

AGNIESZKA TOMKOWIAK<sup>1</sup>, DOROTA WEIGT<sup>1</sup>, ZBIGNIEW BRODA<sup>1</sup>,  
SYLWIA MIKOŁAJCZYK<sup>1</sup>, ALICJA SZABELSKA<sup>2</sup>, JOANNA ZYPRYCH<sup>2</sup>, IDZI SIATKOWSKI<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

## ANALIZA ZWIĄZKU POMIĘDZY PODOBIENSTWEM GENETYCZNYM A FENOTYPOWYM MUTANTÓW KWIATOSTANU LUCERNY

ANALYSIS OF RELATIONSHIP BETWEEN GENETIC AND PHENOTYPIC  
SIMILARITY OF ALFALFA MUTANTS INFLORESCENCES

**Streszczenie.** W doświadczeniu poszukiwano zależności pomiędzy podobieństwem obserwowanym na poziomie molekularnym a podobieństwem fenotypowym mutantów kwiatostanu lucerny. Określenie powyższych zależności pozwoliłoby na ocenę modyfikującego wpływu środowiska na ekspresję informacji genetycznej zawartej w DNA rośliny. Wykonano analizy skupień, w których wykorzystano aglomeracyjne algorytmy hierarchiczne, oraz wyznaczono wartości miar podobieństwa, które następnie porównano, stosując współczynnik Spearmana i test Mantela. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że grupy wyróżnione z wykorzystaniem markerów molekularnych nie znajdują odzwierciedlenia w obserwowanej zmienności cech morfologicznych. Otrzymane wyniki wskazują więc na brak istotnych zależności pomiędzy podobieństwem genetycznym a fenotypowym badanych mutantów lucerny oraz są dowodem na istnienie interakcji pomiędzy genotypem a środowiskiem.

**Słowa kluczowe:** lucerna, podobieństwo genetyczne, podobieństwo fenotypowe

### Wstęp

Lucerna wywiera korzystny wpływ na żyzność gleby i jej strukturę oraz gospodarkę próchniczną. Zajmuje ważne miejsce w produkcji roślinnej gospodarstw ekologicznych. Ze względu na zalety paszowe, dostarczanie dużej ilości suchej i zielonej masy oraz białka z hektara jest zaliczana do najważniejszych wieloletnich roślin pastewnych. Nie-

stety, rodzime odmiany lucerny charakteryzują się słabym plonem nasion, którego zwiększenie w zmiennym klimacie Polski jest zadaniem trudnym (JASIŃSKA i KOTECKI 2003). Odmiany lepiej plonujące można otrzymać, wykorzystując mutacje spontaniczne kwiatostanu, które powodują zmianę w morfologii gron, zwiększając w nich liczbę kwiatów (BODZON 2004, BRODA i IN. 2005, WEIGT i IN. 2009, 2011).

We współczesnej hodowli lucerny coraz częściej są wykorzystywane techniki biologii molekularnej oparte na analizie DNA. Markery pozwalają na selekcję pożądanych form, ocenę czystości nasion mieszańcowych oraz ocenę wyrównania materiałów hodowlanych, ich stopnia homozygotyczności, a także potwierdzenie skuteczności prowadzonych krzyżowań (BARAŃSKI 1996). Markery stanowią znaczniki sprzężonych z nimi cech fenotypowych o znaczeniu użytkowym. Ponadto mutanty, zarówno indukowane, jak i spontaniczne, są cennym materiałem do analizy funkcjonalnej genów z zastosowaniem takich metod jak TILLING czy FOX-hunting (RYBKA 2009). Badanie mutacji punktowych tymi metodami pozwala na szybkie wyodrębnienie i rozpoznanie sekwencji kodującej oraz funkcji genów roślinnych (KONDOU i IN. 2009).

Celem pracy jest ocena zależności pomiędzy podobieństwem obserwowanym na poziomie molekularnym a podobieństwem fenotypowym. Określenie powyższych zależności pozwoli na ocenę modyfikującego wpływu środowiska na ekspresję informacji genetycznej zawartej w DNA rośliny.

