

# HODNOCENÍ VARIABILITY PLANÝCH DRUHŮ RODU *SOLANUM* POMOCÍ METODY RAPD

## *Variability Evaluation of Several Wild Species of Genus Solanum Using RAPD Method*

Hana Vlastníková<sup>1</sup>, Petr Sedlák<sup>1</sup>, Zuzana Kocourková<sup>1</sup>, Zuzana Kohutová<sup>1</sup>,  
Jaroslava Domkářová<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Katedra genetiky a šlechtění, ČZU v Praze

<sup>2</sup> VÚB v Havlíčkově Brodě

### Abstract

Seven RAPD primers were used to distinguish of 20 genotypes of several wild potato species. Tested primers were obtained from Operon Technologies, particularly primers OPG 02, OPG 03, OPG 06, OPG 12, OPG 16, OPG 17 and OPAW 15, which provided sufficient number of polymorphic bands. Polymorphic bands were evaluated by bulked analyse using Dice's coefficient number of similarity individual electrophoreograms. Analyses have shown significant differences between tested genotypes. Applicability of this method is limited because of lower reproducibility of RAPD. The method is fit to distinguishing of species if the standard conditions are kept.

**Key words:** *potato, distinguishing of species, DNA, primers, RAPD*

### Souhrn

Metodou RAPD bylo odlišeno 20 genotypů několika planých druhů brambor. Bylo otestováno 7 dekamerních primerů kitu Operon Technologies. Jednalo se o primery OPG 02, OPG 03, OPG 06, OPG 12, OPG 16, OPG 17, OPAW 15, které poskytly dostatečné množství polymorfních zón. Elektroforeogramy byly následně vyhodnoceny shlukovou analýzou na základě Diceho podobnostních koeficientů. Shluková analýza prokázala významné rozdíly mezi testovanými genotypy. Použitelnost metody je však limitována relativně nižší opakovatelností RAPD analýz, přesto ji při dodržení standardních podmínek lze použít pro identifikaci většiny druhů rodu *Solanum*.

### Úvod

Lilek hlíznatý (*Solanum tuberosum* L.) patří celosvětově mezi velmi významné hlíznaté okopaniny. Naprostá většina odrůd botanicky přísluší k poddruhu *tuberosum*. Rod lilek je rozdělen na celou řadu sekcí, podsekcí a sérií. Rozdělením rodu *Solanum* na tyto systematické kategorie popisuje např. Hoekstra (2000). V rodu *Solanum* se nacházejí druhy diploidní, triploidní, tetraploidní, pentaploidní i hexaploidní (Rybáček *et al.* 1988). *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* a *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* jsou druhy tetraploidní, jedna z hypotéz předpokládá, že vznikly v oblasti dnešní Jižní Ameriky procesem tetraploidizace z botanického druhu *S. vernei* a následným prokřížením těchto původních forem (Rybáček *et al.* 1988). Hawkes (1994) vysvětluje vznik domestikovaných forem bramboru odlišným způsobem – a to křížením *S. leptophyes* a *S. canasence* a následnou záměrnou negativní selekcí zaměřenou na eliminaci rostlin s hořkými hlízami prováděnou člověkem. Tímto způsobem popisuje vývoj prvních kulturních diploidních druhů, pojmenovaných *S. stenotomum* a *S. phureja*. Jiná teorie vzniku *S. tuberosum* ssp. *andigena* uvádí například možnost podílu hybridizace *S. stenotomum* x *S. sparsipilum*. Následný vývoj v poddruhu *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* byl spojen s adaptací na dlouhodobé podmínky letního období v Evropě (Vejl, 2002),

Ostatní botanické druhy jsou v současné době využívány zejména pro vnášení genů odolnosti k různým abiotickým a biotickým stresům

