

Karakterizacija genotipova soje korišćenjem genetičkih markera

- Originalni naučni rad -

Ana NIKOLIĆ, Snežana MLADENović DRINIĆ i Mirjana SREBRIĆ
Institut za kukuruz "Zemun Polje", Beograd-Zemun

Izvod: Precizne i potpune informacije o genetičkom diverzitetu pomažu u planiranju programa rada na selekciji i olakšavaju uvođenje novih genotipova u postojeći genski pul.

Cilj ovog istraživanja je bila karakterizacija 20 genotipova soje iz kolekcije Instituta za kukuruz "Zemun Polje" za koje se pokazalo da poseduju dobre agronomске osobine, visok prinos, otpornost na poleganje i sušu, uz malo rasipanje semena.

Genetička karakterizacija genotipova soje izvršena je pomoću dve vrste genetičkih markera: proteina semena soje kao biohemijskih markera i RAPD kao DNK markera.

Analiza proteina semena i RAPD analiza potvrdila je nizak nivo polimorfizma soje. Primenom obe vrste markera pokazano je da su genotipovi P9272 i Kunitz međusobno najbliži. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivani genotipovi su svrstani u dve veće grupe i oba koeficijenta sličnosti dala su skoro istovetne rezultate. Za genotipove koje smo ispitivali u radu nemamo kompletne podatke o poreklu tako da nije moguće utvrditi da li klasifikacija na osnovu markera odgovara i klasifikaciji na osnovu porekla.

Ključne reči: Genetički diverzitet, proteinski markeri, RAPD markeri, soja.

Uvod

Karakterizacija i korišćenje germplazme zauzimaju centralno mesto u oplemenjivanju biljaka. Značaj korišćenja postojeće genetičke divergentnosti ogleda se u tome što se na taj način izbegava nepoželjna genetička uniformnost koja uslovljava povećanu osetljivost useva na bolesti i promenljive uslove sredine što sve rezultira u sniženju prinosa. Mnogi divlji srodnici gajenih vrsta poseduju gene za otpornost na različite bolesti i štetočine, a otpornije su i na faktore abiotičkog stresa kao što su suša, hladnoća, salinitet. Takođe, cilj je i stvoriti sorte sa boljim kvalitetom zrna i većim prinosom.

Soja (*Glycine max* L. Merr.) je samooplodna biljka sa uskom genetičkom

osnovom. Iako je varijabilnost vrste velika, veliki broj istraživanja je pokazao niski diverzitet u okviru gajene soje, *Abdelnoor i sar.*, 1995, *Powell i sar.*, 1996. Rezultati dobijeni primenom molekularnih markera ukazuju na to da ograničen genetički diverzitet *G. max* nije samo posledica selekcije u programima oplemenjivanja, nego i domestikacije iz *G. soja*, *Morgante i Olivieri*, 1994, *Powell i sar.*, 1996. Danas je veliki deo diverziteta soje izgubljen i zbog masovne upotrebe uniformnih, komercijalnih sorti.

Da bi se obezbedio kontinuitet u uspešnoj selekciji soje neophodno je unošenje divergentne germplazme. Prvi korak u unošenju novih genotipova je utvrđivanje da li se introdukovani genotipovi razlikuju u odnosu na postojeću genetičku osnovu. Za selekciju divergentnih roditelja od velikog značaja mogu biti neutralni DNK markeri - RFLP, *Keim i sar.*, 1992, *Kisha i sar.*, 1997, RAPD, *Thompson i Nelson*, 1998a, SSR, *Diwan i Cregan*, 1997.

Materijal i metode

U ovom radu izvršena je genetička karakterizacija i utvrđena srodnost 20 genotipova soje iz kolekcije Instituta za kukuruz "Zemun Polje" (Tabela 1) primenom proteinskih i RAPD markera. Za ove genotipove je već utvrđeno da poseduju dobra agronomska svojstva kao što su otpornost na poleganje i sušu, visok prinos i malo rasipanje semena.

Tabela 1. Genotipovi soje iz kolekcije Instituta za kukuruz
Soybean Genotypes Belonging to the Collection of the Maize Research Institute

