

AGNIESZKA TOMKOWIAK¹, DOROTA WEIGT¹, ALICJA SZABELSKA², JOANNA ZYPRYCH²,
ZBIGNIEW BRODA¹, IDZI SIATKOWSKI²

¹Katedra Genetyki i Hodowli Roślin
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

²Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

ANALIZA ZRÓŻNICOWANIA GENETYCZNEGO ODMIAN I KLONÓW KONICZYNY BIAŁEJ (*TRIFOLIUM REPENS* L.) Z UŻYCIEM MARKERÓW RAPD

**ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY OF CULTIVARS
AND CLONES OF WHITE CLOVER (*TRIFOLIUM REPENS* L.)
WITH THE USE OF RAPD MARKERS**

Streszczenie. Przedmiotem badań były cztery odmiany koniczyny białej (odmiany te są syntetykami klonów) oraz jedna odmiana rozmnażana generatywnie przez szkółkę selekcyjno-rozmnożeniową. Nadrzędnym celem tej pracy była analiza zróżnicowania genetycznego odmian i klonów koniczyny białej oraz określenie udziału poszczególnych klonów w tworzeniu odmian na podstawie podobieństwa genetycznego określonego za pomocą markerów molekularnych RAPD. Dla każdego współczynnika podobieństwa utworzono macierz podobieństwa. Następnie wykonano dendrogramy. Dla porównania wyników dla każdego współczynnika wykorzystano test Mantela i współczynnik korelacji Spearmana. Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że wyselekcjonowane startery generowały polimorfizm, który pozwolił dobrać komponenty do krzyżowań w celu testowania zdolności kombinacyjnych 1, 2, 3, 4. Dendrogramy wykonane z wykorzystaniem współczynników Nei i Ochiai tworzą grupy podobieństwa, w których skład wchodzi odmiany wraz ze swoimi klonami, najprecyzyjniej więc grupują formy pod względem pochodzenia. Współczynniki Simple Matching, Hamanna oraz Rogersa i Tanimoty tworzą grupy, które często zawierają odmiany i klony nie należące do danej odmiany, nie są więc użyteczne w wyborze komponentów do krzyżowań.

Słowa kluczowe: koniczyna, markery RAPD, podobieństwo genetyczne

Wstęp

W ostatnich latach obserwuje się stopniowy wzrost zainteresowania uprawą roślin motylkowatych, będący wynikiem zastępowania w żywieniu zwierząt gospodarskich białka zwierzęcego paszami z roślin wysokobiałkowych.

Nowe uwarunkowania ekonomiczne, a zwłaszcza możliwości importowe i powiązanie produkcji z cenami światowymi, spowodowały sukcesywnie pogłębiający się przełom w gospodarce rolnej. Dotyczy to także roślin motylkowatych drobnonasiennych, które jako źródło pasz dla produkcji mleka i mięsa są szczególnie powiązane z importem i koniunkturą (MARTYNIAK 1996). Interesujące jest, od strony poznawczej i praktycznej, jak w tych warunkach kształtuje się tworzenie i wykorzystanie postępu biologicznego tej grupy roślin. Polska hodowla zajmuje się kilkunastoma gatunkami roślin motylkowatych drobnonasiennych, z seradłą włącznie, jednak hodowla twórcza, zwłaszcza intensywniejsza, prowadzona jest tylko w kilku gatunkach (MARTYNIAK 1997).

Markery molekularne są podstawowym i niezbędnym narzędziem wykorzystywanym w tworzeniu nowych odmian, ich ochronie i klasyfikacji. Zastosowanie markerów molekularnych pozwala na wprowadzenie bardziej obiektywnych kryteriów selekcji i doboru materiału rodzicielskiego, jak również pozwala w sposób znaczący skrócić czas niezbędny na wyhodowanie nowej odmiany. Najczęściej stosowanymi technikami otrzymywania markerów molekularnych są metody wykorzystujące łańcuchową reakcję polimerazy DNA (PCR – ang. *Polymerase Chain Reaction*), czyli RAPD (ang. *Random Amplified Polymorphic DNA*), AP-PCR (ang. *Arbitrarily Primed PCR*) i DAF (ang. *DNA Amplification Fingerprinting*). Wchodzą one w skład grupy markerów MAAP (ang. *Multiple Arbitrary Amplicon Profiling*). Łańcuchową reakcję polimerazy wykorzystuje się również w analizie sekwencji mikrosatelitarnych techniką STMS (ang. *Sequence Tagged Microsatellite Sites*) oraz w celu uzyskania markerów AFLP (ang. *Amplified Fragment Length Polymorphism*). Jedną z najstarszych technik jest pochodząca z lat siedemdziesiątych ubiegłego wieku technika RFLP (ang. *Restriction Fragment Length Polymorphism*).

