel, Vernal); 2 populacje syntetyczne (Syn 9-3, Syn 7-3); 2 linie wsobne S5 (B<sub>10</sub>, F); 2 mieszańce pojedyncze (B<sub>10</sub>×F, F×B<sub>10</sub>); 3 mutanty ('lp'— długogroniasty, 'br'— wiechowaty, 'tf'— samokończący); odmiana Ulstar (długogroniasta, wyhodowana z mutanta 'lp'). Próby do badań molekularnych oraz do analizy struktury plonu nasion pobierano z roślin rosnących w ogrodzie doświadczalnym Katedry Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Doświadczenie założone zostało w czerwcu 2005 roku, w układzie bloków losowych o wymiarach 13×3m w 3 powtórzeniach.

Markery molekularne RAPD-PCR otrzymywano zgodnie z procedurą opisaną poniżej: fragmenty liści przeznaczonych do izolacji DNA pobierano z 10 losowo wybranych roślin z każdego badanego obiektu. Całkowity DNA izolowano dla każdej z roślin osobno, a następnie sporządzano próbę zbiorczą reprezentującą daną populację.

Izolację DNA przeprowadzano dwiema metodami. Pierwszą była metoda Thomsona-Henry'ego (Thomson i Henry, 1995). Fragmenty liści o powierzchni 50 mm<sup>2</sup> inkubowano w 200 µl buforu TPS o składzie: 100 mM Tris HCl o pH 9,5; 1 M KCl; 10 mM EDTA.

Inkubację przeprowadzono w probówkach Eppendorfa, w łaźni wodnej w temperaturze 95°C przez 15 minut. Po inkubacji zbierano supernatant zawierający DNA.

Drugą metodą izolacji była metoda kolumnkowa z wykorzystaniem zestawu odczynników Qiagen DNeasy Plant Kit. Fragmenty liści o powierzchni 50 mm<sup>2</sup> umieszczano w probówkach z ciekłym azotem i rozcierano tkankę roślinną na proszek. Izolację DNA prowadzono zgodnie z zaleceniami producenta zestawu. Reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) przeprowadzono w objętości 12,5 µl mieszaniny o składzie: woda dejonizowana, 1M Tris HCl, MgCl<sub>2</sub> (25 mM), BSA (20 mg/ml), dNTP (2 mM), starter, Taq polimeraza (5u/µl), DNA. Amplifikację przeprowadzono za pomocą termocyklera T3 firmy BIOMETRA. Na przebieg reakcji PCR składało się 45 cykli; denaturacja DNA zachodziła w 94°C, przyłączanie starterów w 37°C, natomiast synteza nowych nici w 72°C. Elektroforezę produktów amplifikacji prowadzono w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Zdjęcia produktów amplifikacji wykonywane były w świetle UV. Analizę z każdym ze starterów powtarzano dwa razy, wybierając do dalszego opracowania jednie powtarzające się prążki.

Podobieństwo genetyczne (GS) badanych obiektów oszacowano stosując miarę Nei i Li (1979), wyliczając współczynniki według wzoru:  $GS_{AB} = 2N_{AB}/(N_A+N_B)$ , gdzie  $N_{AB}$  oznacza liczbę alleli obecnych zarówno u obiektu *A*, jak i u obiektu *B*,  $N_A$  — liczbę alleli obecnych u obiektu *A*,  $N_B$  — liczbę alleli obecnych u obiektu *B*. Współczynniki te posłużyły do hierarchicznego grupowania obiektów metodą średnich połączeń. Wyniki przeprowadzonego grupowania przedstawiono w formie dendrogramu.

Dla obu analiz podobieństwa (wykonanych na DNA wyizolowanych różnymi metodami) wykorzystano liczbę produktów amplifikacji wygenerowanych w reakcjach z poszczególnymi starterami. Cechy struktury plonu nasion określano w następujący sposób: dla każdego obiektu w każdym bloku pobierano losowo po 10 dojrzałych owocostanów, na podstawie których wyznaczono liczbę strąków oraz liczbę nasion. Na tej podstawie obliczano liczbę nasion w strąku. Następnie nasiona ważono w celu obliczenia masy (plonu) nasion z owocostanu. Płodność obliczano dzieląc liczbę nasion w strąku przez liczbę załączków w załączni i podając wynik w procentach. Obserwacje te powtarzano w 2 kolejnych latach. Dla otrzymanych wyników obliczono średnie, a następnie wykonano analizę wariancji (z grupami wyznaczonymi na podstawie dendrytów jako czynnikiem) w celu ustalenia, czy zmienność poszczególnych cech jest większa w obrębie wyróżnionych grup podobieństwa, czy też pomiędzy tymi grupami. Wszystkie obliczenia wykonano korzystając z pakietu statystycznego Genstat (Genstat 5 Committee, 1993).

