

MOLEKULÁRNA IDENTIFIKÁCIA DRUHOV RODU LÁSKAVEC (*AMARANTHUS L.*) VYUŽÍVANÝCH VO VÝŽIVE. MOLECULAR IDENTIFICATION OF AMARANTH (*AMARANTHUS L.*) SPECIES USED IN NUTRITION.

Veronika Štefúnová, Milan Bežo, Mária Labajová

Abstract: Sixteen genotypes of *Amaranthus caudatus* L., eighteen genotypes of *Amaranthus cruentus* L., and twenty-one genotypes of *Amaranthus hypochondriacus* L. were analyzed using RAPD and ISSR markers. RAPD analysis revealed 72,73–94,12 % polymorphism between *Amaranthus caudatus* L. genotypes, 63,64–93,75 % polymorphism between *Amaranthus cruentus* L. genotypes and 70,00–100,00 % between *Amaranthus hypochondriacus* L. genotypes. ISSR analysis revealed 55,56–100,00 % polymorphism between *Amaranthus caudatus* L. genotypes, 70,00–100,00 % polymorphism between *Amaranthus cruentus* L. genotypes and 64,71–100,00 % between *Amaranthus hypochondriacus* L. genotypes.

Keywords: *Amaranthus caudatus* L., *Amaranthus cruentus* L., *Amaranthus hypochondriacus* L., RAPD, ISSR

ÚVOD

Metodologické zázemie hodnotenia biologickej rozmanitosti jednotlivých kultúrnych aj voľne rastúcich rastlinných druhov je dnes tvorené širokým spektrom molekulárnych analýz (Oslovičová et al. 2010; Vivodík et al. 2011; Ražná, Žiarovská, 2011). Jedným z viacerých aspektov analyzovaným rodom je aj láskavec. Rod láskavec (*Amaranthus* L.) zahŕňa približne 60 druhov, pestované aj voľne rastúce formy. Pestované druhy láskavca sú využívané pre získavanie semien, listov, využívajú sa ako krmivo, ako aj v záhradníctve (Brenner et al., 2000). Tri druhy rodu láskavec sú využívané na produkciu semien: láskavec červenoklasý (*Amaranthus hypochondriacus* L.), láskavec metlinatý (*Amaranthus cruentus* L.) a láskavec chvostnatý (*Amaranthus caudatus* L.) (Lanoue et al., 1996). Keďže pre efektívne využívanie genetických zdrojov rastlín z kolekcii genofondu rastlín je nevyhnutné poznanie fylogenetických vzťahov, niektoré štúdie sa zaoberali otázkou genetickej príbuznosti a rozmanitosti v rámci rodu láskavec s využitím molekulárnych analýz (Xu, Sun, 2001).

Cieľom štúdie bolo analyzovať genotypy troch druhov rodu láskavec (*Amaranthus* L.) na molekulárnej úrovni s využitím techník RAPD a ISSR na princípe polymerázovej reťazovej reakcie.

MATERIÁL A METÓDY

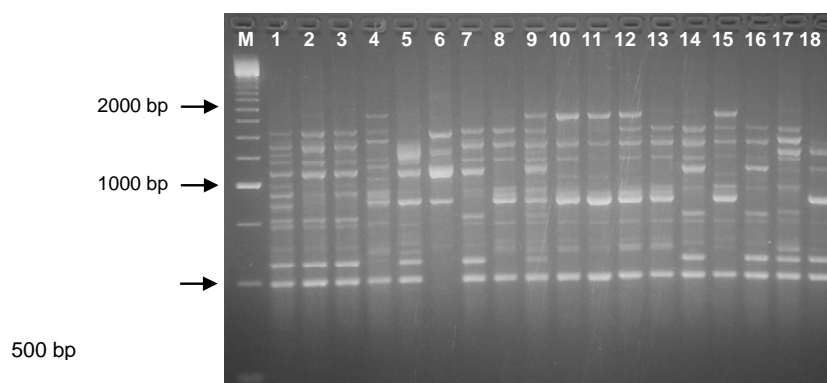
Do štúdie bolo zahrnutých 16 genotypov láskavca chvostnatého, 18 genotypov genotypov láskavca metlinatého a 21 genotypov láskavca červenoklasého. Biologický materiál vo forme semien bol získaný z North Central Regional PI Station (NC 7), Iowa State University, Ames. DNA bola izolovaná z čerstvých listov rastlín genotypov rodu láskavec, pestovaných v *in vitro* podmienkach. Pre izoláciu DNA bol optimalizovaný protokol autorov Rogers, Bendich et al. (1994). Na základe optimalizácie podmienok PCR boli stanovené podmienky pre RAPD analýzu: 20 mmol.dm⁻³ Tris-HCl, pH 8,0, 50 mmol.dm⁻³ KCl, 1 U Taq polymerázy, 3 mmol.dm⁻³ MgCl₂, 0,1 mmol.dm⁻³ deoxyribonukleotidy, 0,4 μmol.dm⁻³ prajmer, 20 ng DNA.

