



Identyfikacja odmian pszenic metodami molekularnymi

Piotr Borsuk, Ireneusz Moraczewski, Andrzej Czaplicki

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

Identification of wheat cultivars using molecular methods

Summary

We used RAPD created polymorphism to analyze the diversity of wheat cultivars. Preliminary analysis of the wheat genome polymorphism by the RAPD indicated that the technique is useful for the identification of similarities between cultivars. Using 10 different primers we studied the pattern of specific amplified DNA fragments – bands of 90 wheat varieties – and we found that three of these primers generated high level of polymorphism. One of these primers, selected for further studies, generated 38 bands with molecular weight in the range from 215 to 1300 bp.

For the purpose of diversity analysis, all polymorphic loci were scored as present/absent. The bivariate 1-0 data were used as the raw matrix. A square symmetric matrix of similarity was obtained using the Czekanowski-Sørensen coefficient. Similarity matrix was then used for cluster analysis using the Unweighted Pair Group Method of Averages (UPGMA) technique. A result was a *finger-print* of all varieties, that allows for their identification.

Using numerical taxonomy we identified in the analyzed group of varieties 10 clusters that indicated high variability of genetic material in this group.

Key words:

wheat, polymorphism.

Adres do korespondencji

Andrzej Czaplicki,
Instytut Hodowli
i Aklimatyzacji Roślin,
Radzików,
05-870 Błonie;
e-mail:
a.czaplicki@ihar.edu.pl

1. Wstęp

Diagnostyka oparta na badaniu DNA będzie odgrywać coraz większą rolę w hodowli roślin. Ma ogromne znaczenie praktyczne i jest niezbędnym narzędziem przy selekcji, identyfikacji oraz badaniach genomu roślinnego (1). Zmienność w sekwencji nukleotydowej DNA może być wykorzystana do mapowania geno-

mu, testowania identyczności, określenia związków rodowych, analizy zmienności genetycznej oraz innych celów.

Rozwinięcie technik PCR stwarza możliwość szybkiego powielania śladowych ilości DNA, przy czym może to dotyczyć zarówno specyficznych jak i niespecyficznych sekwencji. W pierwszym przypadku dla przeprowadzenia doświadczenia niezbędna jest znajomość sekwencji powielanego obszaru, a szczególnie sekwencji bezpośrednio z nim sąsiadujących, co umożliwia zaprojektowanie starterów pozwalających na zamplifikowanie DNA. Zazwyczaj dysponujemy taką wiedzą dla sekwencji niosących informację genetyczną (kodujących RNA lub białka), a co za tym idzie ewoluujących stosunkowo wolno i nie wykazujących istotnych różnic u przedstawicieli jednego gatunku, nawet gdy należą oni do genetycznie izolowanych ras czy odmian. Powoduje to, że obszary te nie mogą być wykorzystywane do diagnostycznego rozróżnienia należących do jednego gatunku odmian, a już na pewno nie pozwalają na klasyfikowanie poszczególnych osobników. Specyficzne analizowanie technikami PCR obszarów niekodujących o wysokiej zmienności jest problematyczne z uwagi na bardzo ograniczoną wiedzę o ich organizacji. Problem ten szczególnie dotkliwie daje się odczuć w badaniach prowadzonych na roślinach.

Metody za pomocą których porównuje się różne odmiany lub gatunki roślin uprawnych powinny charakteryzować się wysoką wiernością wyników, a w przypadku oznaczeń prowadzonych na dużą skalę, prostotą, szybkością i możliwością łatwej analizy otrzymanych wyników (2,3). Praktycznie, wymienione wymagania spełniają jedynie techniki PCR, włączając w to cały szereg modyfikacji klasycznej metody (4-7). Szczególnie korzystna, jak się wydaje, jest technika RAPD, w której w reakcji PCR stosuje się tylko jeden, losowo wybrany, najczęściej 10-nukleotydowy starter (8-10). Starter dobierany jest metodą prób i błędów poprzez sprawdzanie kolejnych, komercyjnie dostępnych lub samodzielnie zaprojektowanych oligonukleotydów. Prawidłowe wyselekcjonowanie startera pozwala na prowadzenie szybkiego, równoległego diagnozowania wielu osobników lub wielu odmian. Technika RAPD do amplifikacji wymaga śladowych ilości DNA. Standardowo ilość DNA wyizolowana z 50-100 mg świeżej tkanki wystarcza na przeprowadzenie ok. 3000 reakcji. Równocześnie reakcje RAPD można prowadzić na jedynie częściowo oczyszczonym DNA. Umożliwia to uproszczenie procedury jego izolacji, a co za tym idzie, znaczne obniżenie kosztów i przyspieszenie prowadzonej analizy (3).

