

OCENA ZRÓŻNICOWANIA GENETYCZNEGO ODMIAN AGRESTU (*Ribes grossularia*) PRZY UŻYCIU METOD RAPD I ISSR

Anita Kuras, Małgorzata Korbin, Stanisław Pluta, Edward Żurawicz

Zakład Hodowli Roślin Sadowniczych,
Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach

Wstęp

Techniki oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy są coraz powszechniej stosowane do analiz genomu roślinnego [NYBOM 1991]. Szczególnie istotną rolę odgrywają w pracach hodowlanych, gdzie precyzyjna ocena tożsamości genotypów i stopnia ich pokrewieństwa jest niezbędna dla opracowania programu krzyżowań. Do najczęściej używanych technik identyfikacyjnych należą oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR): technika losowo wzmocnionego polimorficznego DNA (RAPD – random amplified polymorphic DNA) [WILLIAMS i in. 1990] oraz wewnętrzne pojedyncze powtórzenia mikrosatelitarne (ISSR – inter simple sequence repeats) [ZIĘTKIEWICZ i in. 1994]. Polegają one na amplifikacji (powielaniu) w obecności polimerazy tych fragmentów analizowanego genomu, które są komplementarne do sekwencji użytych w reakcji starterów. W przypadku RAPD do reakcji amplifikacji stosuje się arbitralne, dziesięcionukleotydowe startery, podczas gdy w ISSR używa się starterów osiemnastonukleotydowych o dwunukleotydowych powtórzeniach mikrosatelitarnych [MORENO i in. 1995]. Obie techniki znalazły zastosowanie w identyfikacji odmian oraz określaniu pokrewieństwa w obrębie wielu gatunków roślin sadowniczych [GRAHAM i in. 1994; LANDRY i in. 1994; LANHAM i in. 1995], a ich kompleksowe zastosowanie pozwoliło na rozwiązanie wątpliwości dotyczących tożsamości badanych genotypów [LANHAM, BRENNAN 1999].

Celem badań podjętych w Zakładzie Hodowli Roślin Sadowniczych było porównanie przydatności metod RAPD i ISSR do określenia stopnia powinowactwa genetycznego w obrębie rodzaju *Ribes*. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki analizy polimorfizmu genotypów agrestu (*Ribes grossularia*), stanowiących przedmiot programów hodowlanych prowadzonych w Zakładzie Hodowli Roślin Sadowniczych Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach (ISK).

Materiał i metody

Materiał roślinny. Analizie poddano 12 odmian agrestu ('Invicta', 'Greenfinch', 'Biały Triumf', 'Niesłuchowski', 'Macurines', 'Hinnomaki Rot', 'Rokula', 'Rolonda', 'Resistanta', 'Captivator', 'Karpaty', 'Martlet'), pochodzących z kolekcji

Zakładu Hodowli Roślin Sadowniczych Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa.

Izolacja DNA. Izolację przeprowadzono według metody opracowanej przez DOYLE i DOYLE [1990]. Roztartą w ciekłym azocie tkankę (1 g młodych liści) inkubowano (60°C/30 min) z 15 ml buforu ekstrakcyjnego (2% bromku heksadecylotrimetyloamoniowego – CTAB; 100 mmol Tris HCl·dm⁻³; pH 8,0; 1,4 mol NaCl·dm⁻³; wersenianu sodowego – 20 mmol EDTA·dm⁻³; 2% PVP-40 oraz 1% merkaptocetanolu) i oczyszczano mieszaniną chloroform/alkohol izoamylowy (24 : 1). Kwasy nukleinowe wytrącono izopropanolem, a finalny produkt rozpuszczano w 500 μl buforu TE. Degradację RNA przeprowadzono przy użyciu RNazyA. Stężenie DNA oznaczano elektroforytycznie i spektrofotometrycznie (Gene Quant pro Amersham Pharmacia Biotech).

Łańcuchowa reakcja polimerazy

RAPD. Mieszanina reakcyjna (13 μl) zawierała ok. 10 ng DNA oraz 0,32 U polimerazy, 10 x PCR-bufor II z 2 mmol MgCl₂·dm⁻³ (Ampli Tag Gold, Perkin Elmer), 1,25 mmol dNTP·dm⁻³ i 4 μmol startera na reakcję. Przebadano 35 dziesięcionukleotydowych starterów o arbitralnej sekwencji (OPA 01-11, OPB 01-12, OPC 01-12 – Operon Technologies Inc., USA). Każda reakcja obejmowała 48 cykli (94°C/1 min, 37°C/1 min, 72°C/2 min).