Genotip - Genotype	Poreklo - Origin
1. Bosa	Institut za kukuruz - Maize Research Institute
2. ZPS 015	Institut za kukuruz - Maize Research Institute
3. Nena	Institut za kukuruz - Maize Research Institute
4. L91 4042	Institut za kukuruz - Maize Research Institute
5. L94 128	Institut za kukuruz - Maize Research Institute
6. SG1	Institut za kukuruz - Maize Research Institute
7. Kador	SEMUNDO, Francuska - SEMUNDO, France
8. Bačka	Institut za ratarstvo i povrtarstvo NS - Institute of Field and Vegetable Crops
9. Afroditia	Institut za ratarstvo i povrtarstvo NS - Institute of Field and Vegetable Crops
10. Balkan	Institut za ratarstvo i povrtarstvo NS - Institute of Field and Vegetable Crops
11. Vojvodanka	Institut za ratarstvo i povrtarstvo NS - Institute of Field and Vegetable Crops
12. Shine	RUSTIKA, Italija - RUSTICA, Italy
13. Maple presto	Kanada - Canada
14. Semu 20	SEMUNDO, Francuska - SEMUNDO, France
15. Progres	SEMUNDO, Francuska - SEMUNDO, France
16. PRW 80	Kanada - Canada
17. Elf	III SAD - III USA
18. A 3963	IO SAD - IO USA
19. P9272	PIONIR, SAD - PIONEER, USA
20. Kunitz	III SAD - III USA

Proteini semena izolovani su po modifikovanoj metodi *Wang-a i sar.*, 1994, a zatim su proteinske frakcije razdvojene elektroforezom na poliakrilamidnom gelu, *Fling i Gregerson*, 1986.

Genomska DNK izolovana je po metodi *Rogers-a i Bendich-a*, 1985. RAPD reakcija urađena je po modifikovanom protokolu *Williams-a i sar.*, 1990.

Prisustvo/odsustvo odgovarajućeg markera (proteinske ili DNK frakcije) transformisano je u binarne podatke. Prisustvo odgovarajuće trake označeno je jedinicom a odsustvo nulom. Primenom ovih podataka izračunati su koeficijenti sličnosti korišćenjem koeficijenata po *Jaccard-u*, 1908, i *Sokal-u i Michener-u*, 1958. Ova dva koeficijenta se razlikuju po tome što prvi ne uzima u obzir odsustvo trake kod dva genotipa koji se porede, za razliku od drugog. Matrice koeficijenata sličnosti poslužile su za izračunavanje kofenetičkog koeficijenta korelacije Mantelovim testom. Na osnovu ovih matrica urađena je klaster i PC analiza.

Rezultati i diskusija

Na osnovu dobijenih elektroforegrama proteina semena utvrđeno je da su svi ispitivani genotipovi imali specifičnu proteinsku sliku. Ukupan broj proteinskih frakcija na gelu bio je 26 od kojih je 15 bilo polimorfno (57,7%). Primenom koeficijenata po *Jaccard-u* i *Sokal-u* i *Michener-u* namanja genetička sličnost izračunata je između genotipova Nena i Progres, a najveća između genotipova P9272 i Kunitz. *Sathe i sar.*, 1987, su ispitivali polimorfizam proteina 31 genotipa soje poliakrilamidnom elektroforezom. Ovaj sistem je omogućio diferencijaciju genetički veoma sličnih parova genotipova (*Century* i *Century 84* kao i *Wells II* i *Miami*).

Dendogrami (Grafikoni 1 i 2) dobijeni primenom oba koeficijenta imali su veoma sličnu strukturu. Svaki dendogram sastoji se iz dva velika, jasno odvojena klastera (I i II). U okviru prvog klastera svrstali su se genotipovi selekcionisani u Institutu za kukuruz "Zemun Polje", Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu kao i genotip Kador, koji je poreklom iz Francuske. Genotip Kador je jedan od roditelja domaće sorte L91 4042, pa je to mogući razlog zašto se ovi genotipovi svrstavaju zajedno. Drugi klaster obuhvata dva subklastera. Jedan subklaster sadrži genotipove poreklom iz Evrope (Italija i Francuska), sa izuzetkom genotipa A 3963 poreklom iz SAD. Drugi subklaster sadrži genotipove poreklom iz Severne Amerike (SAD i Kanada). Grupisanje genotipova je u saglasnosti sa njihovim geografskim poreklom.

PC analiza je pokazala sličan raspored genotipova kao i klaster analiza. Rezultati su prikazani u dve dimenzije (PC1 i PC2) na Dijagramima 1 i 2.

Genotipovi su se svrstali u tri grupe sa izuzetkom genotipova L91 4042 i Kador koji ne pripadaju nijednoj grupi. Najveći broj genotipova svrstan je u grupu koja je najmanje stabilna zbog razuđenosti tačaka po PC1 osi. Najveću stabilnost pokazao je genotip Shine koji se nalazi najbliže preseku ordinatnih osa.

