

ODLIŠENÍ ODRŮD PŠENICE OBECNÉ *TRITICUM AESTIVUM* L. METODOU RAPD

Distinguishing of Wheat Varieties (Triticum aestivum L.) by Method RAPD

Zuzana Kohutová, Zuzana Kocourková, Hana Vlastníková, Petr Sedlák
Katedra genetiky a šlechtění, ČZU v Praze

Abstract

The RAPD method was used to distinguish sixteen varieties of common wheat. Four primers – decameric oligonucleotides were selected as genotype-specific RAPD products. It concerned these following primers: OPC5, P49, RAPD7, RAPD9. For these analyses were optimised method of DNA isolation, amplification conditions and visualisation of electrophoreograms. All statistical evaluation was done using GelManager for Windows computer program. Genotype variability was expressed by bulked analyse by Dice coefficient of similarity.

Key words: *wheat, Triticum aestivum, RAPD, primers, varieties*

Souhrn

Metoda RAPD byla použita pro odlišení šestnácti odrůd pšenice obecné. Byly vybrány čtyři primery – dekamerické oligonukleotidy, které poskytovaly genotypově specifické RAPD produkty. Jednalo se o primery OPC5, P49, RAPD7, RAPD9. Pro tyto analýzy byla optimalizována metoda izolace DNA, podmínky amplifikace a vizualizace elektroforeogramů. Pro veškeré statistické vyhodnocení byl použit program GelManager for Windows. Genotypová variabilita byla vyjádřena pomocí shlukové analýzy na základě Diceho podobnostních koeficientů.

Úvod

Pšenice obecná (*Triticum aestivum* L.) představuje v celosvětovém měřítku jednu z nejvýznamnějších obilovin. Produkce této plodiny zajišťuje nejen výživu obyvatelstva, ale je rovněž důležitou součástí krmiv hospodářských zvířat a významnou vstupní surovinou pro řadu odvětví zpracovatelského průmyslu (Benada *et al.*, 1981). Tato studie představuje využití genetických markerů založených na polymorfismu DNA pro odlišení odrůd pšenice obecné, kterou lze z hlediska obecné molekulární genetiky považovat za jeden z modelových druhů s dobře popsáním genomem. Genetická a šlechtitelská pracoviště na celém světě se zabývají vypracováním metody identifikace odrůd s využitím biochemicko-genetických markerů. Tyto snahy jsou zapříčiněny hlavně neustále se zvyšujícím počtem odrůd. Zejména RAPD markery byly úspěšně využity pro identifikaci odrůd mnoha zemědělských plodin a při zjišťování genetické variability v rámci druhů nebo i mezi druhy.

Literární přehled

K aplikaci PCR markerů u pšenice a ostatních hospodářsky významných plodin vede obtížnost rozlišení odrůd v podobě semen či sadby pomocí morfologických znaků. Dosud používané metody k identifikaci odrůd jsou neekonomické a zejména v podobě vegetačních zkoušek velmi časově náročné. Detekce rozdílu mezi genotypy na úrovni druh, poddruh, odrůda, linie atd. na základě odlišnosti DNA, zjištěné za pomoci PCR markerů, označujeme termínem „fingerprinting“. Pro tento odrůdový „fingerprinting“ bývá od 90. let 20. století velice často používána metoda RAPD (Vejl, 2002).

Na základě těchto genetických markerů můžeme také určit vyrovnanost F_1 hybridů, stupeň homozygotnosti a zajistit tak požadovanou uniformitu odrůdy (Rom *et al.*, 1995)

RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) představuje amplifikaci DNA s jedním náhodným primerem (přibližně 6 – 12 bází) náhodně hybridizujícím s templátovou DNA. Reakce probíhá za přítomnosti jednoho krátkého oligonukleotidu (8 – 10 nukleotidů) s náhodně vybranou sekvencí bazí, genomové DNA, směsi nukleotidů dNTP, reakčního pufru a termostabilní DNA polymerázy. Amplifikace je rozdělena do třech základních kroků: denaturace templátové DNA, nasedání primerů tzv. „annealing“ a prodlužování nově vznikajícího řetězce DNA. RAPD na rozdíl od specifické PCR nevyžaduje znalost cílových sekvencí DNA (Řepková a Relichová, 2001).

Výhoda RAPD spočívá ve velké rychlosti analýz a detekci polymorfismů a v možnosti testování vysokého počtu primerů současně. Nevýhodou metody je detekce převážně dominantních markerů, detekce odlišných lokusů při odlišných kříženích a velká závislost na typu termocykleru a podmínkách amplifikace (Gale a Witcombe, 1992).

