

PAWEŁ MILCZARSKI
ANETA BANEK-TABOR
PIOTR MASOJC

Katedra Hodowli Roślin
Akademia Rolnicza w Szczecinie

Wykorzystanie markerów RAPD do identyfikacji odmian pszenżyta

Application of RAPD markers for fingerprinting of triticales cultivars

Celem badań była ocena możliwości wykorzystania techniki losowej amplifikacji polimorficznego DNA (RAPD) do identyfikacji 16 krajowych odmian pszenżyta ozimego. Poszukiwano polimorficznych fragmentów DNA testując 50 starterów o losowych sekwencjach. Do właściwych badań wybrano 17 starterów w obecności, których amplifikacji uległy sekwencje charakteryzujące się polimorfizmem i dużą stabilnością. Otrzymano 30 polimorficznych fragmentów DNA, różniących wszystkie badane odmiany. Markery RAPD wykorzystano do konstrukcji dendrogramu przedstawiającego relacje podobieństwa genetycznego między odmianami.

Słowa kluczowe: fingerprinting, odmiany pszenżyta, podobieństwo genetyczne, markery RAPD

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) was used to study fingerprints and genetic similarities among 16 Polish cultivars of winter triticales. Polymorphic DNA fragments were sought for by testing of 50 arbitrary primers. Final studies were carried out using 17 selected primers that allowed for amplification of the useful 30 RAPD markers. This set of markers produced fingerprints for all the studied triticales cultivars and constituted a basis for developing a dendrogram presenting genetic similarities among varieties.

Key words: fingerprinting, genetic similarities, RAPD markers, triticales cultivars

WSTĘP

Opracowanie i zastosowanie w praktyce systemu markerów molekularnych pozwalającego na rozróżnianie odmian roślin uprawnych w obrębie jednego gatunku może ograniczyć liczbę pomyłek lub nadużyć w obrocie materiałem siewnym. Ścisłe i precyzyjne metody identyfikacji genetycznej stają się nieodzowne przy wzroście liczby odmian uprawnych pochodzących zarówno z krajowych, jak i zagranicznych ośrodków hodowlanych. System markerów umożliwia ustalenie czystości i tożsamości odmianowej danej partii nasion, i tym samym może mieć znaczenie dla ochrony praw autorskich

hodowców. Znajduje on też zastosowanie w systematyzowaniu i gromadzeniu materiałów w bankach genów.

Identyfikację odmian można przeprowadzić dysponując zestawem loci białkowych, izoenzymatycznych lub markerów DNA (Wolko i Kruszka, 1997). Polimorfizm wykrywany na poziomie DNA stwarza możliwość objęcia analizą dużej liczby loci rozmieszczonych w różnych regionach chromosomów. Pozwala on na uzyskanie wieloprzążkowych obrazów świadczących o genetycznej odrębności odmian. Jedną z metod fingerprintingu jest analiza losowo amplifikowanego polimorficznego DNA (RAPD) (Williams i in., 1990). Przy użyciu tej metody oceniano zróżnicowanie odmian jęczmienia (Kuczyńska i in., 2001), ryżu (Mackill, 1995), żyta (Iqbal i Rayburn, 1994). Zestaw loci umożliwiający odróżnienie odmian może być także użyty do analizy podobieństwa genetycznego materiałów wyjściowych w hodowli dostarczając informacji niezbędnych dla podjęcia decyzji o optymalnym schemacie krzyżowań.

Celem pracy jest wykrycie systemu polimorficznych loci RAPD, służącego do identyfikacji krajowych odmian pszenżyta oraz do ustalenia ich podobieństwa genetycznego.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badań stanowiło 16 krajowych odmian pszenżyta, których nasiona w stopniu superelity otrzymano z Hodowli DANKO Sp. z o.o. i z Hodowli Roślin Strzelce Sp. z o.o. Ekstrakcję DNA z prób zbiorczych 20–25 młodych siewek każdej odmiany oraz amplifikację fragmentów DNA techniką RAPD przeprowadzono według metodyki opisaną przez Thomson i Henry (1995) z modyfikacjami Myśków i wsp. (2001). W badaniach testowano 50 starterów o losowych sekwencjach zasad. Wykonano wstępną selekcję starterów wybierając tylko te, które generowały polimorficzne produkty amplifikacji o stabilnych wzorach i silnych sygnałach. Do fingerprintingu odmian i oceny podobieństwa wykorzystano wyłącznie polimorficzne produkty amplifikacji DNA. Profile genetyczne, ze względu na dominujący charakter markerów RAPD, zapisywano w układzie zero-jedynkowym, gdzie 1 oznacza obecność prążka, a 0 — fenotyp null. Podobieństwa genetyczne i dendrogram otrzymano przy użyciu współczynnika Jaccarda, z zastosowaniem hierarchicznego algorytmu analizy skupień (UPGMA), wykorzystując program „Molecular Analyst Fingerprinting” (Bio-Rad).