## WYNIKI

Spośród 35 przetestowanych starterów oligonukleotydowych wybrano 10, które dawały najwięcej produktów amplifikacji. Były to startery OPA 01 (CAGGCCCTTC), OPA 03 (AGTCAGCCAC), OPA 04 (AATCGGGCTG), OPA 07 (GAAACGGGTG), OPB 07 (GGTGACGCAG), OPC 08 (TGGACCGGTG), OPC 18 (TGAGTGGGTG), OPE 14 (TGCGGCTGAG), OPI 02 (GGAGGAGAGG), OPJ 20 (AAGCGGCCTC).

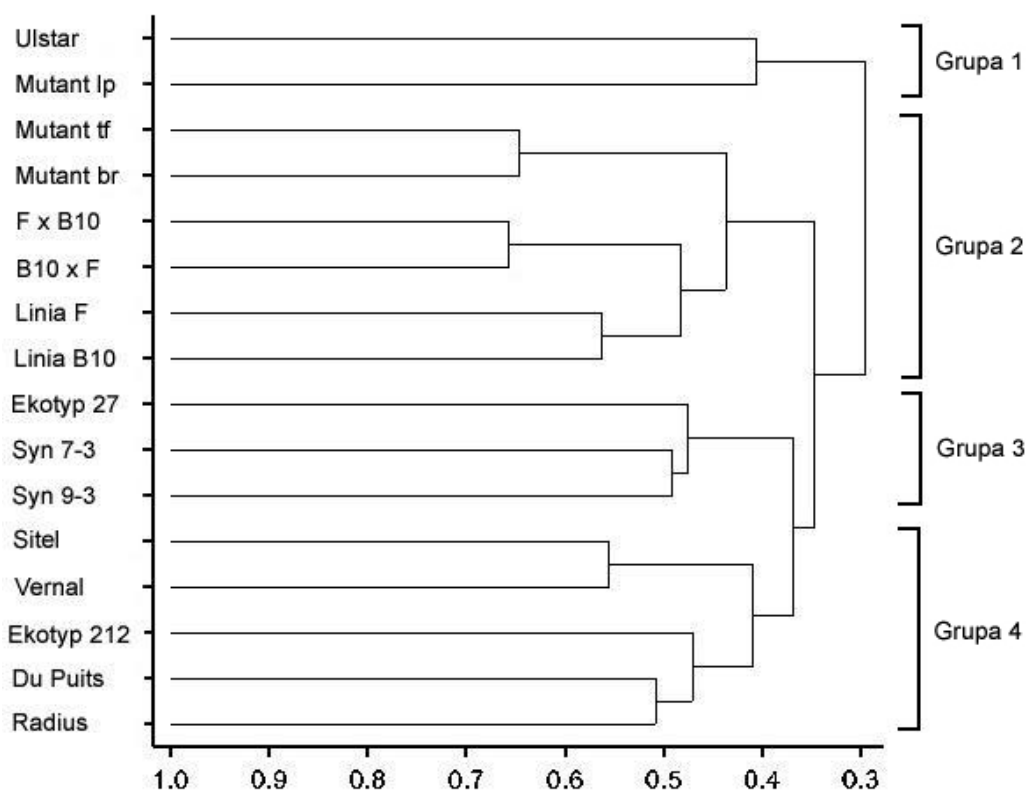
Używając dziesięciu wybranych starterów wykonano dwie serie analiz techniką RAPD, z wykorzystaniem DNA izolowanego dwiema metodami. W zależności od metody izolacji DNA użytego do reakcji PCR otrzymano różną liczbę produktów amplifikacji. Stosując DNA izolowane metodą Thomsona-Henry'ego najmniejszą liczbę produktów amplifikacji uzyskano przy zastosowaniu startera OPB 07 (średnio 3,5 w przeliczeniu na populację) (tab. 1). Największą liczbę produktów amplifikacji wygenerowano stosując starter OPA 01 (6,3 w przeliczeniu na populację). W przypadku, gdy do reakcji użyto DNA izolowanego metodą kolumnkową, liczba produktów dla jednej populacji wynosiła średnio od 6,7 przy użyciu startera OPE 14 do 10,6 w przypadku startera OPB 07. Zauważono, że przy wykorzystaniu DNA izolowanego metodą kolumnkową średnia liczba wygenerowanych prążków była prawie dwukrotnie wyższa niż w przypadku, gdy wykorzystano DNA izolowany metodą Thomsona-Henry'ego (tab. 1). Liczba wszystkich uzyskanych produktów polimorficznych wynosiła dla metody Thomsona-Henry'ego 178, natomiast dla metody kolumnkowej 512 (dla dziesięciu testowanych starterów).

