

Anna Fürguth, Iwona Bartkowiak-Broda, Marcin Matuszczak  
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Zakład Roślin Oleistych w Poznaniu

## Ocena dystansu genetycznego pomiędzy liniami GMS Janpol za pomocą markerów molekularnych PCR-RAPD

### Evaluation of genetic distance among GMS Janpol lines using PCR-RAPD markers

Słowa kluczowe: rzepak ozimy, dystans genetyczny, heterozja, markery molekularne, PCR-RAPD

Key words: winter rapeseed, *Brassica napus L.*, genetic distance, heterosis, molecular markers, PCR-RAPD

Podjęto badania nad oceną dystansu genetycznego linii GMS Janpol na podstawie polimorfizmu DNA. Materiałem do badań było 10 linii GMS Janpol, będących komponentami pięciu wysoko i pięciu nisko plonujących doświadczalnych odmian syntetycznych rzepaku ozimego. Analizy polimorfizmu DNA ocenianych linii dokonano przy pomocy metody PCR-RAPD z zastosowaniem 14 starterów firmy Operon Technologies. Uzyskano 86 różnicujących prążków – markerów, na podstawie których utworzono dendrogram wykazujący relacje pokrewieństwa między badanymi liniami. Potwierdzono zgodność otrzymanych wyników z genealogią tych linii. Zgodność tę potwierdziły również wyliczone wartości dystansu genetycznego. Badania będą kontynuowane w celu określenia zależności pomiędzy dystansem genetycznym a efektem heterozji.

The investigations were undertaken with the aim to evaluate the genetic distance among GMS Janpol lines on the basis of DNA polymorphism. The material for the study consisted of 10 GMS Janpol lines, components of 5 high- and 5 low yielding experimental synthetic varieties of winter rapeseed. DNA polymorphism was evaluated by PCR-RAPD method with the use of 14 primers from Operon Technologies. 86 differentiating markers were formed. They were used for development of dendrogram which showed relationships among investigated lines. This dendrogram and values of genetic distance were in concordance with the pedigree of GMS Janpol lines. The investigations will be continued with the aim to evaluate the relations between genetic distance and heterosis.

## Wstęp

Zjawisko heterozji, czyli wigoru mieszańców jest fenotypowym wynikiem współdziałania genów, określanym jako efekt heterozygoty mieszańców pokolenia F<sub>1</sub>. Według hipotezy dominacji przytoczonej przez Ruebenbauera, wiele genów

uzupełnia się jakościowo dając w stanie heterozygotycznym wzrost wydajności warunkowany przez allele dominujące (Ruebenbauer, Müller 1985). Jest on tym większy, im więcej homozygotycznych alleli uzupełni się u obu form rodzicielskich tworzących pokolenie mieszańcowe. Stąd teoretycznie największego efektu heterozji można oczekiwać przy dużym zróżnicowaniu alleli poszczególnych genów u roślin rodzicielskich. Zróżnicowanie takie występuje wówczas, gdy krzyżowane genotypy są mniej ze sobą spokrewnione, większe jest ich oddalenie genetyczne, czyli — dystans genetyczny. Zatem potomstwo genotypów o dużym dystansie genetycznym powinno wykazywać znaczący efekt heterozji.

Znajomość dystansu genetycznego może być przydatna również przy tworzeniu populacji wyjściowej w procesie hodowlanym, pozwalając dokonać wyboru odpowiednich genotypów charakteryzujących się zmiennością genetyczną pod względem pożądanych cech. W ten sposób wiedza o dystansie genetycznym umożliwia zgromadzenie zróżnicowanego genetycznie materiału wyjściowego, co jest warunkiem postępu w hodowli (Lefort-Buson i in. 1988).

Badania nad związkiem pomiędzy wielkością efektu heterozji a dystansem genetycznym prowadzone są na świecie już od kilkudziesięciu lat, jednak do tej pory w literaturze spotyka się wiele kontrowersyjnych wyników na ten temat.

Oceny dystansu genetycznego można dokonać dwoma drogami:

- 1) przez przewidywanie — *a priori*,
- 2) na podstawie obserwacji i badań — *a posteriori*.

Pierwsze z metod wykorzystują znajomość danych, takich jak genealogia danego obiektu, informacja o pochodzeniu geograficznym. Druga grupa metod opiera się na analizach matematyczno-statystycznych danych uzyskanych z obserwacji cech fenotypowych oraz wyników badań molekularnych (Lefort-Buson, de Vienne 1985).

