



## Analiza polimorfizmu DNA odmian śliwy (*Prunus domestica* L.) przy użyciu techniki RAPD-PCR

Anna Lisek, Małgorzata Korbin, Edward Żurawicz, Elżbieta Rozpara  
Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, Skierniewice

### Analysis of plum (*Prunus domestica* L.) DNA polymorphism using RAPD-PCR technique

#### Summary

Precise identification of plum cultivars is desired in breeding programme of the species as well as in orchard practise. The aim of the presented studies was the determination of 19 plum cultivars *Prunus domestica* L. diversity. RAPD-PCR technique with 77 primers (Operon Technologies) from kits OPB, OPG, OPT and OPU was used for the analysis. Fifty-five polymorphic fragments DNA (600-2700 bp) were obtained in reactions with 33 primers. The highest number of polymorphic fragments (3-5) was observed in reactions with primers OPB 07, OPB 18, OPG 09, OPG 10 and OPT 14. The reactions with OPB 07, OPB 18 and OPG 09 allowed to diversify 15 cultivars, except 'Węgierka Zwykła' and clones 'Promis', 'Tolar', 'Nectavit'.

#### Key words:

plum, cultivars, DNA polymorphism, molecular markers, RAPD.

## 1. Wstęp

Śliwa (*Prunus domestica* L.) jest ważnym gatunkiem sadowniczym. Szybka i precyzyjna identyfikacja odmian śliwy jest podstawą programów krzyżowań i ochrony praw autorskich, a w praktyce sadowniczej i szkółkarskiej pozwala na rozwiązanie problemu zamieszkań. Określenie tożsamości genotypów na podstawie cech morfologicznych nie zawsze jest możliwe, a dodatkowym utrudnieniem bywa wpływ warunków środowiska na wygląd roślin oraz ich długi okres jwenilny. Czynniki te nie mają natomiast

#### Adres do korespondencji

Anna Lisek,  
Instytut Sadownictwa  
i Kwiaciarnictwa,  
ul. Pomologiczna 18,  
96-100 Skierniewice;  
e-mail: alisek@insad.pl

#### biotechnologia

2 (65) 67-72 2004

wpływu na wyniki uzyskiwane przy użyciu wielu technik molekularnych, opartych na analizie DNA roślin. Techniki molekularne (markery izoenzymatyczne, RFLP, AFLP) były już stosowane do odróżniania genotypów z rodzaju *Prunus* (1-7). Najpowszechniej stosowane do wstępnej identyfikacji roślin (stosunkowo prosta procedura i nieznaczne koszty) markery RAPD (losowo amplifikowany polimorficzny DNA), były także użyte w badaniach nad odmianami śliwy i podkładkami z rodzaju *Prunus* (8-12), jednakże badania te nie objęły wielu odmian śliwy uprawianych w Polsce. Celem pracy było określenie polimorfizmu DNA odmian śliwy (*Prunus domestica* L.) polecanych do uprawy w warunkach Polski.

## 2. Materiał i metody

### 2.1. Materiał roślinny

Badania przeprowadzono dla 19 odmian śliwy (*Prunus domestica* L.), (tab. 1), pochodzących z kolekcji hodowli zachowawczej odmian prowadzonej w Instytucie Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach. Próbkę pobierano z dwóch drzew każdej odmiany. Każda próbka zawierała 1 g tkanki roślinnej.

### 2.2. Izolacja DNA

DNA z utartej tkanki roślinnej izolowano metodą Doyle i Doyle (13). Tkanekę roślinną inkubowano w buforze ekstrakcyjnym (2% CTAB, 100 mM Tris HCl pH 8,0, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% PVP, 0,2%  $\beta$ -merkaptoetanol) w temperaturze 64°C (30 minut), a kwasy nukleinowe oczyszczano stosując chloroform/alkohol izoamylowy (24:1) oraz fenol/chloroform/alkohol izoamylowy (25:24:1). Polisacharydy usuwano z próbki 5 N NaCl. DNA wytrącono izopropanolem i zawieszono w buforze TE. RNA usuwano stosując RNazę A (60 minut, 37°C). Stężenie DNA w próbach oznaczano za pomocą spektrofotometru przy długości fali 260 nm.