Markery RAPD zaczęto stosować na początku lat dziewięćdziesiątych. Wykorzystują one reakcję PCR do generowania prążków. Wykazują dominujący charakter dziedziczenia, co uniemożliwia odróżnienie homozygot od heterozygot. Używane 9-11-nukleotydowe startery przyłączają się losowo, zapoczątkowując amplifikację w wielu rejonach genomu jednocześnie.

Istotnym elementem doboru komponentów – klonów do krzyżowań jest zbadanie ich podobieństwa genetycznego w celu testowania zdolności kombinacyjnych, aby można było ulepszyć zdolność wiązania nasion jako ważnego elementu zachowania poziomu plonu suchej masy.

Celem badań prezentowanych w tej pracy była analiza różnicowania genetycznego odmian i klonów koniczyny białej oraz określenie udziału poszczególnych klonów w tworzeniu odmian na podstawie podobieństwa genetycznego określonego za pomocą markerów RAPD.

Material i metody

Materiałem roślinnym użytym do badań były cztery odmiany koniczyny białej (odmiany te są syntetykami klonów, poszczególne klony w obrębie kombinacji swobodnie się przepylają, są więc mieszańcami) oraz jedna odmiana rozmnażana generatywnie przez szkółkę selekcyjno-rozmnożeniową. Odmiany oraz klony otrzymano z Poznańskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o. w Tulcach koło Poznania. Doświadczenie zostało założone w 2007 roku w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin UP w Poznaniu. Materiał roślinny użyty do badań przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Odmiany i klony
Table 1. Cultivars and clones

Klon Clone	Odmiany – Cultivars				
	‘Astra’	‘Romena’	‘Rawo’	‘Aura’	‘Cyma’
1	–	K-210/72	K-56/70	K-56/70	K-48/87
2	–	K-15/76	K-38/81	K-200/78	K-94/95
3	–	K-35/78	–	K-312/78	–
4	–	K-2/80	–	K-38/81	–
5	–	K-51/80	–	–	–

Otrzymywanie markerów RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Genomowy DNA z odmian oraz klonów koniczyny izolowano zmodyfikowaną metodą THOMSONA i HENRY’EGO (1995). Dyski liściowe o powierzchni 2 mm² traktowano 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 w ciągu 15 min.

Reakcję łańcuchową polimerazy (PCR) przeprowadzono w objętości 12,5 µl mieszaniny o składzie: woda dejonizowana; 1 M Tris HCl o pH 8,3, 25 mM MgCl₂, BSA, 2 mM dNTP, starter – 5 pmoli/µl, Taq polimeraza – 5 U/µl, ekstrakt DNA – 25 ng/µl. Taq polimeraza pochodziła z firmy MBI-Fermentas, pozostałe odczynniki – z firmy Sigma.

Amplifikację DNA przeprowadzono za pomocą termocyklera T3 Biometra firmy Polygen. Po wyjęciu prób z termocyklera do każdej z nich dodano 1 µl barwnika (0,25-procentowy błękit bromofenolowy, 40-procentowa sacharoza, woda dejonizowana). Elektroforezę produktów amplifikacji przeprowadzono w 1,5-procentowym żelu agarozowym o składzie: 1,5 g agarozy, 100 ml buforu TBE 1 × (10,8 g Tris base, 5,5 g kwasu borowego, 4 ml 0,5 M EDTA – pH 8,0), 1 µl bromku etydyyny.

