



Wykorzystanie markerów molekularnych w hodowli warzyw

Rafał Barański, Marek Szklarczyk, Dariusz Grzebelus, Barbara Jagosz
Katedra Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa, Akademia Rolnicza, Kraków

Application of molecular markers in vegetable crops breeding

Summary

Molecular markers have been introduced to breeding programmes of vegetables in recent years in Poland. Research done at Dept. of Genetics, Plant Breeding and Seed Science, Agricultural University of Krakow allowed to implement molecular techniques useful in marker assisted selection, assessment of genetic purity of breeding lines and hybrids, and estimation of genetic similarity between breeding materials.

Key words:

izozyme, RAPD, AFLP, marker assisted selection, genetic purity.

1. Wstęp

Markery molekularne są coraz częściej wykorzystywane w hodowli roślin do selekcji pożądanych form, oceny wyrównania materiałów hodowlanych i ich stopnia homozygotyczności, potwierdzenia skuteczności prowadzonych krzyżowań oraz oceny czystości nasion mieszańcowych. Ich wykorzystanie jest uzależnione od stawianego celu i właściwie dobranej metody (1). Pomimo dużej liczby dostępnych technik molekularnych, które pozwalają na otrzymanie potencjalnych markerów (2), jak dotąd, tylko kilka z nich znalazło zastosowanie w praktyce. Obecnie najczęściej wykorzystuje się markery białkowe w tym izoenzymatyczne oraz markery DNA otrzymywane metodami RFLP, RAPD, AFLP (3) i SSR (4). Praktyczne wykorzystanie tych markerów wiąże się z koniecznością prowadzenia kosztownych badań

Adres do korespondencji

Rafał Barański,
Katedra Genetyki, Hodowli
i Nasiennictwa,
Akademia Rolnicza,
Al. 29-Listopada 54,
31-425 Kraków;
e-mail:
baranski@ogr.ar.krakow.pl

biotechnologia

1 (52) 47-50 2001

w celu optymalizacji metodyk analiz dla poszczególnych gatunków oraz identyfikacji sprzężeń potencjalnych markerów z pożądanymi cechami.

W Katedrze Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa Akademii Rolniczej w Krakowie od kilku lat prowadzone są prace nad wykorzystaniem markerów izoenzymatycznych i DNA w hodowli roślin warzywnych. Dotychczasowe badania obejmowały: a) wdrożenie do hodowli pomidora znanego z literatury markera *Rex-1* sprzężonego z odpornością na nicianie, b) opracowanie metodyki analizy locus *Pgi-2* w celu charakteryzacji materiałów hodowlanych kapusty oraz c) opracowanie metodyki wykorzystania markerów RAPD i AFLP do oceny podobieństwa genetycznego materiałów hodowlanych marchwi.

2. Selekcja w oparciu na markerach molekularnych

Prowadzone badania miały na celu wdrożenie do hodowli pomidora markera *Rex-1*, opracowanego przez Williamson i in. (5), sprzężonego z genem *Mi* warunkującym odporność na nicianie. Równolegle z badaniami molekularnymi, rośliny poddawano biologicznemu testowaniu na odporność. Wzorcem odporności były rośliny *Lycopersicon peruvianum*, a wrażliwości odmiana uprawna Moneymaker (*L. esculentum*). W prowadzonym teście glebowym u wszystkich roślin *L. peruvianum* zaobserwowano brak objawów porażenia, a u odmiany Moneymaker całkowite porażenie korzeni przez szkodniki. Wszystkie rośliny *L. peruvianum* były homozygotyczne pod względem allelu *Rex-1^P*, natomiast allel *Rex-1^e* wskazujący na brak odporności wystąpił u roślin odmiany Moneymaker. U wszystkich badanych obiektów hodowlanych stwierdzono obecność allelu *Rex-1^P* będącego markerem genu odporności *Mi*. Natomiast wyniki testu glebowego wskazywały na brak odporności w tych obiektach. Wiadomo, że reakcja roślin zależy od temperatury w czasie ich wzrostu w zainfekowanej glebie. W temperaturze powyżej 27°C następuje załamanie odporności warunkowanej genem *Mi*. Dochodzi wtedy do porażenia zarówno roślin wrażliwych, jak i odpornych. W warunkach szklarniowych, w jakich prowadzi się test, nie ma możliwości kontroli temperatury. Tak zatem analiza molekularna jest bardziej przydatna dla selekcji roślin zawierających gen *Mi*, zwłaszcza w pokoleniach segregujących.