### 2.3. Warunki RAPD-PCR

Reakcję RAPD-PCR przeprowadzono w objętości 13  $\mu$ l. Mieszanina reakcyjna zawierała 10  $\times$  bufor PCR, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM każdego nukleotydu, 0,325 U *Taq* polimerazy, 0,35  $\mu$ M startera, 13 ng DNA. W reakcji przetestowano 77 starterów z firmy Operon Technologies z grup OPB, OPG, OPT i OPU. Amplifikację DNA przeprowadzono w termocyklerze MJ Research (40 cykli: 95°C/30 s, 40°C/45 s, 72°C/90 s). Produkty reakcji rozdzielano w 1,2% żelu agarozowym, wybarwiano bromkiem ety-

dyny i wizualizowano w świetle UV. Do analizy wybrano wyłącznie informatywne produkty reakcji.

### 3. Wyniki i dyskusja

Stosując metodę RAPD-PCR z 64 spośród 77 testowanych starterów z grup OPB, OPG, OPT, OPU obserwowano amplifikację fragmentów DNA z materiału genetycznego wszystkich analizowanych odmian. Znaczące, polimorficzne produkty o długości od 600 do 2700 pz uzyskano w reakcji z 33 starterami. Łącznie uzyskano 55 polimorficznych fragmentów DNA. Najwięcej produktów polimorficznych (3-5) uzyskano w reakcji ze starterami OPB 07, OPB 18, OPG 09, OPG 10 i OPT 14. Przy użyciu pozostałych starterów otrzymywano 1, 2 fragmenty polimorficzne. Ostatecznie do odróżnienia odmian użyto trzech starterów OPB 07, OPB 18 i OPG 09 (tab. 1, rys.). Podobne wyniki uzyskiwali w pracach nad odmianami śliwy inni autorzy (8), którzy 31 odmian śliwy zidentyfikowali stosując 3 startery RAPD (Operon Technologies: B 1, AD 14 i AD 16).

Tabela 1

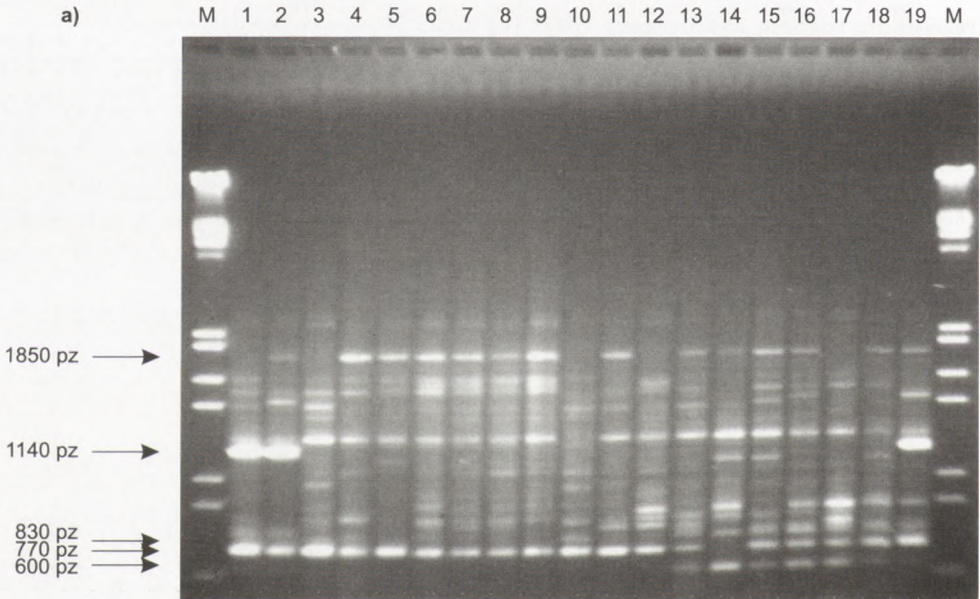
Polimorficzne fragmenty DNA uzyskane w reakcji PCR-RAPD z genomowym DNA 19 odmian śliwy

Odmiana	Długość fragmentu polimorficznego (pz)											
	Starter OPB 07					Starter OPB 18				Starter OPG 09		
	600	770	830	1140	1850	650	720	760	970	630	760	860
Herman	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1
Ruth Gerstetter	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0
Węgierka Wangenheima	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
Węgierka Dąbrowicka	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
Węgierka Wczesna	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1
Węgierka Zwykła	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1
Promis	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1
Tolar	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1
Nectavit	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1
Oneida	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Valjevka	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1
Cacanska Rodna	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1
Bluefre	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0
Amers	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
Renkloda Ulena	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1
Opal	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1
Valor	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Verity	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1
Sanctus Hubertus	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0

(1 – obecność fragmentu polimorficznego, 0 – jego brak).