Analiza statystyczna

Badanie różnicowania genetycznego odmian i klonów koniczyny białej wykonano z użyciem pakietu statystycznego R. W pierwszym etapie analizy statystycznej, wykorzystując wielkość mas molekularnych wygenerowanych produktów amplifikacji, określono podobieństwo genetyczne między odmianami i klonami koniczyny. W tym celu zastosowano siedem współczynników, których postać jest następująca:

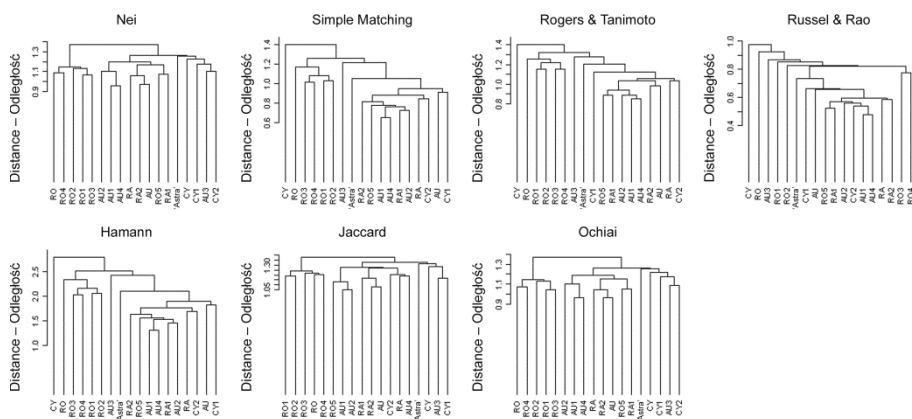
Współczynnik	Wzór
Nei (DICE 1945)	$s_N = \frac{2v_{ij}}{2v_{ij} + w_{ij} + x_{ij}}$
Simple Matching (SNEATH i SOKAL 1973)	$s_{SM} = \frac{v_{ij} + y_{ij}}{v_{ij} + w_{ij} + x_{ij} + y_{ij}}$
Jaccarda (JACCARD 1908)	$s_J = \frac{v_{ij}}{v_{ij} + w_{ij} + x_{ij}}$
Rogersa i Tanimoty (ROGERS i TANIMOTO 1960)	$s_{RT} = \frac{v_{ij} + y_{ij}}{v_{ij} + 2(w_{ij} + x_{ij}) + y_{ij}}$
Russela i Ray (RUSSEL i RAO 1940)	$s_{RR} = \frac{v_{ij}}{v_{ij} + w_{ij} + x_{ij} + y_{ij}}$
Hamanna, 1961	$s_H = \frac{(v_{ij} + y_{ij}) - (w_{ij} + x_{ij})}{v_{ij} + w_{ij} + x_{ij} + y_{ij}}$
Ochiai (OCHIAI 1957)	$s_O = \frac{v_{ij}}{\sqrt{(v_{ij} + w_{ij})(v_{ij} + x_{ij})}}$

gdzie v_{ij} oznacza liczbę par prążków występujących w obu genotypach, w_{ij} oznacza liczbę par prążków występujących odpowiednio w i-tym genotypie, a nieobecnych w j-ym, x_{ij} oznacza liczbę par prążków występujących odpowiednio w j-ym genotypie, a nieobecnych w i-tym genotypie oraz y_{ij} oznacza liczbę prążków nieobecnych w żadnym z genotypów.

Dla każdego współczynnika podobieństwa utworzono macierz podobieństwa. Następnie wykonano dendrogramy. Dla porównania wyników dla każdego współczynnika wykorzystano test Mantela i współczynnik korelacji Spearmana.

Wyniki

Dla zobrazowania dystansów genetycznych dla badanych współczynników zastosowano metodę grupowania elementów we względnie jednorodne klasy. Podstawą grupowania jest podobieństwo pomiędzy elementami – wyrażone za pomocą metryki euklidesowej. Przy wyznaczaniu grup odmian podobnych zastosowano algorytm grupowania hierarchicznego – algorytm tworzy dla zbioru obiektów hierarchię klasyfikacji, zaczynając od takiego podziału, w którym każdy obiekt stanowi samodzielne skupienie, a kończąc na podziale, w którym wszystkie obiekty należą do jednego skupienia. W procesie grupowania wykorzystano metodę średnich. Na rysunku 1 przedstawiono drzewa hierarchiczne dla każdego współczynnika. Dane brane pod uwagę w celu wyznaczania dystansu dla danego współczynnika są średnią ze wszystkich analizowanych starterów.



