



Ispitivanje mogućnosti primene RAPD markera u detekciji DNK polimorfizma sorti lucerke

Nevena Nagl · Ksenija Taški-Ajdković · Goran Barać · Dragan Milić · Slobodan Katić

primljeno / received: 20.04.2010. prerađeno / revised: 01.06.2010. prihvaćeno / accepted: 03.06.2010.
© 2010 IFVC

Izvod: Iako je lucerka najznačajnija gajena biljka za stočnu ishranu u umerenim klimatskim regionima, postizanje značajnih napredaka u oplemenjivanju je veoma komplikovano zbog njene složene genetske konstitucije. Usled alogamije i tetraploidije sintetičke sorte lucerke se karakterišu veoma izraženom varijabilnošću individua unutar same sorte. Poznavanje stepena genetske varijabilnosti sorti i populacija sa poželjnim agronomskim svojstvima moglo bi značajno biti unapređeno upotrebom molekularne genetske analize. Stoga je cilj ovog rada bilo ispitivanje mogućnosti RAPD markera da detektuju varijacije unutar populacije kod pet sorti lucerke različitog porekla. Predstavljeni su rezultati početnog ispitivanja 40 slučajnih RAPD prajmera u cilju ispitivanja njihovih mogućnosti da sintetišu PCR produkte koji bi omogućili kako detekciju polimorfizma između ispitivanih sorti, tako i unutar njih.

Ključne reči: DNK polimorfizam, *Medicago sativa*, PCR, RAPD

Uvod

Lucerka (*Medicago sativa*) je najznačajnija gajena biljka za stočnu ishranu u područjima sa umerenom klimom. Međutim, uprkos njenom izuzetnom ekonomskom značaju, napredak u oplemenjivanju kultivisanih formi ove biljne vrste se veoma teško postiže usled njene biološke i genetske kompleksnosti. Lucerka je autotetraploidna, stranooplodna, entomofilna vrsta sa specifičnom građom cveta. Zbog ovih osobina u oplemenjivanju lucerke se koriste relativno jednostavne metode oplemenjivanja (Katić i sar. 2007), što za rezultat ima veoma visok stepen genetske raznolikosti između pojedinačnih biljaka unutar populacija. Usled toga, genetska struktura sorti lucerke je znatno nepreciznija u odnosu na fiksirane kultivisane forme kao što su inbred linije ili hibridi, što znatno otežava njihovu preciznu genetičku karakterizaciju. Iako je takav cilj za sada teško ostvarljiv, neophodno je preduzeti korake prema njegovom postizanju iz nekoliko razloga: 1) omogućila bi se brza, pouzdana i efikasna diferencijacija sorti, 2) dobila bi se saznanja o genetskoj srodnosti i udaljenosti ekotipova

lucerke sa poželjnim agronomskim svojstvima, 3) unapredilo bi se znanje o populacionoj genetičkoj vrste a samim tim i njenoj potencijalnoj primeni u oplemenjivanju.

Do sada je za određivanje genetske varijabilnosti i karakterizaciju germplazme gajenog bilja razvijeno nekoliko metoda, od kojih su mnogi primenjeni i u istraživanjima na lucerki. Kao prvi korišćen je metod detekcije polimorfizma izoenzima za utvrđivanje komponenti genetske varijabilnosti unutar i između analiziranih populacija (Quiros 1983, Jenczewski et al. 1999). Međutim, stepen polimorfizma koji je detektovan na ovaj način nije bio dovoljan, kako za identifikaciju komponenti ispitivane germplazme, tako i za određivanje stepena njihove srodnosti. Kao prvi metod za detekciju DNK polimorfizma lucerke korišćen je polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata, odnosno RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Botstein et al. 1980) koji, iako je upotrebljen u određenom broju istraživanja (Brummer et al. 1993, Kidwell et al. 1994, Pupilli et al. 1996) nije mogao biti primenjen u ispitivanjima sa velikim brojem uzoraka, usled potrebe za velikom količinom DNK, kao i dugotrajnom i komplikovanom procedurom koju je podrazumevao.