Analiza polimorfizmu DNA przy zastosowaniu technik molekularnych pozwala na niezależną od wpływu środowiska ocenę istniejącej zmienności genetycznej. Ponadto można dokonać jej w znacznie krótszym czasie niż przy pomocy metod tradycyjnych, co znacznie przyspiesza etapy hodowli. Pierwsze markery molekularne wykorzystane do badania zmienności otrzymano już ponad 30 lat temu, stosując elektroforezę izoenzymatyczną. Technika ta pozwala na wykrycie zmienności DNA na poziomie białek, jest jednak ograniczona do niewielkiej ilości wybranych locus (Lefort-Buson i in. 1988). Opracowanie metody PCR (ang.: *polymerase chain reaction*), czyli łańcuchowej reakcji enzymu polimerazy, umożliwiło rozwój wielu metod pozwalających na analizę większej części genomu. Jedną z nich jest reakcja RAPD (ang.: *random amplified polymorphic DNA*) (Welsh, McClelland 1990; Williams i in. 1990), gdzie poprzez zastosowanie wybranych 10-nukleotydowych starterów następuje powielanie fragmentów genomowego DNA o przypadkowej sekwencji. Każdy ze starterów daje charakterystyczny dla danego genotypu obraz polimorficznych prążków — markerów molekularnych. Na ich podstawie dokonuje się obliczeń dystansu genetycznego.

Technikę PCR-RAPD zastosowano również w Pracowni Heterozji Zakładu Roślin Oleistych w badaniach nad liniami GMS Janpol, źródłem genetycznej męskiej sterylności, w celu wyselekcjonowania komponentów do tworzenia odmian syntetycznych opartych na tym systemie i częściowo wykorzystujących efekt heterozji. Poszukiwane są optymalne komponenty o dużym dystansie genetycznym.

## Material i metodyka

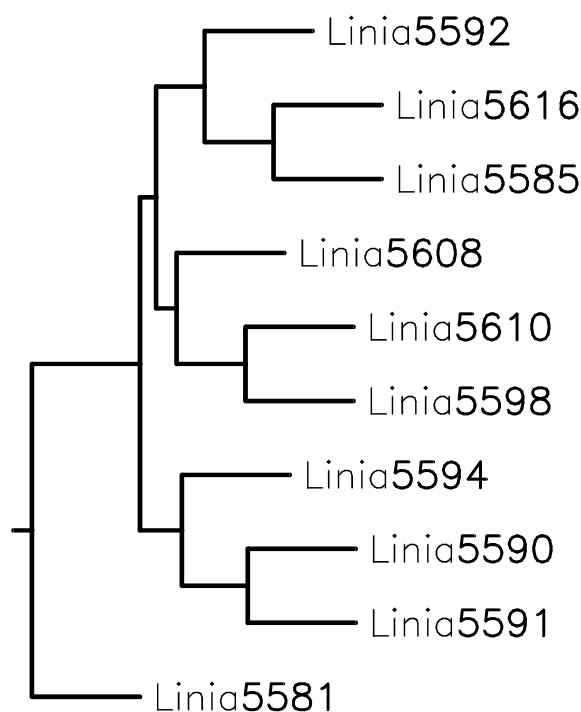
---

Badaniom poddano 10 linii GMS Janpol pochodzących ze zbioru w 1995 roku o następujących numerach polowych: 5581, 5585, 5590, 5591, 5592, 5594, 5598, 5608, 5610, 5616. Kryterium wyboru była ocena plonu doświadczalnych odmian syntetycznych rzepaku ozimego pokolenia S<sub>1</sub>, utworzonych w oparciu o genetyczną męską sterylność GMS Janpol. Wybrano linie będące komponentami pięciu wysoko i pięciu nisko plonujących takich odmian.