## Material i metody

Badania prowadzono na roślinach lucerny (*Medicago sativa* L.) należących do trzech spontanicznych mutacji kwiatostanu: *lp* (z ang. *long peduncle*) – mutant o kwiatostanie długogroniastym, *br* (z ang. *branche raceme*) – mutant o kwiatostanie wiechowatym oraz *tf* (z ang. *top flowering*) – mutant o kwiatostanie samokończącym. Mutant długogroniasty, pochodzący z odmiany ‘Vernal’, charakteryzuje się dłuższą osadką kwiatostanową oraz większą liczbą kwiatów w gronie niż rośliny krótkogroniaste. Mutant o kwiatostanie wiechowatym pochodzi z krzyżowania odmiany ‘Radius’ z francuskimi genotypami i ma kwiatostan o nietypowej dla lucerny morfologii – tworzy rozgałęzienia drugiego i dalszych rzędów, a także charakteryzuje się większą liczbą kwiatów niż grona roślin krótkogroniastych. Mutant o kwiatostanie samokończącym pochodzi z krzyżowania odmiany ‘Radius’ z francuskimi genotypami i ma kwiatostan tworzący się na wierzchołku pędu głównego. Skutkuje to zakończeniem wzrostu osi głównej pędu po fazie kwitnienia. Ponadto badano formy uzyskane w wyniku krzyżowania pomiędzy mutantami: długogroniastymi oraz wiechowatymi ( $lp \times br$ ), długogroniastymi i samokończącymi ( $lp \times tf$ ), a także wiechowatymi i samokończącymi ( $br \times tf$ ). Materiał kontrolny stanowiły rośliny krótkogroniastej odmiany ‘Radius’. Jest to odmiana średniowczesna, dobrze zimująca i odrastająca, dość odporna na wyleganie. Materiał roślinny został wyprowadzony przez prof. dr. hab. Zygmunta Staszewskiego w Instytucie Aklimatyzacji i Hodowli Roślin w Radzikowie.

Doświadczenie założono w szklarni Katedry Genetyki i Hodowli Roślin UP w Poznaniu. Nasiona były wysiewane w marcu do skrzynek z torfem ogrodniczym wymieszanym z piaskiem w proporcji 3 : 1. Następnie 10-centymetrowe siewki przesadzano

pojedynczo do doniczek ( $\phi$  18 cm) z podłożem zawierającym bakterie *Rhizobium*, a następnie do wazonów ( $\phi$  28 cm) umożliwiających swobodny rozwój systemu korzeniowego. Rośliny podlewano wodą bieżącą i raz w tygodniu zasilano nawozem płynnym (Florovit). Po ustaniu ujemnych temperatur przygruntowych rośliny przenoszono na zewnątrz szklarni i utrzymywano je tam do końca września.

Materiał badawczy analizowano pod względem trzech cech ilościowych stanowiących główne składowe plonu nasion: liczba gron na pędzie, liczba strąków w gronie, liczba nasion w strąku.

Analiza umożliwiająca określenie podobieństwa pomiędzy odmianami w formie dendrogramu została sporządzona z użyciem programu komputerowego UVIMAP w funkcji NEI i LI (1979):

$$GS = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$$

gdzie  $2n_{xy}$  oznacza liczbę par podobnych prążków w obu genotypach, natomiast  $n_x$  oraz  $n_y$  oznaczają liczbę wszystkich prążków dla danego genotypu. Wartość GS oznacza indeks podobieństwa pomiędzy dwoma badanymi genotypami.

Uzyskane w pomiarach biometrycznych wyniki opisujące różnorodność badanego materiału wyjściowego lucerny opracowano statystycznie. Wykonano analizy skupień, w których wykorzystano aglomeracyjne algorytmy hierarchiczne, wyznaczono wartości miar podobieństwa, które następnie porównano, stosując współczynnik Spearmana oraz test Mantela.

### **Izolacja DNA za pomocą Dneasy™ Plant Mini Kit firmy Qiagen®**

Materiał roślinny w postaci dysków liściowych o wadze 50-100 mg pobierano z 10 roślin, a następnie umieszczano je w probówkach o wielkości 1,5 ml, do każdej dodano 400  $\mu$ l buforu AP1 oraz 3  $\mu$ l RNAzy. Całość inkubowano przez 30 min w temperaturze pokojowej oraz 30 min w temperaturze 65°C. Po inkubacji dodano 130  $\mu$ l buforu AP2 i na 15 min umieszczono próby w lodzie, po wyjęciu wirowano je przez 5 min w 14 000 obrotów i otrzymany supernatant przenoszono do nowych probówek oraz dodano 250  $\mu$ l buforu AP3 i 500  $\mu$ l etanolu. Objętość roztworu przeniesiono na kolumnienki z membraną wiążącą DNA i wirowano przez 2 min w 8000 obrotów. Kolumnienki ze związanym DNA traktowano 450  $\mu$ l buforu AW i wirowano przez minutę w 8000 obrotów. Następnie kolumnienki traktowano 50  $\mu$ l podgrzanego do 65°C buforu AE oraz inkubowano 20 min w temperaturze pokojowej. Procedurę przemywania buforem eluującym AE wykonano dwukrotnie. Roztwór DNA przechowywano w temperaturze -20°C.

