

ANETTA KUCZYŃSKA¹JAN BOCIANOWSKI*¹PIOTR MASOJC²MARIA SURMA¹TADEUSZ ADAMSKI¹¹Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu²Akademia Rolnicza, Szczecin

Zastosowanie markerów RAPD do określenia podobieństwa genetycznego odmian jęczmienia ozimego (*Hordeum vulgare* L.)

Genetic similarity among cultivars of winter barley (*Hordeum vulgare* L.) revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD)

Celem pracy było zbadanie zróżnicowania odmian jęczmienia ozimego na poziomie molekularnym. Materiał do badań stanowiło osiem odmian: Marinka, Gil, Tramp, Kroton, Tiffany, Horus, Kos oraz Siga. Realizując cel pracy przeprowadzono reakcje RAPD-PCR dla 24 10-nukleotydowych starterów, wybranych wcześniej spośród 300 o losowej sekwencji. W wyniku reakcji otrzymano 172 zamplifikowane fragmenty DNA, z których 115 wykazywało polimorfizm. Obliczono współczynniki podobieństwa genetycznego według Nei'a, które posłużyły do hierarchicznego pogrupowania odmian. Wyniki grupowania przedstawiono w postaci dendrogramu. Największe podobieństwo wykazały pary Tiffany i Horus oraz Marinka i Kos, natomiast najmniej podobne okazały się Kroton i Tiffany oraz Kroton i Siga.

Słowa kluczowe: hierarchiczne grupowanie, jęczmień, podobieństwo genetyczne, RAPD

The aim of this study was to detect genetic similarity among cultivars of winter barley using RAPD (random amplified polymorphic DNA) method. RAPD polymorphism was studied in eight winter barley cultivars: Marinka, Gil, Tramp, Kroton, Tiffany, Horus, Kos and Siga. Twenty-four 10-mer primers were tested in each cultivar. 172 amplification products were observed, from which 115 were polymorphic. Genetic similarity was estimated according to the formula given by Nei and then these results were used for the hierarchical grouping of cultivars. Results of hierarchical grouping were presented on the dendrogram. The highest genetic similarity was revealed between the cultivars Tiffany and Horus, and Marinka and Kos, whereas the lowest genetic similarity was found for Kroton and Tiffany, and Kroton and Siga.

Key words: barley, genetic similarity, hierarchical grouping, RAPD

* Stypendysta Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (FNP) na rok 2002

WSTĘP

Najprostszą w wykonaniu techniką pozwalającą na szybkie wykrycie różnic w sekwencji DNA na obszarze całego genomu jest metoda wykorzystująca polimorfizm losowo amplifikowanych fragmentów DNA. Ze względu na bardzo dużą liczbę (4^{10}) różnych sekwencji dziesięcionukleotydowych starterów, metoda RAPD stała się szczególnie przydatna do poszukiwania markerów ważnych cech użytkowych, w konstrukcji map genetycznych, jak i w ocenie podobieństwa genetycznego odmian (Barua i in., 1993; Bustos i in., 1998; Hang i in., 2000; Kuczyńska i in., 2001). Ważnym nurtem współczesnych badań genetycznych roślin jest poszukiwanie związku między markerem a określoną cechą użytkową. Podłożem stwierdzanej zależności jest silne sprzężenie markera z genem głównym danej cechy, umożliwiające przeprowadzenie selekcji na podstawie analizy polimorfizmu DNA.

Podstawowymi zaletami techniki RAPD jest brak wymogów związanych z wstępną informacją o sekwencji analizowanego DNA oraz mniejsza pracochłonność i zdecydowana szybkość realizacji w porównaniu chociażby z techniką RFLP (polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych). Wadą techniki jest dominujący charakter markerów. Oznacza to, że nie można ustalić, czy amplifikowany fragment DNA występuje w obu allelach, czy tylko w jednym allelu (Marczewski, 1995).

W niniejszej pracy zastosowano markery RAPD do oceny podobieństwa genetycznego ośmiu odmian jęczmienia ozimego.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań obejmował osiem odmian jęczmienia ozimego (*Hordeum vulgare* L.): Marinka (NL), Gil (PL), Tramp (PL), Krotón (PL), Tiffany (DE), Horus (PL), Kos (PL) oraz Sibra (DE). Reprezentują one zarówno formy dwu- jak i sześciorzędowe. Nasiona badanych odmian uzyskano z Centralnego Ośrodka Badania Odmian Roślin Uprawnych w Słupi Wielkiej. DNA analizowanych odmian ekstrahowano z liści 3-tygodniowych siewek przez 15 minut w temperaturze 95°C z wyciętych korkoborem krążków liści o powierzchni 2 mm², umieszczonych w buforze TPS. Następnie przeprowadzono reakcję RAPD-PCR dla 24 10-nukleotydowych starterów, wybranych wcześniej spośród 300 o losowej sekwencji. Przebieg przeprowadzonej reakcji odbywał się według następującego protokołu: 5 min w 95°C, 45 cykli — 1 min w 94°C, 2 min w 36°C, 2 min w 72°C, 10 min w 72°C (Kuczyńska i in., 2001). Każdą reakcję przeprowadzono oddzielnie dla czterech losowo wybranych siewek danej odmiany jęczmienia ozimego.