Tabela 1

**Średnia liczba produktów amplifikacji wygenerowanych dla jednej populacji przez każdy z użytych starterów**

Average number of amplification products generated for every population by the used primers		
Starter primer	Metoda I Method I	Metoda II Method II
OPA 01	6,3	9,1
OPA 03	5,3	9,7
OPA 04	4,4	8,8
OPA 07	4,1	6,8
OPB 07	3,5	10,6
OPC 08	4,1	7,2
OPC 18	5,2	8,9
OPE 14	4,2	6,7
OPI 02	5,1	8,5
OPJ 20	4,0	7,7
Średnia Average	4,6	8,4

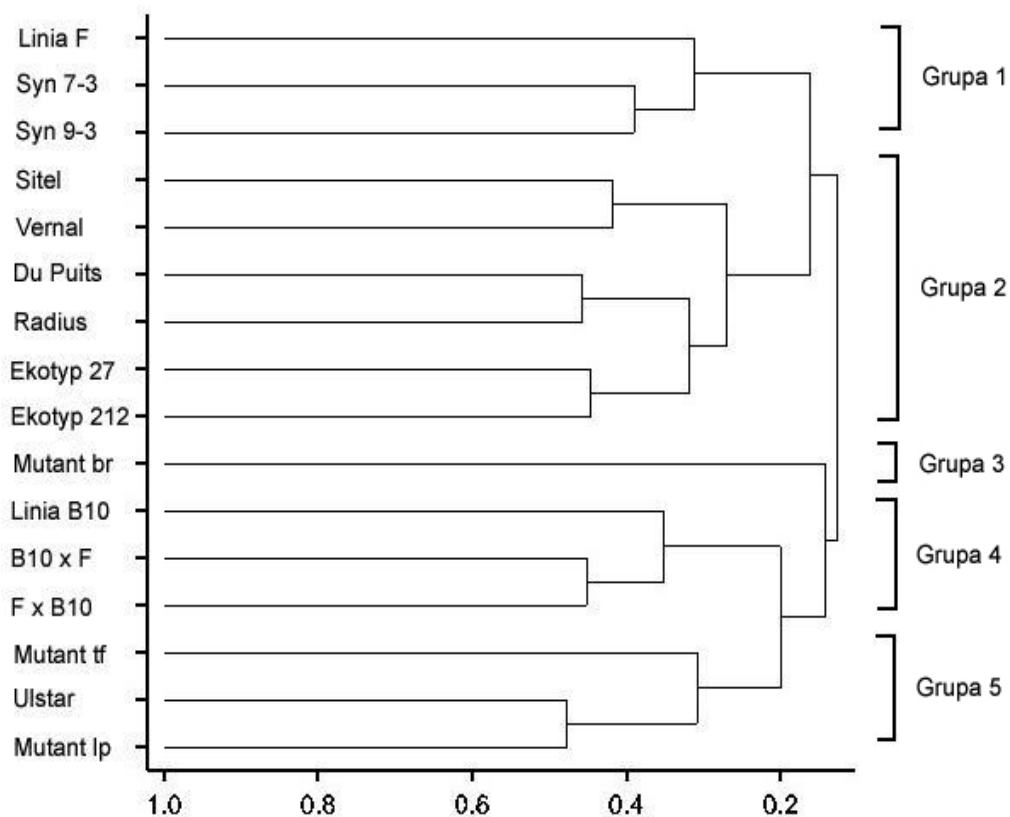
Wynik analizy podobieństwa genetycznego metodą RAPD-PCR także różnił się w zależności od metody izolacji DNA. Przy wykorzystaniu DNA izolowanego metodą Thomsona-Henry'ego badane populacje utworzyły cztery grupy zróżnicowania genetycznego, wyróżnione na poziomie 0,4. Podobieństwo między tymi populacjami wahało się od 0,3 do 0,65 (rys. 1). W grupie pierwszej znalazły się odmiana Ulstar i mutant *lp*. Podobieństwo genetyczne pomiędzy tymi obiektami wynosiło 0,4. Grupę drugą utworzyły linie F oraz B<sub>10</sub>, mieszańce F×B<sub>10</sub> i B<sub>10</sub>×F oraz mutanty *tf* i *br*, pomiędzy którymi podobieństwo wahało się od 0,5 do 0,65. Grupę trzecią utworzyły dwie populacje syntetyczne — Syn 9-3 i Syn 7-3 oraz ekotyp 27, wykazujące podobieństwo w granicach 0,47–0,49. W grupie czwartej znalazły się odmiany Du Puits, Radius, Sitel i Vernal oraz ekotyp 212. Podobieństwo genetyczne w tej grupie wahało się od 0,41 do 0,56.



