

WYKORZYSTANIE MARKERÓW DNA DO OSZACOWANIA ZMIENNOŚCI W POLSKIEJ KOLEKCJI ZASOBÓW GENOWYCH MARCHWI (*Daucus carota* L.)

Rafał Barański¹, Dariusz Grzebelus¹, Teresa Kotlińska², Barbara Michalik¹

¹ Katedra Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa,
Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja w Krakowie

² Pracownia Zasobów Genowych,
Instytut Warzywnictwa im. Emila Chroboczka w Skierniewicach

Wstęp

W latach 2000–2002 prowadzono badania mające na celu ocenę zróżnicowania genetycznego kolekcji zasobów genowych marchwi, zgromadzonych w Pracowni Zasobów Genowych Instytutu Warzywnictwa w Skierniewicach. Ogółem do analiz wykorzystano 95 obiektów należących do rodziny *Apiaceae*, przy badaniu których wykorzystano markery RAPD oraz AFLP. U marchwi markery te były już wcześniej stosowane przez innych autorów dla oszacowania zróżnicowania genetycznego *Daucus carota* i gatunków pokrewnych. NAKAJIMA i in. [1998] podkreślili dużą zgodność otrzymanych wyników z obserwacjami morfologicznymi 26 obiektów z rodzaju *Daucus* o różnym pochodzeniu. Potwierdzili oni przydatność omawianych metod do określania zakresu zmienności, która była wynikiem różnic uwidoczniionych na podstawie analizy 238 markerów RAPD i AFLP, a nie tylko wybranych cech morfologicznych. BRADEEN i in. [2002] wykazali natomiast wysoki poziom zmienności genetycznej i jej nieuporządkowany charakter w obrębie dzikich i uprawnych form *Daucus carota*. GRZEBELUS i in. [2001b] stwierdzili występowanie wysokiego poziomu zmienności genetycznej w materiałach hodowlanych marchwi jadalnej i poddali w wątpliwość przydatność markerów AFLP do oceny czystości odmianowej. Porównanie technik RAPD i AFLP wskazało na podobną przydatność obu technik dla oceny zróżnicowania genetycznego marchwi [GRZEBELUS i in. 2001a]. W niniejszej pracy omówiono wyniki oceny zróżnicowania genetycznego w obrębie 27 obiektów ocenianych w roku 2002 oraz porównano wyniki otrzymane we wszystkich trzech latach badań dla siedmiu obiektów wzorcowych.

Materiał i metody

W roku 2002 badaniami objęto ogółem 27 obiektów należących do rodzajów *Daucus* (22 obiekty), *Torilis* (3 obiekty), *Caucalis* (1 obiekt) i *Orlaya* (1 obiekt), zgodnie ze wstępną klasyfikacją taksonomiczną, przeprowadzoną w trakcie misji kolekcyjnej oraz bezpośrednio po jej zakończeniu (tab. 1). Nasiona wy-

siano do skrzynek i uprawiano w warunkach szklarniowych aż do wytworzenia bujnej rozety liściowej. DNA izolowano z młodych liści 2–3 miesięcznych roślin marchwi. Dla każdego obiektu pobierano liście 15 roślin, mieszano je, a następnie zamrażano i ucierano w ciekłym azocie. Dalszą ekstrakcję prowadzono przy użyciu zestawu DNeasy Plant Kit (Qiagen) zgodnie z instrukcją. Reakcję powielania DNA prowadzono w objętości 20 μ l w warunkach typowych dla techniki RAPD, temperatura przyłączania starterów wynosiła 42°C, a czas syntezy nici komplementarnej (72°C) w każdym z 40 cykli wynosił 2,5 min. Produkty PCR rozdzielano w 1% żelu agarozowym i barwiono bromkiem etydyny. Analizy AFLP prowadzono przy wykorzystaniu zestawów odczynników AFLP Core Reagent Kit i AFLP Starter Primer Kit (Invitrogen). Kolejne etapy (restrykcja mieszaniną enzymów *EcoRI* i *MseI*, ligacja adapterów, preamplifikacja i selektywna amplifikacja) prowadzono zgodnie ze zmodyfikowaną metodyką AFLP [BRIARD i in. 2000]. Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 6% denaturującym żelu poliakrylamidowym. Elektroforogramy wizualizowano przy wykorzystaniu procedury barwienia srebrowego [BRIARD i in. 2000].