WYNIKI

Spośród 50 starterów użytych do analiz, które umożliwiły amplifikację łącznie 308 fragmentów DNA, po wstępnej weryfikacji wybrano 17, dających polimorficzne produkty różnicujące badane odmiany (tab. 1 i 2). Do rozróżnienia każdej z 16 odmian było wystarczające użycie dwóch starterów: tp15 i tp17, które generowały siedem polimorficznych prążków. Opracowany system identyfikacji bazuje na większej liczbie starterów, i z tego względu powinien być przydatny do charakterystyki większej liczby odmian pszenżyta, również tych nie ujętych w niniejszej pracy.

Tabela 1

Sekuencje starterów użytych do identyfikacji odmian pszenżyta Sequences of primers used for fingerprinting of triticale cultivars	
Starter Primer	Sekuencja 5' — 3' Sequence 5' — 3'
tp1	CACAGCGAAG
tp2	GGCGGTGTG
tp3	ACCTCAGCTA
tp4	ACCTCAGCTT
tp5	ACCTCAGCGT
tp6	ACCTCAGCGA
tp7	ACCTCAGCCT
tp8	ACGCTATCGA
tp9	GCAACTACGT
tp10	TGCCGCTAAG
tp11	GACTACGGGG
tp12	CTCACCGTCC
tp13	ATGCTGTACG
tp14	ACACACGCAG
tp15	CGGCCGATTT
tp16	GGGTTGCCGA
tp17	CACAGCTGGG

Zastosowane startery wykrywały unikatowy dla każdej odmiany skład alleli w obrębie 30 loci. Liczba polimorficznych prążków otrzymanych przy zastosowaniu poszczególnych starterów wahała się w granicach od 1 do 4 (tab. 2).

Tabela 2

Identyfikacja odmian pszenżyta przy użyciu polimorficznych markerów RAPD. (1) — obecność prążka, (0) — fenotyp null
Identification of triticale cultivars using polymorphic RAPD markers. (1) — presence of the band (0) — null phenotype

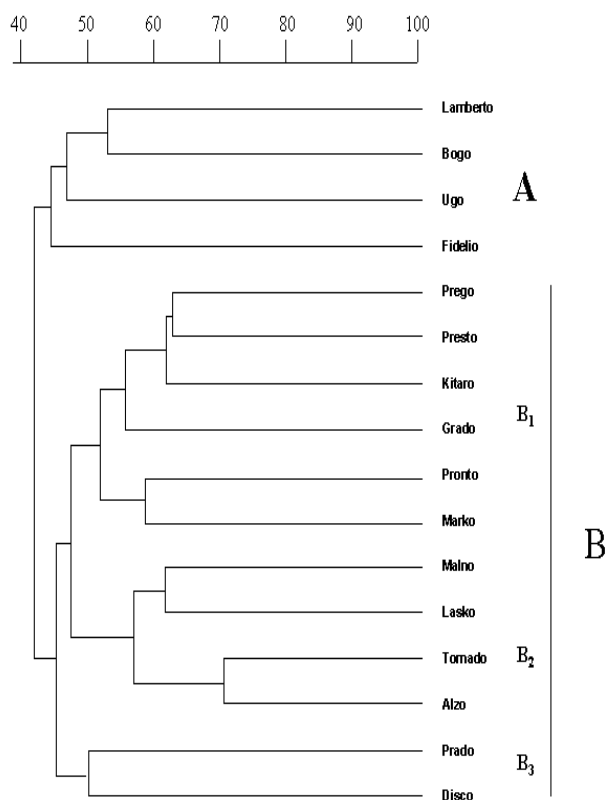
Odmiana Cultivars	Starter/długość fragmentu DNA (pz) Primer/length of fragment DNA (bp)									
	tp1	tp2		tp3	tp4	tp5	tp6	tp7	tp8	
	750	450	500	600	400	800	600	400	350	700
Alzo	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1
Bogo	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1
Disco	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1
Fidelio	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
Grado	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
Kitaro	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0
Lamberto	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1
Lasko	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1
Malno	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0
Marko	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0
Prado	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1
Presto	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1
Pronto	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
Prego	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0
Tornado	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1
Ugo	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0

c.d. Tabela 2

Odmiana Cultivars	Starter/długość fragmentu DNA (pz) Primer/length of fragment DNA (bp)									
	tp9	tp10			tp11			tp12		tp13
	750	300	700	800	550	700	950	650	800	600
Alzo	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0
Bogo	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
Disco	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1
Fidelio	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
Grado	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1
Kitaro	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
Lamberto	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1
Lasko	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1
Malno	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0
Marko	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1
Prado	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1
Presto	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0
Pronto	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0
Prego	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
Tornado	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0
Ugo	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0