Bezpośrednio po ekstrakcji DNA przeprowadzono pomiar koncentracji za pomocą fluorymetru Gene Quant II z użyciem kapilar kwarcowych. Uzyskane po izolacji stężenie DNA rozcieńczano do koncentracji 25 ng/ $\mu$ l. Koncentrację ustalano, korzystając ze wzoru:

$$V_1 = \frac{C_2 \times V_2}{C_1}$$

gdzie:

$C_1$  – koncentracja próby po izolacji,

$C_2$  – koncentracja, którą zamierzamy otrzymać,  
 $V_1$  – ilość DNA o znanej koncentracji potrzebna do rozcieńczenia,  
 $V_2$  – stała umowna objętość próby, np. 50  $\mu$ l.

### Analiza markerów molekularnych RAPD

Reakcję łańcuchową polimerazy przeprowadzono w objętości 12,5  $\mu$ l mieszaniny o składzie: woda dejonizowana – 9,75  $\mu$ l 1M Tris HCl o pH 8,3 – 0,125  $\mu$ l, 25mM MgCl<sub>2</sub> – 1,0  $\mu$ l, BSA – 0,0625  $\mu$ l, 2mM dNTP – 0,625  $\mu$ l, starter – 5pmol/ $\mu$ l – 0,25  $\mu$ l, Taq polimeraza – 5U/  $\mu$ l – 0,1875  $\mu$ l, ekstrakt DNA – 25 ng/ $\mu$ l – 0,5  $\mu$ l. Następnie przeprowadzono amplifikację. Elektroforezę produktów amplifikacji przeprowadzono w 1,5-procentowym żelu agarozowym o składzie: 1,5 g agarozy, 100 ml buforu TBE 1 $\times$  oraz 1,0  $\mu$ l bromku etydyny.

### Testowane startery

Ze 112 testowanych starterów oligonukleotydocy wybrano 19 generujących bardzo duży polimorfizm (103 pążki polimorficzne). Startery oraz ich sekwencje nukleotydowe tworzące polimorfizm zamieszczono w tabeli 1.

Tabela 1. Startery i ich sekwencje nukleotydowe tworzące polimorfizm pomiędzy mutantami lucerny

Table 1. Primers and their nucleotide sequences forming a polymorphism between the alfalfa mutants

Numer startera Starter number	Sekwencja nukleotydocy 5'-3' Nucleotide sequence 5'-3'	Udział zasad azotowych w sekwencjach startera Share of nitrogen bases in the primer sequences (%)			
		G	C	A	T
1	2	3	4	5	6
OPA 03	AGTCAGCCAC	20	40	30	10
OPA 04	AATCGGGCTG	40	20	20	20
OPA 07	GAAACGGGTG	50	10	30	10
OPA 12	TCGGCGATAG	40	20	20	20
OPA 20	GTTGCGATCC	30	30	10	30
OPB 07	GGTGACGCAG	50	20	20	10
OPB 10	CTGCTGGGAC	40	30	10	20
OPB 16	TTTGCCCGGA	30	30	10	30
OPB 19	ACCCCGAAG	20	50	30	–
OPC 03	GGGGGTCTTT	50	10	–	40
OPC 05	GATGACCGCC	30	40	20	10
OPC 18	TGAGTGGGTG	60	–	10	30

Tomkowiak A., Weigt D., Broda Z., Mikołajczyk S., Szabelska A., Zyprych J., Siatkowski I., 2013. Analiza związku pomiędzy podobieństwem genetycznym a fenotypowym mutantów kwiatostanu lucerny. Nauka Przyr. Technol. 7, 3, #34.

Tabela 1 – cd. / Table 1 – cont.

