

## Почетна генетичка карактеризација принова ражи (*Secale cereale* L.) у Банци гена Републике Српске

Мирела Кајкут<sup>1</sup>, Драган Мандић<sup>2</sup>, Лидија Томић<sup>3</sup>, Марина Радун<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Институт за генетичке ресурсе Универзитета у Бањалуци, Република Српска, БиХ

<sup>2</sup>Пољопривредни институт Републике Српске, БиХ

<sup>3</sup>Пољопривредни факултет Универзитета у Бањалуци, Република Српска, БиХ

### Сажетак

Банка гена Републике Српске (Институт за генетичке ресурсе Универзитета у Бањалуци) основана је 2009. године. Карактеризација принова примјеном генетичких маркера започела је током 2010. године. У овом раду приказани су почетни резултати генетичке карактеризације 5 принова ражи. Анализа принова извршена је примјеном *RAPD* маркера (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*). Број амплификованих локуса који су добијени цикличном реакцијом полимеразом износио је 13. Од 13 амплификованих локуса 7 су били полиморфни што представља укупан полиморфизам од 54%. Коефицијент генетичке сличности (према *Jaccard*-у) кретао се од 0,68 за сорту Нанид, 0,73 за сорту Селго и 0,78%, за сорту Алbedo. Коефицијент сличности између принова 1 и 2 (непознатог имена) износио је 1, што значи да ове двије принове имају идентичне алелне профиле за анализирани локусе, односно између принове 1 и принове 2 нема израженог полиморфизма. Генетички најсличнији су сорта Алbedo и дупликатне принове док најмању генетичку сличност са осталим анализираним приновама има сорта Нанид.

*Кључне ријечи:* *RAPD* маркери, дупликатне принове, генетичка сличност.

### Увод

Елементарна улога колекције и чувања биљних генетичких ресурса у свијету је сакупљање и безбједно чување виталних узорака генотипова различитих биљних врста. Идентификација, верификација и карактеризација сваког узорка примјеном егзактних метода су важне и од интереса у одржавању и управљању модерним банкама гена (Ивановић и Константинов, 2000). Увођење молекуларних техника и молекуларних маркера је створила услове за поуздану

идентификацију и верификацију постојећих и нових генотипова у колекцијама, детекцију дупликата у колекцијама, анализу генетичке чистоће колекција, утврђивање генетичких промјена у току дугог чувања на ниским температурама, анализу генетичке дивергентности у стратегији размјене узорака у колекцији, конструкцију елементарних колекција, утврђивање здравственог стања и селекцију интересантних генетичких извора (Ивановић и Константинов, 2000).

Деведесетих година прошлог вијека, *Kary Mullis* је осмислио *PCR* (ланчана реакција полимеразом) и за ово откриће добио Нобелову награду. Ова метода је отворила нова поља истраживања у фундаменталној науци и једина у пракси омогућила откривање до сада непознатих гена и само разумјевање генетичке основе организма. Захваљујући овој методи осмишљени су молекуларни маркери засновани на цикличној реакцији полимеразом (Ивановић и Константинов, 2000).

Детекција полиморфизма насумично умножене ДНК или *RAPD* (*engl. Random Amplified Polymorphic DNA*) маркери се развијају уз помоћ технике цикличне реакције полимеразом (*Williams et al., op cit. Weising et al., 2005*). Њиховим открићем (*Williams et al., 1990*) омогућена је идентификација сорти и клонова, анализа популација као и генетичко мапирање на нивоу врсте. У овом раду извршена је лабораторијска анализа пет принова ражи *RAPD* техником да би се извршила карактеризација и идентификација, те установиле сличности и разлике између тестираних генотипова.