Izolację całkowitego DNA dla każdej linii wykonano z kilkunastu siewek (10–12 z jednej linii), według zmodyfikowanej metody Doyle i Doyle (1990). Zamrażane ciekłym azotem i roztarte na proszek w porcelanowych moździerzach siewki zalewano ogrzanym do temperatury 65°C buforem ekstrakcyjnym 2 × CTAB [2% (w/v) CTAB (ang.: *cetyltrimethylammonium bromide*); 100 mM Tris-HCl (ang.: *tris(Hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride*) (pH 8,0); 20 mM EDTA (ang.: *ethylenediaminetetraacetic acid*); 1,4 M NaCl; 1% (w/v) PVP (ang.: *polyvinylpyrrolidone*); 1% (v/v) β-merkaptoetanol]. Po inkubacji w 65°C przez 30 minut, do każdej z prób dodawano jedną objętość mieszaniny chloroform – oktanol 24:1 (v/v), a następnie wirowano przez 10 minut przy 12000 × g. Pobierano fazę wodną i wytrącano DNA dodając 2/3 objętości izopropanolu. W celu usunięcia kwasów rybonukleinowych próby traktowano RNA-zą A o stężeniu 40 µg/ml, przez 1 godzinę w temperaturze 37°C. Po ponownym wytrąceniu i oczyszczeniu osad DNA rozpuszczano w buforze TE i przechowywano w temperaturze 4°C. Jakość i stężenie preparatów sprawdzano za pomocą elektroforezy w 0,8% żelu agarozowym, w buforze 1 × TBE.

Otrzymane próby DNA poddano analizie polimorfizmu metodą PCR-RAPD. Zastosowano 14 starterów firmy Operon: OP C02, OP G05, OP L12, OP N01, OP P07, OP W01, OP W02, OP W04, OP W05, OP W06, OP W07, OP Y04, OP Y13, OP Y15. Amplifikację DNA przeprowadzono w termocyklerze UNO II firmy Biometra zachowując następujące warunki reakcji: denaturacja wstępna w 95°C przez 30 sekund, a następnie 45 cykli obejmujących denaturację w 95°C przez 30 sekund, hybrydyzację w 35°C przez 1 minutę, polimeryzację w 72°C przez 2 minuty 30 sekund, końcowa polimeryzacja w 72°C przez 5 minut. Produkty reakcji analizowano przy pomocy elektroforezy w 1,8% żelu agarozowym w buforze TBE, przy natężeniu prądu 80 mA, wybarwiano w bromku etydyny i obserwowano w świetle UV. Jako wzór wielkości fragmentów zastosowano DNA faga Lambda trawione enzymami *Hind* III i *Eco* RI (MBI Fermentas).

Na podstawie uzyskanych polimorficznych prążków – markerów, określono relacje pokrewieństwa między badanymi liniami oraz odległości genetyczne pomiędzy nimi, wykorzystując pakiet programów PHYLIP 3.5 (Felsenstein 1993). Dane wyjściowe zapisywano w systemie zero–jedynekowym, gdzie 1 oznaczało występowanie prążka dla danej linii, a 0 — jego brak. Wartości dystansu genetycznego obliczono przy pomocy programu GENDIST według wzoru opracowanego przez Nei (1972). Kontynuując obliczenia w programie NEIGHBOR na podstawie uzyskanych danych o dystansach genetycznych utworzono drzewa pokrewieństwa stosując metodę UPGMA (ang.: *uweighted pair group arithmetic average clustering*). Wyniki pochodzące ze 100 różnych zestawów danych (Margush i McMorris 1981) zostały następnie przekształcone w jedno wspólne drzewo pokrewieństwa dzięki programowi CONSENSE. Jego obraz graficzny w postaci dendrogramu (rys. 1) otrzymano stosując program DRAWGRAM. Wszystkie wymienione programy wchodzą w skład wspomnianego pakietu programów PHYLIP 3.5.



Rys. 1. Dendrogram określający relacje pokrewieństwa między badanymi liniami GMS Janpol, uzyskany przy pomocy pakietu programów PHYLIP, na podstawie markerów typu RAPD — *Dendrogram of relationships among investigated GMS Janpol lines, obtained with the PHYLIP program package, on the basis of RAPD markers*

