

**Lukasz Aleksandrak, Zbigniew Broda**

Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

## **Badanie polimorfizmu „rzepakochwastów” za pomocą markerów RAPD\***

### **„Rapeseed-like weeds” polymorphism detected with RAPD markers**

Słowa kluczowe: rzepakochwast, polimorfizm DNA, RAPD

W ostatnich latach obserwuje się występowanie na plantacjach rzepaku ozimego roślin odbiegających wyglądem od typowego morfotypu roślin uprawianych na danym polu. Pojawienie się ich powoduje obniżenie wartości surowca dostarczanego dla potrzeb przemysłu tłuszczowego ze względu na podwyższoną zawartość kwasu erukowego. Z tego powodu podjęto próbę charakterystyki tych roślin pod względem molekularnym. Badanie przeprowadzono za pomocą metody RAPD przy użyciu wcześniej wyselekcjonowanych 25 starterów. Badanie pozwoliło na podział roślin na kilka grup o różnym stopniu zróżnicowania genetycznego. Podział na poszczególne grupy pokrywał się z miejscem pochodzenia roślin. Podobieństwo genetyczne badanych roślin było zróżnicowane i wahało się od 40 do blisko 90%.

Key words: rapeseed-like weed, polymorphism DNA, RAPD

The occurrence of plants whose morphological appearance is different from the typical morphotype of plants cultivated on a given field has been recently observed in oilseed rape plantations. They show a higher amount of erucic acid, which causes devaluation of material delivered for oil industry. For this reason some molecular analyses were undertaken. The research was performed with RAPD method using 25 primers selected earlier. This study allowed for the division of plants into a few groups of different genetic variability levels. This division was consistent with plants origin. Genetical similarity of analysed plants was different and ranged from 40 to 90%. On the basis of the analyses made so far we may suspect that a part of analysed accessions is probably a turnip-like rape, and a part belongs to varieties of oilseed rape earlier than this cultivated on a field which they came from.

## **Wstęp**

W ostatnich latach obserwuje się występowanie na plantacjach rzepaku ozimego roślin różniących się wyglądem od typowego morfotypu rzepaku. Pojawienie się tych roślin powoduje obniżenie wartości surowca dostarczanego dla potrzeb przemysłu tłuszczowego ze względu na podwyższoną zawartość kwasu eruko-

---

\* Praca finansowana częściowo ze środków KBN w ramach projektu badawczego nr 2 P06 A02126

wego. Z tego powodu podjęto próbę charakterystyki tych roślin pod względem molekularnym. Celem badania jest określenie zróżnicowania genetycznego pomiędzy rzepakochwastami, a także dystansu genetycznego pomiędzy rzepakochwastami a rzepakiem i rzepikiem. Jedną z coraz częściej stosowanych metod jest technika losowej amplifikacji polimorficznego DNA (RAPD), którą wykorzystano w niniejszej pracy. Metoda ta stosowana jest do mapowania genetycznego (Williams i in. 1990) oraz oceny dystansu genetycznego i badania polimorfizmu wewnątrz- i międzygatunkowego (Hu i Quiros 1991, Sun i in. 1998).

## Material i metody badań

---

Material badawczy stanowi potomstwo roślin o morfotypie rzepiku oraz roślin o morfotypie rzepaku wykazujących wczesność kwitnienia. Pochodzą one z plantacji rzepaku ozimego (odmiana Lisek) z różnych rejonów Polski.

Małyszyn – woj. lubuskie: A373 (25), A379 (24), A386 (23), A389 (22),  
8000 (21), 8001 (20)

Pisarzowice – woj. śląskie: AG2 (18), AG3 (17), AG4 (16), AG5 (15)

Modzurów – woj. śląskie: Mo3 (10), Mo5 (11), Mo12 (12), Mo13 (13), Mo14  
(14)

Krzywizna – woj. opolskie: K32 (7), K34 (8), K35 (9)

woj. dolnośląskie: M1 (19)

Jako material porównawczy posłużyły odmiany rzepaku ozimego: Lisek (6), Brink (2) i jarego: Profit (5) oraz rzepiku ozimego: Ludowy (4) i jarego: Torpe (3) oraz Brachina (1).