## Literární přehled

Nesporným úspěchem produkčního šlechtění je, že v optimálních podmínkách se teoretický výnosový potenciál brambor může pohybovat až kolem 120t/ha. V běžné praxi se však tohoto maxima zřídka kdy dosáhne, a to především z důvodu, že u současných vysoce produkčních odrůd, šlechtěných převážně na maximální výnosnost, došlo k výraznému snížení přirozené odolnosti vůči chorobám a škůdcům. Tento fakt vedl k vytvoření názoru, že by se moderní šlechtění mělo ve větší míře zaměřit na zvyšování odolnosti brambor vůči vlivům abiotických a biotických stresů. Těchto cílů se snaží dosáhnout tzv. rezistentní šlechtění orientované na zlepšení přirozených mechanismů obrany na bázi geneticky fixovaných vlastností.

Nedostatek rezistencí vůči chorobám a škůdcům u evropských odrůd vedl k mnohým sběratelským výpravám počátkem 20.století do center původu. Bylo celosvětově založeno několik kolekcí genetických zdrojů brambor.

Již v roce 1909 Salaman identifikoval rezistenci vůči plísni bramboru u hybridu *S. tuberosum* x *S. demissum* (Muller, Black, 1951). Odolné "W-klony" produkované stejnou technikou byly v sortimentu německých odrůd přibližně ve stejné době (Ross, 1979). Manipulací ploidie se zřetelem na parametr EBN („endosperm balance number“), umožňuje využití širšího spektra druhů brambor pro vnesení genů do *Tuberosum* (Hawkes, 1992, Ortiz, 1992). Možnosti využití genů rezistence může rovněž rozšířit somatická hybridizace (fúze protoplastů). Je překvapivé, že relativně málo druhů bylo doposud využito ve šlechtění moderních odrůd (Ross, 1986, Plaisted, 1989). Jedná se především o druhy *S. demissum* (zdroj rezistence vůči plísni bramboru, vůči viru PLRV), *S. acaule* (PVX, PLRV, PSTV, rakovina brambor, hřadátka bramborové, mrazuvzdornost), *S. chacoense* (PVA, PVY, plíseň bramboru, mandelinka bramborová), *S. spegazzinii* (*Fusarium*, rakovina brambor, hřadátka bramborové), *S. stoloniferum* (PVA, PVY) a *S. vernei* (hřadátka bramborové). Příležitostně byly využity i druhy *S. microdontum*, *S. sparsipilum*, *S. verrucosum*, *S. phureja*, *S. tuberosum* ssp. *andigena*, *S. commersonii* a *S. maglia*. Využívání planých druhů bramboru při křížení zhoršuje některé hospodářské vlastnosti (výnos, stolní hodnotu, morfologii a velikost hlíz apod.). Tyto nedostatky musí šlechtitel překonat zpětným křížením. Další alternativou vnesení pouze žádoucích genů je užití genového inženýrství, využití přímé či nepřímé transgenozy. Song *et al.* (2003) takto přenesli gen RB pocházející z *S. bulbocastanum* do *S. tuberosum* přičemž transgenní rostliny vykazovaly zvýšenou odolnost k napadení plíší bramboru. Transgenozí byly též vytvořeny odrůdy New Leaf a New Leaf Plus (Monsanto) odolné k viru PVY a mandelince bramborové.

Při odlišování genotypů brambor se velice často používá metoda RAPD (Random amplified polymorphic DNA) založená na amplifikaci specifických fragmentů DNA. Hosaka *et al.* (1994) použil 31 RAPD markerů pro vzájemné odlišení 67 odrůd z celkového počtu 73 genotypů. Sosinski a Douches (1996) hodnotili rozlišovací schopnost 16 RAPD primerů a vybrali 10 primerů, které poskytly specifické produkty u 46 severoamerických genotypů brambor. Identifikací planých druhů a hledáním zdrojů rezistence se zabýval také například Kuhl (2001). Demeke *et al.* (1993) taktéž dospěl k názoru, že RAPD „fingerprinting“ je ve srovnání s RFLP analýzou výrazně rychlejší a levnější.