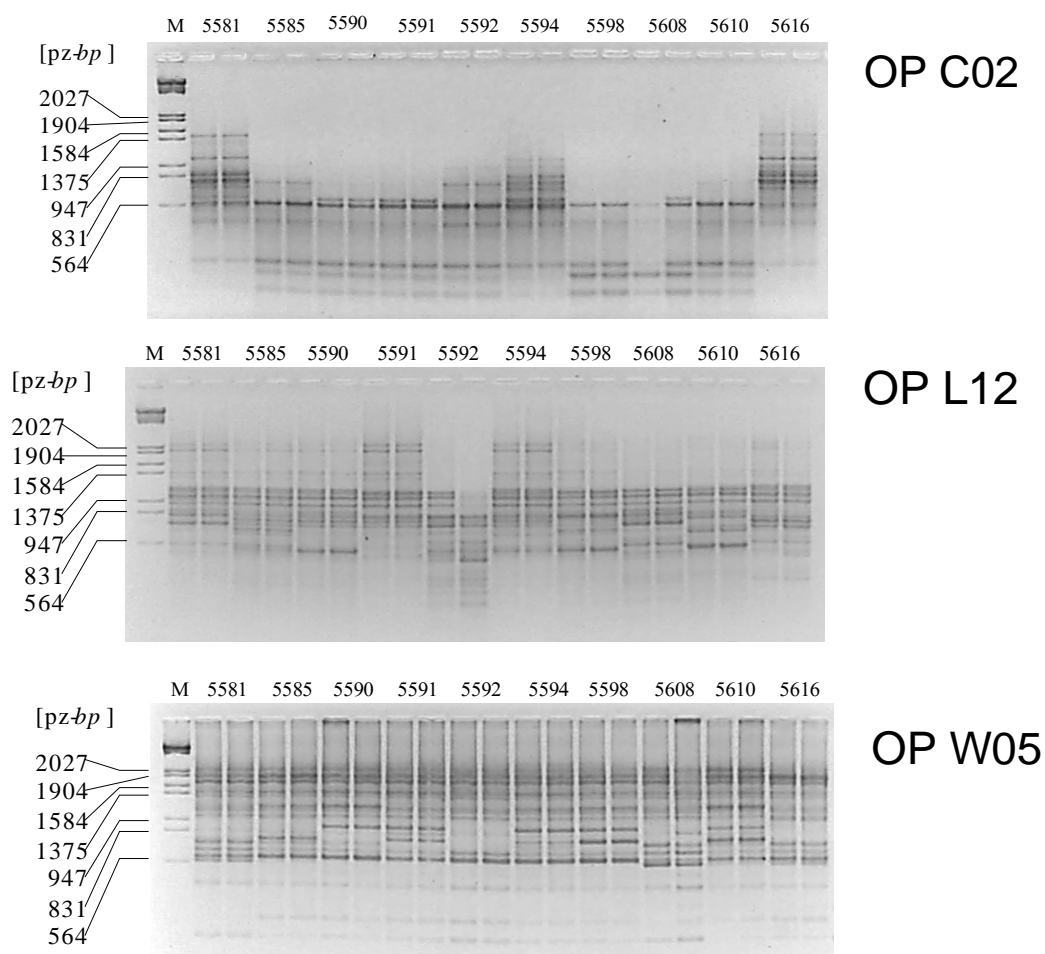
## Wyniki i dyskusja

W przeprowadzonych reakcjach PCR-RAPD, po odrzuceniu mniej wyraźnych prążków ostatecznie uzyskano 86 markerów różnicujących DNA badanych linii. Spośród zastosowanych czternastu starterów najbardziej różnicujące okazały się OP C02, OP L12, OP N01, OP W05 i OP Y15 (fot. 1). Biorąc pod uwagę wszystkie użyte startery i otrzymane markery, średnio na jeden starter przypada 6 uzyskanych polimorficznych prążków. Największą ilość (11) otrzymano w reakcji ze starterem OP L12.

Wartości dystansu genetycznego obliczone dla wszystkich par badanych linii wynosiły od 0,3112 do 1,0871, (tab. 1). Wyliczone wartości dystansu genetycznego, jak również otrzymany w wyniku końcowym dendrogram (rys. 1), określający relacje pokrewieństwa pomiędzy ocenianymi liniami, okazały się zgodne z ich genealogią. Genealogię linii zbadano analizując dane z ośmiu poprzedzających lat. Jako przykład zamieszczono dwa wykresy przedstawiające pochodzenie linii o małej i większej wartości dystansu genetycznego (rys. 2 i 3). Linie o małej odległości genetycznej są blisko spokrewnione i mają wspólnych przodków. Natomiast u linii o większej wartości dystansu genetycznego, bardziej oddalonych genetycznie nie znaleziono wspólnego pochodzenia.

Otrzymane wyniki stanowią wstępny etap badań nad określeniem dystansu genetycznego. Zastosowano na razie zbyt małą liczbę starterów, aby uzyskać wystarczającą ilość markerów do oceny. Dotychczas potwierdzono jedynie zgodność genealogii linii z otrzymanymi dla nich wartościami dystansu genetycznego, określonymi na podstawie markerów PCR-RAPD. Należałoby również zbadać związek pomiędzy tymi wartościami a efektem heterozji, aby stwierdzić przydatność oceny dystansu genetycznego w hodowli mieszańcowej rzepaku. Światowe badania dotyczące poszukiwania tych relacji są często bardzo kontrowersyjne w ocenie.