1	2	3	4	5	6
OPC 20	ACTTCGCCAC	10	50	20	20
OPD 03	GTCGCCGTCA	30	40	10	20
OPD 05	TGAGCGGACA	40	20	30	10
OPD 18	GAGAGCCAAC	30	30	40	–
OPE 05	TCAGGGAGGT	50	10	20	20
OPE 07	AGATGCAGCC	30	30	30	10
OPE 12	TTATCGCCCC	10	50	10	30

## Wyniki

Spośród 112 testowanych starterów oligonukleotydowych 19 generowało bardzo duży polimorfizm (103 prążki polimorficzne), który pozwolił na określenie podobieństwa genetycznego pomiędzy badanymi mutantami lucerny (tab. 2). Starterami, które najsilniej różnicowały badane genotypy, były: OPB 07 i OPC 03 (osiem prążków polimorficznych).

Tabela 2. Charakterystyka produktów amplifikacji DNA uzyskanych w wyniku reakcji RAPD-PCR

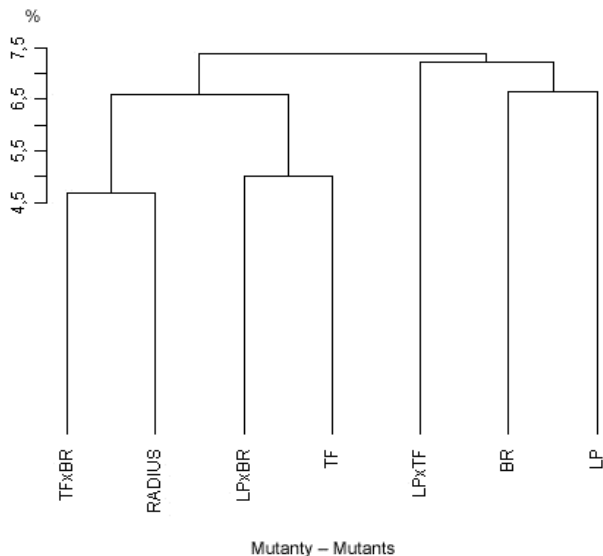
Table 2. Characteristics of DNA amplification products received as a result of RAPD-PCR reaction

Numer startera Starter number	Sekwencja nukleotydomowa 5'-3' Nucleotide sequence 5'-3'	Liczba wygenerowanych fragmentów DNA Number of generated DNA fragments	Liczba wygenerowanych fragmentów polimorficznych Number of generated polymorphic fragments
1	2	3	4
OPA 03	AGTCAGCCAC	4	1
OPA 04	AATCGGCTG	8	5
OPA 07	GAAACGGGTG	5	3
OPA 12	TCGGCGATAG	6	5
OPA 20	GTTGCGATCC	9	7
OPB 07	GGTGACGCAG	8	8
OPB 10	CTGCTGGGAC	7	7
OPB 16	TTGCCCCGGA	9	7
OPB 19	ACCCCGAAG	8	7
OPC 03	GGGGTCTTT	9	8

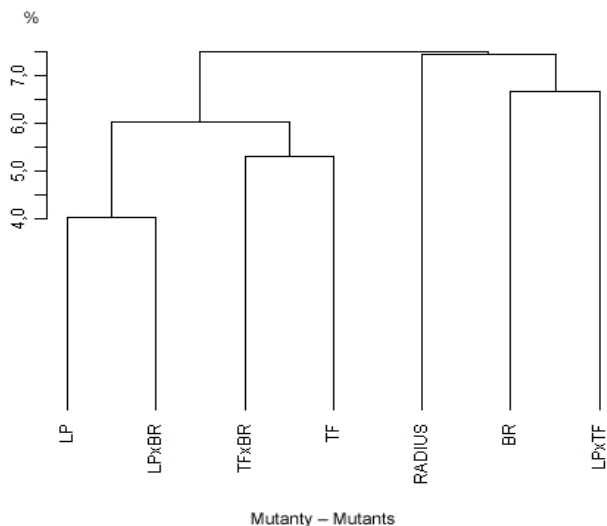
Tabela 2 – cd. / Table 2 – cont.

1	2	3	4
OPC 05	GATGACCGCC	8	6
OPC 18	TGAGTGGGTG	3	1
OPC 20	ACTTCGCCAC	8	6
OPD 03	GTCGCCGTCA	8	7
OPD 05	TGAGCGGACA	6	6
OPD 18	GAGAGCCAAC	10	7
OPE 05	TCAGGGAGGT	5	4
OPE 07	AGATGCAGCC	5	4
OPE 12	TTATCGCCCC	5	4

Dendrogramy wykazały różnice w grupowaniu form zmutowanych ze względu na rozpatrywane cechy fenotypowe: liczbę gron na pędzie (rys. 1), liczbę nasion w strąku (rys. 2), liczbę strąków w gronie (rys. 3), jak i dystans genetyczny (rys. 4). Największe podobieństwo do odmiany kontrolnej 'Radius' wykazały mutanty z genem tf. Obrazuje to dendrogram podobieństwa fenotypowego pod względem liczby strąków w gronie oraz liczby nasion w strąku, a także dendrogram podobieństwa genetycznego.