W przedstawionej pracy zastosowano metody RAPD i taksonomii numerycznej do analizy bioróżnorodności polskich odmian pszenic.

2. Materiał i metody

Przedmiotem badań było 90 odmian pszenic (*Triticum aestivum* L.) uprawianych w Polsce w latach 1950–1990. Były to: Alba, Alcedo, Alfa, Alkora, Almari, Arda, Asta, Aura, Begra, Beta, Bezostaya 2, Blondynka, Broma, Choryńska, Dana, Dańkowska

Biała (Dańkowska), Elena, Emika, Eta, Gama, Gk Sagvari, Gorzowska Szytwna (Gorzowska), Grana, Hadmersleben, Henika, Holme, Jana, Jara, Java, Jawa, Juma, Kadett, Kamila, Kaspar, Kobra, KOC 2792, KOC 742, Kolibri, Komorowska, Kujawianka Więcławicka (Kujawianka), Kutnowianka, Lama, Lanca, Leszczyńska Wczesna (Leszczyńska), Liwilla, Luna, Maltanka, Małgorzatka Udycka (Małgorzatka), Maris Huntsman (Maris), Mira, Mironowskaya 25 (Mirono 25), Mironowskaya 808 (Mirono 808), Mironowskaya Ulutshenaya (Mirono U), Mironowskaya Yubileyay (Mirono Y), Modra, Nadgoplanka, Nagradowicka, Nike, Ninka II, Oda, Odin, Olma, Olza, Opolska, Orofen, Ostka Chłopicka (Ostka Ch), Ostka Popularna (Ostka Pop), Panda, Parada, Podolanka, Polanka, Rada, Ramiro, Rokicka, Roma, Rostocka, Rota, Saga, Salwa, Sigma, SMH 2843, Starke, Szelejewska, Ślązaczka, Weneda, William, Wyskolitewka Szywnosłoma (Wyskolitewka), Zentos, Zorba, Żelazna (w nawiasach podano skrót nazwy użyty w opisie dendrogramu). Odmiany te reprezentują zarówno formy jare jak i ozime. Nasiona pochodziły z Kolekcji Nasion Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie.

Izolację DNA przeprowadzono według zmodyfikowanej metody szybkiej preparatyki DNA opisanej przez Edwardsa i in. (11).

Amplifikację pasm DNA prowadzono w układzie zawierającym w obj. 20 μ l:

- 1) 10 ng DNA roślinnego,
- 2) 1 x bufor (firmy Fermentas),
- 3) 2,5 mM MgCl₂,
- 4) 0,01% żelatyny,
- 5) 200 μ M dATP, dGTP, dCTP, dTTP,
- 6) 1 μ M startera,
- 7) 1 jednostkę termostabilnej polimerazy (firmy Fermentas),

według następującego protokołu:

- 1) 4 min w 94°C,
- 2) 5 cykli: 1 min w 94°C, 1 min w 37°C, 1 min w 72°C,
- 3) 30 cykli: 1 min w 94°C, 20 s w 37°C, 20 s w 72°C,
- 4) 5 cykli: 1 min w 94°C, 1 min w 37°C, 1 min w 72°C,
- 5) następnie 8 min w 72°C.

