

ZMIENNOŚĆ LOCI IZOENZYMATYCZNYCH W KOLEKCJI PODSTAWOWEJ RODZAJU *Pisum*

*Bogdan Wolko*¹, *Wojciech K. Święcicki*¹, *Somsak Apisitwanich*²

¹ Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

² Kasetsart University, Bangkok, Tajlandia

Wstęp

W polskim banku genów rodzaju *Pisum* zgromadzono około 3000 obiektów. Są to zarówno formy prymitywne, odmiany uprawne, a także wyselekcjonowane mutanty spontaniczne i indukowane oraz materiał pochodzący z krzyżowań w programach hodowlanych i badawczych. Zwiększanie liczby obiektów w kolekcjach przy braku ich precyzyjnej waloryzacji często ogranicza ich użyteczność. Z tego powodu kuratorzy dużych zbiorów kolekcyjnych dążą do wyodrębnienia grupy genotypów obejmującej możliwie jak największy zakres zmienności występujący w całej kolekcji [BROWN 1989; ANDERSEN, FAIRBANKS 1990]. Taka grupa obiektów, stanowiąca zwykle około 10% całości zbiorów określana jest nazwą kolekcji podstawowej.

Wieloletnie prace nad charakterystyką zbiorów banku genów *Pisum* pozwoliły na wyodrębnienie z nich kolekcji podstawowej grochu, na podstawie obserwowanej zmienności cech morfologicznych, fizjologicznych i użytkowych. Dla pogłębienia charakterystyki tej kolekcji i zwiększenia jej przydatności do badań genetycznych i hodowlanych postanowiono wzbogacić opis genotypów o analizę zmienności loci izoenzymatycznych. W ciągu ostatnich 40 lat, od kiedy HUNTER i MARKET [1957] połączyli technikę rozdziału elektroforetycznego na żelu skrobiowym z wykrywaniem aktywności rozdzielanych białek enzymatycznych przy pomocy cytochemicznych metod barwienia, markery izoenzymatyczne wykazały swą użyteczność w badaniach z zakresu genetyki i hodowli roślin. Markery izoenzymatyczne mają cały szereg cennych zalet, jakich nie miały inne dotychczas stosowane markery (np. morfologiczne). Izoenzymy występują w różnych tkankach i organach w trakcie całego rozwoju rośliny. Analizy genetyczne pojedynczych osobników można wykonać szybko i przy stosunkowo nis-

kich kosztach w bardzo wczesnym stadium rozwojowym, w małych skrawkach tkanek (nawet w zarodkach lub w pyłku). Większość loci izoenzymatycznych wykazuje niezmiernie cenną w pracach genetycznych zaletę kodominacyjnego sposobu dziedziczenia. Są one także pozbawione interakcji genotyp/środowisko. Ta grupa genów zaliczona przez Komitet Badań Genomu *Pisum* [WEEDEN i in. 1996] do markerów genetycznych pierwszego i drugiego rzędu, może być przydatna do identyfikacji genotypów, przepływu genów, badania pokrewieństwa pomiędzy populacjami i taksonami, a także w dyskusji nad filogenezą gatunków.

Materiał i metody

Polimorfizm loci izoenzymatycznych analizowano w genotypach kolekcji podstawowej Banku Genów w Wiatrowie. Kolekcja ta, reprezentatywna dla zmienności monogenicznej w kolekcji, obejmowała 266 obiektów typowych dla opisanych genów i ich alleli oraz cech dotychczas nie zanalizowanych genetycznie, a także populacje reprezentujące dzikie gatunki *Pisum*. Ze względu na pochodzenie materiał ten można podzielić na cztery grupy: odmiany uprawne (28 obiektów), mutanty spontaniczne i indukowane (101 obiektów), segreganty pochodzące z krzyżowań (63 obiekty) oraz populacje dzikie i miejscowe należące do różnych taksonów (74 obiekty), w tym: *P. abyssinicum*, *P. elatius*, *P. fulvum*, *P. syriacum* oraz dzikie podgatunki *P. sativum* (subsp. *asiaticum*, *cinereum*, *tibeticum*, *transcaucasicum*).