W pracach wykorzystujących markery RFLP do oceny dystansu genetycznego u owsa (Moser, Lee 1994) i rzepaku (Diers i in. 1996) nie stwierdzono użyteczności tego miernika do przewidywania efektu heterozji. W drugiej z cytowanych prac zaobserwowano wyraźną korelację dystansu genetycznego jedynie z wysokością roślin u mieszańców, cechą której heterozja była spowodowana efektem dominacji. Według autorów jednym z najważniejszych powodów słabej korelacji dystansu genetycznego i pożądanej cechy był brak sprzężenia pomiędzy genami warunkującymi daną cechę a większością markerów wykorzystanych do oceny dystansu genetycznego. Konieczne jest sprzężenie loci markerów z QTL (ang.: *quantitative trait loci*) czyli loci genów warunkujących cechy ilościowe. Dystans genetyczny obliczony na podstawie takich markerów mógłby dopiero być wskaźnikiem do przewidywania pozytywnego efektu heterozji (Moser, Lee 1994).



Fot. 1 Elektroforetyczny rozdział na 1,8% żelu agarozowym produktów reakcji PCR-RAPD z zastosowaniem starterów OP C02, OP L12, OP W05 obrazujący polimorfizm DNA linii GMS Janpol. Na górze fotografii – numery badanych linii.

M – standard wielkości fragmentów – DNA faga lambda hydrolizowany enzymami restrykcyjnymi Eco RI i Hind III (w parach zasad – pz).

1,8% agarose gel electrophoresis of PCR-RAPD products obtained using OP C02, OP L12, OP W05 primers, representing DNA polymorphism of GMS Janpol lines. Numbers of studied lines above the photos.

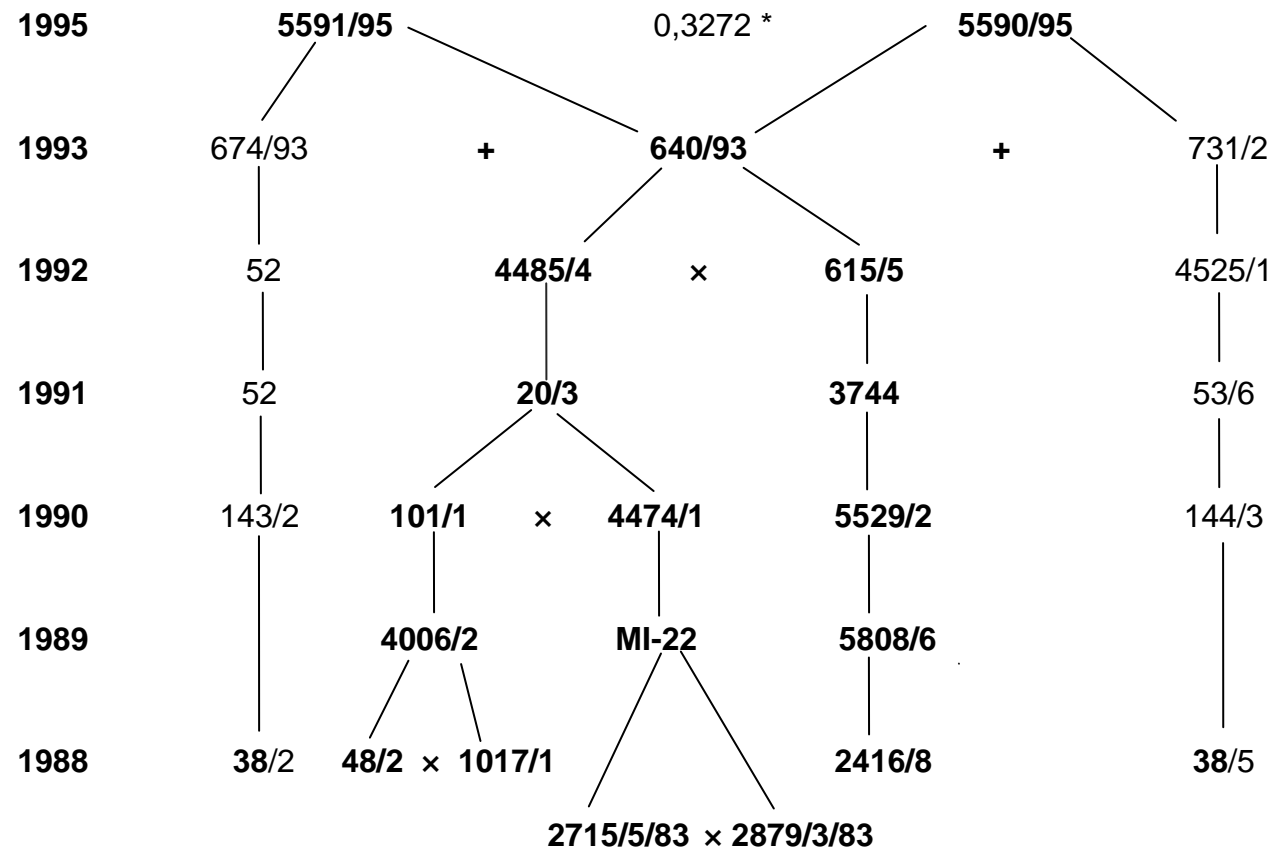
M – molecular size marker – phage lambda DNA digested with endonuclease Eco RI and Hind II (in base pairs – bp).