Tabela 1; Table 1

Lista obiektów wykorzystanych w badaniach
List of accessions used in the study

Numer obiektu Accession no.	Wstępna klasyfikacja taksonomiczna Initial taxonomic classification	Kraj pochodzenia Country of origin
Amsterdam 2 Sweetheart	<i>Daucus carota</i>	Holandia; The Netherlands
G 013	<i>Daucus carota</i>	Grecja; Greece
G 088	<i>Daucus carota</i>	Grecja; Greece
G 118	<i>Daucus carota</i>	Grecja; Greece
S 097	<i>Daucus carota</i>	Syria
T 053	<i>Daucus carota</i>	Turcja; Turkey
T 085	<i>Daucus carota</i>	Turcja; Turkey
T 130	<i>Daucus carota</i>	Turcja; Turkey
S 076	<i>Daucus broteri</i>	Syria
T 046	<i>Daucus broteri</i>	Turcja; Turkey
G 007	<i>Daucus guttatus</i>	Grecja; Greece
G 015	<i>Daucus guttatus</i>	Grecja; Greece
T 035	<i>Daucus guttatus</i>	Turcja; Turkey
T 058	<i>Daucus involucratus</i>	Turcja; Turkey
S 078	<i>Daucus</i> sp.	Syria
S 122	<i>Daucus</i> sp.	Syria
T 047	<i>Daucus</i> sp.	Turcja; Turkey
T 069	<i>Daucus</i> sp.	Turcja; Turkey
T 080	<i>Daucus</i> sp.	Turcja; Turkey
T 086	<i>Daucus</i> sp.	Turcja; Turkey
T 103	<i>Daucus</i> sp.	Turcja; Turkey

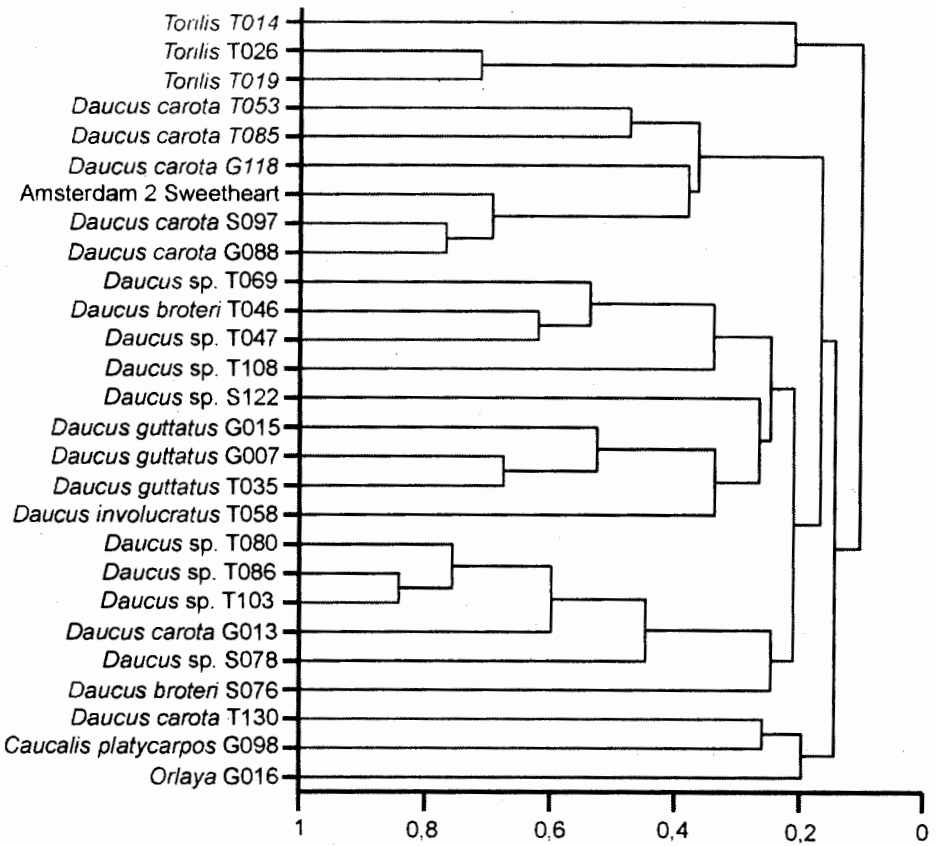
T 108	<i>Daucus</i> sp.	Turcja; Turkey
T 108	<i>Daucus</i> sp.	Turcja; Turkey
G 098	<i>Caucalis</i> sp.	Grecja; Greece
G 016	<i>Orlaya</i> sp.	Grecja; Greece
T 014	<i>Torilis</i> sp.	Turcja; Turkey
T 019	<i>Torilis</i> sp.	Turcja; Turkey
T 026	<i>Torilis</i> sp.	Turcja; Turkey