Tabela 1; Table 1

Systemy enzymatyczne analizowane w kolekcji podstawowej *Pisum*
Enzyme systems examined in the *Pisum* core collection

System enzymatyczny Enzyme system	Akronim Acronym	Liczba obserwowanych loci Number of loci observed
Aldolaza; Aldolase	ALDO	1
Aminopeptydaza leucynowa; Leucine aminopeptidase	LAP	1
Aminotransferaza asparaginianowa	AAT	3
Aspartate aminotransferase		
Dehydrogenaza 6-fosfoglukonianowa	6PGD	2
6-Phosphogluconate dehydrogenase		
Dehydrogenaza izocytrynianowa	IDH	1
Isocitrate dehydrogenase		
Dehydrogenaza szikimianowa; Shikimate dehydrogenase	SKDH	1
Diaforaza (NADH); Diaphorase (NADH)	DIA	1
Esteraza; Esterase	EST	3
Fosfoglukomutaza; Phosphoglucomutase	PGM	2
Izomeraza glukozyfosforanowa	GPI	1
Glucosephosphate isomerase		
Kwaśna fosfataza; Acid phosphatase	ACP	1
Peroksydaza; Peroxidase	PRX	1

Analizowano polimorfizm 12 systemów izoenzymatycznych. Enzymy ekstrahowano z tkanki roślinnej w fazie 2–4 tygodniowych siewek z 5 roślin reprezentujących każdy obiekt. Do analizy wszystkich systemów enzymatycznych użyto tkanki liściowej, z wyjątkiem peroksydazy, którą ekstrahowano z młodych korzeni. Izoenzymy rozdzielano elektroforetycznie w 11% żelu skrobiowym i barwiono wg receptur opisanych przez WOLKO [1995]. Liczbę obserwowanych loci izoenzymatycznych w każdym analizowanym systemie enzymatycznym zamieszczono w tabeli 1.

Wyniki i dyskusja

Polimorfizm izoenzymatyczny wykryto we wszystkich 18 analizowanych loci. Ogólnie każdy z loci izoenzymatycznych wykazywał obecność 2–4 alleli. W 9 loci wykryto tylko po dwa allele – jeden szybciej wędrujący podczas elektroforezy prążek, oznaczony jako F i wolniej wędrujący, oznaczony jako S. W pozostałych loci, oprócz zmienności występujących najczęściej dwu podstawowych alleli F i S wykryto obecność jednego lub dwu dodatkowych rzadko występujących alleli oznaczonych VF, jeśli charakteryzowały się większą ruchliwością elektroforetyczną niż allel F lub oznaczonych jako VS, jeśli ich ruchliwość elektroforetyczna była niższa niż allel S. W tabeli 2 zawarto szczegółowe dane dotyczące liczby wykrytych alleli w każdym locus izoenzymatycznym i oznaczeń literowych ich fenotypów elektroforetycznych.

Tabela 2; Table 2

Polimorfizm loci izoenzymatycznych w kolekcji podstawowej *Pisum*
Isozymie loci polymorphism in the *Pisum* core collection

Locus Locus	Liczba wykrytych alleli Number of alleles discovered	Oznaczenia fenotypów elektroforetycznych Electrophoretic designation of phenotypes
<i>Lap-1</i>	3	F, S, VS
<i>Px-1</i>	2	F, S
<i>Aat-p</i>	3	VF, F, S
<i>Aat-m</i>	2	F, S
<i>Aat-c</i>	2	F, S
<i>Pgm-c</i>	2	F, S
<i>Pgm-p</i>	3	F, S, VS
<i>Gpi-c</i>	4	VF, F, S, VS
<i>Idh</i>	3	F, S, VS
<i>Acp-1</i>	3	VF, F, S
<i>Skdh</i>	2	F, S
<i>Est-1</i>	3	VF, F, S
<i>Est-2</i>	2	F, S
<i>Est-3</i>	3	VF, F, S
<i>Aldo</i>	3	VF, F, S
<i>Pgd-p</i>	2	F, S
<i>Pgd-c</i>	2	F, S
<i>Dia-1</i>	2	F, S

Tabela 3; Table 3

Częstość występowania alleli w analizowanych loci izoenzymatycznych
Allele frequency in analyzed isozyme loci