Odmiana Cultivars	Starter/długość fragmentu DNA (pz) Primer/length of fragment DNA (bp)									
	tp14		tp15				tp16	tp17		
	650	900	300	400	700	850	350	650	800	1000
Alzo	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1
Bogo	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0
Disco	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
Fidelio	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Grado	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
Kitaro	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
Lamberto	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
Lasko	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0
Malno	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0
Marko	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0
Prado	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0
Presto	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0
Pronto	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1
Prego	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
Tornado	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
Ugo	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0

Zestaw 30 polimorficznych prążków RAPD umożliwił określenie relacji podobieństwa genetycznego badanych odmian (rys. 1). Dendrogram wskazuje na obecność dwóch głównych grup skupień (A i B). W skład grupy A wchodzi odmiany: Lamberto, Bogo, Ugo i Fidelio. Grupa B jest bardziej złożona, wykazując istnienie trzech podgrup (B_1 – B_3). Podgrupa B_1 obejmuje odmiany: Prego, Presto, Kitaro, Grado oraz nieco odrębnie skupione odmiany Pronto i Marko. W podgrupie B_2 skupiają się cztery odmiany, wśród których znajdują się blisko spokrewnione Alzo i Tornado. Podgrupę B_3 tworzą odmiany Prado i Disco, które są wyraźnie odrębne od pozostałych odmian grupy B.



Rys. 1. Dendrogram obrazujący relacje podobieństwa genetycznego między odmianami pszenżyta
Fig. 1. Dendrogram showing relationships of the genetic similarity among the triticale cultivars

DYSKUSJA

Technika RAPD jest jedną z prostszych metod oceny zróżnicowania genetycznego i z powodzeniem była wykorzystywana w badaniach linii, rodów i odmian roślin uprawnych (Caetano-Anolles, 1996; Iqbal i Rayburn, 1997; Myśków i in., 2001). Jako jedni z pierwszych zastosowali ją Hu i Quiros (1991) do fingerprintingu odmian brokuła i kalafiora. Autorzy ci stwierdzili użyteczność markerów RAPD w ocenie odrębności genetycznej i wewnętrznej jednorodności odmian. Przydatność markerów RAPD do profilowania genetycznego uzależniona jest od kilku czynników. Pierwszym z nich jest odpowiedni dobór starterów generujących stosunkowo dużą liczbę polimorficznych loci.

W niniejszej pracy zastosowanie dwóch spośród 17 wyróżnionych starterów pozwoliło na identyfikację wszystkich odmian pszenżyta. W podobnych badaniach Terzi (1998) użył siedmiu starterów RAPD do identyfikacji 12 odmian pszenżyta, a Masojć (2000), analizując 6 odmian każdego z trzech gatunków zbóż: pszenicy żyta i pszenżyta wykorzystał osiem starterów generujących łącznie 15 markerów. Pomimo licznych przykładów wykorzystania techniki RAPD do fingerprintingu wielu gatunków, metoda ta została uznana za mało przydatną do oceny polimorfizmu u pszenicy (Devos i Gale, 1992). Niski polimorfizm markerów RAPD u pszenicy zdaniem Koebnera (1995) może wynikać z istnienia sekwencji homologicznych w trzech genomach i znacznej ilości sekwencji powtarzalnych. Również i inni autorzy donoszą o niewielkiej zmienności wykrywanej metodą RAPD np. u odmian żyta (Iqbal i Rayburn, 1994). Myśków i wsp. (2001) opracowali system 18 loci rozmieszczonych na chromosomach 2R–7R, który wymaga zastosowania 16 starterów i pozwala na identyfikację i badanie podobieństwa genetycznego 40 linii wsobnych żyta. Zdaniem Iqbal i wsp. (1997) identyfikacja odmian metodą RAPD może wymagać użycia większej liczby starterów. Autorzy ci wykorzystali 49 starterów do odróżnienia 23 odmian bawełny. Poziom polimorfizmu fragmentów RAPD otrzymany w niniejszej pracy był porównywalny z doniesieniami innych autorów dając podstawę do stwierdzenia przydatności metody RAPD do szybkiej i wiarygodnej identyfikacji odmian pszenżyta.