W celu weryfikacji powtarzalności uzyskanych wyników porównano topologię dendrogramów dla siedmiu obiektów wzorcowych analizowanych we wszystkich latach badań.

Macierze podobieństwa genetycznego wyliczono przy zastosowaniu współczynnika Jaccarda wykorzystując program GenStat v. 6.0. Dendrogram obrazujący zróżnicowanie genetyczne wykreślono w oparciu o algorytm UPGMA. Wyliczono również korelacje między macierzami podobieństwa genetycznego.

Wyniki i dyskusja

W roku 2002 uzyskano 144 markery różnicujące badane obiekty, spośród których 67 otrzymano techniką RAPD, a 77 techniką AFLP, przy czym wzory prążkowe otrzymane zarówno w oparciu o technikę RAPD, jak i AFLP były wysoce polimorficzne. LE CLERC i in. [2002] postulują, że 70 markerów molekularnych to liczba wystarczająca dla wiarygodnej oceny dystansu genetycznego. W niniejszej pracy wykorzystano w tym celu dwukrotnie więcej markerów. Wysoką wiarygodność otrzymanych wyników potwierdza również fakt, iż porównanie macierzy podobieństwa genetycznego wskazuje na dużą zgodność otrzymanych wyników, niezależnie od wybranego rodzaju markerów. Świadczą o tym również wysokie wartości współczynników korelacji (tab. 2). Otrzymane na podstawie tych macierzy dendrogramy pozwoliły na wyróżnienie trzech głównych grup obiektów (rys. 1). Pierwsza obejmowała obiekty należące do rodzaju *Torilis*, druga do rodzaju *Orlaya* i *Caucalis*, a trzecia do *Daucus*. W obrębie grupy *Daucus* znajdowały się dwa siostrzane skupienia, pierwsze obejmujące obiekty *D. carota*, drugie – dzięki gatunkowi *Daucus*, z wyraźnie wyodrębnioną grupą trzech obiektów należących do gatunku *D. guttatus*. Nie stwierdzono grupowania się obiektów zgodnie z ich pochodzeniem geograficznym, co potwierdza obserwacje BRADENA i in. [2002], dotyczące nieustrukturyzowanego charakteru zmienności w obrębie gatunku *D. carota*. SHIM i JØRGENSEN [2000] donosili natomiast o istnieniu związku między lokalizacją geograficzną a dystansem genetycznym dzikich populacji *D. carota* z terenu Danii. Lokalizacja kilku obiektów (*D. carota* T130, *D. carota* G013 oraz jednego z dwóch obiektów *D. broteri*) nie korespondowała z ich proponowaną klasyfikacją taksonomiczną. Wskazuje to na konieczność weryfikacji oceny zebranych obiektów pod względem taksonomicznym. Porównanie macierzy podobieństw genetycznych dla siedmiu obiektów powtórzonych we wszystkich latach badań wskazuje na bardzo dużą zgodność otrzymanych wyników (tab. 3). Również dendrogramy charakteryzowały się bardzo zbliżonym układem obiektów (rys. 2). Grupa obejmująca trzech przedstawicieli gatunku *D. carota* cechowała się naj-



Rys. 1. Dendrogram obrazujący podobieństwo genetyczne 27 obiektów na podstawie łącznej analizy markerów RAPD i AFLP

Fig. 1. Dendrogram illustrating genetic similarity of 27 carrot accessions based on RAPD and AFLP markers