Izolację DNA wykonano z młodych liści według metody Dellaporta (1983). Liście umieszczono w probówce Eppendorfa i włożono na około 5 minut do ciekłego azotu, następnie próbówki umieszczono w lodzie dodając 0,5 ml buforu BE i rozcierano liście homogenizatorem, po roztarciu tkanki dodawano 33  $\mu$ l 20% SDS. Przeprowadzono proces inkubacji w łaźni wodnej w temperaturze 65°C przez 40 minut, a następnie do próbówki dodano 165  $\mu$ l 5M CH<sub>3</sub>COOK i pozostawiono na około 30 minut. Wirowano przez 15 minut w wirówce (13 000 obr./min.), zebrano supernatant. Do supernatantu dodano 0,7 objętości izopropanolu. Probówki umieszczono w zamrażarce w temperaturze –20°C na 20 minut. W kolejnym etapie wirowano przez 15 minut, zlewano supernatant do sucha. Otrzymany osad przepłukano 70% etanolem (500  $\mu$ l) o temperaturze –20°C. Probówki przeniesiono do pompy próżniowej na 5 minut. Po osuszeniu osadu dodano dejonizowaną H<sub>2</sub>O (100  $\mu$ l) i pozostawiono w temperaturze pokojowej do następnego dnia.

Do badania użyto 25 starterów ujawniających polimorfizm, które wyselekcjonowano z 50 starterów firmy Operon Technologies.

Skład mieszaniny reakcyjnej w objętości 12,5  $\mu$ l:

— woda dejonizowana	9,75 $\mu$ l,
— Tris HCl 1 M pH 8,3	0,125 $\mu$ l,
— 25 mM MgCl <sub>2</sub>	1,0 $\mu$ l,
— BSA	0,0625 $\mu$ l,
— 2 mM dNTP	0,625 $\mu$ l,
— starter	0,25 $\mu$ l,
— Taq polimeraza	0,187 $\mu$ l,
— ekstrakt DNA	0,5 $\mu$ l.

Do amplifikacji DNA wykorzystano termocykler T3 firmy Biometra ustawiony na następujący program:

denaturacja wstępna	— 94°C – 1 min;
pierwsze 10 cykli:	
denaturacja	— 94°C – 5 s,
przyłączanie starterów	— 37°C – 30 s,
amplifikacja	— 72°C – 30 s;
dalsze 35 cykli	
denaturacja	— 94°C – 5 s,
przyłączanie starterów	— 37°C – 30 s,
amplifikacja	— 72°C – 60 s.

Elektroforezę produktów PCR przeprowadzono w 1,5% żelu agarozowym, w buforze TBE 1x, przy napięciu 100 V i natężeniu 200 mA. Wzory prążkowe wizualizowano bromkiem etydyny dodając 1,0  $\mu$ l na 50 ml żelu.

Wyniki analizowane były przy użyciu programu UVIMAP (Ver 99) według wzoru Nei i Li (1979):