Elektroforezę fragmentów DNA prowadzono przez 2,5 h pod napięciem 100 V w 1,5% żelu agarozowym zawierającym bromek etydy w stężeniu 0,5 mg/L.

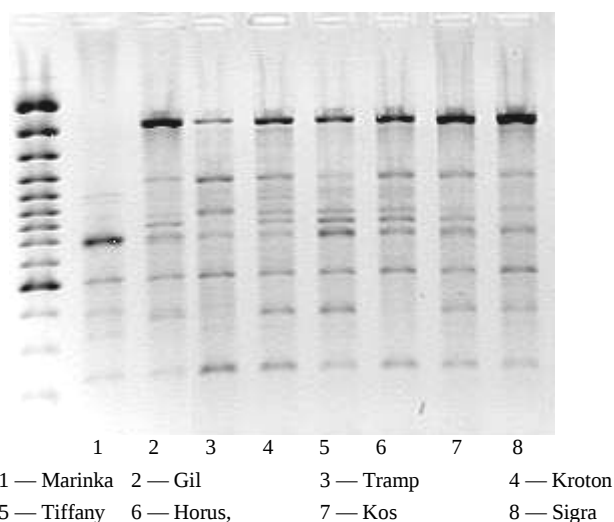
Współczynniki podobieństwa genetycznego (GS) badanych odmian obliczono korzystając ze wzoru (Nei i Li, 1979):

$$GS_{ij} = \frac{2N_{ij}}{N_i + N_j},$$

gdzie N_{ij} oznacza liczbę alleli obecnych zarówno u odmiany i , jak i u odmiany j , N_i — liczbę alleli obecnych u odmiany i , N_j — liczbę alleli obecnych u odmiany j ; $i, j = 1, 2, \dots, 8$. Współczynniki te posłużyły do hierarchicznego grupowania odmian metodą średnich połączeń. Wyniki przeprowadzonego grupowania przedstawiono w formie dendrogramu.

WYNIKI I DYSKUSJA

Liczba i lokalizacja miejsc komplementarnych dla przypadkowych starterów jest odmienna u różnych organizmów, co może być podstawą różnicowania nawet blisko ze sobą spokrewnionych gatunków oraz odmian w obrębie gatunku (Bustos i in., 1998; Hang i in., 2000). W wyniku reakcji RAPD-PCR przeprowadzonych na badanych odmianach jęczmienia ozimego przy zastosowaniu 24 starterów otrzymano 172 zamplifikowane fragmenty DNA, z których 115 wykazywało polimorfizm. Średnia liczba zamplifikowanych fragmentów wyniosła więc 7,2, natomiast średnio 4,8 fragmentów dla użytego startera wykazywało polimorfizm. Dla porównania można przytoczyć prace prowadzone nad łubinem, gdzie przy zastosowaniu 30 primerów otrzymano 146 zamplifikowanych fragmentów DNA, z których jedynie 58 wykazywało polimorfizm (Przyborowski i Weeden, 2001).



Rys. 1. Wyniki rozdziału fragmentów RAPD dla analizowanych odmian jęczmienia ozimego uzyskanych z zastosowaniem startera 18 (5'-TGCTGCAGGT-3')

Fig. 1. Results of RAPD analysis for the studied barley cultivars with the primer 18 (TGCTGCAGGT)

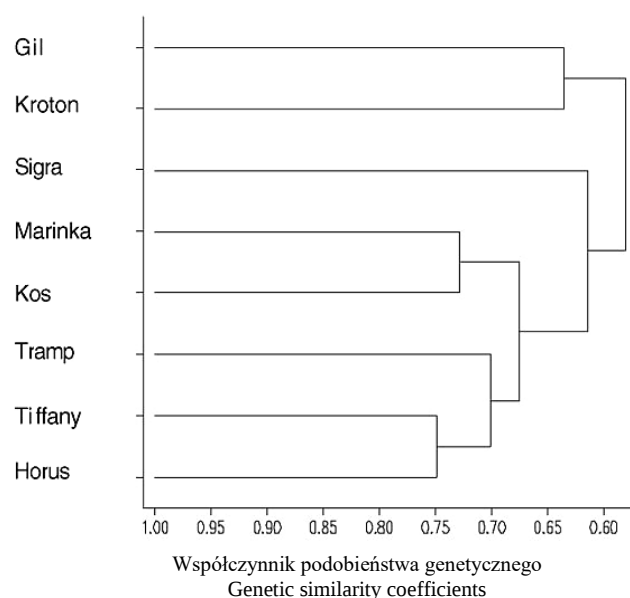
Wynika stąd, że otrzymana w doświadczeniu liczba fragmentów polimorficznych, stanowiąca 66,86% wszystkich zamplifikowanych fragmentów, była znaczna. Tak wysoki polimorfizm wynikać może z doboru — na podstawie wcześniej przeprowadzonych badań — markerów dających największe zróżnicowanie (Kuczyńska i in., 2001). Na rysunku 1 przedstawiono przykładowy foliogram obrazujący rozdział zamplifikowanych fragmentów