Rys. 1. Dendrogramy przedstawiające podobieństwo genetyczne między odmianami i klonami koniczyny białej określone za pomocą różnych współczynników (AU – ‘Aura’, CY – ‘Cyma’, RA – ‘Rawo’, RO – ‘Romena’)

Fig. 1. Dendrograms showing genetic similarity between cultivars and clones of white clover determined by different coefficients (AU – ‘Aura’, CY – ‘Cyma’, RA – ‘Rawo’, RO – ‘Romena’)

Koncentracja wyizolowanego DNA dla odmian i klonów wynosiła: dla ‘Astry’ – 1,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, dla ‘Romeny’ – 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, dla K-210/72 – 1,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, dla K-15/76 – 0,9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, dla K-35/78 – 1,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, dla K-2/80 – 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, dla K-51/80 – 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, dla ‘Rawy’ – 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, dla K-56/70 – 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, dla K-38/81 – 1,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, dla ‘Aury’ – 1,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, dla K-200/78 – 1,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, dla K-312/78 – 1,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, dla ‘Cymy’ – 0,9 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, dla K-48/87 – 1,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, dla K-94/95 – 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Spośród 130 testowanych starterów oligonukleotydowych sześć generowało bardzo duży polimorfizm (53 pążki polimorficzne), który pozwolił na określenie podobieństwa genetycznego pomiędzy badanymi odmianami i klonami koniczyny białej (tab. 2). Najbardziej efektywnym starterem, który najsilniej różnicował badane genotypy, był starter OPA 04 (11 pążków polimorficznych).

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

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

Starter	Sekwencja nukleotydomowa Nucleotide sequence	Liczba wygenerowanych fragmentów DNA Number of generated DNA fragments	Liczba wygenerowanych fragmentów polimorficznych Number of generated polymorphic fragments
OPA 04	AATCGGGCTG	12	11
OPA 09	GGGTAACGCC	10	8
OPC 01	TTCGAGCCAG	8	8
OPC 18	TGAGTGGGTG	10	10
OPG 14	GGATGAGACC	9	8
OPG 17	ACGACCGACA	9	8

W celu porównania wyników dla każdego współczynnika wykorzystano test Mantela i współczynnik korelacji Spearmana. Wyniki zaprezentowano w tabeli 3.

Z powyższych analiz wynikają następujące zależności. Współczynniki Simple Matching oraz Hamanna wykazują identyczne podobieństwa, zatem test Mantela i współczynnik korelacji Spearmana dla tych danych wynosi 1, a drzewa podobieństwa wykazują identyczne pogrupowanie. Bardzo zbliżone wyniki daje także współczynnik Rogersa i Tanimoty, którego współczynnik korelacji Spearmana w stosunku do dwóch wcześniejszych wynosi 0,994. Na podstawie dendrogramów wykreślonych z wykorzystaniem powyższych współczynników można wyróżnić trzy grupy podobieństwa genetycznego. W skład pierwszej grupy wchodzi odmiana 'Rawo' wraz z dwoma swoimi

Tabela 3. Wartości testu Mantela i współczynnika korelacji Spearmana

Table 3. Values of Mantel test and Spearman correlation coefficient

	Nei	Simple Matching	Rogers & Tanimoto	Russel & Rao	Hamann	Jaccard	Ochiai
Nei		0,664	0,692	0,493	0,664	0,993	0,994
Simple Matching	0,660		0,994	0,836	1,000	0,655	0,638
Rogers & Tanimoto	0,696	0,988		0,825	0,994	0,688	0,665
Russel & Rao	0,521	0,857	0,857		0,836	0,486	0,491
Hamann	0,660	1,000	0,988	0,857		0,655	0,638
Jaccard	0,979	0,660	0,712	0,528	0,660		0,986
Ochiai	0,997	0,640	0,676	0,520	0,640	0,973	

Poniżej linii ukośnej – wartości testu Mantela, powyżej linii ukośnej – wartości współczynnika korelacji Spearmana.

Below the curve – Mantel test values, above the curve – Spearman correlation coefficient values.

klonami, trzy klony odmiany 'Aura', klon odmiany 'Romena' oraz klon odmiany 'Cyma'. Dystans genetyczny występujący pomiędzy nimi mieści się w przedziale od 0,6 do 1,0. Drugą grupę stanowią odmiana 'Aura' i klon odmiany 'Cyma'. Dystans genetyczny pomiędzy formami wchodzącymi w skład tej grupy wynosi 1,0. Trzecią grupę tworzą odmiana 'Romena' wraz z czterema swoimi klonami, a dystans genetyczny pomiędzy nimi mieści się w przedziale od 1,0 do 1,2. Dla tych współczynników odmiany 'Astra' i 'Cyma' wykazują najmniejsze podobieństwo względem pozostałych analizowanych obiektów.