Sposobnost oligonukleotida dužine 8-10 baznih parova da tokom PCR reakcije omoguću sintezu produkata amplifikacije različitih dužina,

N. Nagl (✉) · K. Taški-Ajdković · D. Milić · S. Katić
Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Maksima Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Srbija
e-mail: nevena.nagl@ifvcns.na.ac.rs

G. Barać
Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu, Departman za biologiju i ekologiju, Trg Dositeja Obradovića 3, 21000 Novi Sad, Srbija

Ovo istraživanje je finansirano od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije

dovela je do razvitka RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markera (Williams et al. 1990, Welsh & McClelland 1990). Ovaj tip dominantnih markera omogućuje veoma laku i jednostavnu detekciju DNK polimorfizma na velikom broju uzoraka, što je uslovalo njegovu široku primenu u populacionoj genetici i marker asistiranju selekciji. U istraživanjima na lucerki, RAPD markeri su do sada korišćeni u ispitivanjima kolekcija različite germplazme (Echt et al. 1991, McCoy & Echt 1993), konstrukciji genetskih mapa (Echt et al. 1993, Yu & Pauls 1993), intra- i interspecies varijabilnost jednogodišnjih vrsta roda *Medicago* (Brummer et al. 1995, Crochemore et al. 1996), kao i ispitivanju polimorfizma tetraploidne lucerke (Mengoni et al. 2000, Gherardi et al. 1998). Iako se u molekularnim istraživanjima na različitim vrstama iz roda *Medicago* koriste i drugi tipovima markera, kao što su AFLP (Riday et al. 2003)

i mikrosateliti (Diwan et al. 2000, Sledge et al. 2005), RAPD markeri, zbog jednostavnosti upotrebe i niske cene imaju još uvek veliki potencijal za primenu u ovoj vrsti istraživanja.

Imajući u vidu krajnji cilj, određivanje mogućnosti primene RAPD markera u selekcionom materijalu oplemenjivačkog programa lucerke Instituta za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu, cilj ovog rada je bilo ispitivanje mogućnosti nasumično odabranih RAPD prajmera da sintetišu dovoljno polimorfnih PCR produkata koji bi u narednim istraživanjima omogućili procenu DNK polimorfizma kako između ispitivanih sorti, tako i unutar njih.

Materijal i metod rada

Kao materijal u istraživanju odabrano je pet sorti tetraploidne lucerke različitog geografskog

Tabela 1. Rezultati ispitivanja prajmera X kita

Table 1. Results of X kit primer testing

Prajmer Primer	Sorta Variety				
	1. Banat	2. Ghareh	3. Zuzana	4. Pecy	5. RSI 20
X 01	0	0	0	0	0
X 02	0	0	0	0	0
X 03	+	+	+	0	0
X 04	0	0	0	0	0
X 05	+	+	+	0	0
X 06	+	0	0	0	0
X 07	+	+	+	+	+
X 08	+	+	+	+	+
X 09	+	+	+	+	+
X 10	+	+	+/-	+/-	+/-
X 11	+	+	+	+/-	+
X 12	+	+	+	+	+
X 13	0	0	0	0	0
X 14	+	+	+	+	+/-
X 15	+	+	+	+	+
X 16	+	+	+	+/-	+
X 17	+	+	+	+	+
X 18	0	0	0	0	0
X 19	0	0	0	0	0
X 20	0	0	0	0	0

(+) polimorfne trake, (+/-) neujednačeni produkti reakcije, (0) nema produkata reakcije

porekla: 1) NS Banat ZMS II iz Srbije, 2) Ghareh Yon Geh iz Irana, 3) RSI 20 iz Španije, 4) Pecu iz Francuske i 5) Zuzana iz Češke. Sve sorte su se značajno razlikovale u prinosu i komponentama prinosa (Milić 2007). Kod svake sorte su uzorci uzeti sa deset odabranih biljaka iz kojih je kasnije izolovana DNK. Za početnu fazu ispitivanja, predstavljenu u ovom radu, ispitivana su po četiri nasumično odabrana uzorka od svake sorte.

