

VARIABILITY EVALUATION OF *SOLANUM BULBOCASTANUM* GENOTYPES BY MEANS OF RAPD

HODNOCENÍ VARIABILITY GENOTYPŮ *SOLANUM BULBOCASTANUM* METODOU RAPD

Vlastníková H., Vejl P.

Katedra genetiky a šlechtění, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 957, 165 21 Praha, Česká republika.

E-mail: vlastnikova@af.czu.cz, vejl@af.czu.cz

ABSTRACT

Nine RAPD primers were used to distinguish of 38 genotypes of *Solanum bulbocastanum*. Tested primers were obtained from Operon Technologies, particularly primers OPG 03, OPG 06, OPG 12, OPG 15, OPG 16, OPG 17, OPA 15, OPAW 15, OPZ 04 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 between different laboratories. The method is fit to distinguishing of species if the standard conditions are kept.

Keywords: Potato, *Solanum bulbocastanum*, DNA, primers, RAPD

ABSTRAKT

Metodou RAPD bylo analyzováno 38 genotypů planého druhu bramboru *Solanum bulbocastanum*. Bylo otestováno 9 dekamerických primerů kitu Operon Technologies. Jednalo se o primery OPG 03, OPG 06, OPG 12, OPG 15, OPG 16, OPG 17, OPA 15, OPAW 15, OPZ 04, které poskytly dostatečné množství polymorfních zón. Elektroforeogramy byly následně statisticky vyhodnoceny shlukovou analýzou na základě Diceho podobnostních koeficientů. Shluková analýza prokázala rozdíly mezi testovanými genotypy. Použitelnost metody je však limitována relativně nižší reprodukovatelností RAPD analýz mezi různými laboratořemi, přesto ji při dodržení standardních podmínek lze použít pro identifikaci většiny druhů rodu *Solanum*.

Klíčové slova: *Solanum bulbocastanum*, DNA, RAPD primery

ÚVOD

V současné době je známo již přes 200 druhů rodu *Solanum*. Lilek hlíznatý (*Solanum tuberosum* L.) patří celosvětově mezi velmi významné hlíznaté okopaniny. Naprostá většina pěstovaných 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, 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, 1988). Hawkes (1992) vysvětluje vznik domestikovaných forem bramboru odlišným způsobem – a to křížením *S. leptophyes* a *S. canasense* 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 dlouhodobní podmínky letního období v Evropě (Vejl, 2002).

Řada botanických druhů je v současné době testována a následně pak i využívány zejména pro potenciální vnášení genů odolnosti k různým abiotickým a biotickým stresům (Domkářová, 2001). Jedná se především o druhy *S. demissum* (zdroj rezistence vůči plísni bramboru a PLRV), *S. acaule* (PVX, PLRV, PSTV, rakovina brambor, háďátko bramborové, mrazuvzdornost), *S. chacoense* (PVA, PVY, plíseň bramboru, mandelinka bramborová), *S. spegazzinii* (Fusarium, rakovina brambor, háďátko bramborové), *S. stoloniferum* (PVA, PVY) a *S. vernei* (háďátko 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.* takto přenesli gen RB pocházející z *S. tuberosum* 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.

Plíseň bramboru představuje v našich podmínkách nejzávažnější akutní chorobu bramboru. Virulence *Phytophthora infestans* /Mont./ de Bary se neustále vyvíjí a dochází tak k překonávání odolnosti stávajících odrůd. Předpokládanou koevolucí této patogeny s planými druhy rodu *Solanum* v původních lokalitách výskytu došlo pravděpodobně ke vzniku rezistence. Přítomnost nespecifické rezistence u mexických planých druhů zkoumali např. Soest *et al.* již v roce 1984. Pomocí metod genového inženýrství jsou do stávajících odrůd vnášeny jednotlivé R-geny (v minulosti získávané především ze *Solanum demissum*). Předpokládá se tvorba odrůdy se zachovalými znaky, tvořenou směsí linií s různými R-geny, které budou lépe odolávat infekci a zpomalovat šíření v porostu. Předpokladem úspěchu

šlechtění na odolnost je optimální znalost zdrojů rezistence, možností jejího vyhledávání mezi kulturními a planými druhy bramboru. Diploidní druh *Solanum bulbocastanum*, pocházející z Mexika a Guatemaly, je potenciálním zdrojem trvalé, rasově nespecifické rezistence vůči plísni bramboru (Vossen, 2003). Genotypy vzniklé somatickou hybridizací *S. bulbocastanum* a *S. tuberosum* byly shledány vysoce rezistentní k plísni bramboru a to i pod silným infekčním tlakem (Helgeson, 1998). Studium rezistence *S. bulbocastanum* se věnoval též např. Bradeen (2003).