Współczynnik Nei daje porównywalny wynik ze współczynnikiem Ochiai (w tym przypadku test Mantela i współczynnik korelacji Spearmana wynoszą odpowiednio 0,997 i 0,994). Na podstawie dendrogramów wykreślonych z wykorzystaniem współczynników Nei i Ochiai można wyróżnić cztery grupy podobieństwa genetycznego (rys. 1). W skład pierwszej grupy wchodzi odmiana 'Romena' wraz z czterema swoimi klonami, a dystans genetyczny pomiędzy nimi mieści się w przedziale od 1,1 do 1,2. Drugą grupę stanowią trzy klony odmiany 'Aura' i klon odmiany 'Romena'. Dystans genetyczny pomiędzy formami tej grupy wynosi od 0,9 do 1,1. Trzecią grupę tworzą odmiana 'Aura' i klony odmiany 'Cyma', a dystans genetyczny pomiędzy nimi mieści się w przedziale od 0,9 do 1,2. Do czwartej grupy należą odmiana 'Cyma' wraz ze swoim klonem, odmiana 'Astra' oraz klon odmiany 'Aura'. Dystans genetyczny pomiędzy nimi mieści się w przedziale od 1,1 do 1,3. Współczynnik Jaccarda wykazuje się znacznym podobieństwem do współczynników Ochiai i Nei, natomiast drzewa grupujące kolejne gatunki odbiegają swoim kształtem od siebie – wykazują inne pogrupowania. Warto zwrócić uwagę na współczynnik Russela i Ray, który nie wykazuje bardzo dużego podobieństwa do żadnego z wcześniejszych. Z tabeli 3 wynika także, że współczynniki zawierające w swojej formule wartość mówiącą o liczbie prążków nieobecnych w obu porównywanych genotypach charakteryzują się zbliżonymi wartościami, podobnie jak współczynniki nie zawierające w swojej formule informacji o liczbie prążków nieobecnych w obu porównywanych genotypach – one także mają zbliżone wartości, przy czym druga grupa współczynników ma mniejsze wartości niż pierwsza grupa.

Dyskusja

W ostatnich latach markery molekularne stają się podstawowym i niezbędnym elementem w tworzeniu nowych odmian, ich ochronie i klasyfikacji. Hodowcy mają możliwość korzystania z nowych metod, pomagających określić zmienność genetyczną, którą manipulują bądź to na podstawie bezpośredniej analizy DNA, bądź na podstawie sprzężeń markerów z daną cechą (markery izoenzymatyczne). Zastosowanie markerów molekularnych pozwala na wprowadzenie bardziej obiektywnych kryteriów selekcji i doboru materiału rodzicielskiego, jak również pozwala w sposób znaczący skrócić czas niezbędny na wyhodowanie nowej odmiany.

W badaniach, które są przedmiotem tej pracy, wykorzystano technikę molekularną RAPD. Liczba wygenerowanych produktów polimorficznych, pozwalających na określenie dystansu genetycznego między odmianami i klonami koniczyny białej, wynosiła od 8 do 11. Najczęściej spotykanym problemem przy posługiwaniu się techniką RAPD

jest brak powtarzalności uzyskanych wyników (PRZYKŁADY... 2001). Liczba wygenerowanych produktów polimorficznych oraz ich powtarzalność są funkcją następujących parametrów: stężenia chlorku magnezu, stężenia trójfosforanów deoksynukleotydów, Taq polimerazy DNA, koncentracji DNA, temperatury przyłączania starterów (MEUNIER i GRIMONT 1993, PENNER i IN. 1993, ABED i IN. 1995).

Stężenie DNA w wyizolowanych próbkach wynosiło od 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dla 'Romeny' oraz klonów K-56/70 i K-94/95 do 1,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dla K-48/87. MURALIDHARAN i WAKELAND (1993) oraz VAN BELKUM (1994) uważają, że stężenie DNA nie wpływa istotnie na powtarzalność analiz RAPD, lecz jedynie na intensywność prążków. Podobną prawidłowość odnotowano, analizując wyniki badań w tej pracy.