Otrzymane fragmenty DNA rozdzielano elektroforetycznie w 1,6% żelu agarozowym, wizualizowano roztworem bromku etydyny i fotografowano. Fotografie uzyskanych obrazów elektroforetycznych opracowywano przy użyciu programu Fragment NT. Wyniki w postaci zestawów liczb odpowiadającym ciężarom cząsteczkowym określonych prążków, przekształcono na system cyfrowy. Wyniki ocyfrowano zarówno w systemie binarnym (0,1), jak i porządkowym (0,1,2,3). W systemie binarnym (0,1) brano pod uwagę obecność fragmentu o określonym ciężarze (1) lub jego brak (0). W metodzie porządkowej uwzględniano dodatkowo intensywność prążka w skali od 1 (najslabiej widoczne) do 3 (najmocniejsze).

3. Wyniki i dyskusja

W trakcie prowadzonych doświadczeń zaistniała konieczność wyselekcjonowania startera(ów) przydatnego do rozróżniania i klasyfikowania roślin pszenicy w zależności od ich przynależności do różnych odmian. Przyjęto, że starter taki powinien w reakcji RAPD generować możliwie największą liczbę fragmentów DNA, których wielkość byłaby charakterystyczna dla poszczególnych odmian. Ponieważ nie ma możliwości teoretycznego przewidywania zachowania się poszczególnych starterów w reakcji RAPD przeprowadzono testy praktyczne, w których, stosując badane startery, amplifikowano DNA pszenicy niezależnie wyizolowany z roślin należących do 7 różnych odmian. Poza sprawdzeniem czy dany starter w reakcji RAPD generuje dostatecznie bogatą różnorodność fragmentów DNA sprawdzano również powtarzalność uzyskiwanych za jego pomocą wyników (dla każdej reakcji RAPD wykonano 3 niezależne powtórzenia). Łącznie przetestowano 10 oligonukleotydów (tab. 1). Największą zmienność wyników RAPD (w zależności od badanych odmian) zaobserwowano dla starterów OPB 04, A 21 i 923 CA. Starter 923 CA jako charakteryzujący się najwyższą powtarzalnością otrzymanych wyników wykorzystano w dalszej prowadzonych doświadczeniach. Dla 90 badanych odmian zostało za pomocą jego wygenerowanych 38 fragmentów DNA o ciężarze cząsteczkowym od 215 do 1300 par zasad. Analizując DNA pochodzące z dziewięćdziesięciu (90) odmian pszenicy. Uzyskano *fingerprint* tych odmian umożliwiającą ich identyfikację (w ramach badanej grupy).

Tabela 1

Przebadane startery

Nazwa	Sekwencja nukleotydów
	TACAACgAgg
	CTgCTgATg
OPB 04	GACTTAACCg
	GATCTAaggC
	GggAgAAggg
	CCCACAACCC
923 CA	CCACCAACCC
	GgAggAAggg
	GAAACgggTg
A 21	ggACTgAgT

Do dalszej analizy zastosowano metody taksonomii numerycznej (12-14), które znajdują zastosowanie w analizie grup obiektów charakteryzowanych przez wiele zmiennych i hierarchicznego łączenia ich w podzbiory. W tym celu wszystkie polimorficzne loci oznaczano (i zliczano) jako obecne/brakujące (lub słabe, mocniejsze, najmocniejsze). Tak otrzymaną tablicę danych (90 × 38) – to jest 90 odmian i 38 cech przekształcano w kwadratową macierz podobieństwa, wyliczając odległość