Předpokladem pro identifikaci a využití potenciálních genů rezistence v nových odrůdách je nutné podrobné hodnocení a charakterizace výchozích zdrojů rezistence – tedy planých druhů. Pro analýzy genotypů rodu *Solanum* se často používá metoda RAPD (Random amplified polymorphic DNA) založená na amplifikaci specifických fragmentů DNA. Hosaka (1994) použil 31 RAPD markerů pro vzájemné odlišení 67 odrůd z celkového počtu 73 genotypů. Sosinski a Douches (1996) hodnotili vhodnost 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.

MATERIÁL A METODIKA

Biologický materiál

Testovaný materiál byl získán z kolekce genotypů genové banky při Výzkumném ústavu bramborářském Havlíčkův Brod a dále z Potato Introduction Station, Wisconsin, USA. Jednalo se o genotypy *Solanum bulbocastanum* (seznam testovaných genotypů je uveden v tab.1).

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 *in vitro* rostliny.

Amplifikace DNA

DNA byla amplifikována v termocykleru T-Gradient (Biometra, Německo). Pro získání polymorfních zón bylo použito 9 oligonukleotidových sekvencí z kitu firmy Operon Technologies: OPG 03, OPG 06, OPG 12, OPG 15, OPG 16, OPG 17, OPA 15, OPAW 15, OPZ 04 (jednotlivé sekvence viz. <http://operon.com>)

Složení 25 µl reakční směsi bylo následující: 10 ng templátové DNA, 0,7U *Taq* DNA polymeráza (Sigma, Německo), 1x PCR pufr, 2,5 mM MgCl₂, 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 (příklady elektroforeogramů viz. obr. 1, 2). Pořízené snímky byly následně digitalizovány na stolním scanneru a vyhodnoceny pomocí programu Statistica 7 pro 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 (obr.3).

Tab. 1 Seznam testovaných genotypů

č.	charakteristika genotypu:
1. - 21.	populace <i>S. bulbocastanum</i> PI 243510, Wisconsin USA
22.-24.	<i>S.bulbocastanum</i> Genová banka Havl. Brod, PI 243345
25.-29.	<i>S.bulbocastanum</i> Genová banka Havl. Brod, PI 243512
30.	<i>S.bulbocastanum</i> Genová banka Havl. Brod, 8003
31.	<i>S.bulbocastanum</i> Genová banka Havl. Brod, 8010
32.-33.	<i>S.bulbocastanum</i> Genová banka Havl. Brod, PS 12/16
34.-38.	populace <i>S.bulbocastanum</i> PI 243510, Wisconsin USA

VÝSLEDKY A DISKUZE

Izolace vysokomolekulární DNA splnila kvalitativní požadavky pro následnou amplifikaci, koncentrace získané DNA byla ověřena UV-spektrofotometricky na základě využití Lambert-Beerova zákona definujícího množství DNA v izolátu dle hodnot absorbance při vlnové délce 260nm. Následně byla provedena optimalizace metody RAPD a to z hlediska časově teplotního profilu a složení reakční směsi.

Z celkového počtu 10 primerů bylo vybráno 9 dekamerických primerů, které umožnily vzájemně odlišit jednotlivé genotypy. 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.

Vstupní údaje zadávané do programu Statistica 7 pro Windows vycházely pouze ze specifických polymorfních zón. RAPD zóny, které nevykazovaly mezi jednotlivými testovanými genotypy polymorfismus, nebyly pro hodnocení použity. Toto kritérium bylo

rovněž zachováno při hodnocení zón, které byly jen slabě amplifikovány a nebylo možné je reprodukovatelně identifikovat.