W przeprowadzonej analizie podobieństwa genetycznego odmian i klonów koniczyny białej użyto prób zbiorczych DNA, przygotowanych po zmieszaniu materiału roślinnego pobranego z 10 pojedynczych roślin. Strategie otrzymywania prób zbiorczych były początkowo oparte na równych ilościach genomowego DNA z pojedynczych roślin. Równie skuteczną metodą jest łączenie próbek liści lub nasion (SWEENEY i DANNEBERGER 1995, KONGKIATNGAM i IN. 1996, GOLEMBIEWSKI i IN. 1997). Jak zauważyli KÖLLIKER i IN. (2001) podczas analizy podobieństwa genetycznego koniczyny białej, wykorzystanie prób zbiorczych skutkuje otrzymaniem nieco prostszego profilu prążków niż to jest w przypadku profilu otrzymanego z pojedynczych roślin danej odmiany. Również MICHELMORE i IN. (1991) podają, że łączenie prób DNA pochodzących z jednego obiektu nie tylko znacznie redukuje liczbę prób niezbędnych do wykonania analizy, lecz także skutkuje brakiem występowania rzadko pojawiających się alleli, co upraszcza profil elektroforetyczny danej odmiany.

Dla wielu badaczy wybór odpowiedniej miary wyznaczania różnicowania genetycznego analizowanych form stanowi duży problem. Praca ta, oprócz analizy różnicowania genetycznego odmian i klonów koniczyny białej, ma również przybliżyć najczęściej wykorzystywane miary służące do określania różnicowania genetycznego. Metody Jaccarda oraz Nei są oparte na obserwacjach tzw. podwójnej obecności alleli, stąd wnioski wyciągane na ich podstawie są bardzo podobne. Różną od pozostałych miar jest miara Rogersa i Tanimoty. Wynika to z faktu, że wykorzystuje się w niej obecność alleli u jednego obiektu przy równoczesnym braku alleli u drugiego. Niniejsza praca miała na celu analizę różnicowania genetycznego odmian i klonów koniczyny białej z wykorzystaniem techniki RAPD-PCR. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że markery molekularne RAPD znajdują zastosowanie w grupowaniu form pod względem pochodzenia. Najprecyzyjniej obrazują to dendrogramy wykonane na podstawie współczynnika Nei i współczynnika Ochiai (w tym przypadku odpowiednio wartości testu Mantela i współczynnika korelacji Spearmana wynoszą 0,997 i 0,994), podobne wyniki daje współczynnik Jaccarda. Dendrogramy wykonane z wykorzystaniem tych współczynników tworzą grupy podobieństwa, w których skład wchodzi odmiany wraz ze swoimi klonami. Pozostałe współczynniki tworzą grupy, które często zawierają odmiany oraz nie należące do niej klony. Warto zwrócić uwagę na współczynnik Russela i Ray, który nie wykazuje bardzo dużego podobieństwa do żadnego z powyższych. Współczynniki zawierające w swojej formule wartość mówiącą o liczbie prążków nieobecnych w obu genotypach charakteryzują się zbliżonymi wartościami, podobnie jak współczynniki nie zawierające w swojej formule informacji o liczbie

Tomkowiak A., Weigt D., Szabelska A., Zypych J., Broda Z., Siatkowski I., 2012. Analiza różnicowania genetycznego odmian i klonów koniczyny białej (*Trifolium repens* L.) z użyciem markerów RAPD. Nauka Przyr. Technol. 6, 4, #79.

prążków nieobecnych w obu genotypach – one także mają zbliżone wartości, przy czym druga grupa współczynników ma mniejsze wartości podobieństw niż pierwsza grupa.

Wnioski

1. Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że wyselekcjonowane startery generowały polimorfizm, który pozwolił dobrać komponenty do krzyżowań w celu testowania zdolności kombinacyjnych.

2. Dendrogramy wykonane na podstawie współczynników Nei i Ochiai tworzą grupy podobieństw, w których skład wchodzi odmiany wraz ze swoimi klonami, najprecyzyjniej więc grupują formy pod względem pochodzenia.

3. Współczynniki Simple Matching, Hamanna oraz Rogersa i Tanimoty tworzą grupy, które często zawierają odmiany i klony nie należące do danej odmiany, nie są więc użyteczne w wyborze komponentów do krzyżowań.

