

UDK 634.84

*Srtnični prilog**Savić S.¹***IDENTIFIKACIJA KULTIVARA VINOVE LOZE RAPD METODOM
VINE CULTIVAR IDENTIFICATION BY RAPD METHOD****Izvod**

Metoda RAPD se zasniva na jednom ili paru dekamera slučajnih sekvenci DNA koji umnožavaju ciljnu DNA putem PCR-a (Polymerase Chain Reaction). Umnoženi fragmenti DNA se razdvajaju putem elektroforeze, boje etidium-bromidom i posmatraju pod UV svjetlom.

Ključne riječi: DNA, PCR, RAPD, elektroforeza, UV svjetlo.

Abstract

RAPD method relies on single or pairs of decamer random DNA sequences which amplify targeted DNA by the PCR (Polymerase Chain Reaction). Generated DNA fragments are separated by electrophoresis, stain by ethidium bromide and observing under UV lights.

Key words: DNA, PCR, RAPD, electrophoresis, UV lights.

UVOD

Tradicionalno, sorte vinove loze se identifikuju najčešće na bazi morfoloških karakteristika vrha mladog lastara, razvijenog lista, grozda, bobice i sjemenke. Međutim, i ove tzv. kvalitativne karakteristike nekada ne mogu biti siguran pokazatelj porijekla i identiteta kultivara vinove loze.

Određene hemijske i biohemijske analize mogu uspješno da dopune ova morfološka istraživanja. Tako metode analize profila antocijana, različitih izoenzimatskih aktivnosti (npr. esteraze, acidfosfataze, fosfoglukomutaze i dr.) koriste se u kombinaciji sa ampelografijom u ispravljanju nekih grešaka u postojećoj klasifikacionoj shemi vinove loze i za preciznije mjerenje razlika između kultivara (Eiras-Dias&Bruno-Sousa, 1998; Abdallah et al., 1998).

¹ Dr Svetozar Savić, AK "13. jul", AD "Plantaže", Podgorica

Metode koje analiziraju genetski diverzitet direktno na DNA nivou, pokazale su visoku validnost i značajno su unaprijedili taksonomiju vinove loze. DNA marker tehnologija uključuje RFLP, RAPD i STS metode koje su uzrokovale revoluciju u klasifikaciji, identifikaciji i proučavanju genetskog diversiteta kultivara i podloga vinove loze (Costacurta et al., 1996; Stavrakakis&Binari, 1998).

U ovom radu opisana je tzv. RAPD (random amplified polymorphic DNA) metoda, jedno od novijih dostignuća u identifikaciji kultivara vinove loze zasnovana na molekularnim markerima.

OPIS METODE I MATERIJALA KOJI SE KORISTI

Za razliku od RFLP metode koja zahtijeva radioaktivno obilježenu probu za vizuelizaciju različitih fragmenata proizvedenih korišćenjem restriktionih enzima (Savić,2001), RAPD metoda se oslanja na selektivnu DNA amplifikaciju jednog ili para dekamera slučajne sekvence DNA. Amplifikovane sekvence DNA se razdvajaju elektroforezom, boje etidium-bromidom i posmatraju pod UV iluminacijom (Williams et al, 1990).