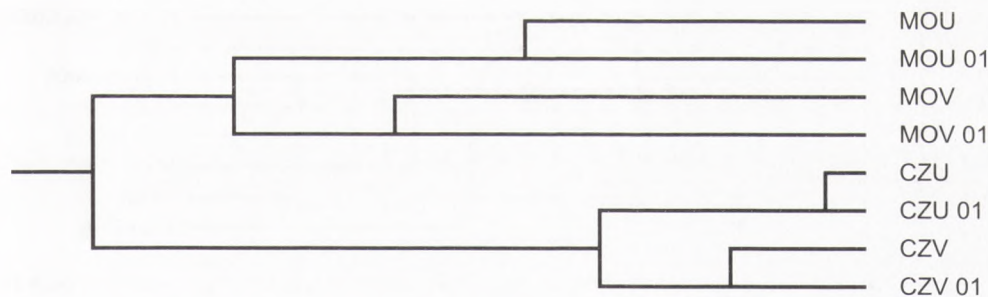
manhatan oraz komplement współczynnika Czekanowskiego-Sørensen. Macierze te następnie poddawano klasteryzacji metodą średnich nieważonych z uśrednieniem arytmetycznym (UPGMA) oraz metodą Warda. Uzyskano tym sposobem osiem dendrogramów grupujących zbiór analizowanych odmian w około dziesięć skupień (podzbiorów). Cztery dla danych binarnych i cztery dla danych ilościowych. Drzewa te nieznacznie różniły się między sobą. W celu określenia stopnia ich podobieństwa dokonano za pomocą metod taksonomii numerycznej porównania drzew. Wyniki przedstawiono w tabeli 2 i na rysunku 1. Najbardziej podobne do siebie, jak się okazało, były dendrogramy uzyskiwane za pomocą tej samej miary odległości i metody klasteryzacji (a zatem niezależne od metody ocyfrowania danych). Dowodzi to równocześnie obu tych sposobów z tym, że metoda ilościowa umożliwia analizę danych z mniejszą stratą informacji.

Tabela 2

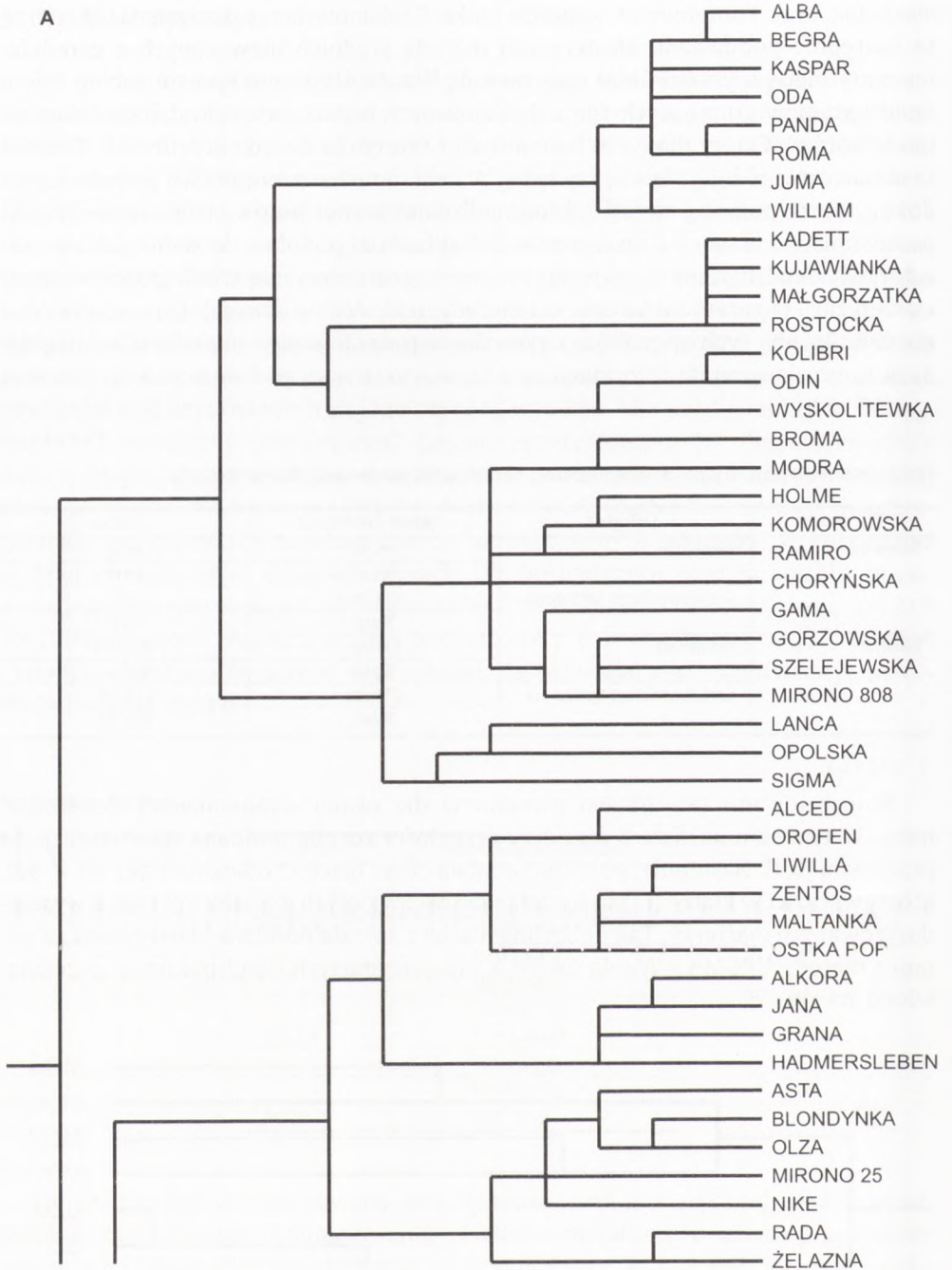
Objaśnienie oznaczeń użytych w dendrogramie obrazującym porównanie drzew (rys. 1)