## Metodika

### Biologický materiál

Testovaný materiál byl získán z kolekce genotypů genové banky při Výzkumném ústavu bramborářském Havlíčkův Brod. Jednalo se o genotypy několika botanických druhů brambor (seznam testovaných genotypů je uveden v tab. 1).

## Izolace DNA

DNA byla izolována z *in vitro* kultur pomocí komerčního kitu DNeasy Plant MiniKit od firmy Qiagen z výchozí hmotnosti rostlinného pletiva 100mg.

## Amplifikace DNA

DNA byla amplifikována v termocykleru T-gradient (Biometra, Německo). Pro získání polymorfních zón bylo použito 7 oligonukleotidových sekvencí z kitu firmy Operon Technologies: OPG 02, OPG 03, OPG 06 5, OPG 12, OPG 16, OPG 17, OPAW 15 (jednotlivé sekvence viz. <http://operon.com>)

Složení 25µl reakční směsi bylo následující: 10 ng templátové DNA, 0,7U Taq DNA polymeráza (Sigma, Německo), 1x PCR pufr, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM dNTP, 25ng primer, 2x deionizovaná voda.

Časově teplotní profil RAPD reakce byl nastaven takto: 1x 94 °C, 260s, 40x (94°C, 30s denaturace, 36,5 °C, 45s annealing primerů, 72 °C, 90 s extenze), 1x 72°C, 300s

## Elektroforetická separace a vizualizace

Produkty RAPD reakce byly separovány v horizontálním, 1,5 % agarózovém gelu. K separaci bylo použito zařízení firmy Bio-Rad (USA). Elektroforeogramy byly vizualizovány dle standardních protokolů ethidium bromidem a pod UV zářením dokumentovány pomocí kamery Polaroid. Pořízené snímky byly následně digitalizovány na stolním scanneru a vyhodnoceny pomocí programu GelManager for Windows. Podobnost jednotlivých drah byla hodnocena na základě přítomnosti („1“) či absence („0“) „bandu“ v každé zóně odpovídající každému amplifikovanému polymorfnímu fragmentu DNA pomocí Diceho podobnostních koeficientů. Byly porovnány všechny získané elektroforeogramy a vypracována shluková analýza, jejímž výsledkem je přiložený dendrogram.

**Tab. 1: Seznam testovaných genotypů**

| číslo vzorku: | druh:                        |
|---------------|------------------------------|
| 1.            | <i>Solanum phureja</i>       |
| 2.            | <i>Solanum demissum</i>      |
| 3.            | <i>Solanum demissum</i>      |
| 4.            | <i>Solanum demissum</i>      |
| 5.            | <i>Solanum berthaultii</i>   |
| 6.            | <i>Solanum berthaultii</i>   |
| 7.            | <i>Solanum berthaultii</i>   |
| 8.            | <i>Solanum berthaultii</i>   |
| 9.            | <i>Solanum berthaultii</i>   |
| 10.           | <i>Solanum berthaultii</i>   |
| 11.           | <i>Solanum tuberosum</i>     |
| 12.           | <i>Solanum tuberosum</i>     |
| 13.           | <i>Solanum tuberosum</i>     |
| 14.           | <i>Solanum tuberosum</i>     |
| 15.           | <i>Solanum tuberosum</i>     |
| 16.           | <i>Solanum pinnatisectum</i> |
| 17.           | <i>Solanum microdontum</i>   |
| 18.           | <i>Solanum verucosum</i>     |
| 19.           | <i>Solanum vernei</i>        |
| 20.           | <i>Solanum stoloniferum</i>  |

## Výsledky a diskuse

Z celkového počtu 10 prumerů bylo vybráno 7 dekamerických prumerů, které umožnily vzájemně odlišit jednotlivé botanické druhy. Pro identifikaci byly použity primery sady Operon Technologies (USA). Genetická vzdálenost byla hodnocena na základě pouze těch RAPD produktů, které se vyznačovaly reprodukovatelností amplifikace a zároveň optimálně vyjadřovaly variabilitu testovaného souboru genotypů.