DNA badanych odmian, otrzymanych w wyniku zastosowania startera 18 (5'-TGCTGCAGGT-3'). Należy zaznaczyć, że wyniki reakcji RAPD-PCR dla każdego z czterech powtórzeń danej odmiany były identyczne dla każdego z użytych starterów.

Tabela 1

Współczynniki podobieństwa genetycznego odmian jęczmienia ozimego
Genetic similarity coefficients of winter barley cultivars

	Marinka	Gil	Tramp	Kroton	Tiffany	Horus	Kos
Gil	0,6364						
Tramp	0,6867	0,6234					
Kroton	0,5957	0,6357	0,5532				
Tiffany	0,6509	0,5605	0,6627	0,5278			
Horus	0,6591	0,6098	0,7386	0,5563	0,7486		
Kos	0,7284	0,6133	0,6914	0,5693	0,6788	0,6860	
Sigra	0,5921	0,5857	0,6842	0,5354	0,5677	0,5802	0,6486



Rys. 2. Hierarchiczne grupowanie odmian na podstawie podobieństwa genetycznego
Fig. 2. Hierarchical grouping of cultivars on the basis of genetic similarity

Współczynniki podobieństwa genetycznego według Nei'a dla analizowanych odmian przedstawiono w tabeli 1. Wynika z nich, że największe podobieństwo pod względem genetycznym wykazywały pary Tiffany i Horus (0,75) oraz Marinka i Kos (0,73). Najmniej podobne okazały się natomiast odmiany Kroton i Tiffany (0,53) oraz Kroton i Sigra (0,54). Różnica pomiędzy największym a najmniejszym współczynnikiem podobieństwa genetycznego nie jest więc znaczna. Przeprowadzone, na podstawie współczynników podobieństwa genetycznego, grupowanie hierarchiczne odmian metodą średnich połączeń

przedstawiono w formie dendrogramu (rys. 2). Grupowanie to nie pozwoliło na wyróżnienie zdecydowanych skupień odmian. Może to wskazywać na stosunkowo niewielkie zróżnicowanie puli genowej w badanym zestawie odmian jęczmienia ozimego. Nie można jednak wykluczyć, że otrzymana liczba polimorficznych fragmentów DNA (115) okazała się niewystarczająca do wykazania różnic występujących między badanymi odmianami na poziomie molekularnym.

WNIOSKI

1. Zastosowana w badaniach metoda wykorzystująca losowo amplifikowany, polimorficzny DNA okazała się bardzo wydajna. Przy zastosowaniu 24 starterów otrzymano 172 zamplifikowane fragmenty DNA, z których 115 (66,86%) wykazało polimorfizm.
2. Uzyskany polimorfizm fragmentów DNA nie pozwolił na wyodrębnienie zdecydowanych grup odmian jęczmienia ozimego różniących się znacząco na poziomie molekularnym; zróżnicowanie współczynników podobieństwa między parami odmian było niewielkie: od 0,53 dla odmian Kroton-Tiffany do 0,75 dla pary Tiffany-Horus.

LITERATURA

- Barua U. M., Chalmers K. J., Hackett C. A., Thomas W. T. B., Powell W., Waugh R. 1993. Identification of RAPD markers linked to a *Rhynchosporium secalis* resistance locus in barley using near-isogenic lines and bulked segregant analysis. *Heredity* 71: 177 — 184.
- Bustos De A., Casanova C., Soler C., Jouve N. 1998. RAPD variation in wild populations of four species of the genus *Hordeum* (*Poaceae*). *Theor. Appl. Genet.* 96: 101 — 111.
- Hang A., Burton C. S., Hoffman D. L., Jones B. L. 2000. Random amplified polymorphic primer-generated embryo DNA polymorphisms among 16 North American malting barley cultivars. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 58 (4): 147 — 151.
- Kuczyńska A., Milczarski P., Surma M., Masojć P., Adamski T. 2001. Genetic diversity among cultivars of spring barley revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *J. Appl. Genet.* 42 (1): 43 — 48.
- Marczewski W. 1995. Markery molekularne w genetyce i hodowli roślin. *Postępy Biochemii* 41 (4): 237 — 243.
- Nei M., Li W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction. *Proceedings of the Academy of Sciences of the USA* 76: 5269 — 5273.
- Przyborowski J. A., Weeden N. F. 2001. RAPD-based assessment of genetic similarity and distance between *Lupinus* in section *Albus*. *J. Appl. Genet.* 42 (4): 55 — 61.