Rys. 1. Dendrogram podobieństwa genetycznego pomiędzy badanymi obiektami — analiza wykonana przy użyciu DNA izolowanego metodą Thomsona-Henry'ego

Fig. 1. Dendrogram of genetic similarity between the examined objects — analysis made with DNA isolated by the Thomson - Henry method

W przypadku, gdy do badania podobieństwa genetycznego metodą RAPD-PCR użyto DNA izolowanego metodą kolumnkową wynik analizy był inny niż wówczas, gdy używano DNA izolowanego metodą Thomsona-Henry'ego. Obiekty na dendrogramie będącym wynikiem tej analizy utworzyły pięć grup podobieństwa genetycznego, którego wartość wahała się od 0,15 do 0,48 (rys. 2). W grupie pierwszej znalazły się populacje syntetyczne Syn 7-3 i Syn 9-3 oraz linia F; podobieństwo między nimi wahało się od 0,32 do 0,4. Grupę drugą utworzyły odmiany Du Puits, Radius, Sitel i Vernal oraz ekotypy 27 i 212, pomiędzy którymi podobieństwo wynosiło od 0,28 do 0,45. W grupie trzeciej znalazł się jedynie mutant *br*. Grupa czwarta utworzona została przez linię B<sub>10</sub> i mieszańce F×B<sub>10</sub> oraz B<sub>10</sub>×F. Podobieństwo genetyczne w tej grupie wahało się od 0,35 do 0,45. W grupie piątej znalazły się mutanty *lp*, *tf*, oraz odmiana Ulstar, wykazujące podobieństwo na poziomie 0,32–0,48.



Rys. 2. Dendrogram podobieństwa genetycznego pomiędzy badanymi obiektami — analiza wykonana przy użyciu DNA izolowanego metodą kolumnkową

Fig. 2. Dendrogram of genetic similarity between the examined objects — analysis made with DNA isolated by the column method

Wartości średnie, zakres i współczynniki zmienności oraz wartości NIR dla obserwowanych cech struktury plonu nasion zestawiono w tabeli 2. W roku 2006 największą średnią liczbę nasion w strąku osiągnęła linia F, natomiast najniższą mieszaniec pojedynczy  $F \times B_{10}$ . W roku 2007 najniższą liczbę nasion przypadających na strąk zanotowano u odmiany Ulstar, a najwyższą u odmian Radius i Vernal. Warto zauważyć, iż w roku 2007 średnie wartości tej cechy były niemal dla wszystkich obiektów wyższe niż w roku 2006.

Tabela 2

**Zmienność czterech obserwowanych cech struktury plonu w badanych populacjach lucerny**  
**Variability of the observed features of seed yield structure in the examined populations of alfalfa**

Obiekty Objects	Liczba nasion w strąku Number of seeds per pod							
	2006				2007			
	min	średn.	max	CV	min	średn.	max	CV
Ekotyp 27	0,43	1,43	2,24	64,32	1,38	2,02	2,60	30,26
Ekotyp 212	0,74	1,41	1,96	43,85	1,62	1,87	2,01	11,61
Du Puits	1,04	1,52	2,08	34,39	1,92	2,48	3,04	22,58
Radius	0,86	1,15	1,34	22,30	1,68	2,50	3,30	32,41
Sitel	0,60	1,42	2,36	62,60	1,42	1,79	2,14	20,12
Vernal	0,92	1,41	1,92	35,48	1,14	2,50	4,12	60,28
Syn 7-3	0,38	0,69	0,86	38,79	1,14	1,76	2,44	36,86
Syn 9-3	1,42	1,96	2,70	33,69	1,50	2,37	3,26	37,08
Linia F	0,66	1,19	1,88	52,31	1,56	2,25	3,40	44,39
Linia B <sub>10</sub>	0,60	0,83	1,17	36,20	1,88	2,02	2,26	10,33
FxB <sub>10</sub>	0,50	0,55	0,60	9,10	1,66	2,41	3,34	35,36
B <sub>10</sub> XF	1,54	1,75	1,86	10,54	1,64	2,10	2,72	26,55
Ulstar	0,96	1,43	1,74	29,01	1,04	1,53	1,80	27,89
Mutant <i>lp</i>	0,68	1,31	1,66	41,83	1,72	1,91	2,08	9,48
Mutant <i>tf</i>	0,87	0,98	1,10	11,70	1,56	1,65	1,70	4,889
Mutant <i>br</i>	0,62	1,17	1,58	42,31	1,34	1,59	2,04	24,35
NIR <sub>0,05</sub>	0,869				1,13			
LSD <sub>0,05</sub>								
Obiekty Objects	Liczba strąków w owocostanie Number of pods per infructescence							
	2006				2007			
	min	średn.	max	CV	min	średn.	max	CV
Ekotyp 27	9,6	12,73	14,4	21,33	9,6	10,60	11,2	8,22
Ekotyp 212	14,0	15,06	17,2	12,26	9,0	10,93	12,4	15,98
Du Puits	15,2	18,06	19,6	13,75	14,8	15,20	15,6	2,63
Radius	12,2	13,93	15,0	10,87	8,4	11,00	14,2	26,78
Sitel	15,6	16,53	18,0	7,78	12,0	13,20	14,8	10,93
Vernal	11,8	12,06	12,6	3,83	10,6	11,66	12,6	8,63
Syn 7-3	12,2	13,86	15,8	13,09	13,4	14,46	15,0	6,39
Syn 9-3	11,0	12,53	13,8	11,32	10,6	11,40	12,8	10,67
Linia F	14,2	15,40	16,8	8,52	10,6	12,73	16,0	22,56
Linia B <sub>10</sub>	13,2	15,53	18,2	16,20	11,0	12,00	12,8	7,63
FxB <sub>10</sub>	11,0	14,93	20,4	32,71	9,8	11,80	15,6	27,90
B <sub>10</sub> XF	15,4	18,66	21,2	15,90	11,6	12,80	14,4	11,27
Ulstar	16,4	21,06	26,0	22,81	14,6	20,46	26,0	27,89
Mutant <i>lp</i>	10,2	15,86	20,2	32,34	21,8	23,73	26,2	9,47
Mutant <i>tf</i>	12,2	15,86	20,8	27,97	12,2	13,20	14,0	6,94
Mutant <i>br</i>	15,0	18,53	22,4	20,02	12,2	13,80	15,4	11,59
NIR <sub>0,05</sub>	5,093				3,75			
LSD <sub>0,05</sub>								