DNK je izolovana iz listova lucerke, prema metodu Somma (2004), dok je za analizu DNK polimorfizma ispitano 40 RAPD prajmera sa 10 nukleotida, iz ROTH® GmbH kitova X i Y. Lančana reakcija polimeraze se odvijala u zapremini od 25 µl koja je sadržavala: 2,5 µl pufera (Fermentas), 0,2 mM dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 µM prajmera, 2 jedinice *Taq* polimeraze (Fermentas) i 40 ng DNK. Za amplifikaciju produkata reakcije korišćen je Biometra Tpersonal PCR aparat, dok

se amplifikacija odvijala po sledećem programu: početna denaturacija na 94°C u trajanju od 4 min, zatim 40 ciklusa sa 94°C 2 min, 36°C 1 min i 72°C 2 min, sa krajnjom elongacijom od 10 min na 72°C. Produkti reakcije su analizirani na 1,7% agaroznom gelu sa 0,005% etidijum bromida, pod UV svetlom.

Rezultati i diskusija

Mogućnost detekcije polimorfizma sorti lucerke je ispitivana pomoću slučajno odabranih RAPD prajmera. Ispitivanjem prajmera iz kita X (Tab. 1) ustanovljeno je da se u reakcijama sa sedam prajmera (X01, X02, X03, X13, X18, X19 i X20) nisu mogli dobiti produkti reakcije ni kod jedne sorte. U reakcijama sa šest prajmera (X07, X08, X09, X12, X15 i X17) dobijeni su jasno vidljivi produkti amplifikacije koji su bili polimorfni

Tabela 2. Rezultati ispitivanja prajmera Y kita
Table 2. Results of Y kit primer testing

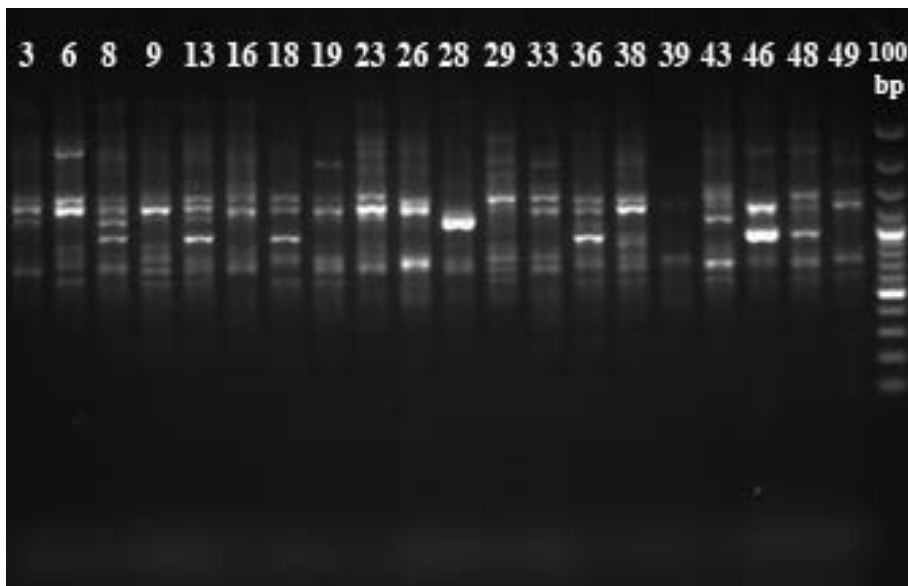
Prajmer Primer	Sorta Variety				
	1. Banat	2. Ghareh	3. Zuzana	4. Pecu	5. RSI 20
Y01	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Y02	+	+	+	+	+
Y03	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Y04	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Y05	+	+/-	+	+	+
Y06	+	+	+	+	+
Y07	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Y08	+/-	+/-	-	+/-	-
Y09	+	+	+	+	+/-
Y10	+	+	+	+	+
Y11	+	+	+	+	+
Y12	0	0	0	0	0
Y13	+	+	+	+	+
Y14	0	0	0	0	0
Y15	+	+	+	+	+
Y16	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Y17	-	+/-	+/-	+/-	+/-
Y18	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Y19	+	+	+	+/-	+
Y20	0	0	0	0	0