## Материјал и методе рада

Као узорци за молекуларну анализу насумично су одабране принове ражи (*Secale cereale* L.) из Банке биљних гена Републике Српске, која се налази у оквиру Института за генетичке ресурсе Универзитета у Бањој Луци. Анализирано је пет принова ражи (Табела 1.) од којих су прве три признате сорте, а остале двије су колекционисане код индивидуалних пољопривредних произвођача. Од сваке принове узето је по два узорка из којих је извршена изолација укупне геномске ДНК СТАВ екстракционим протоколом (*Javornik и Kump, 2006*). Након изолације, извршена је квантификација дволанчане ДНК спектрофотометријским мјерењем апсорпције свјетлости таласне дужине 260 nm. Циклична реакција полимеразом (*PCR*) припремљена је у финалној запремини од 25  $\mu$ l. Свака реакција садржавала је по 20 ng ДНК, 10  $\times$  *PCR* пуфера (*Fermentas*), 0,2 mM сваког од четири нуклеотида (*Fermentas*), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5  $\mu$ M прајмер и 0,25 U Таq ДНК полимеразе (*Fermentas*). Извршена је амплификација три локуса: ОРА01, ОРА02 и ОРА04 (*Fermentas*). Наведени прајмери су кориштени са циљем да се молекуларном анализом установи присуство односно одсуство полиморфизма између анализираних принова. Први степен *PCR* реакције, активација ензима, одвијала се при 94°C у трајању од пет минута. Амплификација ДНК се одвијала у 40 циклуса са температурама денатурације 94° С у трајању од 30 секунди и налијегање прајмера при 37°C у трајању од по 30 секунди, и елонгацијом тј. продуживањем ДНК на температури од 72°C у

трајању од једне минуте. Након што су сви циклуси завршени, услиједила је продужена елонгација у трајању од 8 минута при температури од 72°C.

Раздвајање и визуелизација продуката цикличне реакције полимеразом вршена је електрофорезом на 1% агарозном гелу уз додавање етидијум бромида који омогућава визуелизацију ДНК молекула. Кориштен је маркер *Fermentas GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder*, који садржи ДНК фрагменте познате дужине од 100-3000 bp (базни пар). Електрофореза се одвијала у електричном пољу напона 90 V у трајању од 60 минута.

На основу фотографија гелова извршена је визуелна анализа којом су добијени резултати о присуству односно одсуству фрагмената ДНК умножених цикличном реакцијом полимеразом са одабраним прајмерима. Сваки генотип анализиран је на присуство односно одсуство ДНК фрагмената одређене дужине за употребљени прајмер. Присуство одређеног ДНК фрагмента описано је нумеричком ознаком «1» а одсуство «0». На овај начин добијена је нумеричка матрица која се користи за израчунавање коефицијента сличности по *Jaccardu* (1908) и креирање дендограма помоћу *NTSYSpc* софтвера.

### Резултати рада и дискусија

Укупан број амплификованих локуса који су добијени цикличном реакцијом полимеразом употребом три прајмера (ОРА01, ОРА02 и ОРА04) износио је 13. Од 13 амплификованих локуса 7 су били полиморфни што представља укупан полиморфизам од 54%. Степен полиморфизма за прајмер ОРА01 износио је 25%, за прајмер ОРА02 износио је 67% и за прајмер ОРА04 износио је 50%. Цикличном реакцијом полимеразом прајмером ОРА04 амплификовани су најјаснији фрагменти док је прајмер ОРА02 био најинформативнији показујући степен полиморфизма од 67%.

Поређењем амплификованих ДНК фрагмената са ДНК фрагментима познате дужине, утврђене су дужине фрагмената изражене у базним паровима (табела 1). Дужина ДНК фрагмената добијених цикличном реакцијом полимеразом прајмером ОРА01 варирала је од 400 до 1500 базних парова са просјечном дужином умножених фрагмената од 1075 bp. Фрагменти умножени примјеном прајмера ОРА02 имали су дужину од 1050 до 1350 bp, са просјечном дужином за прајмер од 1217 bp док су фрагменти умножени прајмером ОРА04 варирали у дужини од 700 до 1350 са просјечном дужином од 1067 bp. Просјечна дужина умножених ДНК фрагмената за сва три употребљена прајмера износила је 1104 bp.