Odmiany ‘Herman’, ‘Cacanska Rodna’, ‘Amers’, ‘Valor’ zróżnicowano na podstawie wyników reakcji RAPD ze starterem OPB 07, odmiany ‘Węgierka Wangenheima’, ‘Węgierka Wczesna’, ‘Oneida’, ‘Renkloda Ulena’, ‘Opal’ odróżniono na podstawie wyników reakcji ze starterami OPB 07 i OPB 18. Odmiany ‘Ruth Gerstetter’, ‘Węgierka Dąbrowicka’, ‘Valjevka’ i ‘Sanctus Hubertus’ identyfikowano na podstawie wzorów prążkowych DNA uzyskanych w reakcji ze starterami OPB 07 i OPG 09. Do odróżnienia odmian ‘Bluefre’ i ‘Verity’ konieczne było zastosowanie starterów OPB 07, OPB 18 i OPG 09.

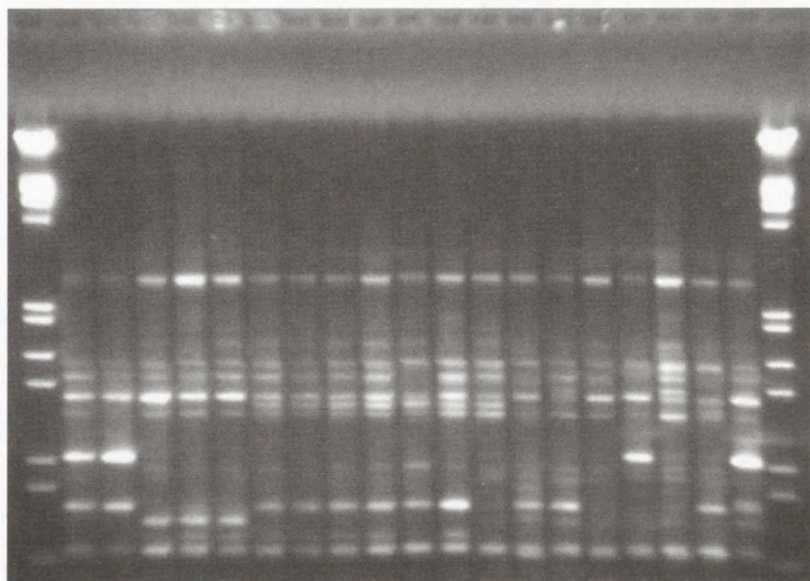
Analiza polimorfizmu DNA nie pozwoliła odróżnić odmian ‘Węgierka Zwykła’ oraz trzech jej klonów ‘Promis’, ‘Tolar’, i ‘Nectavit’. W przypadku tych odmian wzory DNA uzyskiwane w reakcjach z testowanymi starterami były takie same. Niemożność zidentyfikowania genotypów przy użyciu techniki RAPD była opisywana w badaniach nad śliwą (10), brzoskwinia (14) i migdałem (15). W takim przypadku zalecane jest użycie innych technik. Zastosowane w badaniach identyfikacyjnych śliwy markery ISSR i AFLP wykazywały wyższy stopień polimorfizmu DNA niż markery RAPD (5,10).



Rys. Polimorfizm DNA 19 odmian śliwy *Prunus domestica* L., w reakcji RAPD-PCR ze starterami a) OPB 07, b) OPB 18, c) OPG 09. M-marker Lambda DNA trawiony *Eco* RI i *Hin* d III, 1 – ‘Herman’, 2 – ‘Ruth Gerstetter’, 3 – ‘Węgierka Wangenheima’, 4 – ‘Węgierka Dąbrowicka’, 5 – ‘Węgierka Wczesna’, 6 – ‘Węgierka Zwykła’, 7 – ‘Promis’, 8 – ‘Tolar’, 9 – ‘Nectavit’, 10 – ‘Oneida’, 11 – ‘Valjevka’, 12 – ‘Cacanska Rodna’, 13 – ‘Bluefre’, 14 – ‘Amers’, 15 – ‘Renkloda Ulena’, 16 – ‘Opal’, 17 – ‘Valor’, 18 – ‘Verity’, 19 – ‘Sanctus Hubertus’.

