

KAMILA NOWOSAD**HENRYK BUJAK**Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa
kamila.nowosad@upwr.edu.pl

Genotypowanie kukurydzy z wykorzystaniem markerów KASP*

Maize genotyping using KASP markers

Genotypowanie w oparciu o markery SNP oznaczane metodą KASP jest szybkie, tanie i wydajne. Pozwala na określenie genotypu dla dużej liczby obiektów hodowlanych w stosunkowo krótkim okresie czasu przy niskim nakładzie kosztów. Genotypowaniu poddano linie wsobne kukurydzy, które pochodziły z polskich firm hodowlanych. Genomowe DNA zostało wyizolowane przy użyciu kitów ze złożem krzemionkowym firmy Syngen i posłużyło do analiz molekularnych mających na celu określenie dystansu genetycznego pomiędzy badanymi genotypami kukurydzy. Genotypowanie metodą KASP (ang. Kompetitive Allele Specific PCR) przeprowadzono z wykorzystaniem zmodyfikowanego protokołu PCR oraz sond typu FRET (ang. Fluorescence Resonance Energy Transfer) z barwnikami fluorescencyjnymi (FAM i HEX). Analizy przeprowadzono w urządzeniu RT-PCR Illumina Eco. W badaniach wykorzystano 50 par starterów KASP wybranych z publicznie dostępnej bazy opracowanej dla kukurydzy, które pozwoliły na amplifikację polimorficznych produktów na matrycy genomowego DNA wszystkich badanych genotypów, a przy ich wyborze brano pod uwagę lokalizację chromosomową, tak aby reprezentowały wszystkie 10 chromosomów kukurydzy. Ponadto uwzględniono także ich pozycję w genomie tak, aby były reprezentatywne dla całego genomu oraz były równo od siebie oddalone. Do określenia genotypu w każdej próbce i dla każdego analizowanego markera KASP wykorzystano oprogramowanie Illumina Eco Study. Dzięki zastosowanemu oprogramowaniu wygenerowany raport dla każdego genotypu i dla wszystkich testowanych markerów wyeksportowano do programu pyESGK, co pozwoliło na stworzenie matrycy z genotypem każdej próbki dla każdego locus. Otrzymana matryca danych (50 x 94) wyeksportowana została do programu R w którym wykonane zostały analizy statystyczne. Zastosowane startery KASP pozwoliły na efektywne zróżnicowanie

* Praca wykonana w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej finansowanych przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi

badanego materiału oraz potwierdziły swój wysoki polimorfizm i powtarzalność. Uzyskane wyniki wskazują na duże zróżnicowanie badanej kolekcji linii kukurydzy, a obliczone podobieństwo genetyczne mieściło się w przedziale 0,40 do 0,90. Wykreślone dendrogramy podobieństwa genetycznego grupują linie na czterech osobnych odgałęzieniach (kładach), a genotypy tworzące poszczególne skupienia dzielą się na kolejne 2 główne podgrupy. Po jednej stronie dendrogramu grupują się linie SM11/17, SM10/17 i SM14/17, a po przeciwnej stronie ostatnia grupę tworzą linie SM8/17, SM52/18 oraz LK4 tworząc najbardziej odległe od siebie skupiska. Przeprowadzona analiza składowych głównych pozwoliła na wyodrębnienie czterech grup skupisk linii podobnie do dendrogramu. W każdej z wydzielonych grup, niezależnie od metody, zgrupowane są materiały pochodzące zarówno z jednej, jak i drugiej hodowli, co świadczy o podobnym tle genetycznym polskich materiałów hodowlanych kukurydzy. Uzyskane wyniki stwarzają także możliwość wykorzystania badanych genotypów w programach hodowlanych do uzyskania mieszańców lub syntetyków o korzystnych kombinacjach cech z których można będzie wyprowadzać nowe wartościowe linie. Dodatkowo zastosowanie markerów KASP o wiadomej lokalizacji chromosomowej stwarza możliwość wykorzystania uzyskanych wyników w pracach związanych z mapowaniem asocjacyjnym cech użytkowych u kukurydzy.