Časový a teplotný profil reakcií bol nasledovný: 2 minúty pri 94 °C pre úvodnú denaturáciu, 45 cyklov: 1 minútu pri 94 °C pre denaturáciu, 1 minútu pri 36 °C pre naviazanie prajmera, 2 minúty pri 72 °C pre polymerizáciu a záverečný krok 7 minút pri 72 °C pre polymerizáciu. Reakcie prebiehali v termocykléri PTC-150 Minicycler (MJ Research). Optimalizované podmienky boli stanovené aj pre ISSR analýzu: 20 mmol.dm⁻³ Tris-HCl, pH 8,0, 50 mmol.dm⁻³ KCl, 1 U Taq polymerázy, 3 mmol.dm⁻³ MgCl₂, 0,1 mmol.dm⁻³ deoxyribonukleotidy, 0,2 μmol.dm⁻³ prajmer, 20 ng DNA. Produkty polymerázovej reťazovej reakcie boli rozdeľované v 2 % agarózovom géli (3 : 1, Amresco) v 1 × TBE tlmivom roztoku, farbené etídium bromidom (0,5 μg.ml⁻¹) a fotografované pri UV žiarení pomocou dokumentačného systému KODAK EDAS 290. Vo elektroforeogramoch bol použitý markér 250 bp DNA markér (Invitrogen™, Life Technologies) pre určenie veľkosti zmnožených fragmentov. Zo získaných elektroforeogramov bola hodnotená prítomnosť alebo neprítomnosť nasyntetizovaného DNA fragmentu s použitím GeneSnap (Syngene) programu. Genetická príbuznosť bola počítaná na základe Nei, Li (1979) indexu príbuznosti. Výsledné matice boli zostrojené analýzou UPGMA štatistickým programom SYNTAX.

VÝSLEDKY

DNA polymorfizmus láskavca chvostnatého bol hodnotený metódou RAPD pomocou 5 prajmerov. Priemerná hodnota indexu príbuznosti medzi genotypmi podľa Nei, Li (1979) bola 0,71. Rozlišovacia schopnosť prajmera bola v rozsahu 3,25–6,88, s priemerom 4,85. Použitím jednotlivých prajmerov bolo možné rozlíšiť 19–75 % genotypov. Najviac genotypov (75 %) bolo možné rozlíšiť prajmerom RALA-05 (5'CCCGCCTCCC 3'). Polymorfizmus zmnožených úsekov DNA genotypov láskavca chvostnatého medzi jednoduchými opakujúcimi sa poradiami nukleotidov bol analyzovaný pomocou 8 prajmerov. Priemerná hodnota indexu príbuznosti medzi rovnakým spektrom genotypov podľa Nei, Li (1979) bola takmer na rovnakej úrovni, ako priemerná hodnota zistená metódou RAPD (0,72). Priemerná hodnota rozlišovacej sily prajmera Rp (6,30) bola o 29,82 % vyššia ako priemerná hodnota rozlišovacej schopnosti prajmera zistená metódou RAPD. Ôsmimi prajmermi použitými v ISSR analýze sa rozlíšilo od 38 do 88% genotypov. Viac ako 75% genotypov sa rozlíšilo pomocou štyroch prajmerov (ISLA-(CA)₆GT – 75 %, ISLA-(CA)₆AG – 81 %, ISLA-(CA)₆GG – 88 %, ISLA-(GT)₆CC – 88 %). Vysoký stupeň genetickej príbuznosti medzi genotypmi láskavca chvostnatého, určený na základe polymorfizmu RAPD a ISSR markerov, indikuje spoľahlivosť oboch metód pre hodnotenie vzájomných vzťahov.