Tabela 1

Dystans genetyczny dla każdej z par badanych linii GMS Janpol uzyskany przy pomocy programu Gendist z pakietu PHYLIP  
*Genetic distance of each investigated pair of GMS Janpol lines, obtained with the use of GENDIST program from PHYLIP package*

Linie:	5581	5585	5590	5591	5592	5594	5598	5608	5610	5616
5581		<b>0,8708</b>	0,7655	0,7167	0,7167	0,6042	<b>1,0871*</b>	0,6257	<b>0,9280</b>	0,5831
5585	<b>0,8708</b>		0,5831	0,6702	0,4654	0,7908	0,4113	0,7655	0,3939	<b>0,3600</b>
5590	0,7655	0,5831		<b>0,3272</b>	0,5831	0,4841	0,4113	0,4654	0,3939	0,6702
5591	0,7167	0,6702	<b>0,3272</b>		0,5423	0,4113	0,4841	0,6257	0,4290	0,8168
5592	0,7167	0,4654	0,5831	0,5423		0,5625	0,5225	0,5423	0,6257	0,4290
5594	0,6042	0,7908	0,4841	0,4113	0,5625		0,8168	<b>1,0871*</b>	0,7908	0,6931
5598	<b>1,0871</b>	0,4113	0,4113	0,4841	0,5225	0,8168		0,4113	<b>0,3112*</b>	0,6042
5608	0,6257	0,7655	0,4654	0,6257	0,5423	<b>1,0871*</b>	0,4113		0,5031	0,7167
5610	<b>0,9280</b>	0,3939	0,3939	0,4290	0,6257	0,7908	<b>0,3112*</b>	0,5031		0,5831
5616	0,5831	<b>0,3600</b>	0,6702	0,8168	0,4290	0,6931	0,6042	0,7167	0,5831	