ISSR. Mieszanina reakcyjna (13 μl) zawierała 30 ng DNA oraz 0,65 U polimerazy i 1 x bufor (Platinum Gibco), 0,8 mmol dNTP·dm⁻³ i 4 μmol startera na reakcję. Testowano 10 starterów o powtarzalnych sekwencjach (801, 816, 843-850), zestaw nr 9 UBC (University of British Columbia). Każda reakcja obejmowała 35 cykli (94°C/40 s, 55°C/50 s, 72°C/1 min).

Wszystkie reakcje PCR prowadzono w termocyklerze PTC – 200 (MJ Research), a produkty amplifikacji rozdzielano elektroforytycznie w 1,5% żelu agarozowym i analizowano w świetle UV. Każda reakcja była powtarzana i tylko produkty powtarzalne były analizowane w dalszych badaniach.

Wyniki i dyskusja

W wyniku reakcji amplifikacji przeprowadzonych przy użyciu technik RAPD-PCR i SSR-PCR komercyjnymi starterami uzyskano 647 produktów, spośród których 149 (69 dla RAPD i 80 dla ISSR) pozwalało na różnicowanie badanych genotypów. Polimorficzne produkty RAPD posiadały wielkość od 450 do 2050 par zasad (pz), podczas gdy produkty uzyskane przy użyciu techniki SSR od 400 do 2856 pz (tab. 1a, 1b). Na podstawie tych wyników wybrano 4 startery RAPD i 4 startery SSR, w reakcji z którymi obserwowano wyraźne, informatywne produkty polimorficzne różnicujące badane odmiany. Analiza dendrogramów utworzonych na podstawie komputerowej analizy produktów polimorficznych (Dnasis, Phylip) i wykreślonych w oparciu o indeksy podobieństwa [NEI, LI 1979] wskazuje na zgrupowanie odmian zgodnie z krajem pochodzenia, np. 'Karpaty' i 'Niesłuchowski' (odmiany pochodzące z Ukrainy), jak również zgodnie z ich rodzodem np. 'Captivator' i 'Residenta' (rys. 1a, 1b). Wyniki uzyskane w oparciu o dane RAPD i SSR są podobne. Jedynie w przypadku odmian agrestu 'Invicta', 'Rokula' i 'Rolonda' zaobserwowano różnice w dystansie genetycznym przy tych samych dla obu metod tendencjach w zakresie pokrewieństwa odmian.

Tabela 1; Table 1

Uproszczony schemat identyfikacji 12 odmian agrestu przy zastosowaniu technik RAPD (a) i ISSR (b) z wybranymi starterami, w reakcji z którymi obserwowano produkty polimorficzne

The simplified scheme of identification of 12 gooseberry cultivars at using RAPD (a) and ISSR (b) techniques with selected primers in which polymorphic products were observed

a)