Polymorfizmus náhodne zmnoženej DNA metódou RAPD medzi genotypmi láskavca metlinatého bol hodnotený pomocou 9 prajmerov. Priemerná hodnota indexu príbuznosti (0,76) bola o 6,60 % vyššia ako v genotypoch láskavca chvostnatého. Na druhej strane, priemerná hodnota rozlišovacej schopnosti prajmera Rp (3,89) v metóde RAPD bola o 19,79 % nižšia ako priemerná hodnota rozlišovacej schopnosti prajmera v metóde RAPD zistená v genotypoch láskavca chvostnatého. Setom uvedených prajmerov sa odlišilo od 22 do 72 % genotypov. Prajмеры RALA-03 (5'CCTGGGCCTC 3') a RALA-08 (5'CCGGCCTTCC 3') rozlíšili najviac genotypov (72 %) láskavca metlinatého. Polymorfizmus zmnožených úsekov DNA láskavca metlinatého medzi jednoduchými opakujúcimi sa poradiami nukleotidov bol analyzovaný pomocou 6 prajmerov. Priemerná hodnota indexu príbuznosti genotypov láskavca metlinatého (0,74) bola o 2,63 % nižšia ako pri použití metódy RAPD. Obdobne ako pri metóde RAPD, aj pri použití ISSR bola priemerná hodnota rozlišovacej sily prajmera (5,28) nižšia ako pri analýze genotypov láskavca chvostnatého. Použitím šiestich prajmerov sa rozlíšilo od 39 do 89 % genotypov. Tri prajмеры (ISLA-(GT)₆CC, ISLA-(GTG)₃GC, ISLA-(GA)₆CC) umožnili rozlíšiť viac ako 75 % analyzovaných genotypov.



Obrázok 1. Elektroforeogram rozdelených nasyntetizovaných fragmentov DNA genotypov láskavca metlinatého v PCR ISSR s prajmerom ISLA-(GA)₆CC. M – molekulový markér, 1 – Ames 1959 RRC 1, 2 – Ames 5129 RRC 360, 3 – Ames 21948, 4 – PI 566896 Komo, 5 – PI 511719 Niqua, alegria, chang, 6 – PI 511876 Huatle, 7 – PI 527567 IZ 32, 8 – PI 604558 Mapes 821, 9 – PI 612169 Tibet Yellow, 10 – Ames 5638 RRC 1139, 11 – Ames 5648 RRC 1148, 12 – PI 477913 RRC 1011, 13 – Ames 5493 RRC 768, 14 – Ames 5369 RRC 685, 15 – Ames 5310 RRC 659, 16 – Ames 25121 CEN/IB/97/AMA/003, 17 – Ames 2215 RRC 308, 18 – PI 566897 Kerala Red.

Polymorfizmus náhodne zmnoženej DNA láskavca červenoklasého bol hodnotený metódou RAPD pomocou 4 prajmerov. Priemerná hodnota indexu príbuznosti (0,70) bola najnižšia v porovnaní s predchádzajúcimi dvomi druhmi láskavca. Priemerná hodnota rozlišovacej schopnosti prajmera Rp (4,91) pre genotypy láskavca červenoklasého bola najvyššia zo všetkých troch analyzovaných druhov metódou RAPD. Jednotlivé prajmery v RAPD analýze rozlíšili 38 až 62 % genotypov. Žiaden z prajmerov nerozlíšil viac ako 75% genotypov, najviac genotypov (62 %) bolo možné rozlíšiť pomocou prajmera RALA-01 (5'CTGGGTGGA 3'). ISSR polymorfizmus DNA genotypov láskavca červenoklasého bol analyzovaný pomocou 7 prajmerov. Priemerná hodnota indexu príbuznosti (0,73) bola porovnateľná s ostatnými analyzovanými druhmi láskavca. Na druhej strane priemerná hodnota rozlišovacej sily prajmera Rp (4,27) bola najnižšia medzi porovnávanými druhmi láskavca, analyzovanými metódou ISSR. Jednotlivé prajmery v ISSR analýze rozlíšili 29–62 % genotypov. Rovnako pri analýze metódou RAPD, aj pri metóde ISSR, bolo možné jedným prajmerom rozlíšiť len 62 % genotypov použitím prajmera ISLA-(GTG)₃GC.