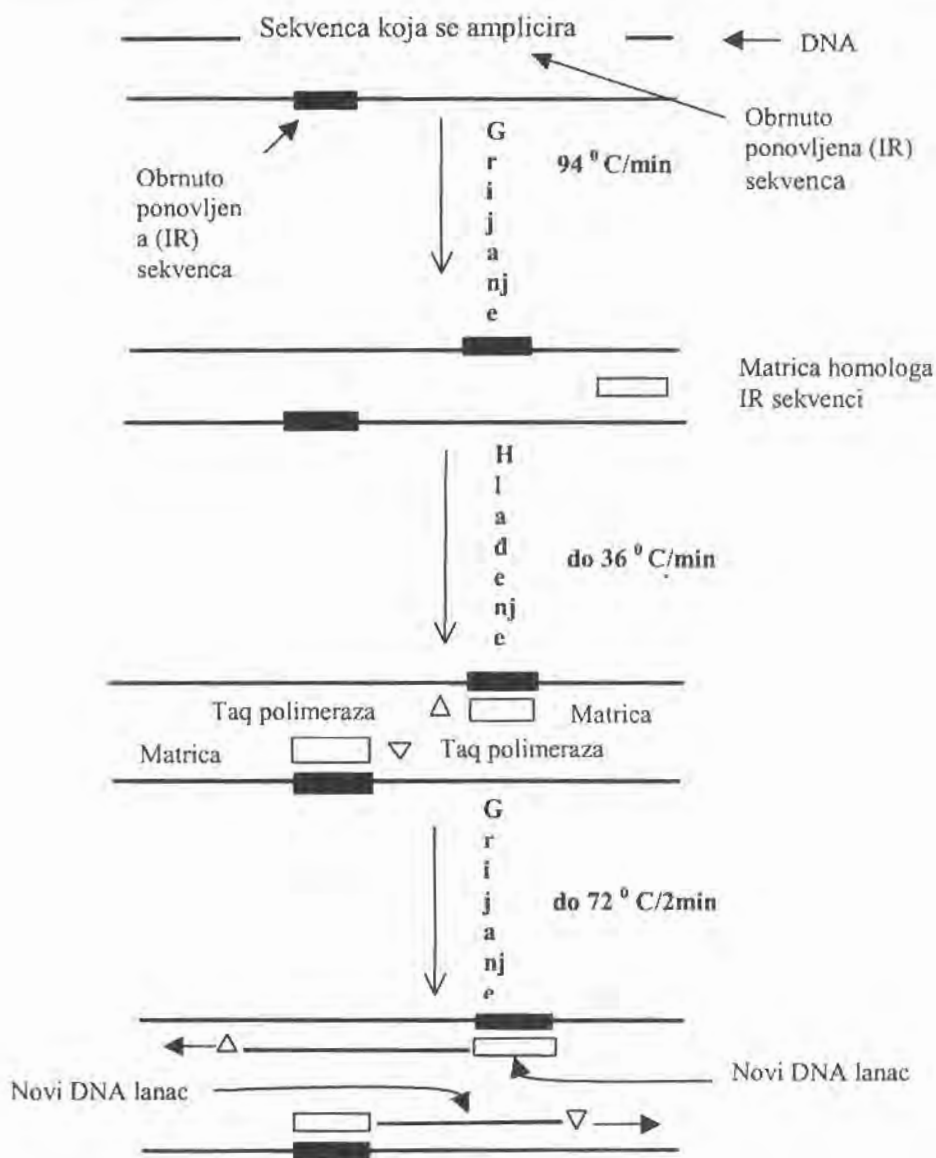
Priprema genomskog DNA

DNA se obično ekstrahuje iz svježeg biljnog materijala vinove loze. Ovaj metod je predložen od Yoshimura et al. (1992) i zasniva se na dobijanju DNA drobljenjem listnog materijala u tečnom azotu, korišćenjem tučka i avana. Deragon&Landry (1992) predlažu metod koji se ne zasniva na destrukciji lista, kao prethodni, već se listni diskovi promjera 5mm enzimatski rastvaraju za dobijanje uzorka DNA. Ekstrakcija se izvodi iz čistih, mladih i potpuno otvorenih listova. Količina DNA neophodna za RAPD analizu je između 10-50 ng.

Metod ekstrakcije koji se koristi prilikom istraživanja mora biti brz i jeftin, pri ispitivanju velikog broja uzoraka.

Kalupi (matrice)

Kalupi su obično dugi 9-10 baza, sa 50% sadržaja guanina i citozina, bez samokomplementarnih krajeva. Mogu se nabaviti i u komercijalnoj formi kod različitih proizvođača ili mogu biti sintetizovani od strane istraživača ako posjeduju određenu aparaturu i stručnost. Obično se praktikuje da se počne sa nekoliko kalupa i zadrži na onima koji obezbjeđuju PCR amplifikaciju produkata koji pomažu u razlikovanju jednog kultivara od drugog.



Sl. 1. Shematski prikaz selektivne DNA amplifikacije korišćenjem slučajnih matrica sa «thermal cycling» procedurom.

Fig. 1. Schematic representation of selective DNA amplification by using accidental matrix with «thermal cycling» procedure

DNA amplifikacija

Amplifikacija se izvodi uz pomoć specijalnih instrumenata nazvanih «thermal cyclers», koji imaju kapacitet da povećavaju ili snižavaju temperaturu veoma brzo, kao i da je održavaju na zadanom nivou.