Głównym problemem, na który natrafiają badacze pracujący techniką RAPD jest uzyskanie powtarzalności wyników amplifikacji. Trudności, stwierdzane także i w tej pracy, skłaniają wielu autorów (Iqbal i Rayburn, 1994; Mackill, 1995; Terzi, 1998) do wstępnej weryfikacji markerów i wyboru tylko takich, które wykazują stabilne obrazy elektroforetyczne w powtórzeniach. Zachodzi również konieczność rygorystycznego przestrzegania wcześniej dopracowanych metod amplifikacji DNA (Heun i Helentjaris, 1993). Z powodu wyżej wymienionych trudności liczba markerów analizowanych w niniejszej pracy została ograniczona do 30.

Analiza podobieństwa genetycznego badanych odmian pszenżyta doprowadziła do wyodrębnienia dwóch grup skupień, co wskazuje na odrębność genetyczną zawartych w nich odmian. Obserwowane na dendrogramie grupy na ogół nie odzwierciedlają hipotetycznych związków między odmianami, które wynikają z ich pochodzenia. Odmiany mające po jednym wspólnym komponencie rodzicielskim nie tworzyły ze sobą bezpośrednich skupień na dendrogramie, z wyjątkiem Lamberto i Fidelio. Wydaje się, iż nie wynikało to z charakteru markerów RAPD, które w przypadku badania zróżnicowania linii żyta potwierdziły zależności rodowodowe (Myśków i in., 2001). Należy raczej przypuszczać, że zastosowane markery były w większości zlokalizowane w regionach genomu pochodzących od komponentów rodzicielskich, różnicujących badane odmiany. Wskazuje to na potrzebę objęcia badaniami znacznie większej liczby loci RAPD, tak by zapewnić wykorzystanie polimorfizmu większości chromosomów pszenżyta w ocenie podobieństwa genetycznego.

WNIOSKI

1. Analiza polimorfizmu 30 markerów RAPD wyróżnionych z użyciem 17 starterów pozwala na identyfikację 16 krajowych odmian pszenżyta.
2. Otrzymany dendrogram rozdzielił badane odmiany na dwie główne grupy skupień. Uzyskany podział może stanowić wskazówkę przy doborze materiałów wyjściowych do hodowli nowych odmian pszenżyta.

LITERATURA.

- Caetano-Anolles G. 1996. Scanning of nucleic acids by in vitro amplification: new developments and applications. *Nature Biotechnology* 14: 1668 — 1674.
- Devos K.M., Gale M.D. 1992. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 84: 567 — 572.
- Heun M., Helentjaris T. 1993. Inheritance of RAPDs in F₁ hybrids of corn. *Theor. Appl. Genet.* 85: 961 — 968.
- Hu J., Quiros C.F. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell Rep.* 10: 505 — 511.
- Iqbal J.M., Aziz N., Saeed N.A., Zafar Y. 1997. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 94: 139 — 144.
- Iqbal J.M., Rayburn L.A. 1994. Stability of RAPD markers for determining cultivar specific DNA profiles in rye (*Secale cereale* L.). *Euphytica* 75: 215 — 220.
- Koebner R.M.D. 1995. Predigestion of DNA template improves the level of polymorphism of random amplified polymorphic DNAs in wheat. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 12: 63 — 67.
- Kuczyńska A., Milczarski P., Surma M., Masojć P., Adamski T. 2001. Genetic diversity among cultivars of spring barley revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *J. Appl. Genet.* 42(1): 43 — 48.
- Mackill D.J. 1995. Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers. *Crop. Sci.* 35: 889 — 894.
- Masojć P. 2000. Identyfikacja odmian pszenżyta przy użyciu markerów RAPD. *Folia Univ. Agric. Stetin.* 206 *Agricultura* (82): 179 — 184.
- Myśków B., Masojć P., Banek-Tabor A., Szolkowski A. 2001. Genetic diversity of inbred rye lines evaluated by RAPD analysis. *J. Appl. Genet.* 42, 1: 1 — 4.
- Terzi V. 1998. RAPD markers for fingerprinting barley, oat and triticale varieties. *J. Genet. Breed.* 51: 2, 115 — 120.
- Thomson D., Henry R. 1995. Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. *Biotechniques* 19: 394 — 400.
- 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 Acids Res.* 18: 6531 — 6535.
- Wolko B., Kruszka K. 1997. Molecular diagnostics in plant breeding. *Plant Breed. and Seed Science*, 41, 1: 17 — 39.