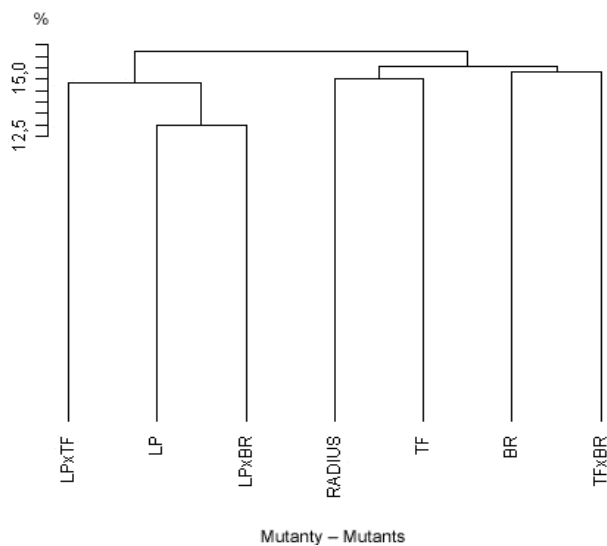


Rys. 1. Dendrogram podobieństwa fenotypowego mutantów lucerny pod względem liczby gron na pędzie  
 Fig. 1. Dendrogram of phenotypic similarity of alfalfa mutants in the number of racemes on the shoot



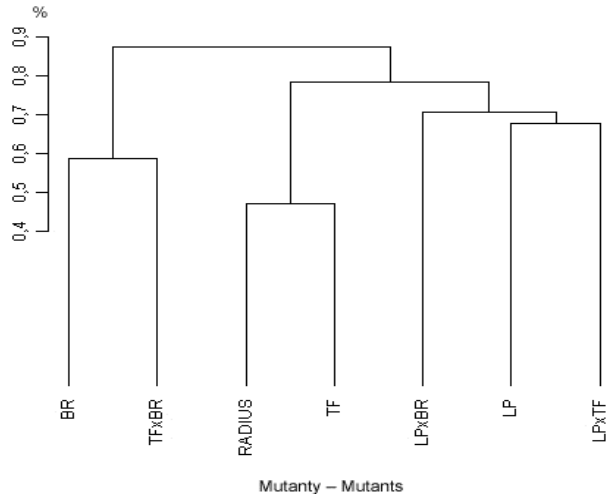
Rys. 2. Dendrogram podobieństwa fenotypowego mutantów lucerny pod względem liczby nasion w strąku

Fig. 2. Dendrogram of phenotypic similarity of alfalfa mutants in the number of seeds in the pod



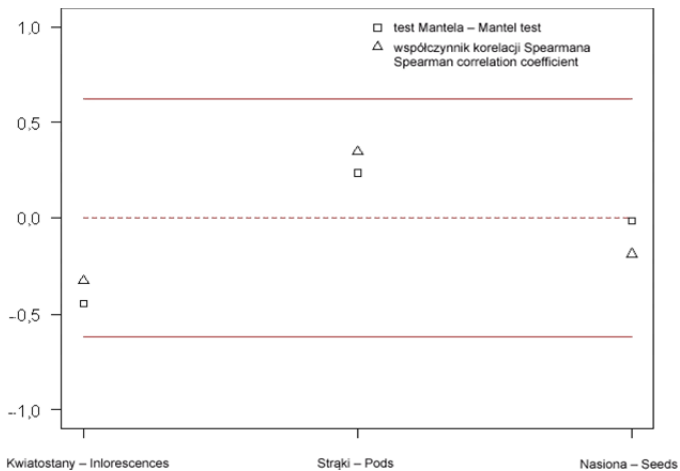
Rys. 3. Dendrogram podobieństwa fenotypowego mutantów lucerny pod względem liczby strąków w gronie

Fig. 3. Dendrogram of phenotypic similarity of alfalfa mutants in the number of pods in the raceme



Rys. 4. Dendrogram podobieństwa genetycznego mutantów lucerny na podstawie współczynnika NEI i LI (1979)  
 Fig. 4. Dendrogram of genetic similarity of alfalfa mutants based on NEI and LI (1979) coefficient