Druga metoda koja je u ovom radu korišćena za utvrđivanje genetičkog

diverziteta soje je RAPD metoda. Od ukupno testiranih 27 prajmera 18 je dalo reproducibilne rezultate i korišćeno je u daljoj analizi. Broj fragmenata dobijen RAPD analizom bio je 86 od kojih je 32 (37,2%) bilo polimorfno. Slične rezultate primenom RAPD markera dobili su *Thompson i Nelson*, 1998, a utvrdivši da je nivo polimorfizma kod genotipova kultivisane soje 33.7%. *Baranek i sar.*, 2002, ispitivali su polimorfizam 19 genotipova soje iz Češke nacionalne kolekcije i utvrdili da je od ukupno 122 detektovana fragmenta 55 (45%) bilo polimorfno, što je nešto više od onoga što je utvrđeno u ovom radu. *Giancola i sar.*, 2002, su takođe dobili slične rezultate za polimorfizam kultivisanih genotipova soje koji su u komercijalnoj upotrebi u Argentini soje koristeći RAPD markere (31,4%).

Genetička sličnost između parova genotipova izračunata je korišćenjem koeficijena sličnosti koji su korišćeni i kod proteinskih markera. Najmanja genetička sličnost izračunata je između genotipova Maple presto i Bosa, a najveća između genotipova Kunitz i P 9272.

Klaster analiza (Grafikoni 3 i 4) je pokazala da se genotipovi grupišu u dva veća klastera (I i II), ali na drugačiji način u odnosu na grupisanje na osnovu proteinskih markera. U okviru prvog klastera grupisali su se genotipovi selekcionisani u Institutu za kukuruz "Zemun Polje", kao i dva genotipa poreklom iz SAD. Drugi klaster sadrži genotipove selekcionisane u Institutu za kukuruz u Zemun Polju, Institutu za ratarstvo i povrtarstvo u Novom Sadu, genotipove poreklom iz Evrope (Italija i Francuska), kao i genotipove poreklom iz Severne Amerike (SAD i Kanada). Grupisanje genotipova na osnovu podataka dobijenih iz RAPD analize nije u vezi sa njihovim geografskim poreklom. Međutim, samo geografsko poreklo nije adekvatan indikator potencijalne sličnosti između ispitivanih genotipova zato što mnogi američki i evropski genotipovi vode poreklo od istih izvora u Aziji. Takođe, za genotipove koje smo ispitivali u radu nemamo kompletne podatke o poreklu tako da nije moguće utvrditi da li klasifikacija na osnovu markera odgovara i klasifikaciji na osnovu porekla.

Na osnovu PC analize genotipovi su se grupisali na sličan način kao i na osnovu klaster analize. Rezultati su prikazani u dve dimenzije (PC1 i PC2) na Dijagramima 3 i 4.

Svi genotipovi svrstali su se u tri grupe. Najmanju stabilnost pokazala je grupa koja obuhvata najveći broj genotipova, zbog razuđenosti tačaka, kako po PC1, tako i po PC2 osi. Najveću stabilnost pokazao je genotip Elf koji se nalazi najbliže preseku nultih ordinata.

Zaključak

Analiza proteina semena i RAPD analiza dvadeset genotipova različitog porekla potvrdila je nizak nivo polimorfizma soje.

Polimorfizam proteina semena soje ima ograničenu primenu u proceni njihove genetičke divergentnosti, zbog malog broja dobijenih markera i njihove relativno niske polimorfnosti. Mogao bi da se koristi za precizniju procenu genetičke

divergentnosti ukoliko se prati i polimorfizam u koncentraciji proteinskih frakcija.

RAPD metoda pokazuje brojne prednosti kao tehnika za karakterizaciju i procenu divergentnosti genotipova soje u poređenju sa analizom polimorfizma proteinskog kompleksa semena. U ovom radu za procenu genetičke divergentnosti korišćen je mali broj RAPD markera, svega 18. Da bi se obezbedila bolja pokrivenost genoma, a time i bolja procena genetičke divergentnosti, potrebno je u analizi koristiti veći broj markera.

Oba koeficijenta korišćena za izračunavanje genetičke sličnosti, kao i za klaster i PC analizu dala su približno iste rezultate.

Na osnovu dobijenih rezultata primenom proteinskih i RAPD markera i klasifikacije bazireane na njima, može se zaključiti da se povećanje divergencije germplazme i stvaranje široke osnove za selekciju može postići ukrštanjem genotipova kao što su Nena i Progres, odnosno Maple presto i Bosa.