Locus Locus	Frekwencja alleli; Allele frequency (%)														Allel typu dzikiego Wild type allele
	ogółem; total				odmiany hodowlane; cultivars				populacje dzikie; wild populations						
	VF	F	S	VS	VF	F	S	VS	VF	F	S	VS			
<i>Lap-1</i>	-	37,3	62,3	0,37	-	42,9	57,1	-	-	25,4	73,2	1,4	S		
<i>Px-1</i>	0,38	61,3	38,3	-	-	82,9	17,1	-	-	53,0	45,6	-	F		
<i>Aat-p</i>	0,37	25,0	74,7	-	-	14,3	85,7	-	-	56,5	42,1	-	F		
<i>Aat-m</i>	-	66,8	33,2	-	-	37,1	62,9	-	-	81,9	18,1	-	F		
<i>Aat-c</i>	-	99,2	0,8	-	-	100,0	-	-	-	97,3	2,7	-	F		
<i>Pgm-c</i>	-	85,7	14,3	-	-	85,7	14,3	-	-	82,2	17,8	-	F		
<i>Pgm-p</i>	-	47,2	52,0	0,8	-	42,9	57,1	-	-	84,1	13,2	2,7	F		
<i>Gpt-c</i>	0,37	97,7	1,5	0,37	-	96,4	3,6	-	-	95,8	1,4	1,4	F		
<i>Idh</i>	-	12,8	78,6	8,6	-	7,1	82,1	10,8	-	15,4	75,1	9,5	S		
<i>Acp-1</i>	2,3	54,1	43,7	-	-	82,1	17,9	-	-	37,3	55,9	-	S		
<i>Skdh</i>	-	55,6	44,4	-	-	64,3	35,7	-	-	35,1	64,9	-	S		
<i>Est-1</i>	0,22	80,4	39,4	-	-	53,6	46,4	-	-	52,7	47,3	-	F		
<i>Est-2</i>	-	48,6	51,4	-	-	32,1	67,9	-	-	53,8	46,2	-	F		
<i>Est-3</i>	2,2	74,9	22,9	-	-	85,7	14,3	-	-	81,3	11,9	-	F		
<i>Aldo</i>	0,37	41,0	58,6	-	-	65,7	34,3	-	-	22,2	76,4	-	S		
<i>Pgd-p</i>	-	73,2	26,8	-	-	53,6	46,4	-	-	76,5	23,5	-	F		
<i>Pgd-c</i>	-	67,7	32,3	-	-	60,7	39,3	-	-	72,4	27,6	-	F		
<i>Dta-1</i>	-	29,1	70,9	-	-	7,1	92,9	-	-	33,8	66,2	-	S		

W oparciu o uzyskane wyniki polimorfizmu izoenzymatycznego obliczono częstość alleli w analizowanych loci (tab. 3). We wszystkich loci najczęściej występowały allele F i S w różniących się proporcjach. Pozostałe dwa allele występowały z bardzo niską częstością. Allel VF wykryto w 7 loci, a allel VS w czterech. Pod względem polimorfizmu wyróżnił się locus *GPI-c*, w którym wykryto 4 allele. Allel F występował najczęściej, a pozostałe trzy – VF, S i VS występowały bardzo rzadko. Ograniczony zakres zmienności wykazał również locus *Aat-c*, w którym dominował allel F, a tylko w dwu genotypach wykryto allel typu S. Częstość alleli w analizowanych loci obliczono również osobno dla grupy odmian hodowlanych oraz populacji dziko występujących gatunków grochu i populacji miejscowych, w celu porównania zakresu zmienności pul genowych obu grup (tab. 3).

Występowanie tzw. „rzadkich” alleli ograniczone jest w większości do puli genowej populacji dzikich. Hodowlana pula genowa jest ich niemal całkowicie pozbawiona. W tabeli 4 podano gatunki i genotypy będące źródłem tej zmienności allelicznej. Proporcje częstości występowania podstawowych alleli F i S w obu grupach wykazały także różnice, w niektórych przypadkach bardzo wyraźne (np. loci *Pgm-p*, *Acp-1*, *Aat-m*, *Aldo*, *Dia-1*). Geny izoenzymatyczne nie kontrolują cech użytkowych i z tego względu nie były poddane bezpośredniej presji selekcji hodowlanej, jednak wydaje się, że różnice w częstości alleli mogły powstać na skutek możliwego sprzężenia allozymów z cechami użytkowymi preferowanymi w hodowli.