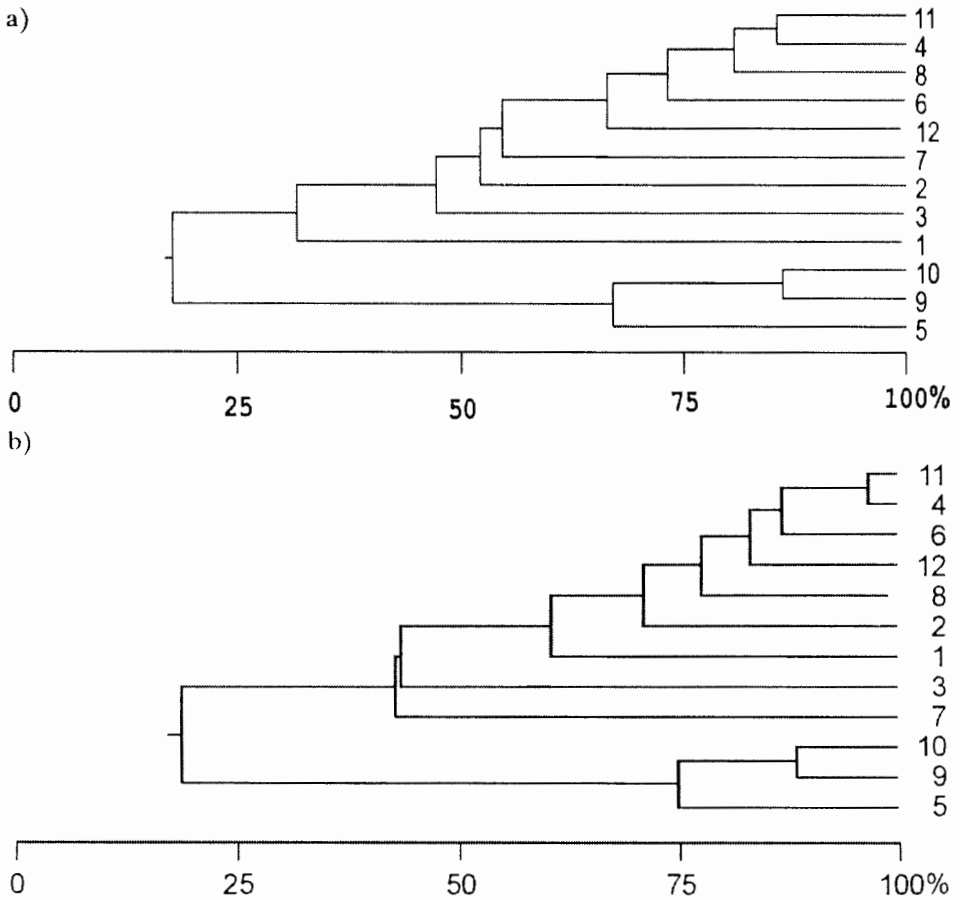
Starter Primer	Wielkość produktów RAPD (pz) Length of RAPD products (bp)	Invicta	Greenfinch	Biały Triumf	Niesłuchowski	Macurines	Hinnomaki Rot	Rokula	Rolonda	Resistenta	Captivator	Karpaty	Martlet
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
OPC-02	400	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
	980	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
	1018	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0
	1636	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0
	2036	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
OPC-07	600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	640	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0
	980	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
	1636	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
OPC-08	506	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	560	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	760	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1
	1636	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
OPC-11	960	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
	1016	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1

b)

Starter Primer	Wielkość produktów ISSR (pz) Length of ISSR-PCR products (bp)	Invicta	Greenfinch	Biały Triumf	Niestu-chowski	Macurines	Hinnomaki Rot	Rokula	Rolonda	Resistenta	Captivator	Karpaty	Martlet
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
816	400	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
	980	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
	1018	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0
	1636	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0
	2836	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
844	600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	640	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0
	980	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0
	1650	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
845	606	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	660	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
	920	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1
	940	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
	960	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
1016	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
848	480	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
	600	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	960	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0
	1020	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

RAPD – technika losowo wzmocnionego polimorficznego DNA; random amplified polymorphic DNA

ISSR – wewnętrzne pojedyncze powtórzenia mikrosatelitarne; inter simple sequence repeats



1 ... 12 – genotypy 12 odmian agrestu, patrz tab. 1a i 1b; genotypes of 12 gooseberry varieties, see Table 1a and 1b

Rys. 1. Dendrogram uzyskany dla 12 genotypów agrestu w oparciu o wyniki reakcji RAPD (a) i ISSR (b)

Rys. 1. Dendrogram for 12 gooseberry genotypes obtained on the basis of RAPD (a) and ISSR (b) reaction data

Markery DNA są niezwykle przydatne przy charakteryzowaniu genomu roślin [GRAHAM i in. 1994; LANDRY i in. 1994; MORENO i in. 1995; LANHAM i in. 1995; ZHEN-XIANG i in. 1996; SZAFRAN i in. 1997]. Ich przygotowanie wymaga jednak dokładnego opracowania metodyki badań dla każdego z analizowanych gatunków. Warunki reakcji i zestaw starterów do genetycznej charakterystyki gatunków z rodzaju *Ribes* przy zastosowaniu stosunkowo prostej techniki RAPD były analizowane w europejskich ośrodkach naukowych [SZAFRAN i in. 1997; LANHAM, BRENNAN 1998; 1999]. Ponieważ jednak każda z technik generująca markery identyfikacyjne umożliwia analizę innego regionu genomu, jednoczesne ich stosowanie pozwala na pełniejszą analizę testowanych genotypów, co wykazano w pracach nad identyfikacją odmian porzeczki czerwonej [LANHAM, BRENNAN 1999], jak również w przedstawionej pracy dotyczącej agrestu.