Caetano-Anollés *et al.* (1997) poukazují na omezení a nevýhody uplatnění RAPD analýzy. Především na nízkou reprodukovatelnost výsledků, odlišné výsledky z různých laboratoří a variabilitu výsledků způsobenou změnami v termálním cyklu.

RAPD markery v genetice pšenice použili například Demeke *et al.* (1996), Dweikat *et al.* (1993), Francis *et al.* (1995), Joshi a Nguyen (1993), Ko *et al.* (1993), Loarce (1993), Vejl (1997a), Vejl (1997b).

Metodika

Biologický materiál

Pro RAPD analýzy bylo použito 16 genotypů pšenice obecné (*Triticum aestivum* L.). Jednalo se o tyto odrůdy: Apache (1), Banquet (2), Complet (11), Corsaire (3), Drifter (4), Ebi (5), Mladka (12), Nela (13), Rheia (14), Rialto (6), Samanta (15), Sandra (7), SG-S5-02 (8), Sparta (9), Sulamit (16), Zdar (10).

Izolace DNA

Izolace DNA byla prováděna pomocí komerčně dodávaného izolačního kitu DNeasy Plant Mini Kit od firmy Qiagen a kitu Plant Gene Elute od firmy Sigma. K izolaci byly používány listy klíčnicích rostlin.

Kvalita izolované DNA (vysokomolekularita) byla ověřena pomocí elektroforetické separace v 1% agarózovém gelu na horizontální elektroforéze. Vyizolovaná DNA byla kvantifikována pomocí UV-spektrofotometru a poté ředěna na koncentraci 10 ng.μl⁻¹.

Amplifikace DNA

Polymerázová řetězová reakce probíhala v termocykleru T-gradient (Biometra, Německo). Byly vybrány 4 primery, které poskytovaly u souboru dvaceti odrůd polymorfní RAPD produkty. Jednalo se o tyto primery: OPC5, P49, RAPD7 a RAPD9.

Pro RAPD reakci bylo chemické složení následující: 10 ng templátové DNA, 30 ng primeru, 1x PCR pufr, 2,5 mM MgCl₂, 200 μM dNTP, 1U *Taq* polymerázy. Reakční směs byla převrstvena 17 μl minerálního oleje. Pro RAPD byl použit námi optimalizovaný teplotní a časový profil uvedený v tabulce 1.

Elektroforetická separace RAPD produktů a počítačová analýza elektroforeogramů

Pro separaci amplifikovaných fragmentů DNA byla použita horizontální 1,5 % agarózová elektroforéza (přístroj firmy Bio Rad, USA). Vizualizaci umožňuje přítomnost ethidium bromidu v agarózovém gelu a prosvícení na UV transiluminátoru paprsky o vlnové délce 312 nm. Agarózové gely není možno uchovávat, proto byla pořízena fotodokumentace fotokamerou Polaroid. Byl použit

grafický způsob zadávání binárních dat (přítomnost-absence polymorfní zóny) do programu GelManager for Windows, který umožnil komplexní vyhodnocení variability. Byly porovnány všechny získané elektroforeogramy a vypracována shluková analýza, ze které jsme získali dendrogram a podobnostní matice Diceho koeficientu.

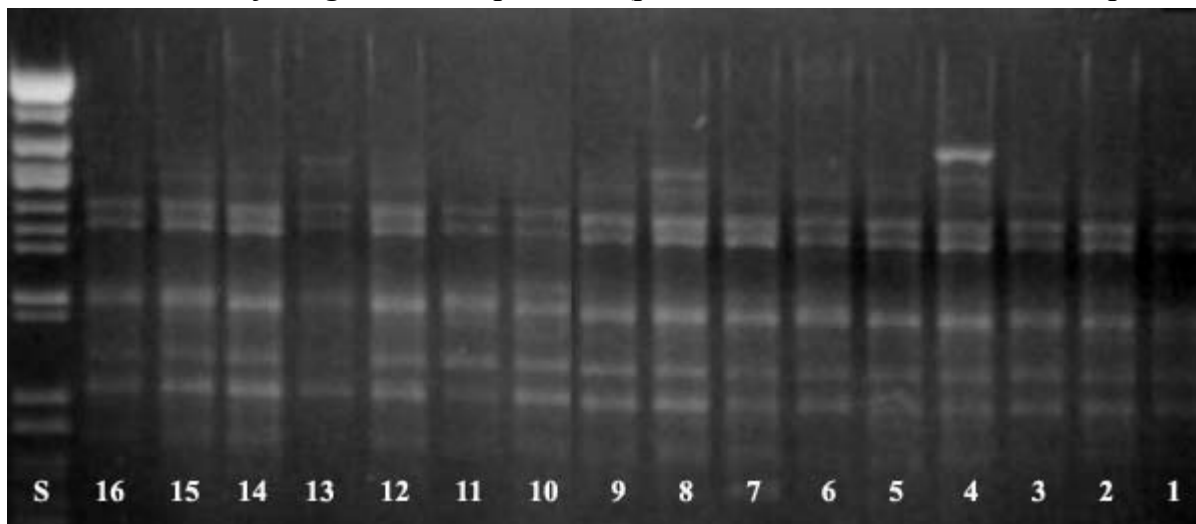
Tabulka 1: teplotně časový profil optimalizované RAPD reakce