**Obrázek 1: Elektroforeogram RAPD produktů – primer OPAW 15**



Pozn.: S – hmotnostní standard  $\lambda$ DNA/Eco47I(AvaII)

*Označení genotypů je uvedeno v tabulce 1.*

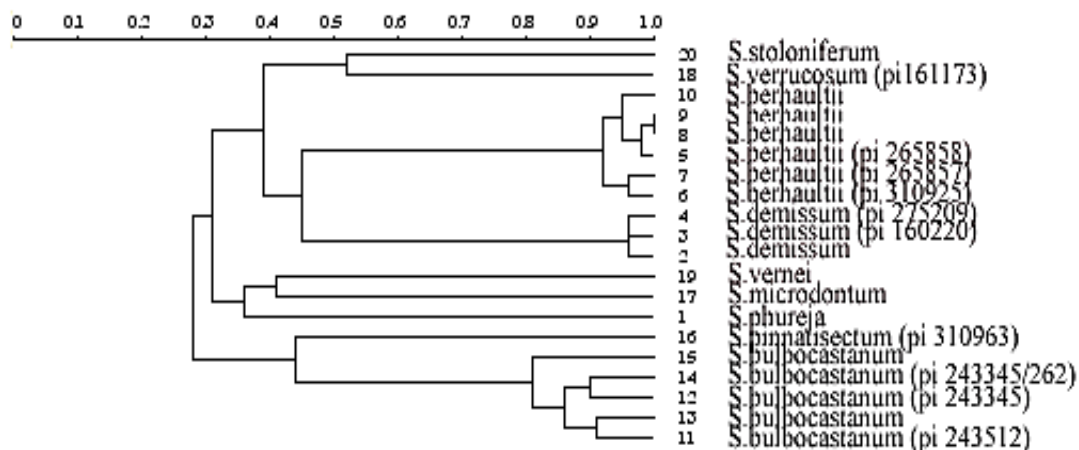
Vstupní údaje zadávané do programu GelManager for Windows vycházely pouze z druhově specifických polymorfních zón. RAPD zóny, které nevykazovaly mezi jednotlivými testovanými druhy polymorfismus, nebyly pro hodnocení použity. Toto kritérium bylo rovněž zachováno při hodnocení zón, které byly jen slabě amplifikovány a nebylo možné je reprodukovatelně identifikovat.

**Tab. 2: Matice Diceho podobnostních koeficientů vyjadřující podobnost (%) mezi RAPD profily jednotlivých analyzovaných genotypů (seznam genotypů s příslušnými čísly viz. tab. 1)**

|    |     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |    |
|----|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|----|
| 20 | 100 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  | </ |
|----|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|----|

V tabulce (tab. 2.) jsou uvedeny hodnoty Diceho podobnostních koeficientů, které byly získány vyhodnocením všech polymorfních zón. Hodnoty Diceho podobnostních koeficientů byly použity pro sestavení dendrogramu uvedeného na obrázku 2.

**Obrázek 2: Dendrogram vyjadřující genetickou vzdálenost získaný na základě vyhodnocení všech polymorfních RAPD zón (příbuznost) testovaných genotypů**



V důsledku složité reakční kinetiky je RAPD velmi citlivá na reakční podmínky, které mohou způsobit velké rozdíly v reprodukovatelnosti výsledků. Jedním z hlavních faktorů je druh a koncentrace termostabilní polymerázy, koncentrace tohoto enzymu pro RAPD je v rozmezí 2-5U /100μl objemu, obecně platí, že s růstem koncentrace roste i počet amplifikovaných produktů, při velmi vysoké koncentraci již však vznikají nereprodukovatelné fragmenty (Caetano-Anollés, 1992). Důležitým faktorem pro specifičnost amplifikace je též volba „analační“ teploty a časových parametrů amplifikace. Obecně platí, že vyšší teplota zaručuje vyšší specifičnost hybridizace mezi primerem a templátovou DNA a tím se snižuje frekvence nespecifických amplifikací. Waugh *et al.* (1992) uvádí optimální „analační“ teplotu 35°C, Singsit a Ozias-Akins (1993) 36°C, Mandolino *et al.* (1996) 38°C, Caetano-Anollés (1992) pozoroval, že s rostoucí teplotou dochází k zjednodušování RAPD spektra a to především v důsledku úbytku slabých zón. Z výše uvedeného plyne, že optimální teplota se pohybovala mezi 35-38°C. Při provádění RAPD analýz v této práci byla zvolena teplota 36,5°C.