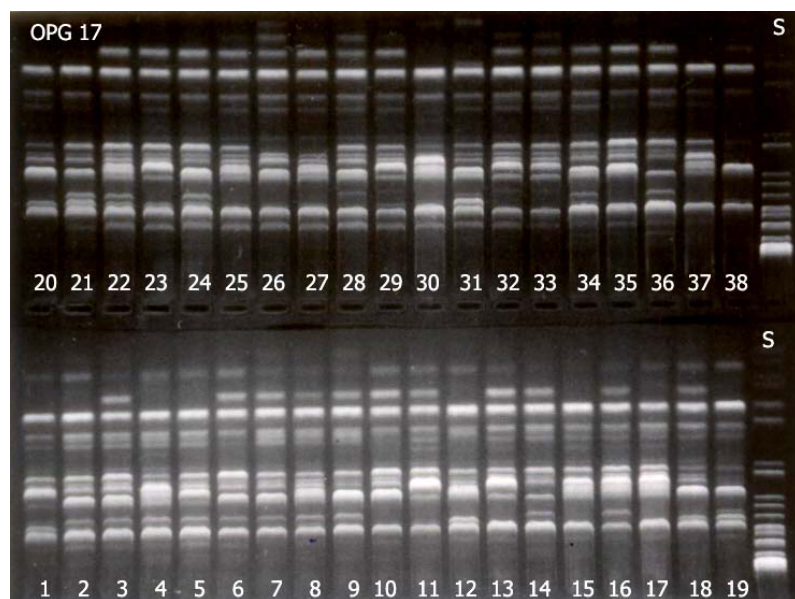
V důsledku složité reakční kinetiky je RAPD velmi citlivá na reakční podmínky, které mohou způsobit velké rozdíly v reprodukovatelnosti výsledků. Jedním z hlavních faktorů je druh a koncentrace termostabilní polymerázy, koncentrace tohoto enzymu pro RAPD je v rozmezí 2-5U /100μl objemu, obecně platí, že s růstem koncentrace roste i počet amplifikovaných produktů, při velmi vysoké koncentraci již však vznikají nereprodukovatelné fragmenty (Caetano-Anollés, 1992). Důležitým faktorem pro specifčnost amplifikace je též volba „annelační“ teploty a časových parametrů amplifikace. Obecně platí, že vyšší teplota zaručuje vyšší specifčnost hybridizace mezi primerem a templátovou DNA a tím se snižuje frekvence nespecifických amplifikací. Waugh *et al.* (1992) uvádí optimální „annelační“ 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 variability byla provedena shluková analýza vycházející z Diceho podobnostních koeficientů získaných vyhodnocením všech polymorfních zón a následné grafické vyjádření genetické vzdálenosti pomocí dendrogramu (Obr.3). Markerovací schopnost RAPD zón lze též hodnotit například jejich relativní četností výskytu u jednotlivých genotypů (Demeke *et al.*, 1993).

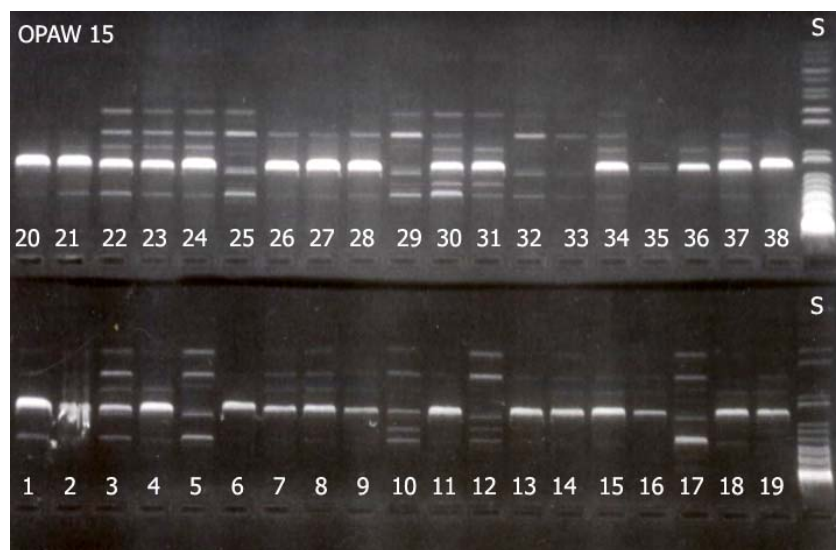
Obr.1 Elektroforeogram marekru OPG 17

legenda.: S – hmotnostní standard λDNA/Eco47I(AvaII)