Aby określić zależność pomiędzy podobieństwem genetycznym a podobieństwem fenotypowym, wykonano test Mantela i określono współczynnik korelacji Spearmana (rys. 5). W przypadku liczby gron na pędzie powiązanie między podobieństwem feno-



Rys. 5. Test Mantela i współczynnik korelacji Spearmana pomiędzy dystansem genetycznym a zróżnicowaniem fenotypowym poszczególnych cech struktury plonu  
 Fig. 5. Mantel test and Spearman correlation coefficient between genetic distance and phenotypic diversity of individual characteristics of yield



typowym i genetycznym było ujemne. Z kolei dla liczby nasion w strąku wartość testu Mantela była bliska zeru. Oznacza to, że nie ma zależności pomiędzy podobieństwem genetycznym a fenotypowym ze względu na tę cechę. Pozostałe wartości, zarówno dla testu Mantela, jak i współczynnika korelacji Spearmana, były zawarte w przedziale  $(-0,5; 0,5)$ . Sugeruje to, iż powiązanie pomiędzy podobieństwem genetycznym a fenotypowym rozpatrywanych cech jest niewielkie.

## Dyskusja

Dzięki najnowszym osiągnięciom w dziedzinie genetyki molekularnej oraz inżynierii genetycznej selekcja z użyciem markerów molekularnych może współzawodniczyć z selekcją fenotypową lub stanowić jej uzupełnienie. Zastosowanie markerów molekularnych w programach hodowlanych pozwala na ograniczenie ich rozmiaru i czasu trwania. Badania teoretyczne i analityczne wskazują, że maksymalna wydajność procesu selekcji w przypadku cech ilościowych jest osiągnięta poprzez jednoczesne użycie do tego celu zarówno informacji pochodzących z poziomu molekularnego, jak i obserwacji fenotypowych. Jak do tej pory MAS (z ang. MAS – *marker assisted selection*) okazała się efektywną metodą dla cech, które są kontrolowane przez małą liczbę genów. Dla cech uwarunkowanych poligenicznie selekcja z użyciem markerów molekularnych jak na razie jest mniej efektywna. Zmienność ekspresji genów cech ilościowych w różnych warunkach środowiskowych uwidacznia problemy związane z programami hodowlanymi wykorzystującymi MAS i jednocześnie utrudnia selekcję prowadzoną wyłącznie na podstawie fenotypu. Tak więc połączenie obu metod selekcyjnych wydaje się najbardziej efektywne (TORRES i IN. 2010).

W badaniach będących przedmiotem tej pracy zastosowano technikę RAPD PCR do szacowania podobieństwa genetycznego pomiędzy mutantami lucerny oraz ich mieszańcami. W niniejszej pracy liczba wygenerowanych produktów polimorficznych, pozwalających na określenie podobieństwa genetycznego wynosiła od jednego do ośmiu, a więc była charakterystyczna dla zastosowanej metody (BRODA i DOBRZYCKA 2007, SKUZA i IN. 2013). Liczba ta stanowi funkcję następujących parametrów: stężenia chlorku magnezu, trójfosforanów deoksynukleotydów, Taq polimerazy DNA, koncentracji DNA oraz temperatury przyłączania starterów (MEUNIER i GRIMONT 1993, PENNER i IN. 1993, ABED i IN. 1995). KÖLLIKER i IN. (2001), przeprowadzając analizę podobieństwa genetycznego koniczyny białej (*Trifolium repens* L.), zauważyli, że na profil prążków po elektroforezie ma również wpływ łączenie DNA badanych roślin w próby zbiorcze, których wykorzystanie skutkuje otrzymaniem nieco prostszego profilu prążków w porównaniu z profilem otrzymanym z pojedynczych roślin danej odmiany. W przeprowadzonej analizie podobieństwa genetycznego mutantów oraz mieszańców lucerny wykorzystano próby zbiorcze DNA, przygotowane po zmieszaniu materiału roślinnego pobranego z 10 pojedynczych roślin. Strategie otrzymywania prób zbiorczych były początkowo oparte na równych ilościach genomowego DNA, które otrzymywano z pojedynczych roślin. Równie skuteczną metodą jest łączenie próbek liści lub nasion (SWEENEY i DANNEBERGER 1995, KONGKIATNGAM i IN. 1996, GOLEMBIEWSKI i IN. 1997). Również MICHELMORE i IN. (1991) podają, że łączenie prób DNA pocho-

dających z jednego obiektu znacznie redukuje liczbę prób niezbędnych do wykonania analizy, ale skutkuje też brakiem występowania rzadko pojawiających się alleli, a to upraszcza profil elektroforetyczny danej odmiany.