Obiekty Objects	Plon nasion z owocostanu Seed yield per infructescence [mg]							
	2006				2007			
	min	średn	max	CV	min	średn	max	CV
Ekotyp 27	13,3	48,6	67,8	62,61	31,7	42,8	52,6	24,39
Ekotyp 212	37,7	50,8	63,3	26,07	38,4	49,4	58,2	20,14
Du Puits	37,3	54,3	80,6	37,85	57,4	75,3	90,3	24,13
Radius	21,6	37,1	46,8	36,96	30,3	50,2	70,4	36,86
Sitel	24,2	42,4	70,4	60,95	38,2	44,7	50,5	12,67
Vernal	23,8	36,8	52,3	39,85	28,4	58,3	10,6	64,48
Syn 7-3	9,4	28,2	53,6	78,16	31,7	51,5	80,2	49,23
Syn 9-3	38,6	49,3	60,7	28,27	33,4	55,9	70,3	37,19
Linia F	22,3	57,9	12,2	96,53	33,8	52,5	80,3	40,72
Linia B <sub>10</sub>	18,8	37,2	73,3	82,33	42,4	45,2	50,6	8,663
FxB <sub>10</sub>	8,8	18,9	35,8	75,69	35,8	59,4	101,8	55,92
B <sub>10</sub> xF	68,4	70,5	70,4	4,97	40,6	55,7	80,4	33,33
Ulstar	40,6	71,5	110,8	45,37	32,5	65,1	91,5	44,62
Mutant <i>lp</i>	27,3	45,2	80,2	59,86	50,4	60,3	70,3	16,88
Mutant <i>tf</i>	26,5	34,5	46,5	31,11	44,2	47,4	48,1	4,784
Mutant <i>br</i>	25,1	56,6	70,6	47,81	38,1	40,4	43,8	5,33
NIR <sub>0,05</sub>	0,042				0,033			
LSD <sub>0,05</sub>								
Obiekty Objects	Płodność Fertility							
	2006				2007			
	min	średn	max	CV	min	średn	max	CV
Ekotyp 27	4,13	15,60	21,54	63,70	13,27	20,19	25,00	30,43
Ekotyp 212	6,92	14,39	18,32	44,99	15,14	18,75	22,62	19,98
Du Puits	9,81	13,71	19,62	37,96	18,11	23,40	28,68	22,59
Radius	7,75	12,13	17,30	39,75	15,14	22,52	29,73	32,40
Sitel	6,90	14,86	27,13	72,50	16,32	20,61	24,60	20,13
Vernal	8,44	12,78	17,61	36,03	10,46	22,93	37,8	60,28
Syn 7-3	4,18	9,45	15,16	58,24	12,53	19,41	26,81	36,85
Syn 9-3	10,53	15,55	23,68	45,65	13,16	20,82	28,60	37,08
Linia F	6,23	17,73	37,17	95,42	14,72	21,26	32,08	44,39
Linia B <sub>10</sub>	5,04	9,86	18,49	75,97	15,80	16,97	18,99	10,33
FxB <sub>10</sub>	5,00	6,00	7,40	20,82	16,60	24,13	33,40	35,36
B <sub>10</sub> xF	14,95	18,06	21,17	17,22	15,92	20,38	26,41	26,56
Ulstar	10,00	16,67	21,88	36,43	10,83	15,97	18,75	27,90
Mutant <i>lp</i>	7,23	17,02	26,17	55,74	18,30	20,36	22,13	9,48
Mutant <i>tf</i>	8,53	10,78	14,22	28,02	15,29	16,21	16,67	4,915
Mutant <i>br</i>	6,26	13,26	17,58	46,14	13,54	16,09	20,61	24,35
NIR <sub>0,05</sub>	12,72				10,89			
LSD <sub>0,05</sub>								