Obično 10-20 ng genomske DNA ili 1 μ l sirovog ekstrakta, zajedno sa malom količinom (0.2-0.8 μ M) kalupa i jedne ili više jedinica Taq polimerase pomiješa i prelije sa kapi mineralnog ulja radi izbjegavanja evaporacije. Smješa se stavlja u thermal cycler gdje se proces ponavlja 40-45 puta. Jedan ciklus amplifikacije sastoji se od: jednog minuta na 94 °C, jednog minuta na 36 °C i dva minuta na 72 °C. Procedura može da traje do četiri časa ali se može redukovati na 2,5 sata bez negativnih efekata na kvalitet uzorka (Yu&Pauls, 1992). Nakon procesa uzorci se čuvaju na nižoj temperaturi (4-15 °C).

U toku rasta temperature do 94 °C (slika 1.), ciljna DNA se denaturiše i ostaje kao jedan lanac. Kada temperatura padne do 36 °C, kalupi se pričvršćuju na homolognoj DNA sekvenci, na svakom lancu. Zbog toga što su kalupi kratki oni će se pričvrstiti na velikom broju djelova genoma. U nekim slučajevima, druga sekvenca, homologna sa kalupom ali obrnute konfiguracije, pojavljuje se na suprotnom lancu (slika 1.) unutar 2000 nukleotidnih baza u suprotnom smjeru. Weeden (1991) navodi da sa kalupom koji je 10 nukleotidnih baza dug, ovaj obrnuti raspored sekvenci se očekuje da se pojavi kod angiospermi od jedan do deset puta, zavisno od veličine genoma.

Kada temperatura ponovo dostigne 72°C, kalup povećava sintezu DNA korišćenjem ciljne DNA kao obrasca. Veliki dio genoma, gdje je kalup pričvršćen, je van obrnutog rasporeda sekvenci opisanom u prethodnom tekstu, i umnožava se samo jednom. Sekvenca okružena obrnutim rasporedom umnožiće se dva puta. Veći dio ciljne DNA će se umnožiti jednom za svaku kompletiranu reakciju, dok će se sekvence umnožiti dva puta. Sa svakim narednim ciklusom broj kopija ove sekvence je udvostručen, tj. povećava se eksponencijalno dok se ostatak genoma uvećava linearno. Ako ponovimo ciklus 30 puta, onda će samo jedan do deset segmenata genoma biti replicirani 2³⁰ puta, dok se veći dio genoma replikuje samo 30 puta.

Welsh et al. (1991) navodi da do 120 kultivara može biti analizirano u roku od 36 časova u poređenju sa jednom nedjeljom pri korišćenju RFLP analize.

Elektroforeza

Cijela količina PCR produkta stavlja se u 1-2% agarozni gel u kojem se vrši elektroforeza na 30-35 V u trajanju od pet sati. Brzina elektroforeze može biti uvećana. Neki istraživači preferiraju da dodaju etidium-bromid u gel, ali se ova praksa generalno ne preporučuje. Umjesto ovoga bojenje etidium-bromidom se izvodi nakon elektroforeze.

Gel se ispituje pod UV svjetlom (312 nm) i fotografiše tako da može biti detaljno analiziran.

Analiza gela i primjena metode

Zasnovano na ukupnom broju različitih segmenata vidljivih u toku istraživanja i onih prisutnih ili odsutnih iz pojedinačnih posmatranja, nekoliko sličnosti može biti utvrđeno da se determiniše odnos pristupa ovoj metodi. Analiza slike gela i određivanje oznaka pokazatelja vrši se kompjuterski. Za sortnu identifikaciju moraju se utvrditi segmenti koji su karakteristični samo za određenu sortu.

Williams et al.(1990); Klein-Lankhorst et al. (1991) su utvrdili da je moguće detektovati i promjene u jednom paru baza genomske DNA i obezbijediti markere za cijeli genom. Simultano korišćenje para kalupa može rezultovati u pojavi dodatnog polimorfizma koji se ne primjećuje kod upotrebe samo jednog kalupa.

Prilikom odlučivanja primjene metoda na određene vrste korišćenjem određenih instrumenata, neophodno je obezbijediti optimalne uslove za eksperiment. Razlike koje se jave mogu biti vezane, najvjerovatnije, za instrumente kao i razlike u čistoći DNA i kalupa. (Klein-Lankhorst et al., 1991). Neke od vrsta kod kojih je metod uspješno primijenjen za analizu genotipa su: Theobroma (Wilde et al., 1992), pšenica (He et al., 1992), Arachis (Lanham et al., 1992) i Brassica oleracea (Hu and Quiros, 1991).