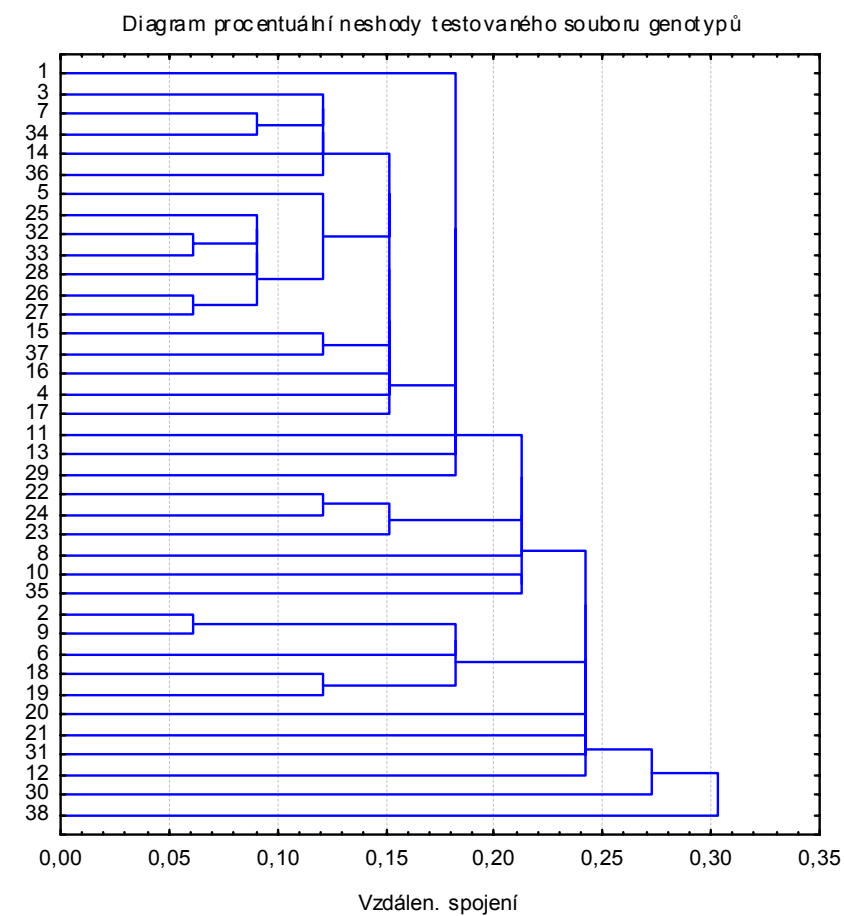
Označení genotypů je uvedeno v tabulce 1.



Obr.2 Elektroforeogram marekru OPAW 15



Obr.3 Dendrogram



Z výše uvedeného dendrogramu je patrné, že použité RAPD primery umožnily odlišit všech 38 testovaných genotypů. Dále lze konstatovat, že genetická příbuznost testovaných genotypů *Solanum bulbocastanum* byla poměrně vysoká. Z grafického znázornění procentuální neshody lze odvodit, že téměř 95% testovaných genotypů vykazuje 80-ti % shodu genomů při hodnocení pomocí uvedených 9-ti primerů. Provedená analýza též potvrzuje, že populace genotypů se jeví jako vysoce heterozygotní a genetická variabilita v rámci druhu je tedy poměrně značná.

V přiloženém dendrogramu lze odlišit zhruba čtyři skupiny genotypů, do první lze zařadit genotypy: 1, 3, 4, 5, 7, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 34, 36, 37 (*S. bulbocastanum*, populace PI 243510), dále 25, 26, 27, 28, 29 (*S. bulbocastanum* Havl. Brod PI 243512), dále 32, 33 (*S. bulbocastanum* Havl. Brod, PS12/16), druhá skupina zahrnuje 8, 10, 35 (*S. bulbocastanum*, populace PI 243510), dále 22, 23, 24 (*S. bulbocastanum* Havl. Brod PI 243345), do třetí skupiny lze zařadit 2, 6, 9, 12, 18, 19, 20, 21 (*S. bulbocastanum*, populace PI 243510), 31 (*S. bulbocastanum* Havl. Brod 8010) a do poslední skupiny zbývají 30 (*S. bulbocastanum* Havl. Brod 8003) a 38 (*S. bulbocastanum*, populace PI 243510).

Z provedených analýz vyplývá, že materiál dodaný genovou bankou při Výzkumném ústavu bramborářském Havlíčkův Brod a materiál získaný z Potato Introduction Station, Wisconsin, USA, přísluší k těmž botanickému druhu *Solanum bulbocastanum* L.

Na základě výsledků provedených analýz byla potvrzena dostačující rozlišovací schopnost RAPD analýzy a lze ji tedy při dodržení standardních podmínek doporučit např. pro správu genových zdrojů v rámci genových bank.

ZÁVĚR

Na základě uvedených výsledků lze vyvodit, že zvolený metodický postup a vybrané oligonukleotidové primery umožnily spolehlivě odlišit genotypy jednotlivých vzorků druhu *Solanum bulbocastanum*. V průběhu experimentů bylo potvrzeno, 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.

Poděkování

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“.