W przypadku liczby strąków w owocostanie, ich największą średnią liczbę w roku 2006 zawiązała odmiana Ulstar (21,07 szt.), natomiast najmniejszą odmiana Vernal (12,07 szt.). W roku 2007 najwyższą liczbą strąków w owocostanie charakteryzował się mutant *lp* (23,73 szt.), a najniższą ekotyp 27 (średnio 10,6 strąka). Najwyższym średnim plonem nasion z owocostanu odznaczała się w roku 2006 odmiana Ulstar (71,5 mg), a w roku 2007 odmiana Du Puits (75,3 mg). Najmniejszą masę nasion z jednego owocostanu stwierdzono



w 2006 roku u mieszańca  $F \times B_{10}$  (18,9 mg), a w roku 2007 u mutantu *br* (40,4 mg). Średnia płodność w roku 2006 wahała się od 6% u mieszańca  $F \times B_{10}$  do 18% u mieszańca  $B_{10} \times F$ . W roku mieszańiec 2007  $F \times B_{10}$  osiągnął najwyższą płodność (24%), natomiast płodnością najniższą cechowała się odmiana Ulstar (16%).

Wyniki analizy wariancji zestawiono w tabelach 3 oraz 4. Średnie kwadraty z analizy wariancji dla poszczególnych cech w 2006 i 2007 roku uwzględniającej podział obiektów na grupy według dendrogramu otrzymanego przy wykorzystaniu metody izolacji Thomsona-Henry'ego przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3

**Średnie kwadraty z analizy wariancji dla poszczególnych cech w 2006 i 2007 roku dla dendrogramu powstałego z wykorzystaniem metody Thomsona-Henry'ego**  
**Mean squares from analysis of variance for the observed features in 2006 and 2007, for the dendrogram created with the Thomson-Henry method**

Rok Year	Źródło zmienności Source of variation	Liczba stopni swobody Degrees of freedom	Cecha Trait			
			liczba strąków w owocostanie number of pods per infructescence	liczba nasion w strąku number of seeds per pod	plon nasion z owocostanu seed yield per infructescence	płodność fertility
2006	grupy groups	3	41,79*	0,3247	37,9	26,85
	błąd residual	44	10,22	0,3163	63,4	52,19
2007	grupy groups	3	162,46***	0,385	34,3	24,4
	błąd residual	44	5,703	0,4284	34,35	36,57

\* Istotne na poziomie 0,05; Significant at level 0.05

\*\*\* Istotne na poziomie 0,001; Significant at level 0.001

Tabela 4

**Średnie kwadraty z analizy wariancji dla poszczególnych cech w 2006 i 2007 roku dla dendrogramu powstałego z wykorzystaniem metody kolumnkowej**  
**Mean squares from analysis of variance for the observed features in 2006 and 2007, for the dendrogram created with the column method**

Rok Year	Źródło zmienności Source of variation	Liczba stopni swobody Degrees of freedom	Cecha Trait			
			liczba strąków w owocostanie number of pods per infructescence	liczba nasion w strąku number of seeds per pod	plon nasion z owocostanu seed yield per infructescence	płodność fertility
2006	grupy groups	4	26,39	0,1883	15,81	16,68
	błąd residual	43	10,91	0,3288	66,05	53,73
2007	grupy groups	4	84,573***	0,5782	17,1	35,32
	błąd residual	43	9,303	0,4114	35,95	35,84

\*\*\* Istotne na poziomie 0,001, Significant at level 0.001

Analizę wariacji grup wyróżnionych na podstawie dendrogramu wykreślonego na podstawie analizy RAPD z wykorzystaniem izolacji metodą kolumnkową przedstawiono w tabeli 4. W przypadku tej metody otrzymywania markerów RAPD obserwowano zależności pomiędzy podobieństwem genetycznym a cechami fenotypowymi jedynie dla liczby strąków w owocostanie w drugim roku obserwacji (2007), przy czym była to zależność istotna na poziomie 0,001. Analiza ta wykazała, że grupy wyróżnione na dendrogramie podobieństwa różniły się istotnie statystycznie jedynie w przypadku liczby strąków w owocostanie (w roku 2006 wartości tej cechy dla poszczególnych grup różniły się istotnie na poziomie 0,05, natomiast w roku 2007 na poziomie 0,001). Dla pozostałych cech grupy wyznaczone na podstawie analizy molekularnej nie miały przełożenia na podobieństwo pod względem cech fenotypowych.

#### DYSKUSJA

Do oceny dystansu genetycznego badanych genotypów lucerny użyto markerów RAPD. Technika ta jest wykorzystywana między innymi do: określenia pochodzenia materiałów mieszańcowych, identyfikacji gatunków oraz odmian hodowlanych (Hu i Quiros 1991; Weder Jurgen, 2002), oceny dystansu lub podobieństwa genetycznego (Marilla i Scoles, 1996; Irzykowska i Bocianowski, 2008), identyfikacji markerów sprzężonych z genami warunkującymi korzystne cechy ilościowe (Waugh i Powell, 1992) oraz jakościowe — między innymi odporności na patogeny (Schachermayr i in., 1994), badania polimorfizmu wewnątrzgatunkowego i międzygatunkowego u wielu gatunków (Brown i in. 1993). Segregacje markerów RAPD wg praw Mendla oraz ich dziedziczenie obserwowano np. u jęczmienia, lucerny oraz soi (Williams i in., 1990, Echt i in., 1992). Przy testowaniu lucerny markerami RAPD zmienność wewnątrz populacji jest zwykle bardzo wysoka. Prawdopodobnie wynika to z obcopenności tego gatunku oraz tego, iż lucerna jest w większości tetraploidalna (Crochemore i in., 1996).