Literatura

- DOYLE J.J., DOYLE J.L. 1990. *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. Focus 12: 13–15.
- GRAHAM J., MCNICOL R.J., GREIG K., VAN DE VEN W.T.G. 1994. *Identification of red raspberry cultivars and an assessment of their relatedness using fingerprints produced by random primers*. J. Hort. Sci. 69: 123–130.
- LANDRY B.S., LI R.Q., CHIEUNG W.Y., GRANGER R.L. 1994. *Phylogeny analysis of 25 apple rootstocks using RAPD markers and tactical tagging*. Theor. Appl. Genet. 89: 847–852.
- LANIAM P.G., BRENNAN R.M. 1998. *Characterization of genetic resources of redcurrant (Ribes rubrum Ribesia) using anchored microsatellite markers*. Theor. Appl. Genet. 96: 917–21.
- LANIAM P.G., BRENNAN R.M. 1999. *Genetic characterization of gooseberry (Ribes Grossularia subgenus Grossularia) germoplasm using RAPD, ISSR and AFLP markers*. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 74(3): 361–366.
- LANIAM P.G., BRENNAN R.M., HACKETT C., MCNICOL R.J. 1995. *RAPD fingerprinting of black currant (Ribes nigrum L.) cultivars*. Theor. Appl. Genet. 90: 166–172.
- MORENO S., GOGORCENA Y., ORTIZ J.M. 1995. *The use of RAPD markers for identification of cultivated grapevine (Vitis vinifera L.)*. Sc. Horticulturae 62: 237–243.
- NEI M., LI W.H. 1979. *Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleas*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5267–5273.
- NYBOM H. 1991. *Application of DNA fingerprinting in plant breeding*. Procc. Intern. Symp. DNA fingerprinting, Bern: 294–311.
- SZAFRAN E., KURAS A., WRÓBLEWSKI T., PLUTA S., ŻURAWICZ E. 1997. *Badania polimorfizmu odmian porzeczki czarnej (R. nigrum L.) techniką RAPD*. Materiały z I Krajowej Konferencji Hodowli Roślin, Poznań, 19–20 XI 1997: 439–445.
- WILLIAMS J.G.K., KUBELIK A.R., LIVAK K.J., RAFALSKI J.A., TINGEY S.V. 1990. *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primes are useful as genetics markers*. Nucleic Acids. Res. 18: 6531–6535.
- ZIEN-XIANG LU, REIGHARD G.I., BAIRD W.V. 1996. *Identification of peach rootstock cultivars by RAPD markers*. J. Hort. Sci. 31: 127–129.
- ZIĘTKIEWICZ E., RAFALSKI A., LABUDA D. 1994. *Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification*. Genomic 20: 176–83.

Słowa kluczowe: agrest, polimorfizm DNA, techniki RAPD i ISSR

Streszczenie

Celem pracy była ocena przydatności technik RAPD i ISSR do określenia stopnia powinowactwa genetycznego 12 odmian agrestu (*R. grossularia*), używanych w programach hodowlanych w Zakładzie Hodowli Roślin Sadowniczych. W oparciu o wyniki reakcji amplifikacji przeprowadzonej przy użyciu techniki

RAPD i ISSR dokonano wyboru starterów, w reakcji z którymi obserwowano produkty polimorficzne, różnicujące genotypy. Analiza pokrewieństwa genotypów, oszacowanego na podstawie komputerowej analizy produktów polimorficznych wykazała, że stosowanie obu technik pozwala na pełniejszą analizę testowanych genotypów.

EVALUATION OF GENETIC DIVERSIFICATION OF GOOSEBERRY (*R. grossularia*) GENOTYPES USING RAPD AND ISSR TECHNIQUES

Anita Kuras, Małgorzata Korbin, Stanisław Pluta, Edward Żurawicz
Research Institute of Pomology and Floriculture, Skierniewice

Key words: gooseberry, DNA polymorphism, RAPD and ISSR techniques

Summary

The aim of the studies was an estimation of RAPD and ISSR techniques usefulness to determine genetic relationships of 12 gooseberry cultivars used in breeding programme at the Fruż Breeding Department. Polymorphic PCR products generated in RAPD and ISSR reaction were chosen to genetic relationship determination (Dnastar, Phylip) analysis. The results showed similar tendency for data obtained at RAPD and ISSR but simultaneous use of both techniques allowed to increase the precision in determination of relationships.

Mgr Anita **Kuras**
Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa
ul. Pomologiczna 18
96-100 SKIERNIEWICE
e-mail: akuras@insad.pl