(+) polimorfne trake, (+/-) neujednačeni produkti reakcije, (-) uniformni produkti reakcije, (0) nema produkata reakcije

na uzorcima svih ispitivanih sorti, dok se pomoću preostalih sedam prajmera iz kita (X03, X05, X06, X10, X11, X14 i X16) vidljiv polimorfizam mogao detektovati samo kod pojedinih sorti ili njihovih pojedinačnih uzoraka. Od ispitivanih

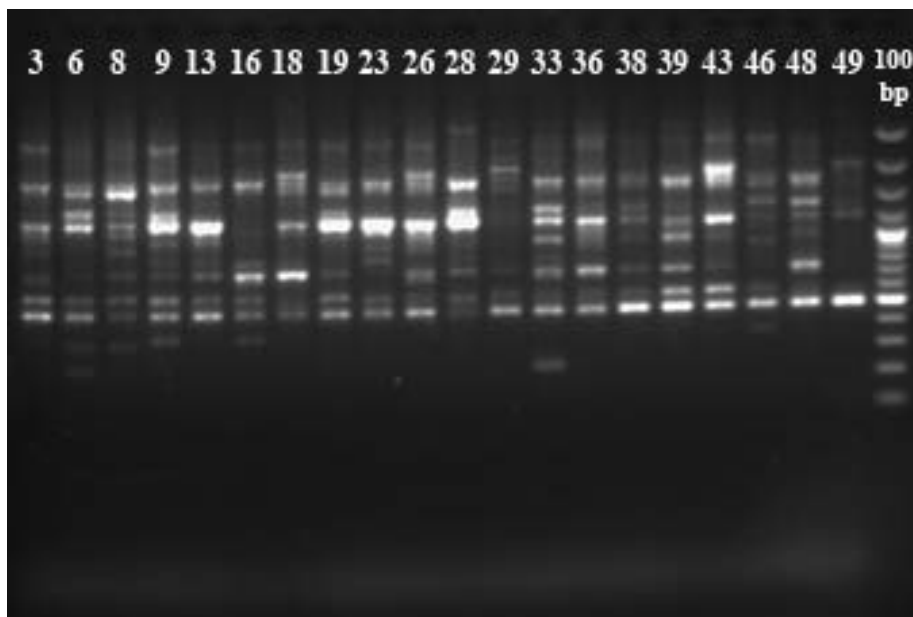
sorti, najveći broj polimorfni prajmera detektovan je kod sorte Banat (13), dok ih je najmanje imala sorta Peci (7).

Ispitivanjem mogućnosti detekcije polimorfizma RAPD prajmera iz Y kita (Tab. 2)



Slika 1. Produkti amplifikacije prajmera Y10 kod sorti lucerke: Banat (3,6,8,9), Ghareh (13,16,18,19), Zuzana (23,26,28,29), Peci (33,36,38,39), RSI 20 (43,46,48,49), GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (100 bp)

Figure 1. Amplification products of primer Y10 in alfalfa varieties: Banat (3,6,8,9), Ghareh (13,16,18,19), Zuzana (23,26,28,29), Peci (33,36,38,39), RSI 20 (43,46,48,49), GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (100 bp)



Slika 2. Produkti amplifikacije prajmera Y13 kod sorti lucerke: Banat (3,6,8,9), Ghareh (13,16,18,19), Zuzana (23,26,28,29), Peci (33,36,38,39), RSI 20 (43,46,48,49), GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (100 bp)

Figure 2. Amplification products of primer Y13 in alfalfa varieties: Banat (3,6,8,9), Ghareh (13,16,18,19), Zuzana (23,26,28,29), Peci (33,36,38,39), RSI 20 (43,46,48,49), GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (100 bp)

ustanovljeno je da u reakcijama sa tri prajmera (Y12, Y14 i Y20) nije bilo moguće dobiti produkte reakcije, dok je sa jedanaest prajmera (Y01, Y03, Y04, Y05, Y07, Y08, Y09, Y16, Y17, Y18 i Y19) bilo moguće dobiti polimorfne trake samo kod pojedinih sorti ili njihovih pojedinačnih uzoraka. Polimorfni produkti reakcije kod svih ispitivanih sorti su dobijeni u reakcijama sa šest prajmera (Y02, Y06, Y10, Y11, Y13 i Y15) (Sl. 1 i 2). Polimorfizam svih uzoraka sorti Banat i Zuzana je ustanovljen kod reakcija sa devet prajmera, dok se kod uzoraka sorti Ghareh, Peczy i RSI 20 polimorfizam mogao detektovati nakon reakcija sa osam prajmera. U reakciji uzoraka sorte Banat sa prajmerom Y08, kao i uzoraka sorte Zuzana i RSI 20 sa prajmerom Y17, dobijeni su uniformni produkti reakcije.