Tabela 2; Table 2

Współczynniki korelacji pomiędzy macierzami podobieństwa genetycznego 27 obiektów otrzymanymi przy wykorzystaniu różnych markerów molekularnych

Correlation coefficients between matrices of genetic similarity for 27 carrot accessions obtained with different kinds of molecular markers

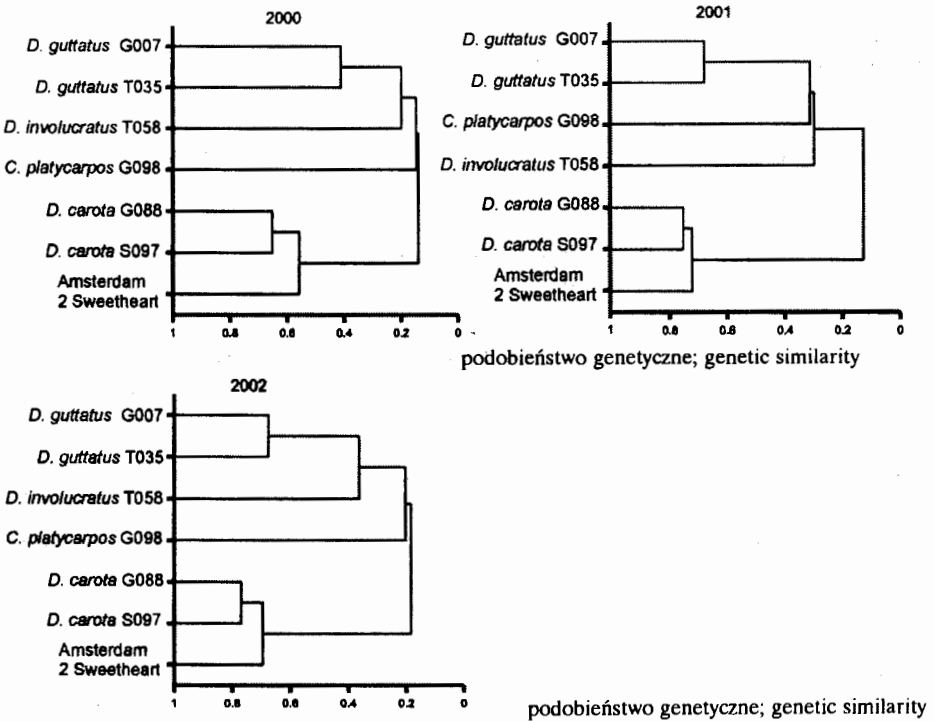
Techniki Techniques	RAPD	AFLP	RAPD i AFLP RAPD and AFLP
RAPD	1		
AFLP	0,912	1	
RAPD i AFLP	0,971	0,983	1

Tabela 3; Table 3

Współczynniki korelacji pomiędzy macierzami podobieństwa genetycznego siedmiu obiektów badanych w latach 2000–2002

Correlation coefficients between matrices of genetic similarity for seven carrot accessions evaluated in the years 2000–2002

Lata; Years	2000	2001	2002
2000	1		
2001	0,973	1	
2002	0,977	0,983	1



Rys. 2. Podobieństwo genetyczne siedmiu obiektów badanych w latach 2000–2002
Fig. 2. Genetic similarity of seven carrot accessions evaluated in 2000–2002

większym podobieństwem genetycznym, a jednocześnie była ona najbardziej oddalona od pozostałych obiektów należących do rodzajów *Daucus* oraz *Caucualis*. Uzyskane wyniki są wykorzystywane przez kuratora kolekcji do racjonalizacji zarządzania polskimi zasobami genowymi marchwi.

Wnioski

1. Markery RAPD i AFLP są przydatne dla oceny dystansu genetycznego w kolekcji zasobów genowych rodzaju *Daucus* i pokrewnych, a także do weryfikacji taksonomicznej klasyfikacji zgromadzonych materiałów.

2. Macierze dystansu genetycznego były podobne niezależnie od wybranego rodzaju markerów.
3. Stwierdzono dużą zgodność wyników w kolejnych latach badań dla siedmiu obiektów wzorcowych.