Таб. 1. Анализа локуса амплификованих цикличном реакцијом полимеразом прајмерима ОРА01, ОРА02, ОРА04 са приказаним дужинама алела у базним паровима.

*The analysis of loci amplified with cyclic polimerase reaction with OPA01, OPA02, OPA04 primers presented with allele lengths in base pairs.*

Прајмер <i>Primer</i>	Дужина у базним паровима <i>Base Pair Lenght</i>	Принова <i>Accession</i>	АЛБЕДО <i>Albedo</i>		СЕЛГО <i>Selgo</i>		НАНИД <i>Nanid</i>		ПРИНОВА1 <i>Accession</i>		ПРИНОВА 2 <i>Accession</i>	
		Узорак <i>Sample</i>	A1	A2	C1	C2	H1	H2	CA1	CA2	PM1	PM2
		Локус <i>Locus</i>										
ОРА01	1500	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	1250	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1150	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	400	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ОРА02	1350	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1250	6	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	1050	7	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
ОРА04	1350	8	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	1250	9	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	1200	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1050	11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	850	12	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	700	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

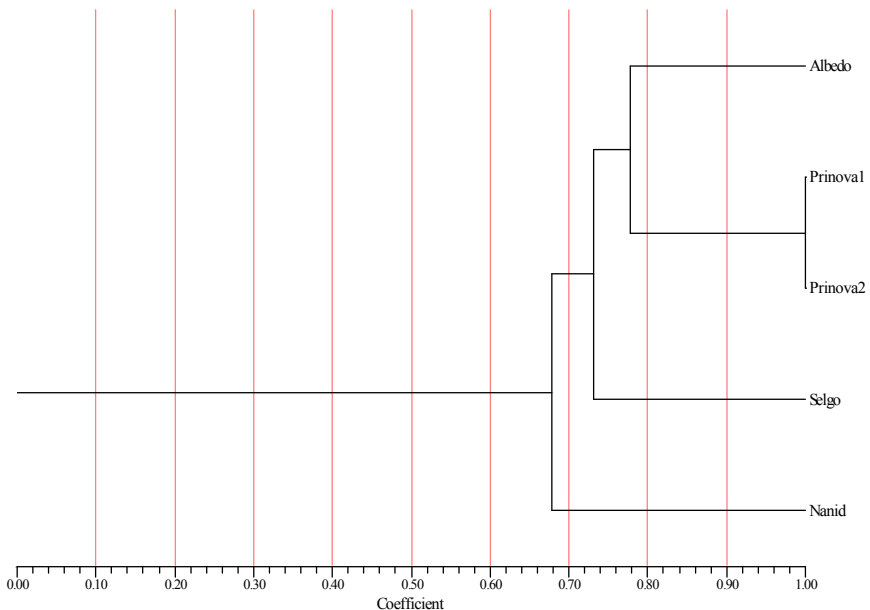
Анализом електрофореграма, амплификованим локусима код сва три кориштена прајмера додјелена је нумеричка вриједност «1» а неамплификованим «0». На овај начин добијена је улазна матрица за анализу сличности односно различитости између посматраних принова. Коэффициент генетичке сличности израчунат је према *Jaccard*-у:

$$J=a/(n-d),$$

гдје је а број полиморфних локуса, n мономорфних док је d укупан број амплификованих локуса.

Вриједности коэффицијента сличност кретале су се од 0,68 за сорту Нанид, сорту Селго 0,73 до 0,78 за сорту Алbedo. Коэффициент сличности између принове 1 и 2 износио је 1,00 што значи да ове двије принове имају идентичне алелне профиле за анализиране локусе.

Према израчунатим вриједностима коэффицијента према *Jaccard*-у урађена је «cluster» анализа *UPGMA* методом поређења свих могућих парова. Дендрограм је конструисан помоћу система за нумеричку таксономију и мултиваријантне анализе - *NTSYS - pc Softvera*, верзија 1.80 (*Rohlf, F.J.*, 1993).