ZAKLJUČAK

Brzina izvođenja eksperimenta mnogo je veća u poređenju sa drugim metodama (RFLP) za analizu genoma, dok je neophodna količina za eksperiment prečišćene DNA mala, što omogućava analizu velikog broja uzoraka korišćenjem pojedinih djelova biljaka: sjemena, listova i td. Ova metoda omogućava uspješnu detekciju genoma ispitivanog kultivara.

LITERATURA

- Abdallah, F.B., Chibani, F., Fnayou, A., Ghorbel, A., & Bour-Siquot, J.M., (1998): Biochemical characterization of Tunisian grapevine varieties. *J.Int.Sci.Vigne.Vin* 32, 17-25.
- Costacurta, A., Crespan, M., & Milani, N., (1996): Varietal and clonal characterization experiences by means of molecular markers in *Vitis Vinifera* L. *Riv. Vitic. Enol.* 49. 35-40.
- Deragon, J.M., Landry, B.S. (1992): RAPD and other PCR-based analyses of plant genomes using DNA extracted from small leaf disks. *PCR Methods and Applications* 1: 175-180.

- Eiras-Dias, J.E. & Bruno-Sousa, R., (1998): Isoenzymatic polymorphism differentiation of Portuguese grapevine cultivars. *Am. J. Enol.Vitic.* 49, 86-90.
- He, S., Ohm, H., & Mackenzie, S. (1992): Detection of DNA sequence polyorphisms among wheat varieties. *Theor. Appl. Genet.* 84: 573-578.
- Hu, J., & Quiros, C.F. (1991): Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant cell Reports* 10: 505-511.
- Klein-Lankhorst R.M. et al. (1991): Isolation of molecular markers for tomato (*L.esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor. Appl. Genet.* 83: 108-114.
- Lanhman, P.G., Fenneli, S., Moss, J.P., & Powel, W., (1992): Detection of polymorphic loci in *Arachis* germplasm using random amplified polymorphic DNAs. *Genome* 35: 885-889.
- Savic, S., (2001): Identifikacija kultivara vinove loze RFLP metodom, *Poljoprivreda i šumarstvo*, Vol 47 (1-2), Podgorica.
- Stavarakakis, M.N., & Binari, K., (1998): Genetic study of grape cultivars belonging to the muscat family by random amplified polymorphic DNA markers, *Vitis* 37, 119-122.
- Weeden, N.F., (1991): Chromosome organization and gene mapping. In *Advanced Methods in Plant Breedings and Biotechnology*. D.R. Murray (Ed.), CABI, pp. 23-49.
- Welsh, J.et al. (1991): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18(24): 7213-7218.
- Wilde, J., Waugh, R. , & Powell, W., (1992): Genitic fingerprinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* 83: 871-877.
- Williams, J.K.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res.* 18: 6531-6535.
- Yoshimura, S., Yoshimura, A., & Iwata, N., (1992): Simple and rapid PCR method by using crude extracts from rice seedlings. *Japan. J. Breed.* 42: 669-674.
- Yu, K., & Pauls, K.P., (1992): Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucleic Acids Research* 20: 2606.

VINE CULTIVAR IDENTIFICATION BY RAPD METHOD

by

Svetozar Savić,**AK "AK 13. jul", AD "Plantaže", Podgorica****Summary**

Traditionally, vine cultivars are mainly identified on the base of morfological features of tip of young shoot, developed leaf, bunch of grape, berry and seed. But, these qualitative features could not always be reliable indices of grapevine cultivars genesis and identity.

Recent developments in varietal identification based on molecular markers and relying on polymorphisms based on random amplified DNA (RAPD) is described and evaluated. This method relies on single or pairs of decamer random DNA sequences which amplify targeted DNA by the PCR (Polymerase Chain Reaction). DNA is usually extracted from plant material from young plantlets by grinding fresh plant material using a mortar and pestle.

The primers are usually 9 to 10 base long, have upwards of 50% guanin and citosin content and lack self-complementary ends. DNA amplification is carried out with help of specialized instruments, called thermal cyclers, which have the capacity to raise or lower the temperature quickly and maintain it at almost the nominal levels.

The whole amount of the reaction is loaded on a 1-2% agarose gel and electrophoresed at 30-35 V for five hours. The gels are examined under UV lights (312 nm) and are photographed so that they can be analyzed in detail. Speed of conductness of RAPD analysis is higher comparing other methods for genome analysis. The amount of DNA required for RAPD analysis is small. The method is capable of detecting genom of investigated cultivar.