Literatura

BRADEEN J.M., BACH I.C., BRIARD M., LE CLERC V., GRZEBELUS D., SENALIK D., SIMON P.W. 2002. *Molecular diversity analysis of cultivated carrot (*Daucus carota*) and wild *Daucus* populations reveals a genetically nonstructured composition*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 127: 383–391.

BRIARD M., LE CLERC V., GRZEBELUS D., SENALIK D., SIMON P.W. 2000. *Modified protocols for rapid extraction of plant genomic DNA, AFLP™ analysis, and visualization with radioisotope or silver stain in carrots*. Pl. Mol. Biol. Rep. 18: 235–241.

GRZEBELUS D., BARAŃSKI R., JAGOSZ B., MICHALIK B., SIMON P.W. 2001a. *Comparison of RAPD and AFLP techniques used for the evaluation of genetic diversity of carrot breeding materials*. Acta Hort. 546: 413–416.

GRZEBELUS D., SENALIK D., JAGOSZ B., SIMON P.W., MICHALIK B. 2001b. *The use of AFLP markers for the identification of carrot breeding lines and F1 hybrids*. Plant Breeding 120: 526–528.

LE CLERC V., BRIARD M., REVOLLON P. 2002. *Influence of number and map distribution of AFLP markers on similarity estimates in carrot*. Theor. Appl. Genet. 106: 157–162.

NAKAJIMA Y., OEDA K., YAMAMOTO T. 1998. *Characterization of genetic diversity of nuclear and mitochondrial genomes in *Daucus* varieties by RAPD and AFLP*. Plant Cell Rep. 17: 848–853.

SHIM S.I., JØRGENSEN R.B. 2000. *Genetic structure in cultivated and wild carrots (*Daucus carota* L.) revealed by AFLP analysis*. Theor. Appl. Genet. 101: 227–233.

Słowa kluczowe: marchew, dystans genetyczny, zasoby genowe

Streszczenie

Ocenę zróżnicowania genetycznego prowadzono dla 27 obiektów należących do rodzajów *Daucus*, *Caucalis*, *Orlaya* i *Torilis* w oparciu o 144 markery różnicujące badane obiekty, spośród których 67 otrzymano techniką RAPD, a 77 techniką AFLP. Macierze dystansu genetycznego były podobne, niezależnie od wybranego rodzaju markerów. Analiza pozwoliła na wyróżnienie trzech głównych grup obiektów obejmujących odpowiednio obiekty należące do rodzaju *Torilis*, *Orlaya/Caucalis* oraz *Daucus*. Porównanie macierzy podobieństw genetycznych dla siedmiu obiektów powtórzonych w trzech latach badań wskazało na bardzo dużą zgodność otrzymanych wyników, co zostało potwierdzone bardzo zbliżonym układem obiektów na dendrogramach. Uzyskane wyniki są wykorzystywane przez kuratora kolekcji do racjonalizacji zarządzania polskimi zasobami genowymi marchwi.

THE USE OF DNA MARKERS FOR EVALUATION
OF GENETIC DIVERSITY IN THE POLISH GERMPLASM COLLECTION
OF CARROT (*Daucus carota* L.)

Rafał Barański¹, Dariusz Grzebelus¹, Teresa Kotlińska², Barbara Michalik¹

¹Department of Genetics, Plant Breeding and Seed Science,
Agricultural University, Kraków

²Gene Bank, Institute of Vegetable Crops, Skierniewice

Key words: carrot, genetic distance, germplasm

Summary

Genetic diversity was evaluated for 27 accessions belonging to genera *Daucus*, *Caucalis*, *Orlaya* and *Torilis* on the basis of 144 molecular markers differentiating them, out of which 67 were obtained using RAPD, and 77 using AFLP techniques. Genetic distance matrices were similar regardless the kind of marker. Analysis allowed for the identification of three clusters grouping accessions belonging to genera *Torilis*, *Orlaya/Caucalis* and *Daucus*. Comparison of similarity matrices for seven accessions evaluated in all three years showed that the results were highly reproducible, which was confirmed by a similar tree topology. The results are utilized by the curator as a tool for more rational management of the collection.

Dr inż. Dariusz **Grzebelus**

Katedra Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa
Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja w Krakowie

Al. 29 Listopada 54

31-425 KRAKÓW

e-mail: dgrzebel@ogr.ar.krakow.pl