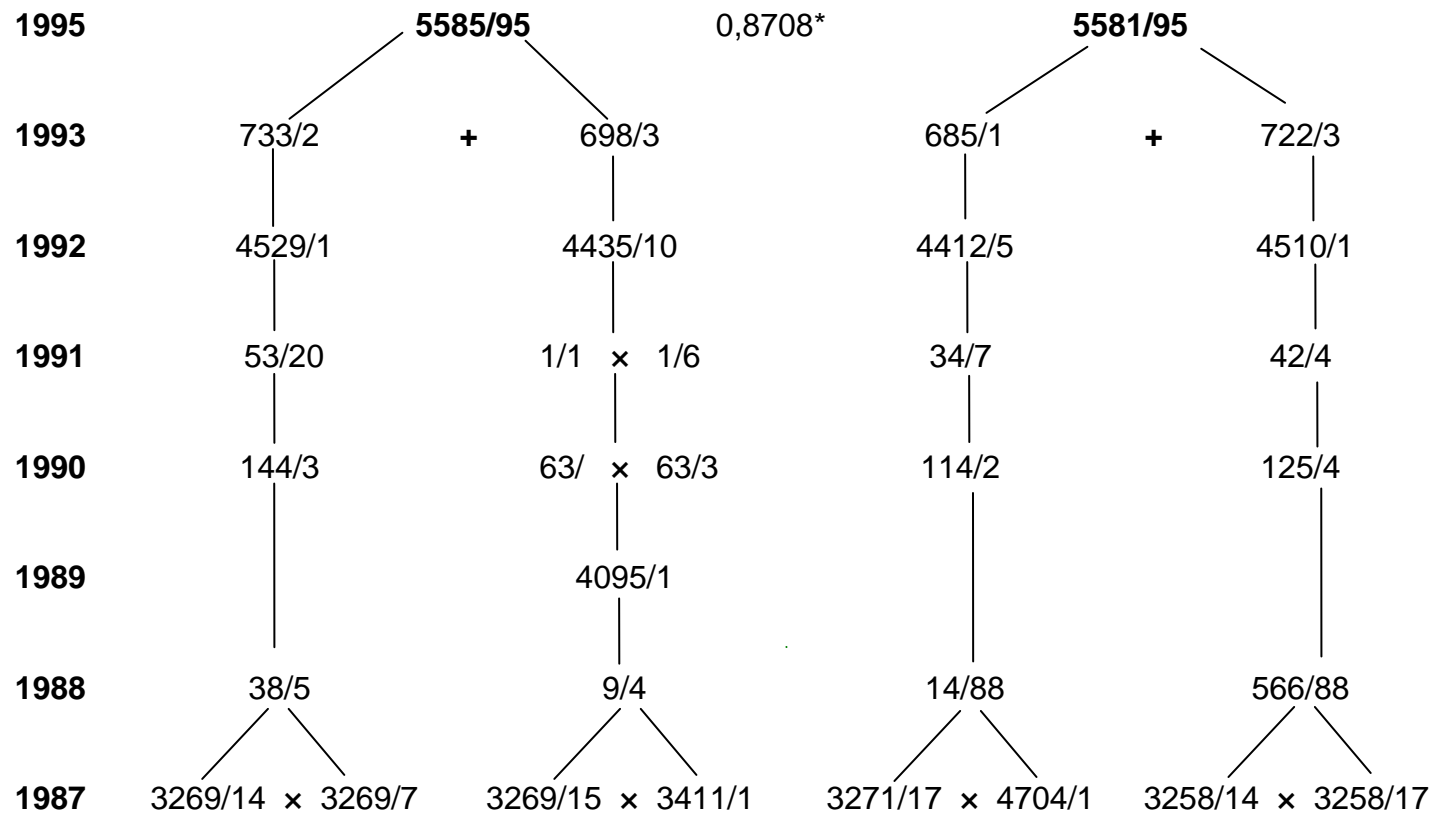
Dystans wyliczony metodą Nei. Tłustym drukiem wyróżniono najwyższe i najniższe wartości, \* oznaczono wartości skrajne  
*Genetic distance counted using Nei's method. The highest and the lowest values are marked with a bold type, extreme values are marked with the sign \*.*



\* — wartość dystansu genetycznego dla badanych linii, po lewej stronie rok zbioru — wspólne rodowody oraz numery badanych linii zaznaczono tłustym drukiem  
*the genetic distance value of studied lines, the year of a harvest on the left — the common pedigree and numbers of studied lines are marked with a bold type*

Rys. 2. Pochodzenie linii GMS Janpol o małym dystansie genetycznym — *Parentage of GMS Janpol lines with small genetic distance*





\* — wartość dystansu genetycznego między badanymi liniami, po lewej stronie rok zbioru — *the genetic distance value between studied lines, the year of a harvest on the left*

Rys. 3. Pochodzenie linii GMS Janpol o dużym dystansie genetycznym — brak wspólnych przodków — *Parentage of GMS Janpol lines with a big genetic distance – lack of common pedigree*

Podobne wnioski można znaleźć w innej pracy dotyczącej badań nad oceną dystansu genetycznego u sześciu populacji soi (Helms i in. 1997), gdzie ocenę przeprowadzono z wykorzystaniem markerów RAPD. Analiza polimorfizmu DNA tą metodą jest wprawdzie szybsza i mniej pracochłonna niż przy zastosowaniu metody RFLP, jednakże zastosowanie starterów o przypadkowej sekwencji powoduje powielanie fragmentów DNA również z neutralnej, nie kodującej części genomu, co jest przyczyną małej współzależności między ocenianym dystansem genetycznym a przewidywanym efektem heterozji (Rafalski i in. 1998; Helms i in. 1997). Poza koniecznością selekcji markerów związanych z cechami ilościowymi proponuje się również użycie specyficznych starterów w reakcjach PCR (Rafalski i in. 1998).