Najczęściej napotykanym problemem przy posługiwaniu się techniką RAPD jest słaba powtarzalność uzyskanych wyników, wynikająca z wrażliwości tej metody na zmiany warunków amplifikacji (Słomski, 2001). Liczba, powtarzalność i intensywność produktów otrzymanych w technice RAPD są funkcją wielu parametrów: stężenia chlorku magnezu, trójfosforanów deoksynukleotydów, *Taq* polimerazy DNA, koncentracji oraz metody izolacji DNA, liczby cykli, temperatury przyłączania starterów oraz typu termocyklera (Davin-Regli i in., 1995; Meunier i Grimont, 1993; Park i Kohel, 1994; Penner i in., 1993). Dokonane obserwacje mogą potwierdzić istotny wpływ metody izolacji DNA na wynik analizy podobieństwa genetycznego metodą RAPD — liczba produktów otrzymana w wyniku analizy wykonanej z użyciem DNA izolowanego przy pomocy metody kolumnkowej była niemal dwukrotnie wyższa niż liczba produktów otrzymana w wyniku analizy wykorzystującej metodę Thomsona-Henry'ego. W przypadku metody kolumnkowej liczba uzyskanych po reakcji PCR produktów amplifikacji wynosiła średnio 8,4 produktu na ścieżkę (wartość średnia dla dziesięciu testowanych starterów). Przy wykorzystaniu metody Thomsona-Henry'ego liczba otrzymanych produktów była niewielka i wynosiła średnio 4,6 na ścieżkę (dla dziesięciu testowanych starterów).

Wartość ta była porównywalna do liczby produktów otrzymanych w analizach RAPD przez innych autorów. Yu i Pauls (1993) studiowali zależności genetyczne między odmianami lucerny na próbach zbiorczych DNA (bulked DNA) z użyciem 10 starterów, które generowały średnio po 5 produktów.

Na wykreślonych dendrogramach podobieństwa genetycznego dały się wyróżnić wyraźne grupy, skupiające populacje podobne pod względem genetycznym. Zastosowana metoda izolacji DNA miała wpływ nie tylko na liczbę otrzymanych produktów amplifikacji, ale również na końcowy wynik analizy podobieństwa genetycznego, przedstawiony na dendrogramach podobieństwa (rys. 1 i 2). W przypadku analizy z wykorzystaniem DNA izolowanego metodą Thomsona-Henry'ego obiekty na dendrogramie utworzyły 4 grupy podobieństwa genetycznego, natomiast w przypadku wykorzystania DNA izolowanego metodą kolumnkową, obiekty na dendrogramie utworzyły 5 grup. Interesujące było, czy owe grupy skupiają populacje, odznaczające się istotnie podobną wartością danej cechy, innymi słowy, czy badane populacje grupują się pod względem którejś z obserwowanych cech, przy równoczesnym istotnym zróżnicowaniu pomiędzy grupami.

Przeprowadzona analiza wariancji wykazała, że zarówno dla dendrogramu będącego wynikiem analizy wykorzystującej metodę Thomsona-Henry'ego, jak i dla tego wykorzystującego metodę kolumnkową, jedynie w przypadku jednej cechy zaobserwowano grupowanie się populacji o podobnych wartościach. Cechą tą była liczba nasion w strąku, która różnicowała wyróżnione grupy podobieństwa genetycznego na dendrogramie wykreślonym dla metody Thomsona-Henry'ego w dwóch kolejnych latach obserwacji (przy czym istotność różnic wartości tej cechy w poszczególnych grupach podobieństwa była znacznie wyższa w drugim roku obserwacji — poziom istotności 0,001). Na dendrogramie wykreślonym dla metody kolumnkowej zaobserwowano grupowanie się populacji o podobnych wartościach tej cechy jedynie w roku 2006 (poziom istotności wynosił 0,001).

Obserwacje te wskazują, że grupy podobieństwa wyróżnione za pomocą techniki RAPD nie odpowiadają grupom podobieństwa pod względem cech morfologicznych, innymi słowy — nie obejmują populacji podobnych pod względem obserwowanych cech. Tendencję grupowania się obiektów pod względem wartości cechy morfologicznej zauważono jedynie dla cechy liczby strąków w owocostanie, jednak tendencja owa nie była do końca powtarzalna w latach.