ZÁVER

RAPD a ISSR markery sú vhodnými nástrojmi pre molekulárnu identifikáciu genotypov. Poskytujú množstvo informatívnych hodnôt, využiteľných pre následné fylogenetické analýzy.

LITERATÚRA

- BRENNER, D. M., BALTENSPERGER, D. D., KULAKOW, P.A. et al. 2000. Genetic Resources and Breeding of *Amaranthus*. In *Plant Breeding Reviews*, vol. 19, 2000, p. 227–285. ISBN 0-471-38787-8
- HAAS, H. U., MICHEL, A., HURLE, K. 1997. Genetic diversity in *Amaranthus retroflexus*. In *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent*, vol. 62/3 a, 1997, p. 759–765.
- CHAN, K. F., SUN, M. 1997. Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of *Amaranthus*. In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 95, 1997, p. 865–873.
- LANOUE, K. Z., WOLF, P. G., BROWNING, S., HOOD, E. E. 1996. Phylogenetic analysis of restriction site variation in wild and cultivated *Amaranthus* species (*Amaranthaceae*). In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 93, 1996, p. 722–732.
- MANDAL, N., DAS, P. K. 2002. Intra- and interspecific genetic diversity in grain *Amaranthus* using random amplified polymorphic DNA markers. In *Plant Tissue Cult.*, vol. 12, 2002, p. 49–56.
- NEI, M., LI, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. In *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 76, 1979, no. 10, p. 5269–5273.
- OSLOVIČOVÁ, VERONIKA, GÁLOVÁ, ZDENKA, CHŇAPEK, MILAN, BALÁŽOVÁ, ŽELMÍRA. 2010. Identification of *Triticum aestivum* L., *Triticum spelta* L. and *Triticum durum* DESF. genotypes on the HMW-GS base. In *Plant, Soil and Environment*, vol. 56, 2010, no 2, p. 82–86. ISSN 1214-1178.

- POPA, G., CORNEA, C. P., CIUCA, M., BABEANU, N., POPA, O., MARIN, D. 2010. Studies on genetic diversity in *Amaranthus* species using the RAPD markers. In *TOM XVII.*, issue 2, 2010, p. 280–285.
- POWELL, W., OROZOCO-CASTILLO, C., CHALMERS, K. J., PROVAN, J., WAUGH, R., 1995. Polymerase chain reaction-based assays for characterization of plant genetic resources. In *Electrophoresis*, vol. 16, 1995, p. 1726–1730.
- RAŽNÁ, K., ŽIAROVSKÁ, J. 2011. Aplikácia DNA markérov pre identifikáciu nutrične významných genotypov ľanu siateho. In *Výživa a zdravie 2011*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, p. 345-350
- TRANSUE, D. K., FAIRBANKS, D. J., ROBISON, L. R., ANDERSEN, W. R. 1994. Species identification by RAPD analysis of grain amaranth genetic resources. In: *Crop Science*, vol 34, 1994, p. 1385–1389.
- VIVODÍK, MARTIN, GÁLOVÁ, ZDENKA, BALÁŽOVÁ, ŽELMÍRA. 2011. Identification, differentiation and characterization of barley genotypes using SSR markers. In *Potravinárstvo*, roč. 5, mimoriadne č. 2011, s. 96-100. ISSN 1338-0230.
- XU, F. – SUN, M. 2001. Comparative analysis of phylogenetic relationships of grain amaranths and their wild relatives (*Amaranthus*; *Amaranthaceae*) using internal transcribed spacer, amplified fragment length polymorphism, and double-primer fluorescent intersimple sequence repeat markers. In *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 21, 2001, p. 372–387.

Acknowledgements: We thank to D. Brenner of the USDA North Central Regional Plant Introduction Station at Ames, Iowa, USA, for the supply of seed material. This work was supported by KEGA — 001SPU-4/2012 — Plant Genetic Technologies and laboratory equipment was obtained by the project ECPUA — Excellent Center of Protection and Use of Agrobiodiversity.

Kontaktná adresa: Ing. Veronika Štefúnová, PhD., prof. RNDr. Milan Bežo, CSc., Ing. Mária Labajová, Katedra genetiky a šľachtenia rastlín, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A Hlinku 2, Nitra, veronika.stefunova@uniag.sk