Pro statistické zhodnocení mezidruhové variability byla provedena shluková analýza vycházející z Diceho podobnostních koeficientů a následným grafickým vyjádřením genetické vzdálenosti pomocí dendrogramu. Markerovací schopnost RAPD zón lze též hodnotit například jejich relativní četností výskytu u jednotlivých genotypů (Demeke *et al.*, 1993).

Z uvedeného dendrogramu je patrné, že soubor genotypů lze rozdělit do několika skupin z hlediska jejich genetické vzdálenosti. Vzniklo 5 „shluků“ genotypů a to: 1.skupina zahrnující *S. stoloniferum* a *S. verrucosum*, 2.skupina *S. berthaultii*, 3.skupina *S. demissum*, 4.skupina *S. vernei*, *S. microdontum* a *S. phureja*, 5.skupina *S. bulbocastanum* a *S. pinnatisectum*.

## Závěr

Na základě uvedených výsledků lze vyvodit, že zvolený metodický postup a vybrané oligonukleotidové primery umožnily spolehlivě odlišit genotypy jednotlivých testovaných botanických druhů rodu *Solanum*. V průběhu experimentů se potvrdilo, že je nezbytné dodržet standardní podmínky pro dosažení opakovatelných RAPD profilů vhodných pro odlišení genotypů. Pro případné využití metody se doporučuje optimalizace podmínek pro konkrétní laboratorní podmínky.

Hodnocením variability druhů rodu *Solanum* se zabýval i J.G. Hawkes (citace Bradshaw, J. E., Mackay, G.R., 1994). Ve své práci uvádí třídění primárně založené na základě morfologických znaků a křížitelnosti (stupně ploidity) jednotlivých druhů. Rod *Solanum* rozčlenil na 2 subsekcce („*Estolonifera*“

a „*Potatoe*“). Subsekce *potatoe* je dále tříděna na 19 serií, přičemž druhy testované v rámci této analýzy spadají do těchto serií:

1. Bulbocastana: *S. bulbocastanum*(2x, 3x)
2. Pinnatisecta: *S. pinnatisectum* (2x)
3. Tuberosa (plané): *S. berthaultii* (2x), *S. microdontum*. (2x, 3x), *S. vernei* (2x), *S. verrucosum* (2x)
4. Tuberosa (kulturní): *S. phureja* (2x)
5. Longipedicellata: *S. stoloniferum* (4x)
6. Demissa: *S. demissum* (6x)

Pozn.: ( $x = 12$ )

Genetické vzdálenosti testovaných genotypů vycházející z provedené RAPD analýzy se shodují se závěry, které uvádí Bonierbale et al. (1990), který pomocí metody RFLP porovnával 18 planých druhů brambor. K podobným výsledkům dospěl i Spooner et al. (1991). Taxonomickým tříděním diploidních planých druhů brambor pomocí AFLP se zabývali též Lara-Cabrera a Spooner (2004).

## Literatura

Přehled citované literatury je k dispozici u autora.

***Práce byla finančně podporována grantovým projektem QF 4107 „Vývoj metod identifikace a charakterizace donorů rezistence k plísni bramborové v genofondu bramboru pomocí DNA markerů a biologického testu v in vitro podmínkách“.***

---

Kontaktní adresa autora: Ing. Hana Vlastníková, Katedra genetiky a šlechtění, ČZU v Praze, Kamýcká 957, 165 21 Praha 6 – Suchbátka, E-mail: vlastnikova@af.czu.cz