3. Ocena wyrównania genetycznego

Materiały hodowlane kapusty głowiastej białej (*Brassica oleracea* var. *capitata*) były oceniane pod względem występowania wariantów allozymatycznych izomerazy glukozy-6-fosforanowej (PGI, EC5.3.1.9). Rozdział elektroforetyczny prowadzono na płytkach z octanu celulozy, a jego produkty barwiono według zmodyfikowanej metodyki Heberta i Beatona (6). Analizami prowadzonymi od 1997 r. objęto ponad

10 000 roślin z linii hodowlanych oraz mieszańców dwu- i trójliniowych. W badanych materiałach zidentyfikowano trzy allele *Pgi-2*. Ocena ok. 20-50 roślin danej linii pozwalała na określenie, który allel *Pgi-2* występuje w roślinach, czy badane rośliny są homo- czy heterozygotyczne pod względem badanego locus oraz czy badana linia jest wyrównana. Pozwala to na eliminowanie tych roślin, które odbiegają fenotypem *Pgi-2* od większości roślin badanej linii. U kapusty nasiona odmian mieszańcowych produkowane są na podstawie zjawiska samonieżgodności. Często jednak dochodzi do przepyleń w obrębie formy matecznej w wyniku załamania się tego systemu, co prowadzi do zamieszania partii nasion mieszańcowych. Jeżeli linie rodzicielskie różnią się allelami *Pgi-2*, to analiza tego locus u minimum 100 roślin w obrębie każdego mieszańca pozwala na sprawdzenie ich mieszańcowego pochodzenia. Możliwe jest w ten sposób oszacowanie ewentualnego stopnia zamieszania nasion mieszańcowych.

4. Ocena podobieństwa genetycznego materiałów hodowlanych

Oceną objęto cztery zestawy linii hodowlanych (linie męskosterylne i dopełniające) i trzy mieszańce F_1 marchwi (*Daucus carota* L. ssp. *sativus*) otrzymane na bazie tych linii. Markery RAPD i AFLP zidentyfikowano przy wykorzystaniu standardowych metod, a produkty reakcji rozdzielano elektroforetycznie odpowiednio w 1% żelu agarozowym i 6% żelu poliakrylamidowym. Dla obu typów markerów sporządzono matryce dystansu genetycznego i dendrogramy ilustrujące podobieństwo genetyczne. W wyniku zastosowania tych technik otrzymano 47 markerów RAPD i 88 markerów AFLP. Obie techniki pozwoliły na ocenę poziomu zróżnicowania genetycznego pomiędzy badanymi materiałami hodowlanymi marchwi, które zostało zobrazowane w postaci dendrogramów. Otrzymane dendrogramy różniły się długością rozgałęzień, stanowiących miarę zróżnicowania genetycznego, natomiast układ obiektów charakteryzowało duże podobieństwo odzwierciedlające ich rodowody (korelacje pomiędzy maczycami podobieństwa genetycznego wynosiły: Pearsona 0,71 i Spearmana 0,55). Linie męskosterylne zawsze znajdowały się razem z odpowiadającymi im liniami dopełniającymi, a mieszańce zachowywały podobny dystans do obu form rodzicielskich. Połączenie wyników uzyskanych z obu technik w postaci jednego dendrogramu pozwoliło na uzyskanie najbardziej wiarygodnego obrazu pokrewieństwa badanych obiektów. Wykazano tym samym możliwość wykorzystania technik AFLP i RAPD do oceny zróżnicowania genetycznego u marchwi.

Literatura

1. Staub J. E., Serquen F. C., Gupta M., (1996), HortScience, 31(5), 729-741.
2. Karp A., Isaac P. G., Ingram D. S., (1998), *Molecular tools for screening biodiversity*, Chapman & Hall, London.

3. Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M., (1995), *Nucleic Acids Res.*, 23, 4407-4414.
4. Morgante M., Olivieri A. M., (1993), *Plant Journal*, 3, 175-182.
5. Williamson V. M., Ho J. Y., Wu F. F., Miller N., Kaloshian I., (1994), *Theor. Appl. Genet.*, 87, 757-763.
6. Barański R., (2000), *Acta Physiologiae Plantarum*, 22, 45-51.