Test Mantela oraz współczynnik korelacji Spearmana wskazują, że grupy wyróżnione na podstawie markerów molekularnych nie mają odzwierciedlenia w obserwowanej zmienności cech fenotypowych. Dendrogramy powstałe na podstawie analizy cech struktury plonu tworzą grupy skupiające inne formy niż dendrogramy powstałe na podstawie analizy RAPD. Różnice w układzie grup podobieństwa genetycznego i fenotypowego badanych form lucerny świadczą o silnym wpływie czynników środowiskowych na analizowane cechy struktury plonu. Im silniej na fenotyp wpływają czynniki zewnętrzne, tym niższy jest stopień odziedziczalności badanej cechy. Jednocześnie udział zmienności genetycznej w całkowitej zmienności organizmu pod względem tej cechy jest mniejszy (WEIGT i IN. 2011). Uzyskane wyniki wskazują na niski stopień odziedziczalności analizowanych cech struktury plonu nasion, potwierdzając badania innych autorów (VOLENEC i IN. 2002, WEIGT i IN. 2009). Modyfikujący wpływ środowiska utrudnia selekcję w kierunku ważnych cech hodowlanych uwarunkowanych poligenicznie, często też wzajemnie ze sobą dodatnio lub ujemnie skorelowanych (BODZON 2004, WEIGT i IN. 2011), dlatego istotnym czynnikiem selekcyjnym w hodowli roślin powinna być ich analiza na poziomie genetycznym.

## Wnioski

1. Grupy wyróżnione na podstawie markerów molekularnych nie znajdują odzwierciedlenia w obserwowanej zmienności cech fenotypowych.

2. Otrzymane wyniki wskazują na brak zależności pomiędzy podobieństwem genetycznym a fenotypowym badanych mutantów lucerny oraz dowodzą istnienia interakcji pomiędzy genotypem a środowiskiem.

## Literatura

- ABED Y., DAVIN-REGLI A., CHARREL R.N., BOLLET C., MICCO P., 1995. Variation of RAPD fingerprint patterns using different DNA – extraction methods with Gram – positive bacteria. World J. Microbiol. Biotechnol. 11: 238-239.
- BARAŃSKI R., 1996. Otrzymywanie roślin haploidalnych. W: Zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli roślin. Red. B. Michalik. Drukrol, Kraków: 50-90.
- BODZON Z., 2004. Correlations and heritability of the characters determining the seed yield of the long-raceme alfalfa (*Medicago sativa* L.). J. Appl. Genet. 45: 49-59.
- BRODA Z., DOBRZYCKA A., 2007. Badanie samonieżgodności oraz podobieństwa genetycznego zróżnicowanych genotypowo form lucerny (*Medicago sativa* L.). Biul. Inst. Hod. Aklim. Rośl. 245: 205-214.
- BRODA Z., WEIGT D., HEGENBARTH R., 2005. Charakterystyka morfologiczna i cytologiczna oraz ocena struktury plonu nasion w liniach wsobnych mutantów kwiatostanu lucerny (*Medicago sativa* L. sl.). Pr. Zakr. Nauk Roln. Leśn. PTPN 98/99: 155-165.

Tomkowiak A., Weigt D., Broda Z., Mikołajczyk S., Szabelska A., Zypych J., Siatkowski I., 2013. Analiza związku pomiędzy podobieństwem genetycznym a fenotypowym mutantów kwiatostanu lucerny. Nauka Przyr. Technol. 7, 3, #34.