Od 40 ispitivanih prajmera, stabilna i ponovljiva manifestacija DNK polimorfizma kod svih uzoraka ispitivanih sorti se mogla uočiti nakon reakcija sa njih trinaest. Reakcije sa 18 prajmera su kao rezultat imale produkte koji su se mogli detektovati samo kod uzoraka pojedinih sorti, pojedinačnih uzoraka ili su bili nezadovoljavajuće jasnoće i ponovljivosti. Reakcije sa devet prajmera nisu dale nikakav produkt. Iako će za definitivne zaključke o stepenu polimorfizma unutar i između sorti, kao i veličini i broju dobijenih fragmenata biti potrebni podaci analize svih uzoraka odabranih sorti, dobijeni preliminarni rezultati amplifikacije pokazuju da veličina i broj produkata reakcije može značajno varirati, kao i da postoji verovatnoća da je stepen DNK polimorfizma unutar i između sorti veoma visok. Postojanje polimorfizma unutar sorti ili ekotipova lucerke je do sada u nekoliko navrata navedeno u literaturi (Gherardi et al. 1998, Tucak et al. 2008) što je posledica kako njenog načina selekcije tako i njene tetraploidne prirode (Mengoni et al. 2000, Noeparvar et al. 2008).

Zaključak

Činjenica da je od nasumično odabranih RAPD prajmera samo deo njih dao stabilne i polimorfne produkte reakcije, pokazuje da je sprovođenje ovakve vrste preliminarnih istraživanja veoma korisno, a prethodilo bi bilo kakvom razvoju opsežnog programa primene RAPD markera u oplemenjivanju lucerke. Mogućnosti izdvajanja polimorfni prajmera omogućava njihovu kasniju bržu i efikasniju primenu u različitim programima marker asistiranu selekcije.

RAPD markeri mogu biti veoma korisni u ispitivanjima DNK polimorfizma lucerke, što je

rezultat njihove sposobnosti da detektuju varijabilnost u različitim delovima genoma. Iako se, usled slabe ponovljivosti i dominantne prirode, ne mogu koristiti za pouzdanu identifikaciju genotipova, mogu biti veoma korisni u ispitivanju genetske srodnosti i udaljenosti populacija i ekotipova, naročito u kombinaciji sa kodominantnim tipovima markera, kao što su mikrosateliti.