Сл. 1. Дендрограм добијен анализом података цикличне реакције полимеразом RAPD прајмерима OPA01, OPA02 и OPA04 код 5 принова ражи.

*Dendrogram analysis of data obtained by a cyclic polymerase reaction using RAPD primers OPA01, OPA02, OPA04 on five rye accessions.*

Анализом добијеног дендрограма може се утврдити да принова 1 и принова 2 представљају дупликатне генотипове, док су сорте Албеда, Селго и Нанид имају јединствене генотипове за анализиране локусе који се разликују од дупликатних принова као и међусобно. Генетички најсличнији су сорта Албеда и дупликатне принове док најмању генетичку сличност са осталим анализираним приновама има сорта Нанид.

### Закључак

У новије вријеме технике молекуларне генетике и молекуларне биологије представљају значајан допринос традиционалним техникама морфолошке и биохемијске евалуације принова у банкама гена. Генетичка карактеризација принова ражи извршена је методом за испитивање полиморфизма генома која се заснива на цикличној реакцији полимеразом коришћењем *RAPD* прајмера. *RAPD* маркери могу имати значајну примјену у евалуацију и идентификацију у банкама гена што је доказано у овом раду. Утврђено је присуство дупликатних принова у колекцији (принова 1 и принова 2) док остале три принове (Албеда, Селго и Нанид) имају јединствене генотипове за анализиране локусе.

У будућем раду неопходно је извршити анализу већег броја локуса цикличном реакцијом полимеразом примјеном различитих *RAPD* прајмера који морају представљати паралелан рад са процесима морфолошке и биохемијске евалуације принова.

### Литература

1. *Ивановић, В., Константинов, К.* (2000) Савремена биофизика. Београд, Веларта :161-164, 192-194, 206-207.
2. *Javornik, B., Kump, B.* (1993) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in buckwheat. *Fagopyrum* 13 : 35-39.
3. *Rohlf, F.J.* (1993) NTSYS-*pc*. Numerical taxonomy and multivariate analysis: version 2.02. New York ,Applied Biostatistics.
4. *Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Kahl, G.* (2005) DNA fingerprinting in Plants. Taylor&Fransis Group : 58-61, 263.
5. *Williams, J.K.G., 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 Acids Res.*, 18, 6531-6535.

# Initial Genetic Characterisation of Rye (*Secale cereale* L.) in the Gene Bank of the Republic of Srpska

Mirela Kajkut<sup>1</sup>, Dragan Mandić<sup>2</sup>, Lidija Tomić<sup>3</sup>, Marina Radun<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>*Genetic Resources Institute of University of Banja Luka, Republic of Srpska, BiH*

<sup>2</sup>*Agricultural Institute of Republic of Srpska, BiH*

<sup>3</sup>*Faculty of Agriculture of University of Banja Luka, Republic of Srpska, BiH*

## Abstract

The Gene Bank of the Republic of Srpska (Genetic Resources Institute of the University of Banja Luka) was established in 2009. The characterisation of accessions with molecular markers began during 2010. This paper presents the initial results of genetic characterisation of five rye accessions. The analysis was performed using RAPD markers (Randomly Amplified Polymorphic DNA). 13 amplified loci were obtained by polymerase chain reaction and 7 were polymorphic which represents 54% of total polymorphism. The coefficient of genetic similarity (according to Jaccard) ranged from 0.68 for the Nanid variety, 0.73 for the Selge variety and 0.78%, for the Albedo variety. The coefficient of similarity between accessions 1 and 2 (unknown name) was 1, which means that these two accessions have identical allelic profiles for the analysed loci. The Albedo variety and duplicate accessions are the most genetically similar whilst the Nanid variety was the least genetically similar to other accessions under study.

*Key words:* RAPD markers, duplicated accessions, genetic similarity.

Mirela Kajkut

*E-mail Address:*

*mirekakajkut@gmail.com*