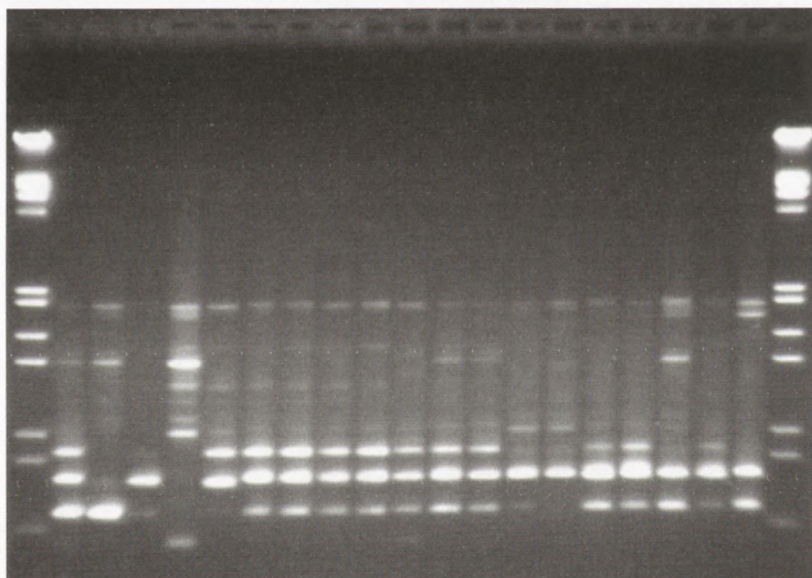
b) M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 M

970 pz →  
760 pz →  
720 pz →  
650 pz →



c) M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 M

860 pz →  
760 pz →  
630 pz →



Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że markery RAPD-PCR okazały się przydatne do odróżnienia badanych odmian śliwy. Odróżnienie odmiany 'Węgierka Zwykła' oraz trzech jej klonów wymaga zastosowania dodatkowych metod analizy DNA.

## Literatura

1. Agarwal S., Nath A. K., Sharma D. R., (2001), *Scientia Horticulturae*, 90, 227-242.
2. Byrne D. H., Littleton T. G., (1988), *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 113 (6), 918-924.
3. Rajapakse S., Belthoff L. E., He G., Estager A. E., Scorza R., Verde I., Ballard R. E., Baird W. V., Callahan A., Monet R., Abbott A. G., (1995), *Theor. Appl. Genet.*, 90, 503-510.
4. de Vincente M., Truco M. J., Egea J., Burgos L., Arus P., (1998), *Plant Breeding*, 117, 153-158.
5. Goulão L., Monte-Corvo L., Oliveira C. M., (2001), *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 126(1), 72-77.
6. Dirlwanger E., Duha S., Viruel M. A., Saunier R., (1998), *Acta Horticulturae*, 465, 69-77.
7. Zhou L., Kappel F., Hampson Ch., Wiersma P.A., Bakkeren G., (2002), *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 127(5), 786-792.
8. Ortiz A., Renaud R., Calzada I., Ritter E., (1997), *Journal of Horticultural Science*, 72(1), 1-9.
9. Bellini E., Giordani E., Nenecetti V., Paffetti D., (1998), *Acta Horticulturae*, 478, 53-59.
10. Shimada T., Hayama H., Haji T., Yamaguchi M., Yoshida M., (1999), *Euphytica*, 109, 143-147.
11. Zhen-Xiang L., Reighard G. L., Baird W. V., Abbott A. G., Rajapakse S., (1996), *HortScience*, 31(1), 127-129.
12. Casas A. M., Igartua E., Balaguer G., Moreno M. A., (1999), *Euphytica*, 110, 139-149.
13. Doyle J. J., Doyle J. L., (1990), *Focus*, 12, 13-15.
14. Warburton M. L., Bliss F. A., (1996), *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 121(6), 1012-1019.
15. Bartolozzi F., Warburton M. L., Arulsekhar S., Gradziel T. M., (1998), *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 123(3), 381-387.