Cecha wielkości plonu nasion lucerny przez wielu autorów uważana jest za cechę niestabilną i silnie zależną od warunków środowiskowych. Delouche (1980) i Sypniewski (1986) twierdzą, że na zmniejszenie plonu nasion może mieć wpływ niedobór wody w okresie kwitnienia, wiązania i dojrzewania strąków. Również Staszewski (1975) zwraca uwagę na wpływ zbyt niskiej ilości opadów — suma opadów poniżej 220 mm w miesiącach letnich powoduje znaczny spadek plonu nasion. Obserwacje własne poczynione w niniejszej pracy (duża rozbieżność między podobieństwem fenotypowym a genotypowym) mogą potwierdzać bardzo silny, modyfikujący wpływ środowiska na ekspresję cech związanych z plonem nasion lucerny.

PODSUMOWANIE WYNIKÓW

1. Reakcja PCR przeprowadzona z wykorzystaniem DNA izolowanego metodą kolumnkową dała prawie dwa razy więcej produktów amplifikacji niż w przypadku DNA izolowanego metodą Thomsona-Henry'ego.
2. Współczynniki podobieństwa wyliczone na podstawie analiz wykorzystujących dwie różne metody izolacji DNA (metodę Thomsona-Henry'ego oraz kolumnkową) grupowały badane populacje w różny sposób.
3. Wykonana analiza wariancji potwierdziła silną zależność podobieństwa genetycznego z obserwowanymi wartościami cech struktury plonu nasion jedynie dla cechy liczby strąków w owocostanie.

LITERATURA

- Brown P. T. H., Lange F. D., Kranz E., Lorz H. 1993. Analysis of single protoplasts and regenerated plants by PCR and RAPD technology. *Mol. Gen. Genet.* 235: 157 — 165.
- Crochemore M. L., Huyghe C., Kerlan M. C., Durand F., Julier B. 1996. Partitioning and distribution of RAPD variation in a set of populations of the *Medicago sativa* complex. *Agronomie* 16: 421 — 432.
- Davin-Regli A., Abed Y., Charrel R. N., Bollet C., Micco P. 1995. Variations in DNA concentrations significantly affect the reproducibility of RAPD fingerprint patterns. *Res. Microbiol.* 146: 561 — 568.
- Delouche J. C. 1980. Environmental effects on seed development and seed quality. *Hort. Sc.* 15: 775 — 780.
- Echt C. S., Erdahl L. A., McCoy T. J. 1992. Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. *Genome* 35: 84 — 87.
- Genstat 5 Committee. 1993. Genstat 5 Release 3 Reference Manual. Clarendon Press, Oxford.
- Hu J., Quiros C. F. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Rep.* 10: 505 — 511.
- Irzykowska L., Bocianowski, J. 2008. Genetic variation, pathogenicity and mycelial growth rate differentiation between *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* isolates derived from winter and spring wheat. *Annales of Applied Biology* 152: 369 — 375.
- Julier B., Porcheron A., Ecalle C., Guy P. 1995. Genetic variability for morphology, growth and forage yield among perennial diploid and tetraploid lucerne populations (*Medicago sativa* L.). *Agronomie* 15: 295 — 304.
- Marilla E. F., Scoles G. J. 1996. The use of RAPD markers in *Hordeum* phylogeny. *Genome* 39: 646 — 654.
- Meunier J. R., Grimont P. A. D. 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* 144: 373 — 379.
- Nei M., Li W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269 — 5273.
- Park Y. H., Kohel R. J. 1994. Effects of concentration of MgCl<sub>2</sub> on RAPD DNA polymorphism. *Biotech.* 16: 652.
- Penner G. A., Bush A., Wise R., Kim W., Domier L., Kasha K., Laroche A., Scoles G., Molnar S. J., Fedak G. 1993. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods Appl.* 2: 341 — 345.
- Schachermayr G., Siedler H., Gale M. D., Winzeler H., Winzeler M., Keller B. 1994. Identification and localization of molecular markers linked to the Lr9 leaf rust resistance gene of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 88: 110 — 115.
- Słomski R. (red.). 2001. Przykłady analiz DNA — praca zbiorowa: 158 — 160.
- Staszewski Z. 1975. Lucerny. PWRiL, Warszawa.
- Sypniewski J. 1986. Problemy uprawy roślin strączkowych w Polsce. *Fragm. Agron.* 1: 29 — 36.
- Thomson D., Henry R. 1995. Single step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. *Biotechniques* 19: 394 — 400.

- Volenc J. J., Cunningham S. M., Haagenson D. M., Berg W. K., Joern B. C., Wiersma D. W. 2002. Physiological genetics of alfalfa improvement: past failures, future prospects. *Field Crops Research* 75: 97 — 110
- Waugh R., Powell W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends Biotech.* 10: 186 — 191.
- Weder Jurgen K.P., 2002. Identification of food and feed legumes by RAPD-PCR. *Lebensm.-Wiss. und Technol.* 35: 504 — 511.
- Willams J. G., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531 — 6535.
- Yu K., Pauls K. P. 1993. Rapid estimation of genetic relatedness among heterogeneous populations of alfalfa by random amplification of bulked genomic DNA samples. *Theor. Appl. Genet.* 86: 788 — 794.