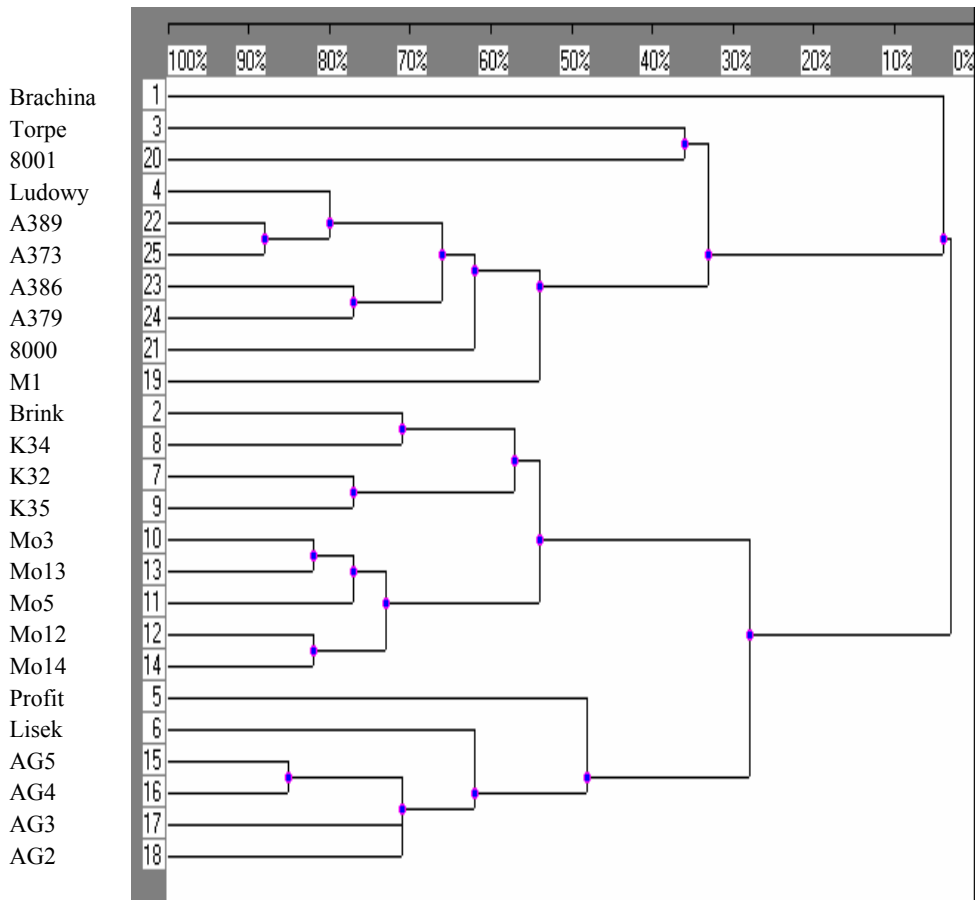
$$A = 2n_{xy} / (n_x + n_y),$$

gdzie  $2n_{xy}$  oznacza prążki występujące w obu genotypach, zaś  $n_x$  oraz  $n_y$  oznaczają prążki charakterystyczne dla danego genotypu. Analizy wykonane zostały z przedziałem ufności 0,05.

## Wyniki i dyskusja

---

Przy zastosowaniu wcześniej wyselekcjonowanych 25 starterów uzyskano dendrogram ukazujący stopień podobieństwa genetycznego badanych obiektów (rys. 1). Analiza molekularna wykazała duże zróżnicowanie badanych roślin. Badanie pozwoliło na podział roślin na kilka grup o różnym stopniu podobieństwa genetycznego. Podział na poszczególne grupy pokrywał się z miejscem pochodzenia roślin. Można wyróżnić dwie podstawowe grupy. W jednej z nich znajduje się rzepik oraz rzepakochwasty o morfotypie zbliżonym do rzepiku, natomiast do

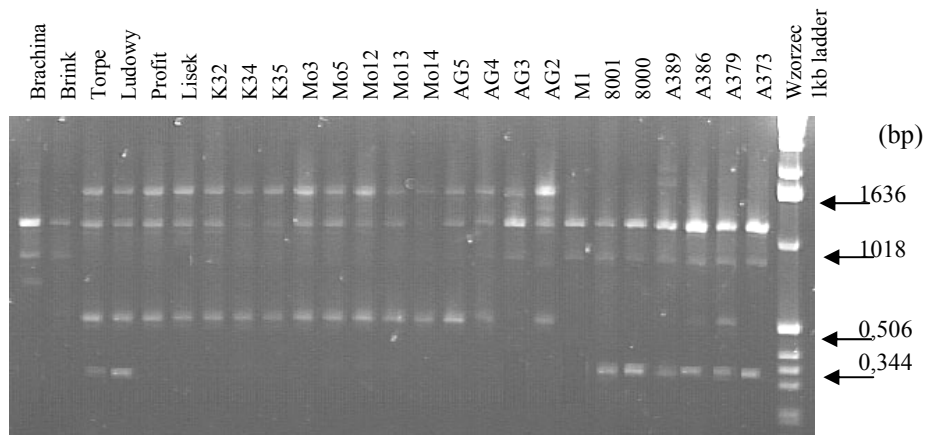


Rys. 1. Podobieństwo genetyczne pomiędzy rzepakochwastami oraz rzepakiem i rzepikiem — *Genetical similarity among rapeseed-like weeds and oilseed rape and turnip-like rape*

drugiej grupy został zakwalifikowany rzepak oraz rzepakochwasty o morfotypie podobnym do rzepaku. Podział ten potwierdza wstępną klasyfikację tych roślin opartą na obserwacji cech morfologicznych.

Sun i in. (1998) w swoich badaniach nad pokrewieństwem genetycznym pszenicy otrzymali podobny efekt. Obiekty podzielone zostały na dwie grupy: w jednej znalazły się europejskie genotypy pszenicy orkisz, w drugiej chińskie genotypy pszenicy zwyczajnej oraz pszenicy tybetańskiej, co sugeruje znacznie większe pokrewieństwo pszenicy tybetańskiej do chińskiej pszenicy zwyczajnej niż do europejskiej pszenicy orkisz i potwierdza wcześniejszą klasyfikację bazującą na obserwacjach morfologicznych.

Podobieństwo genetyczne w obrębie poszczególnych grup było różne i sięgało od 40% pomiędzy rzepakochwastem 8001 a odmianą rzepiku jarego Torpe do 90% pomiędzy rzepakochwastami A389 i A373. Największy polimorfizm ujawniły startery: OPA 09, OPA 04 oraz OPG 16. Masa molekularna produktów PCR wynosiła od 300 do 1800 bp (rys. 2). Ogólna liczba generowanych prążków wynosiła od 6 do 11 prążków, co jest zgodne z ogólnymi założeniami teoretycznymi Waugh i Powell (1992), którzy oceniają, że startery 10 nukleotydowe dla większości roślin powinny dawać od 2 do 10 produktów amplifikacji.



