

VYUŽITÍ TECHNIK SSR A ISSR PRO IDENTIFIKACI ODRŮD BRAMBOR

Nováková, A., Čurn, V., Bárta, J., Heřmanová, V.

Biotechnologické centrum, Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích



ÚVOD

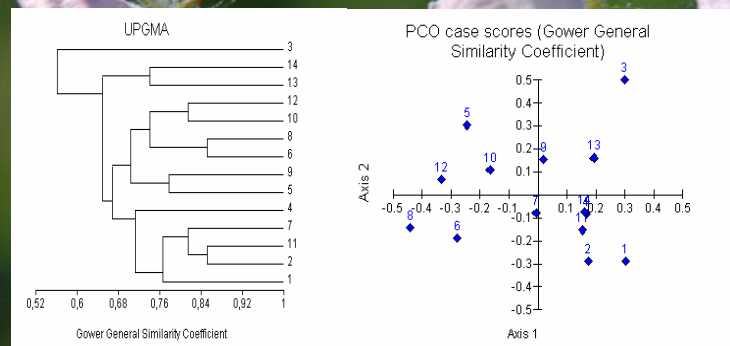
V současné době je v České republice registrováno 150 odrůd brambor (stav roku 2005), z nichž přes 70 % jsou produkty zahraničních (evropských) šlechtitelských subjektů. Klasická morfometrická charakterizace odrůd přestává být v objemu registrovaných odrůd účinná, obzvláště na úrovni hlíz. Pořeba identifikovat konkrétní odrůdu na úrovni hlíz je přitom nejdůležitější, hlavně z obchodního hlediska. Platný zákon č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích a vyhláška na něj navazující (Vyhláška MZe č. 332/1997 Sb.) vyžadují u konzumních brambor garanci odrůdové deklaraci při obchodním styku.

Tradičním postupem identifikace odrůd je porovnání nejrůznějších morfologických a hospodářských znaků, nicméně současná úroveň pěstování plodin požaduje stále více zavádění nových, rychlých a přesných metod. Molekulární a biochemické markery se staly účinným nástrojem stanovení genetické variability, který umožňuje charakterizaci jednotlivých genotypů.

Cílem tohoto příspěvku bylo prověřit vhodnosti molekulárních markerů SSR a ISSR pro charakterizaci a identifikaci odrůd brambor.

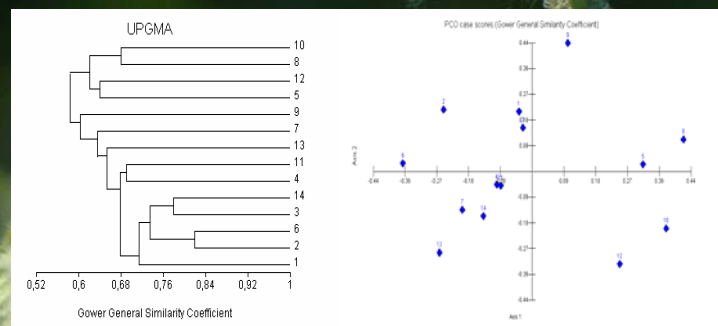
VÝSLEDKY A ZÁVĚR

Celý datový soubor získaný na základě SSR a ISSR analýz byl vyhodnocen standardními statistickými metodami a na Obr. 1 – 3 jsou uvedeny výsledky shlukové analýzy (UPGMA metoda) a ordinační analýzy (PCO analýza). Genetická podobnost byla stanovena pro všechny porovnávané vzorky, byly sestaveny matice genetických distancí (Gower General Similarity coefficient) a tyto hodnoty byly dále statisticky vyhodnoceny. Výsledky shlukových analýz jsou prezentované ve formě dendrogramu, výsledky PCO analýzy ve formě ordinačního diagramu.



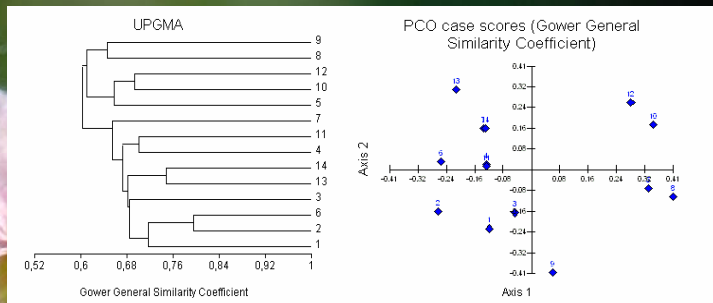
Obr. 1: Výsledky shlukové (a) a ordinační analýzy – PCO analýza (b) získané na základě vyhodnocení 10 SSR markerů.

SSRs analýza. Polymorfismus SSR markerů (Simple Sequence Repeats) byl sledován u čtrnácti vybraných odrůd po amplifikaci mikrosatelitních lokusů pomocí deseti vybraných primerových párů. Statistické hodnocení vycházelo z matice přítomnosti polymorfních fragmentů a bylo hodnoceno 28 polymorfních ze 34 možných pozic fragmentů. Z dendrogramu vyplývá, že nejvyšší podobnost mají dvojice odrůd Karmela (2) a Westamyl (11) a Sinora (6) a Keřkovské rohlíčky (8), ale i u nich je podobnost jen okolo 85%.



Obr. 2: Výsledky shlukové (a) a ordinační analýzy – PCO analýza (b) získané na základě vyhodnocení 4 ISSR markerů.

ISSRs analýza. Polymorfismus ISSR markerů (Inter Simple Sequence Repeats) byl sledován rovněž u čtrnácti vybraných odrůd po amplifikaci DNA pomocí čtyř vybraných primerů. Pro statistické hodnocení na základě matice přítomnosti polymorfních fragmentů bylo použito 100 polymorfních ze 102 možných pozic fragmentů. Z dendrogramu je patrné, že podobnost mezi odrůdami se pohybuje v rozmezí 55 – 80%.