Typ danych	Odległość	Sposób klasteryzacji	Symbol
ilościowe	Manhatan	UPGMA	MOU
		Ward	MOV
	Czekanowskiego-Sørensen	UPGMA	CZU
		Ward	CZV
binarne	Manhatan	UPGMA	MOU 01
		Ward	MOV 01
	Czekanowskiego-Sørensen	UPGMA	CZU 01
		Ward	CZV 01

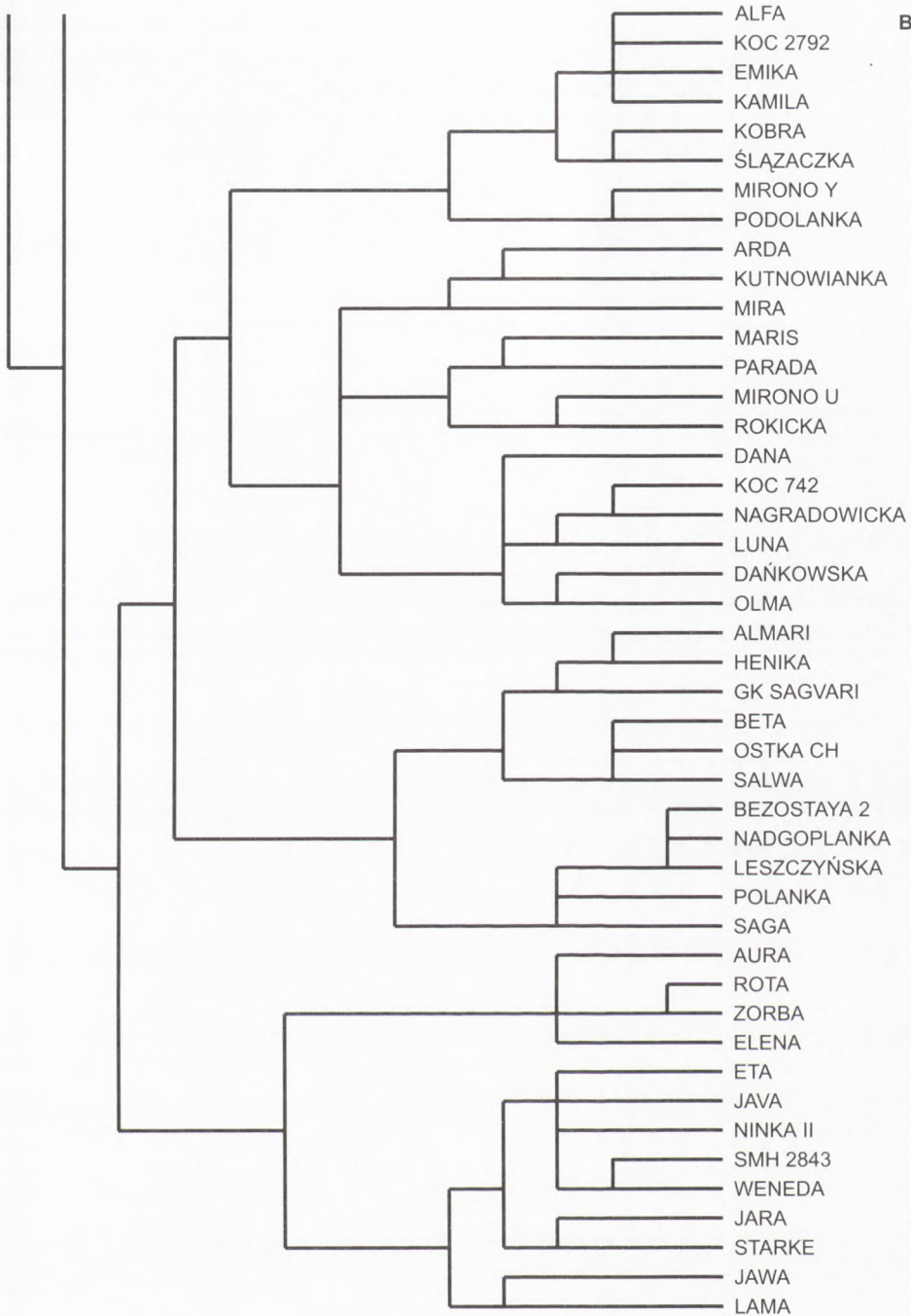
Skonstruowano też drzewo uśrednione dla ośmiu wspomnianych dendrogramów. W tym celu każda z 8 macierzy odległości została poddana standaryzacji do przedziału [0,1]. Następnie, policzona została nowa macierz odległości (też 90×90), której wartości w klatce (i,j) są średnią wartości wziętych z klatek (i,j) tych 8 wystandaryzowanych macierzy. Tak policzona macierz została poddana klasteryzacji za pomocą metody UPGMA i Warda (jeden z tak otrzymanych dendrogramów przedstawiono na rys. 2).