LITERATURA

Bradeen J. M., Naess S. K., Song J., Haberlach G.T., Wielgus S.M., Buell C.R., Jiang J., Helgeson J.P. (2003): Concomitant reiterative BAC walking and fine genetic mapping enable physical map development for the broad-spectrum late blight resistance region, RB. Mol. Gen. Genomics, 269: 603-611

Bradshaw J. E., Mackay G. R.(1994): Breeding strategies for Clonally Propagated potatoes, Potato Genetics. CAB International

Caetano-Anollés G., Bassam B. J., Gresshoff P. M. (1992): Primer-template interactions during DNA amplification fingerprinting with single arbitrary oligonucleotides. Mol. Gen. Genet., 235:157 – 165

Demeke T., Kawchuk L. M., Lynch D. R. (1993): Identification of potato cultivars and clonal variants by random amplified polymorphic DNA analysis. American Potato Journal, 70: 561-570

Domkářová J. (2001): Zhodnocení genofondu odrůd *Solanum tuberosum* L. z hlediska kvality a odolnosti k chorobám. Dizertační práce, ČZU Praha

Gotz E. (1991): Untersuchungen zur vertikalen und horizontalen Phytophthora-Resistenz an in vitro-Pflanzen der Kartoffel. Kartoffelforschung Aktuell, Gross Lusewitz, 19-24

Hawkes J. G., Jackson M. T (1992): Taxonomic and evolutionary implications of the nedosperm balance number hypothesis in potatoes. Theor.Appl.Genet. 84.

Helgeson J.P., Pohlman J.D., Austin S. (1998): Somatic hybrids between *Solanum bulbocastanum* nad potato: a new source of resistance to late blight. Theor. Appl. Genet., 96: 738-742

Hoekstra L. (2000): Family *Solanaceae*, genus *Solanum*. www publikace, <http://www.plant.wageningen-ur.nl/about/Biodiversity/Cgn/collections>,

Hosaka K., Mori M., Ogawa K. (1994): Genetic relationships of Japanese potato cultivars assessed by RAPD analysis. American potato Journal, 71: 535-546

Kuhl J.C., Hanneman R.E, Havey M.J. (2001): Characterization and mapping of *Rpi1*, a late blight resistance locus from diploid (1EBN) Mexican *Solanum pinnatisectum*. Mol. Genet. Genomics, 265:977-985.

Muller K. O., Black W.(1951): Potatoe breeding for resistance to blight and virus disease during the hundred years. Zeitschrift für Pflanzensuchtung 31, (citace podle Bradshaw, Mackay, 1994)

Mandolino G., De Marco S., Faeti V., Bagatta M., Carboni A., Ranalli P. (1996): Stability of fingerprints of *Solanum tuberosum* plants derived from conventional tubers and vitrotubers. Plant Breeding, 115: 439-444

Plaisted R. L., Hoopes R. W.(1986): The past record and future prospects for the use of exotic potato germplasm. American Potato Journal 66

Ross, H. (1978): Wild species and primitive cultivars as ancestors of potato varieties. Proceedings of the Conference: Broadening the Genetic Base of Crops,

Rybáček V., Čača Z., Fric V., Fricová E., Šroller J., Votoupal B., Daniel J., Findejs R., Míča B., Radil B., Rasochová M., Rasocha V., Tuček V., Voklál B., Zrůst J. (1988): Brambory. SZN Praha

Singsit C., Ozias-Akins P. (1993): Genetic variation in monoloids of diploid potatoes and detection of clone-specific random amplified polymorphic DNA markers. Plant Cell Reports, 12: 144-148

Song J., Bradeen, J. M. Naess S. K., Raasch J.A., Wielgus S. M., Haberlach G. T., Liu J., Kuang H., Austin-Phillips S., Buell S. R., Helgeson J. P., Jiang J. (2003): Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. Proceedings of the Nat. Acad. of Sci., 100 (16)

Sosinski B., Douches D.S. (1996): Using polymerase chain reactionbased DNA amplification to fingerprint North American potato cultivars. HortSci, 31:130-133.

Vejl P, Skupinová S., Sedlák P., Bardová M (2002): Analýza rostlinného genomu, ČZU Praha
Vossen E., Sikkema A., Hekkert B. L., Gros J., Stevens P., Muskens M., Wouters D., Pereira A., Stiekema W., Allefs S. (2003): An ancient R gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. The Plant Journal, 36: 867-882

Waugh R., Baird E., Powell W. (1992): The use of RAPD markers for detection of gene introgression in potato. Plant Cell Reports, 11: 466-469