Kroky RAPD	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
počáteční denaturace	94,0	260	1
denaturace	94,0	30	39
„annealing“	37,8	45	39
prodlužování	72,0	90	39
závěrečné prodlužování	72,0	300	1
uchování produktů	4,0	max.	1

Výsledky a diskuse

Výsledkem izolace DNA byla vysokomolekulární DNA, která byla otestována a po kvantifikaci naředěna na koncentraci 10 ng.μl⁻¹. Otestovaná DNA byla použita pro reakci náhodné amplifikace polymorfní DNA – RAPD. Bylo vyzkoušeno 42 primerů, z nichž 33 za daných podmínek reakce amplifikovalo a pouze 4 primery poskytly genotypově specifické RAPD zóny. Pro specifčnost amplifikace jsou důležitým faktorem „annelační“ teplota a časový profil RAPD reakce. Různí autoři uvádí rozdílné „annelační“ teploty v intervalu 35 °C – 38 °C. Pro získání výsledků v této práci byla použita teplota 37,8 °C. Z elektroforeogramů RAPD polymorfních produktů jednotlivých odrůd byl vyhodnocen rozsah genotypové variability zadáním údajů do programu GelManager for Windows, jehož výsledkem byla matice Diceho podobnostních koeficientů (tabulka 2). Ta byla použita pro sestavení dendrogramu. Joshi a Nguyen (1993) charakterizovali pomocí RAPD markeru 15 odrůd pšenice obecně, Gonzalez a Ferrer (1993) provedli RAPD analýzu 19 druhů a poddruhů rodu *Hordeum* a RAPD markery využili pro identifikaci odrůd také Loarce et al. (1996), Vierling a Nguyen (1992) a Vejl (1997a).

Obrázek 1: Elektroforeogram RAPD produktů (primer RAPD7 u souboru 16 odrůd pšenice)

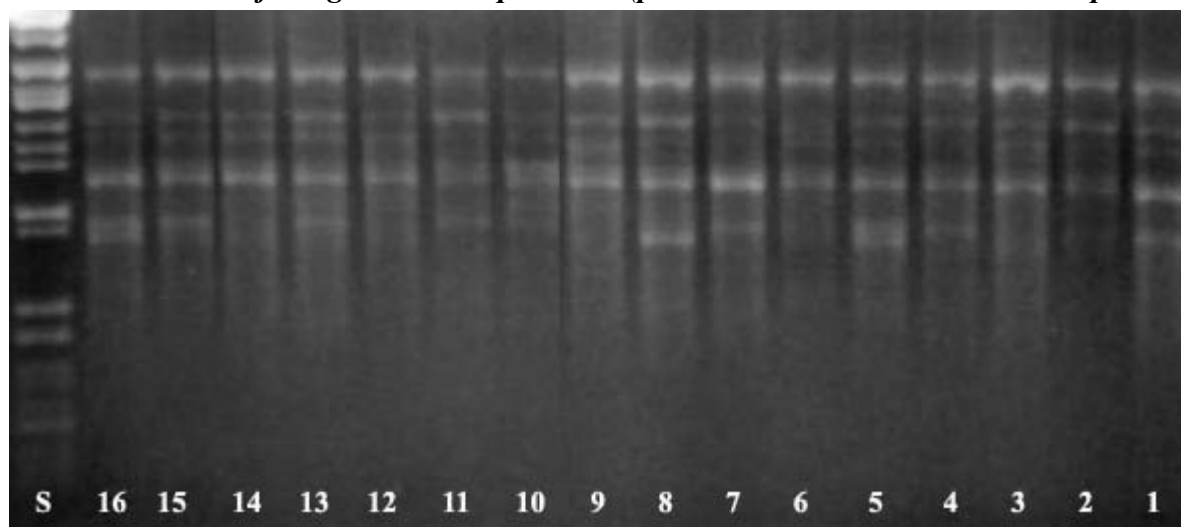


Pozn.:

S – hmotnostní standard λDNA/Eco47I (AvaII)

Označení genotypu je uvedeno v kapitole metodika

Obrázek 2: Elektroforeogram RAPD produktů (primer OPC5 u souboru 16 odrůd pšenice)



Pozn.:

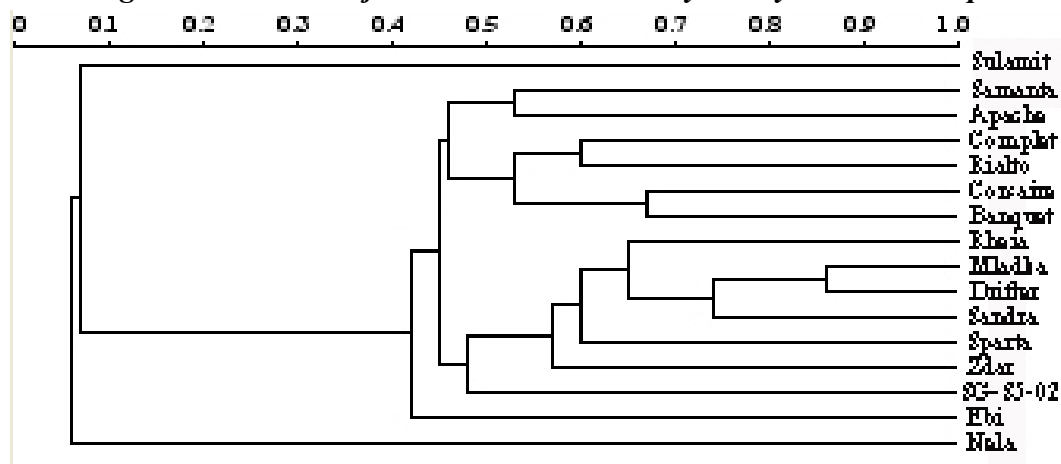
S – hmotnostní standard λ DNA/Eco47I (AvaII)

Označení genotypu je uvedeno v kapitole metodika

Tabulka 2: Matice Diceho podobnostních koeficientů vyjadřující podobnosti v % mezi RAPD profily analyzovaných odrůd pšenice. Označení genotypu je uvedeno v kapitole metodika

16	100																
15	0	100															
14	0	43	100														
13	0	22	0	100													
12	0	55	67	0	100												
11	40	33	60	0	57	100											
10	0	33	40	0	57	25	100										
9	0	53	46	0	60	36	55	100									
8	25	27	46	0	40	55	55	43	100								
7	0	57	67	29	67	40	60	62	46	100							
6	0	57	50	0	44	60	20	46	31	33	100						
5	0	40	46	0	40	36	36	43	43	31	46	100					
4	0	50	60	0	86	50	75	73	55	80	40	36	100				
3	0	50	57	22	55	50	33	40	53	57	43	40	50	100			
2	0	53	62	0	60	55	36	43	43	46	62	57	55	67	100		
1	25	53	46	0	40	36	36	29	43	31	31	43	36	40	57	100	
	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	

Obrázek 3: Dendrogram charakterizující variabilitu mezi analyzovanými odrůdami pšenice



Z uvedeného dendrogramu je patrné, že mezi odrůdami Mladka a Drifter je nejnížší genotypová variabilita. Největší genetická vzdálenost od ostatních genotypů byla prokázána u odrůdy Sulamit.

Závěr

Výsledky experimentů, které sledovaly možnost využití RAPD markerů při odlišení jednotlivých odrůd pšenice obecné, potvrzují, že metoda RAPD je vhodným postupem pro řešení této problematiky. Pro odlišení šestnácti odrůd byly dostačující 4 primery poskytující polymorfní produkty. Pro spolehlivé odlišení rozsáhlejšího souboru odrůd bude navrženo otestovat a vybrat větší množství primerů, jejichž výsledkem budou polymorfní zóny vhodné pro vyhodnocení. Nevýhodou je relativně vysoká citlivost metody, a proto je vhodné metodu vždy optimalizovat pro dané laboratorní podmínky.

Literatura

Přehled citované literatury je k dispozici u autora.

Práce je podporována výzkumným záměrem MSM 412100002 a grantovým projektem QF4190.

Kontaktní adresa autora: Ing. Zuzana Kohutová, Katedra genetiky a šlechtění, ČZU v Praze, Kamýcká 957, 165 21 Praha 6 – Suchbát, E-mail: kohutova@af.czu.cz