Tabela 4; Table 4

Rzadko występujące allozyny w obiektach kolekcji podstawowej *Pisum*
Rarely occurred allozymes in *Pisum* core collection accessions

Locus Locus	Allozym Allozyme	Takson Taxon	Nr katalogowy obiektu * Catalogue no. of accession *
<i>Aat-c</i>	S	<i>P. syriacum</i> <i>P. sativum</i> (rasa miejscowa; land race)	Wt 419 Wt 15999
<i>Aat-p</i>	VF	<i>P. fulvum</i>	Wt 302
<i>Acp-1</i>	VF	<i>P. abyssinicum</i> <i>P. sativum</i> ssp. <i>cinereum</i> <i>P. sativum</i> x <i>P. syriacum</i>	Wt 1, Wt 4, Wt 5, Wt 6 Wt 601 Wt 11352
<i>Aldo</i>	VF	<i>P. abyssinicum</i>	Wt 13
<i>Est-1</i>	VF	<i>P. sativum</i> (mutanty; mutants)	Wt 10268, Wt 11692
<i>Est-3</i>	VF	<i>P. elatius</i> <i>P. fulvum</i>	Wt 114 Wt 301, Wt 302, Wt 303, Wt 304
<i>Gpi-c</i>	VF VS	<i>P. syriacum</i> <i>P. sativum</i> (rasa miejscowa; land race)	Wt 403 Wt 11541
<i>Pgm-p</i>	VS	<i>P. syriacum</i>	Wt 424, Wt 425

* ŚWIĘCICKI i in. [1981]. *The Catalogue of Pisum Lines*. PWRiL.

Izoenzymy w dziko rosnących populacjach roślin podlegają naturalnej selekcji. Zakładając, że zmienność alleliczna loci izoenzymatycznych powstaje na drodze mutacji i powstałe allozymy są równo wartościowe pod względem biochemicznym, można przypuszczać, że allozym występujący częściej w genotypach prymitywnych jest tzw. typem „dzikim”. Allozymy występujące rzadziej powstały na skutek późniejszych mutacji allelu wyjściowego, pojawiających się w procesie ewolucji. W przypadku allozymów, dziedziczących się w sposób kodominacyjny ustalenie „dzikiego” allela nie jest tak istotne z genetycznego punktu widzenia, jak w przypadku cech morfologicznych o dominacyjnym charakterze dziedziczenia, dla których przyjęty allel „dziki” jest zwykle dominującym [BLIXT 1997]. Na podstawie zmienności allozymów wykrytej w grupie dzikich i prymitywnych populacji grochu opracowano „dziki” ideotyp loci izoenzymatycznych u *Pisum* (tab. 3). Jako „dziki” typ allela uznano allozym występujący z najwyższą częstością. Określenie takiego wzorca może mieć znaczenie dla dyskusji nad filogenezą i pokrewieństwem taksonów w rodzaju *Pisum*.

Wnioski

1. Wysoki poziom polimorfizmu izoenzymatycznego w rodzaju *Pisum* pozwala na wykorzystanie go do wzbogacenia charakterystyki zasobów kolekcyjnych lub jako markerów odmianowych.
2. Wyniki oznaczenia częstości występowania allozymów w badanych grupach kolekcji podstawowej *Pisum* pozwalają na wykorzystanie ich do dyskusji nad niektórymi aspektami filogenezy i taksonomii grochu.
3. Porównanie częstości występowania allozymów pomiędzy odmianami hodowlanymi a populacjami dzikimi wskazuje na zawężenie zmienności hodowlanej puli genowej. Źródłem rzadko występujących allozymów są populacje dzikie. To spostrzeżenie ma istotne znaczenie dla kuratorów kolekcji banków genów przy tworzeniu kolekcji podstawowych. Powinny one obejmować możliwie największy zakres zmienności genotypowej reprezentowanej w całej kolekcji gatunku.