- GOLEMBIEWSKI R.C., DANNEBERGER T.K., SWEENEY P.M., 1997. Potential of RAPD markers for use in the identification of creeping bentgrass cultivars. *Crop Sci.* 37: 212-214.
- JASIŃSKA Z., KOTECKI A., 2003. Szczegółowa uprawa roślin. T. 2. Wyd. AR, Wrocław.
- KÖLLIKER R., JONES E.S., JAHUFER M.Z.Z., FORSTER J.W., 2001. Bulked AFLP analysis for the assessment of genetic diversity in white clover (*Trifolium repens* L.). *Euphytica* 121: 305-315.
- KONDOU Y., HIGUCHI M., TAKAHASHI S., SAKURAI T., ICHIKAWA T., KURODA H., YOSHIZUMI T., TSUMOTO Y., HORII Y., KAWASHIMA M., HASEGAWA Y., KURIYAMA T., MATSUI K., KUSANO M., ALBINSKY D., TAKAHASHI H., NAKAMURA Y., SUZUKI M., SAKAKIBARA H., KOJIMA M., AKIYAMA K., KUROTANI A., SEKI M., FUJITA M., ENJU A., YOKOTANI N., SAITOU T., ASHIDATE K., FUJIMOTO N., ISHIKAWA Y., MORI Y., NANBA R., TAKATA K., UNO K., SUGANO S., NATSUKI J., DUBOUZET J.G., MAEDA S., OHTAKE M., MORI M., ODA K., TAKATSUJI H., HIROCHIKA H., MATSUI M., 2009. Systematic approaches to using the FOX hunting system to identify useful rice genes. *Plant J.* 57: 883-894.
- KONGKIATNGAM P., WATERWAY M.J., COULMAN B.E., FORTIN M.G., 1996. Genetic variation among cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.) detected by RAPD markers amplified from bulk genomic DNA. *Euphytica* 89: 355-361.
- MEUNIER J.-R., GRIMONT P.A.D., 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microbiol.* 144, 5: 373-379.
- MICHELMORE R.W., PARAN I., KESSELI R.V., 1991. Identification of markers linked to disease – resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9828-9832.
- NEI M., LI W.H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269-5273.
- PENNER M.W., 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.
- RYBKA K., 2009. TILLING I FOX-hunting: nowe metody analizy funkcjonalnej genów. *Post. Biol. Komórki* 36, 4: 539-554.
- SKUZA L., ROGALSKA S.M., DYBA S.M., BOCIANOWSKI J., 2013. RAPD polymorphism in the prebreeding material for cultivation of synthetic variations of lucerne (*Medicago sativa* L.). *Centr. Eur. J. Biol.* 8, 1: 38-47.
- SWEENEY P.M., DANNEBERGER T.K., 1995. RAPD characterization of *Poa annua* L. populations in golf course greens and fairways. *Crop Sci.* 35: 1676-1680.
- TORRES A.M., AVILA C.M., GUTIERREZ N., PALOMINO C., MORENO M.T., CUBERO J.I., 2010. Marker-assisted selection in faba bean (*Vicia faba* L.). *Field Crops Res.* 115, 3: 243-252.
- VOLENEC 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 Res.* 75, 2-3: 97-110.
- WEIGT D., BOCIANOWSKI J., BRODA Z., TOMKOWIAK A., 2011. Analysis of variation and interdependence of phenotypic traits in inflorescence mutants of lucerne (*Medicago sativa* L. sl.). *Pol. J. Agron.* 5: 49-56.
- WEIGT D., BRODA Z., LIRA J., MIKOŁAJCZYK S., 2009. Morpho-developmental and cytological characteristics of inflorescence mutants in alfalfa (*Medicago sativa* L. sl.). *Plant Breed. Seed Sci.* 60: 13-21.

## ANALYSIS OF RELATIONSHIP BETWEEN GENETIC AND PHENOTYPIC SIMILARITY OF ALFALFA MUTANTS INFLORESCENCES

**Summary.** The experiment attempted to specify the relation between the similarity observed on the molecular level and the phenotypic similarity. Determining the above mentioned connections would enable to evaluate the modifying influence of the environment on the expression of genetic information included in the DNA of a plant. On the basis of the received results, it was concluded that the groups singled out according to their molecular markers are not reflected in the observed variability of the morphological features. The research results thus indicate that there is no relation between the genetic and phenotypic similarity of the examined alfalfa mutants; what is more the results confirm the existence of an interaction between the genotype and the environment.

**Key words:** alfalfa, genetic similarity, phenotypic similarity

*Adres do korespondencji – Corresponding address:*

*Agnieszka Tomkowiak, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Dojazd 11, 60-632 Poznań, Poland, e-mail: agatom@up.poznan.pl*

*Zaakceptowano do opublikowania – Accepted for publication:*

*29.05.2013*

*Do cytowania – For citation:*

*Tomkowiak A., Weigt D., Broda Z., Mikołajczyk S., Szabelska A., Zyprych J., Siatkowski I., 2013. Analiza związku pomiędzy podobieństwem genetycznym a fenotypowym mutantów kwiatostanu lucerny. *Nauka Przyr. Technol.* 7, 3, #34.*