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.
- 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.
- JACCARD P., 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat. 44: 223-270.
- 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.
- 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.
- MARTYNIAK J., 1996. Motylkowate – postęp zakłócony. Nowocz. Roln. 11: 9-10.
- MARTYNIAK J., 1997. Postęp biologiczny u roślin motylkowatych drobnonasiennych w warunkach gospodarki rynkowej. W: Hodowla roślin. Materiały z I Krajowej Konferencji, Poznań, 19-20 listopada 1997. Poznań: 49-56.
- MEUNIER J.R., GRIMONT P.A.D., 1993. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. Res. Microbiol. 144: 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.
- MURALIDHARAN K., WAKELAND E.K., 1993. Concentration of primer and template qualitatively affects products in random-amplified polymorphic DNA PCR. BioTechniques 14, 3: 362-364.
- NEI M., 1972. Genetic distance between populations. Am. Nat. 106: 283-292.
- 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.
- NEI M., TAJIMA F., TATENO Y., 1983. Accuracy of estimated phylo-genetic trees from molecular data. II. Gene frequency data. J. Mol. Evol. 19, 2: 153-170.

Tomkowiak A., Weigt D., Szabelska A., Zypych J., Broda Z., Siatkowski I., 2012. Analiza różnicowania genetycznego odmian i klonów koniczyny białej (*Trifolium repens* L.) z użyciem markerów RAPD. Nauka Przyr. Technol. 6, 4, #79.

- OCHIAI A., 1957. Zoogeographic studies on the soleoid fishes found in Japan and its neighbouring regions. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 22: 526-553.
- 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.
- PRZYKŁADY analiz DNA. 2001. Red. R. Słomski. Wyd. AR, Poznań.
- ROGERS J.S., 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. Stud. Genet. 7213: 145-153.
- ROGERS D.J., TANIMOTO T.T., 1960. A computer program for classifying plants. Science 132: 1115-1118.
- RUSSEL P.F., RAO T.R., 1940. On habitat and association of species of anopheline larvae in south-eastern Madras. J. Malaria Inst. India 3: 153-178.
- SNEATH P.H.A., SOKAL R.R., 1973. Numerical taxonomy. Freeman, San Francisco.
- 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.
- THOMSON D., HENRY R., 1995. Single step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. BioTechniques 19: 394-400.
- VAN BELKUM A. 1994. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. Clin. Microbiol. Rev. 7: 174-184.

ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY OF CULTIVARS AND CLONES OF WHITE CLOVER (*TRIFOLIUM REPENS* L.) WITH THE USE OF RAPD MARKERS

Summary. The research focused on four white clover cultivars (which are synthetic clones) and one cultivar generatively propagated through the selection-propagation school. The overall objective of this study was to analyse the genetic diversity of cultivars and clones of white clover and to determine the share of individual clones in the creation of cultivars based on genetic similarity specified using RAPD molecular markers. For each similarity coefficient the similarity matrix was created. Then the dendrograms were built. For the results comparison for each ratio Mantel test and Spearman correlation coefficient were used. On the basis of the analysis it was stated that selected primers generated polymorphisms, which allowed to select components for the crosses to test the ability of combinations. The dendrograms constructed with the use of the coefficients of Nei and Ochiai create similarity groups which include cultivars with their clones so they the most precisely group the forms in terms of the origin. Coefficients of Simple Matching, Hamann, Rogers and Tanimoto create groups, which often contain cultivars and clones that do not belong to a given cultivar, so they are not so useful in selecting components for the crosses.

Key words: clover, RAPD markers, genetic similarity

Tomkowiak A., Weigt D., Szabelska A., Zyprych J., Broda Z., Siatkowski I., 2012. Analiza różnicowania genetycznego odmian i klonów koniczyny białej (*Trifolium repens* L.) z użyciem markerów RAPD. *Nauka Przyr. Technol.* 6, 4, #79.

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 druku – Accepted for print:

30.08.2012

Do cytowania – For citation:

*Tomkowiak A., Weigt D., Szabelska A., Zyprych J., Broda Z., Siatkowski I., 2012. Analiza różnicowania genetycznego odmian i klonów koniczyny białej (*Trifolium repens* L.) z użyciem markerów RAPD. *Nauka Przyr. Technol.* 6, 4, #79.*