Rys. 1. Dendrogram obrazujący porównanie ośmiu drzew – objaśnienia w tekście i tabeli 2.



Rys. 2. Jedno z dwóch drzew uśrednionych dla ośmiu otrzymanych dendrogramów klasteryzacja za pomocą metody Warda – objaśnienia w tekście. Ze względów technicznych podzielone na dwie części oznaczone jako A i B.



Otrzymane wyniki świadczą o znacznej różnorodności materiału genetycznego reprezentowanego przez tę grupę. Dowodzą też możliwości zastosowania metody RAPD do badania bioróżnorodności odmian pszenic.

Literatura

1. Landry B. L., Hubert N., Deragon J. M., (1992), Proceedings of 13th Eucarpia Congress, (July 06-11th), Angers, France, 667-668.
2. Andersen W. R., Fairbanks D. J., (1992), Diversity, 6, 51-53.
3. Rafalski J. A., Tingey S. V., (1993), Elsevier Science Publishers, Reviews 9, 8, 275-280.
4. Williams J. G., Kubeliok A. R., Livak J. K., Rafalski J. A., Tingey V. S., (1990), Nucleic Acid Research, 18, 6531-6535.
5. Andersen W. R., Fairbanks D. J., (1992), Diversity, 6, 51-53.
6. Balakrishna F., (1992), Proceedings of 13th Eucarpia Congress, (July 06-11th), Angers, France, 603-604.
7. Welsh J., Petersen C., McClelland M., (1990), Nucleic Acid Research, 19, 303-306.
8. Devos K. M., Gale M. D., (1992), Theor. Appl. Genet., 84, 567-572.
9. Debener T., Bartels C., Lore M., (1996), Molecular Breeding, 2, 321-327.
10. Demeke T., Sasikumar B., Hucl P., Chibbar R. N., (1997), Maydica, 42, 133-142.
11. Edwards K., Johnstone C., Thompson C., (1991), Nucleic Acid Research, 19, 1349.
12. Sokal R. R., Sneath P. H. A., (1963), *Principles of Numerical Taxonomy*, San Francisco, W. Freeman.
13. Anderberg M. R., (1973), *Cluster analysis for applications*, Academic Press, New York.
14. Abbott L. A., Bisby F. A., Rogers D. J., (1985), *Taxonomic Analysis in Biology. Computers, Models, and Databases*, Columbia Univ. Press.