Literatura

- Botstein D, White R L, Skolnick M, Davis R W (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-332
- Brummer E C, Kochert G, Bouton J H (1991): RFLP variation in diploid and tetraploid alfalfa. *Theor. Appl. Genet.* 83: 89-96
- Brummer E C, Bouton J H, Kochert G (1995): Analysis of annual *Medicago* species using RAPD markers. *Genome* 38: 362-367
- Diwan N, Bouton J H, Kochert G, Cregan P (2000): Mapping of simple sequence repeat (SSR) DNA markers in diploid and tetraploid alfalfa. *Theor. Appl. Genet.* 101: 165-172
- Gherardi M, Mangin B, Goffinet B, Bonnet D, Huguot T (1998): A method to measure genetic distance between allogamous populations of alfalfa (*Medicago sativa*) using RAPD molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 96: 406-412
- Echt C S, Erdahl L A, McCoy T J (1991): Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa. *Genome* 35: 84-87
- Echt C S, Kidwell K K, Knapp S J, Osborn T C, McCoy T J (1993): Linkage mapping in diploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Genome* 37: 61-71
- Jenczewski E, Prosperi J M, Ronfort J (1999): Evidence for gene flow between wild and cultivated *Medicago sativa* (Leguminosae) based on allozyme markers and quantitative traits. *Am. J. Bot.* 86: 677-687
- Katić S, Mihailović V, Milić D, Vasiljević S, Karagić Đ (2007): Uticaj učestalosti košenja na prinos i trajnost polusrodnih porodica lucerke. *Zbornik radova Instituta za ratarstvo i povrtarstvo* 44: 21-27
- Kidwell K K, Austin D F, Osborn T C (1994): RFLP evaluation of nine *Medicago* populations representing the original germplasm sources for north American alfalfa cultivars. *Crop Sci.* 34: 230-236
- McCoy T J, Echt C S (1993): Potential of trispecies bridge crosses and random amplified polymorphic DNA markers for introgression of *Medicago daghestanica* and *M. pironae* germplasm into alfalfa (*M. sativa*). *Genome* 36: 594-601
- Mengoni A, Gori A, Bazzicalupo M (2000): Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa*. *Plant Breed.* 119: 311-317
- Milić D (2007): Varijabilnost kvantitativnih osobina genetički divergentnih genotipova lucerke (*Medicago sativa* L.). Magistrska teza, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad
- Noeparvar S, Valizadeh M, Monirfar H, Haghighi A R, Darbani B (2008): Genetic diversity among and within alfalfa populations native to Azerbaijan based on RAPD analysis. *J. Biol. Res. – Thessaloniki* 10: 159-169
- Pupilli F, Businelli S, Paolucci F, Scotti C, Damiani F, Arcioni S (1996): Extent of RFLP variability in tetraploid populations of alfalfa, *Medicago sativa*. *Plant Breed.* 115: 106-112
- Quiros C F (1983) Alfalfa (*Medicago sativa* L.). In: Tanksley SD,

- Orton TJ (eds), Isozymes in plant genetics and breeding. Part B. Elsevier Scientific Publ. Co., Amsterdam, 253-294
- Riday H, Brummer E C, Campbell A, Luth D, Cazcarro P. (2003): Comparisons of genetic and morphological distance with heterosis between *Medicago sativa* subsp. *sativa* and subsp. *falcata*. Euphytica 131: 37-45
- Sledge M, Ray I, Jiang G (2005): An expressed sequence tag SSR map of tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 111: 980-992
- Somma M (2004): Extraction and purification of DNA. In: Querci M., Jermini M., Van den Eade (eds), The analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms (special publication 1.03.114, edition), Ispra: European Commission, Joint Research Centre
- Tucak M, Popović S, Čupić T, Grljučić S, Bolarić S, Kozumplik V (2008): Genetic diversity of alfalfa (*Medicago* spp.) estimated by molecular markers and morphological characters. Periodicum Biologorum 110: 243-249
- Welsh J, McClelland M (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl. Acids Res. 18: 7213-7218
- Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V (1990): DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18: 6531-6535
- Yu P, Pauls K P (1993): Segregation of random amplified polymorphic DNA markers and strategies for molecular mapping in tetraploid alfalfa. Genome 36: 844-851

Research on the Possibility of RAPD Markers Application in Detecting DNA Polymorphism of Alfalfa Varieties

Nevena Nagl¹ · Ksenija Taški-Ajduković¹ · Goran Barać² · Dragan Milić¹ · Slobodan Katić¹

¹Institute of Field and Vegetable Crops, Maksima Gorkog 30, 21000 Novi Sad, Serbia

²University of Novi Sad, Faculty of Sciences, Department for Biology and Ecology, 21000 Novi Sad, Serbia

Summary: Although alfalfa is the most important forage crop grown in the temperate regions, breeding improvements are not easily achieved due to high genetic complexity of this species. Because of allogamy and tetraploidy, cultivated alfalfa synthetic varieties have a high degree of genetic diversity among individual plants in populations. The knowledge of the extent of genomic variability in cultivars bearing desirable agronomic traits is an area that could benefit from molecular genetic analyses. Therefore, the aim of the present work was to evaluate the ability of RAPD markers to detect intra-population variation in five alfalfa varieties. Presented here are the first results of investigating 40 randomly selected RAPD primers in order to establish whether they were able to synthesize PCR products, which would enable detection of polymorphism between the selected varieties and inside them as well.

Key words: DNA polymorphism, *Medicago sativa*, PCR, RAPD