Literatura

- Abdelnoor, R.V., E.G. Barros and M.A. Moreira** (1995): Determination of diversity within Brazilian soybean germplasm using RAPD polymorphic techniques and comparative analysis with pedigree data. *Braz. J. Genet.* **18**: 265-273.
- Baranek, M., M. Kadlec, J. Raddova, M. Vachun and M. Pidra** (2002): Evaluation of genetic diversity in 19 *Glycine max* (L.) Merr. accessions included in the Czech National Collection of soybean genotypes. *Czech J. Genet. Plant Breed.* **38** (2): 69-74.
- Diwan, N. and P.B. Cregan** (1997): Automated sizing of fluorescent-labeled SSR markers to assay genetic variation in soybean. *Theor. Appl. Genet.* **95**: 723-733.
- Fling S.P. and D.S. Gregerson** (1986): Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.* **155**: 83-88.
- Giancola, S., S. Marcucci Poltri, P. Lacaze and H.E. Hopp** (2002): Feasibility of integration of molecular markers and morphological descriptors in a real case study of a plant variety protection system for soybean. *Euphytica* **127** (1): 95-113.
- Jaccard, P.** (1908): Nouvelles recherches sur la distribution floral. *Bull. Soc. Vand.Sci. Nat.* **44**: 223 -270.
- Keim, P., W. Beavis, J. Schupp and R. Freestone** (1992): Evaluation of soybean RFLP marker diversity in adapted germplasm. *Theor. Appl. Genet.* **85**: 205-212.
- Kisha, T.J., B.W. Diers, J.M. Hoyt and C.H. Sneller** (1997): Genetic diversity among soybean plant introductions and north american germplasm. *Crop Sci.* **38**: 1669-1680.

- Morgante, M.** and **A.M. Olivieri** (1994): Genetic mapping and variability of seven soybean simple sequence repeat loci. *Genome* 37:763-769.
- Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingley** and **A. Rafalski** (1996): The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers for germplasm analysis. *J. Mol. Breed.* 2: 225-238.
- Rogers, S.O.** and **A.J. Bendich** (1985): Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 5: 69-76.
- Sathe, S.K., G.G. Lilley, A.C. Mason** and **C.M. Weaver** (1987): High-resolution sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of soybean (*Glycine max* L.) seed proteins. *Cereal Chem.* 64: 380-384.
- Sokal, R.R.** and **C.D. Michener** (1958): A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kans. Sci. Bull.* 38: 1409-1438.
- Thompson, J.A.** and **R.L. Nelson** (1998a): Core set of primers to evaluate genetic diversity in soybean. *Crop Sci.* 38: 1356-1362.
- Thompson, J.A.** and **R.L. Nelson** (1998b): Utilization of diverse germplasm for soybean yield improvement. *Crop Sci.* 38: 1362-1368.
- Wang, C., K. Bian, H. Zhang, Z. Zhou** and **J. Wang** (1994): Polyacrylamide gel electrophoresis of salt soluble proteins for maize variety identification and genetic purity assessment. *Seed Sci. Tech.* 22 (1): 51-57.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski** and **S.V. Tingey** (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.

Primljeno: 14.02.2005.

Odobreno: 18.12.2006.

* *
*

Characterisation of Soybean Genotypes Using Genetic Markers

- Original scientific paper -

Ana NIKOLIĆ, Snežana MLADENOVIĆ DRINIĆ and Mirjana SREBRIĆ
Maize Research Institute, Zemun Polje, Belgrade-Zemun

Summary

More accurate and complete descriptions of genotypes could help determinate future breeding strategies and facilitate introgression of new genotypes in a current soybean genetic pool.

Genetic similarity can be estimated indirectly using pedigree data or directly using biochemical (isozymes, proteins) and molecular markers (DNK markers).

The objective of this study was to characterise 20 soybean genotypes from the collection of the Maize Research Institute, Zemun Polje, which have good agronomic performances, high yield, lodging and drought resistance, and low scattering.

Genetic characterisation of 20 soybean genotypes was obtained using two types of genetic markers: soybean seed proteins as biochemical markers and RAPD markers as molecular markers. Seed proteins were isolated and separated by PAA electrophoresis. Genomic DNA from these genotypes was characterised by RAPD markers with 20 selected decamer primers. On the basis of the presence/absence of bands in protein gels/amplified DNA fragments, coefficients of similarity were calculated between pairs of genotypes. The similarity matrix was submitted for the hierarchical cluster analysis of the unweighted pair group using the arithmetic average (UPGMA) method and a necessary computation was performed using the NTSYS-pc programme.

The protein seed analysis and the RAPD analysis confirmed a low level of genetic diversity in soybean. The highest genetic similarity was between genotypes P9272 and Kador using both types of markers. According to obtained results, soybean genotypes were assigned in two larger groups and coefficients of similarity showed similar results. Due to the lack of pedigree data for analysed genotypes, a correspondence with molecular marker data could not be determined.

Received: 14/02/2005

Accepted: 18/12/2006

Adresa autora:

Ana NIKOLIĆ

Institut za kukuruz "Zemun Polje"

Slobodana Bajića 1

11185 Beograd-Zemun

Srbija

E-mail: nikolana@hotmail.com