Obr. 3: Výsledky shlukové (a) a ordinační analýzy – PCO analýza (b) získané na základě vyhodnocení všech SSR a ISSR markerů.

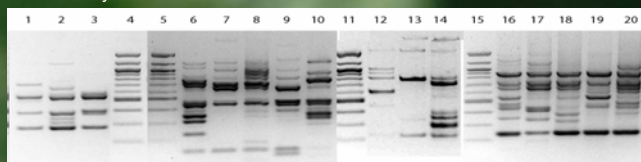
SSR a ISSR. Statistické hodnocení vycházelo z matice přítomnosti polymorfních fragmentů získaných při obou analýzách a bylo hodnoceno 128 polymorfních ze 136 možných pozic fragmentů. Z dendrogramu je patrné, že analyzované vzorky tvoří individuální skupiny s mírou podobnosti 55-80%.

Míra odlišnosti mezi jednotlivými vzorky/odrůdami je dostatečná a umožňuje jejich jednoznačnou identifikaci. Obdobný charakter mají i výsledky PCO analýz, kdy se nevytváří patrné shluky odrůd, individuální vzorky jsou dobře odlišitelné. Při porovnání výsledků je patrné, že charakter distribuce SSR a ISSR markerů je odlišný, vzorky jsou na dendrogramech na obr. 1a a 2a seskupeny v odlišných skupinách a tyto dva markerovací systémy se jeví jako nezávislé.

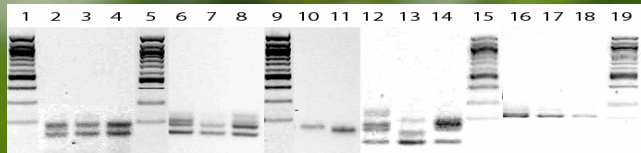
Byla získána spektra deseti SSR a čtyř ISSR markerů pro čtrnáct vybraných odrůd brambor z celkového množství sto padesáti odrůd registrovaných v ČR v roce 2005. Byl zhodnocen získaný polymorfismus a odrůdy byly rozděleny do kategorií podle elektroforetického fenotypu. Metoda analýzy polymorfismu mikrosatelitů (SSR i ISSR) je vhodnou metodou pro hodnocení variability a identifikaci vybraných odrůd, avšak s určitým omezením u SSR, kterým je malý polymorfismus detekovaný v jednotlivých lokusech a pro hodnocení je pak nutné použít více mikrosatelitních lokusů.

Z dosavadních výsledků a nových poznatků se jako další vhodný přístup jeví použití molekulárních technik REMAP, IRAM, RBIP. Tyto markery vykazují vyšší míru polymorfismu a podle nejnovějších výsledků můžeme u těchto technik předpokládat použití pouze jednoho nebo několika málo primerů pro jednoznačné odlišení širšího spektra odrůd (Bežo *et al.*, 2006).

Pro případné spolehlivé odlišení všech odrůd pěstovaných v ČR by bylo vhodné použít větší počet markerů, ať již molekulárních nebo morfologických či biochemických.



Obr.4: Příklad elektroforeogramu produktů amplifikace s ISSR markery. 1-3 amplifikováno s primerem P1 odrůdy Colette, Karmela a Aneta, 4-10 amplifikováno s primerem P3 odrůdy Colette, Karmela, Aneta, Delikat a Liseta, 12-14 amplifikováno s primerem B1 odrůdy Colette, Karmela a Aneta, 16-20 amplifikováno s primerem B1 odrůdy Colette, Karmela, Aneta, Delikat a Liseta, 4,5,11 a 15 velikostní marker 100bp.



Obr.5: Příklad elektroforeogramu produktů amplifikace s SSR markery. 2-4 amplifikováno s primerem STGBSS odrůdy Colette a Karmela, 5-8 amplifikováno s primerem STM3012 odrůdy Colette, Karmela a Aneta, 9-11 amplifikováno s primerem STWIN12G odrůdy Westamyl a Flora, 12-14 amplifikováno s primerem STM3015 odrůdy Keřkovské rohlíčky, Vladan a Desirée, 16-18 amplifikováno s primerem STM1052 odrůdy Flora, Futura a Valfi, 1,5,9,15 a 19 velikostní marker 100bp.

MATERIÁL A METODIKA

Rostlinný materiál.

Pro analýzy byly použity hlízy vybraných registrovaných odrůd brambor, a to Aneta (3), Colette (1), Delikat (4), Desirée (10), Flora (12), Fontána (7), Futura (13), Karmela (2), Keřkovské rohlíčky (8), Liseta (5), Sinora (6), Valfi (14), Vladan (9), Westamyl (11), které byly získány z pracoviště ÚKZÚZ Lupa u Havlíčkova Brodu. Izolace DNA byla prováděna ze získané hlízové stávy, za použití izolacího kitu Invisorb Spin Plant Mini Kit (INVITEK).

PCR-SSR analýza.

Pro PCR-SSR analýzy byly vybrány primery STM1102, STM2005, STM3015, STWIN12G, STGBSS, STIIKA, STM3012, STM1106, STM1052, STS1 a STS2.

ISSR analýza.

Pro PCR-ISSR analýzy byly vybrány primery P1, P3, P4 a B1.

SSR a ISSR analýzy byly prováděny podle standardních protokolů Biotechnologického centra, Zemědělské fakulty, Jihočeské univerzity (http://www2.zf.jcu.cz/public/departments/amlab/te-sarce/uvod_mib.pdf)