Rys. 2. Wzór prążków dla startera OPG 16 — Bands pattern for primer OPG 16

Podjęty problem jest zjawiskiem słabo jeszcze poznany. Pierwsze doniesienia o występowaniu rzepakochwastów w uprawach rzepaku ozimego pojawiły się pod koniec lat dziewięćdziesiątych. Badania rzepakochwastów przeprowadzone przez Wojciechowskiego i in. (2000) pozwalają przypuszczać, iż badane rośliny są prawdopodobnie rzepikiem wyrosłym z nasion które osypany się w poprzednich latach. Nasiona te zachowują żywotność nawet do siedmiu lat (Smith i in. 1995). Rzepak (*Brassica napus*) jest naturalnym allotetraploidem łączącym w sobie podstawowe zespoły chromosomów *Brassica campestris* (AA = 20) i *Brassica oleracea* (CC = 18). Gatunki z rodziny *Brassicaceae* są roślinami mniej lub bardziej obco-pylnymi. Możliwe jest więc krzyżowanie się tych gatunków przez swobodne przepylenie w warunkach polowych i powstawanie częściowo płodnych mieszańców (Grabiec 1967). Można też zakładać, że analizowane rośliny są mieszańcami rzepaku z rzepikiem. Podejrzewa się także, że obserwowane rośliny mogą być pozostałością po pastewnych formach *Brassica*: Perko lub Brachina. Obie te formy powstały w wyniku krzyżowania rzepiku ozimego z kapustą chińską. Możliwe jest więc, że pojawiające się w uprawach rzepaku formy rzepikowe są tzw. powracającymi diploidami, które wysegregowały z form Perko lub są pozostałością po uprawianej wcześniej na tych terenach Brachinie. Przeprowadzone badanie nie wykazało jednak wysokiego podobieństwa analizowanych obiektów do Brachiny.

W ostatnim czasie coraz częściej w uprawach rzepaku ozimego spotyka się także rośliny o morfotypie rzepaku, które jednak wykazują wczesność kwitnienia w stosunku do odmiany występującej na danym polu. Pozwala to przypuszczać, że należą one do innej niż uprawiana na danym polu odmiana rzepaku lub są krzyżówką odmian. Rzepakochwasty K32, K34 i K35 wykazały duże podobieństwo genetyczne do wczesnej szwedzkiej odmiany Brink, co może potwierdzać tę hipotezę.

## Wnioski

---

1. Analiza molekularna pozwoliła na podział badanych roślin na kilka grup o różnym stopniu podobieństwa genetycznego.
2. Stopień podobieństwa genetycznego w obrębie poszczególnych grup był różny i wynosił od 40 do 90%
3. Można wyróżnić dwie podstawowe grupy. W jednej z nich znajduje się rzepik oraz rzepakochwasty o morfotypie zbliżonym do rzepiku, natomiast do drugiej grupy został zakwalifikowany rzepak oraz rzepakochwasty o morfotypie podobnym do rzepaku.
4. Na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań można przypuszczać, że część analizowanych obiektów stanowi rzepik, część zaś należy do innych, wcześniejszych odmian rzepaku niż ta uprawiana na polu skąd pochodziły lub jest krzyżówką z wcześniejszą odmianą.

## Literatura

---

- Dellaporta S.L., Wood J., Hicks J.B. 1983. A plant DNA miniprepation Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1: 19-22.
- Grabiec B. 1967. Badania nad mieszańcami oddalonymi u *Brassica*. *Hodowla i Aklimatyzacja Roślin*, 11/2: 179-234.
- Hu J., Quiros C.F. 1991. Identification of broccoli and califlower cultivars with RAPD markers. *Plant Cell. Rep.*, 10: 505-511.
- Nei M., Li W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5269-5273.
- Smith J.M., Froment M.A. 1995. A survey of management practices and the rotational position of high erucic acid rape (HEAR). *Proc. of 9th Int. Rapeseed Congress*, F-33, Cambridge, England.
- Sun Q., Ni Z., Liu Z., Gao J., Huang T. 1998. Genetic relationship among Tibetan wheat Common wheat and European spelt wheat revealed by RAPD markers. *Euphytica*, 99: 205-211.
- Waugh R., Powell W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends Biotech.*, 10: 186-191.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18 (22): 6531- 6535.
- Wojciechowski A., Cichy H., Weigt M. 2000. Wyniki obserwacji morfologicznych oraz analiz cytogenetycznych i chemicznych roślin o morfotypie rzepiku występujących na plantacjach rzepaku ozimego. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXI: 237-247.