Pomimo wspomnianych trudności z wykorzystaniem markerów RAPD do oceny dystansu genetycznego i jego zastosowaniem w hodowli mieszańców, w literaturze można znaleźć również pozytywne wyniki. Rezultaty takie osiągnięto w badaniach nad liniami wsobnymi kukurydzy (Lanza i in. 1997), jak też formami rodzicielskimi gorczycy sarepskiej (Jain i in. 1994). W obu przypadkach na podstawie markerów uzyskanych metodą PCR-RAPD dokonano podziału badanych genotypów na odległe genetycznie grupy, a mieszańce otrzymane w wyniku krzyżowań między nimi wykazywały wysoki stopień heterozji. Nie znaleziono natomiast zależności między dystansem genetycznym a heterozją, jeśli podział na wspomniane grupy nie był brany pod uwagę. Najważniejszym pozytywnym wnioskiem uzyskanym z omawianych badań jest użyteczność analiz RAPD w zakwalifikowaniu genotypów o nieznanym pochodzeniu do znanych heterotycznych grup. Taki podział pozwoliłby zmniejszyć koszty hodowli poprzez eliminację badań mieszańców wewnątrz danej grupy (Jain i in. 1994). Pomocny byłby również przy wyborze najlepszych kombinacji krzyżowań między liniami, redukując liczbę badanych mieszańców w doświadczeniach polowych (Lanza i in. 1997).

Badania nad mieszańcami pokolenia  $F_1$  utworzonymi między genotypami o tym samym i odmiennym pochodzeniu geograficznym, czyli spokrewnionymi i odległymi genetycznie prowadzono już kilkanaście lat temu we Francji (Lefort-Buson i in. 1987). Badano europejskie i azjatyckie linie wsobne rzepaku. Otrzymane wyniki jasno ukazały przewagę w plonowaniu mieszańców  $F_1$  z grupy europejsko-azjatyckiej, w relacji do badanych odmian i linii wsobnych oraz mieszańców utworzonych wewnątrz grup linii europejskich czy azjatyckich. Uzyskano zatem pozytywny efekt heterozji krzyżując genotypy oddalone genetycznie.

Tak więc ocena dystansu genetycznego może być pomocna przy wyborze odpowiednich komponentów rodzicielskich do krzyżowań, jak też przy kwalifikowaniu genotypów do odległych genetycznie grup (jeśli nie znamy pochodzenia badanych obiektów). Zastosowanie markerów molekularnych otrzymanych metodą PCR-RAPD pozwala przyspieszyć dokonanie takiej oceny.

## Literatura

---

- Diers B.W., Mc Vetty P.B.E., Osborn T.C. 1996. Relationship between heterosis and genetic distance based on restriction fragment length polymorphism markers in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Crop Sci.* 36: 79-83.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissues. *Focus* 12: 13-15.
- Felsenstein J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Helms T., Orf J., Vallad G., Mc Clean P. 1997. Genetic variance, coefficient of parentage, and genetic distance of six soybean populations. *Theor. Appl. Genet.* 94: 20-26.
- Jain A., Bhatia S., Banga S.S., Prakash S., Lakshmikumaran M. 1994. Potential use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to study the genetic diversity in Indian mustard (*Brassica juncea*) and its relationship to heterosis. *Theor. Appl. Genet.* 88: 116-122.
- Lanza L.L.B., de Souza Jr. C.L., Ottoboni L.M.M., Vieira M.L.C., de Souza A.P. 1997. Genetic distance of inbred lines and prediction of maize single-cross performance using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 94: 1023-1030.
- Lefort-Buson M., de Vienne D. 1985. Les distances génétiques. Estimations et applications. INRA – Paris.
- Lefort-Buson, Guillot-Lemoine B., Dattee Y. 1987. Heterosis and genetic distance in rapeseed (*Brassica napus* L.): crosses between European and Asiatic selfed lines. *Genome* 29: 413-418.
- Lefort-Buson, Hebert Y., Damerval C. 1988. Les outils d'évaluation de la diversité génétique et phénotypique. *Agronomie* 8 (3): 173-178.
- Margush T., McMorris F.R. 1981. Consensus n-trees. *Bulletin of Mathematical Biology* 43: 239-244.
- Moser H., Lee M. 1994. RFLP variation and genealogical distance, multivariate distance, heterosis, and genetic variance in oats. *Theor. Appl. Genet.* 87: 947-956.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- Rafalski A., Gidzińska M., Wiśniewska I. 1998. Systemy PCR w badaniach pokrewieństwa genetycznego linii kukurydzy. *Biuletyn IHAR – Radzików* 208: 131-140.
- Ruebenbauer T., Müller H.W. 1985. *Ogólna hodowla roślin*. PWN – Warszawa.
- Welsh J., Mc Clelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Research*. 18 (24): 7213-7218.
- Williams J.G.K., 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 Acid Research*. 18 (22): 6531-6535.