Literatura

- ANDERSEN W.R., FAIRBANKS D.G. 1990. *Molecular Markers: Important Tools for Plant Genetic Resource Characterization*. Diversity 6: 51–53.
- BLIXT S. 1978. *Problems relating to pea breeding*. Agri. Hort. Genet. 36: 56–87.

BROWN A.D.H. 1989. *The case for Core Collections*. W: The Use of Plant Genetic Resources. Cambridge Univ. Press str. 136–156.

HUNTER R.L., MARKET C.L. 1957. *Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels*. Science 125: 341–348.

ŚWIĘCICKI W.K., ŚWIĘCICKI W., CZERWIŃSKA S. 1981. *The Catalogue of Pisum Lines*. PWRiL.

WEEDEN N.F., ŚWIĘCICKI W.K., TIMMERMAN-VAUGHN G.M., ELLIS T.H.N., AMBROSE M. 1996. *The current pea linkage map*. Pisum Genetics 28: 1–5.

WOLKO B. 1995. *Markery molekularne w badaniach genetycznych rodzaju Lupinus*. Hod. Rośl. Nas. 39(5): 3–64.

Słowa kluczowe: *Pisum*, izoenzymy, bank genów, kolekcja podstawowa

Streszczenie

Zgromadzone w krajowej kolekcji *Pisum* w Wiatrowie zasoby obejmują dzikie populacje, odmiany uprawne i miejscowe, wyselekcjonowane mutanty spontaniczne i indukowane oraz linie pochodzące z krzyżowań w programach hodowlanych i badawczych. Utworzono z nich kolekcję podstawową rodzaju *Pisum* (266 obiektów), reprezentującą dotychczas opisaną zmienność monogeniczną w genotypach typowych dla alleli, liniach testowych z genami – markerami poszczególnych chromosomów oraz z nowymi genami.

Dla zwiększenia przydatności kolekcji podstawowej *Pisum* zgromadzonej w Wiatrowie scharakteryzowano zakres zmienności loci izoenzymatycznych. Analizowano polimorfizm 18 loci izoenzymatycznych metodą rozdziału elektroforetycznego na żelu skrobiowym. Wszystkie badane loci enzymatyczne wykazały obecność 2–4 allozymów. Niektóre z wykrytych allozymów występowały bardzo rzadko, najczęściej w populacjach należących do dzikich gatunków *Pisum*. Zakres obserwowanej zmienności izoenzymatycznej w poszczególnych grupach obiektów posłużył do obliczenia częstości alleli i oceny polimorfizmu każdej z grup oraz porównania zmienności pomiędzy grupami. Uzyskane wyniki wykorzystano do dyskusji na temat wykorzystania markerów izoenzymatycznych do charakterystyki genotypu obiektów kolekcyjnych.

ISOZYMIC LOCI POLYMORPHISM IN THE *Pisum* CORE COLLECTION

Bogdan Wolko¹, Wojciech K. Świącicki¹, Somsak Apisitwanich²

¹ Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznań,

² Kasetsart University, Dept. of Genetics, Bangkok, Thailand

Key words: *Pisum*, isozymes, gene bank, core collection

Summary

The *Pisum* national collection at Wiatrowo covers wild populations, cultivars and land races, selected spontaneous and induced mutants, as well as cross derivatives from breeding and research programs. There has been constituted the core collection of *Pisum* genus (266 accessions), representing hitherto described monogenic variability in typical genotypes for alleles, tester lines with marker genes for particular chromosomes, and with new genes.

To increase the usefulness of *Pisum* core collection gathered at Wiatrowo, the range of isozyme loci variability was characterized. The polymorphism of 18 isozyme loci was analyzed using electrophoretic separation on starch gel. All tested loci showed the presence of 2–4 allozymes. Some of them occurred very rarely, usually in populations belonging to the wild species of *Pisum*. The range of observed isozyme variability in particular groups of accessions was used for statistical calculations of allele frequency and for estimating polymorphism in each group as well as for comparison of variability among groups. The results were used for discussion on utility of isozyme markers for genotype characterization of collection accessions.

Doc. dr hab. Bogdan **Wolko**
Instytut Genetyki Roślin
Polska Akademia Nauk
ul. Strzeszyńska 34
60-479 POZNAŃ
e-mail: bwol@igr.poznan.pl