

MAGDALENA POLAK, JANUSZ SABOR

## Markery izoenzymowe w badaniach nad zróżnicowaniem genetycznym populacji drzew leśnych Część I. Technika i zakres zastosowań

Isoenzyme Markers in Investigations of Forest Tree Genetics Diversity.  
Part I. Technics and Uses

### Wstęp

Izozymy są to różne formy molekularne enzymów homologicznych, wywodzące się z genetycznie uwarunkowanych różnic w strukturze pierwszorzędowej. Struktura ta określona jest proporcją i kolejnością aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym utrwalona przez kowalencyjne wiązania peptydowe. Dla większości do tej pory przebadanych gatunków drzew leśnych stwierdzono, że izozymy składają się z od 325 do 700 reszt aminokwasowych (średnio 425), a kodujący je łańcuch DNA osiąga długość kilku tysięcy zasad [1].

Różnice genetyczne polegają na obecności na chromosomach homologicznych wielu loci genowych oraz różnych alleli dla danego enzymu. Allozymy są różnymi formami enzymu w przypadku, kiedy skład polipeptydów jest determinowany przez różne allele tego samego locus, natomiast struktura izozymów (izoenzymów) jest determinowana przez więcej niż jeden locus [3]. W większości pozycji literatury oba typy enzymów określane są ogólnie jako izozymy, często również używany jest termin izoenzymy alleliczne [4].

Różnorodność izozymów wynika zatem z istnienia polimorficznych loci i zmienności genetycznej.

Poszczególne izozymy katalizują tę samą reakcję w organizmie, ale różnią się funkcjonalnie pod względem regulacji czynności enzymatycznej, to jest:

- powinowactwa do substratów i kofaktorów (czyli substancji współdziałających w danej reakcji enzymatycznej);

- specyficzności substratowej;
- działania efektorów allosterycznych (substancji modyfikujących aktywność enzymu przez zmianę konformacji białka enzymatycznego w obrębie centrum aktywnego);
- lokalizacji wewnątrzkomórkowej;
- czasu syntezy w czasie różnicowania.

Różne izozymy wykazują optimum swojej aktywności katalitycznej w odmiennych warunkach; stąd też mogą być aktywowane przez roślinę w różnych organach, w różnych stadiach rozwoju, czy też w różnych siedliskach. Polimorfizm enzymów ujawnia się często na poziomie wewnątrzgatunkowym, a w biologii populacyjnej izozymy wykorzystuje się do rozpoznawania pojedynczych klonów oraz jako źródło informacji na temat genetycznych różnic międzypopulacyjnych. Badanie polimorfizmu izoenzymów wnosi duży wkład w zrozumienie i możliwość opisanie genetycznej struktury populacji, szczególnie drzew iglastych, które posiadają łatwe do izolacji tkanki haploidalne (makrogametofit, endosperma czyli bielmo pierwotne) stanowiące niezbędny materiał do analiz genetycznych. Dla dokładności wyników można używać kilku markerów izoenzymowych równocześnie. Istotne jest aby badać enzymy heterogeniczne, które kodowane są przez poliformiczne loci, co oznacza, że w obrębie jednego gatunku przejawiają się w różnej liczbie i typach loci genowych (np. esterazy, peroksydazy, fosfatazy, aminopeptydazy) [1]. Doskonałym materiałem do analiz biochemicznych są nasiona, gdyż zawierają oprócz haploidalnej tkanki megagametofitu także diploidalne zarodki będące materiałem dla badań porównawczych pomiędzy pokoleniem rodzicielskim i potomnym. Analiza genetyczna potomstwa powstałego z kontrolowanego zapylenia krzyżowego umożliwia określenie sposobu dziedziczenia (odziedziczalności) izozymu

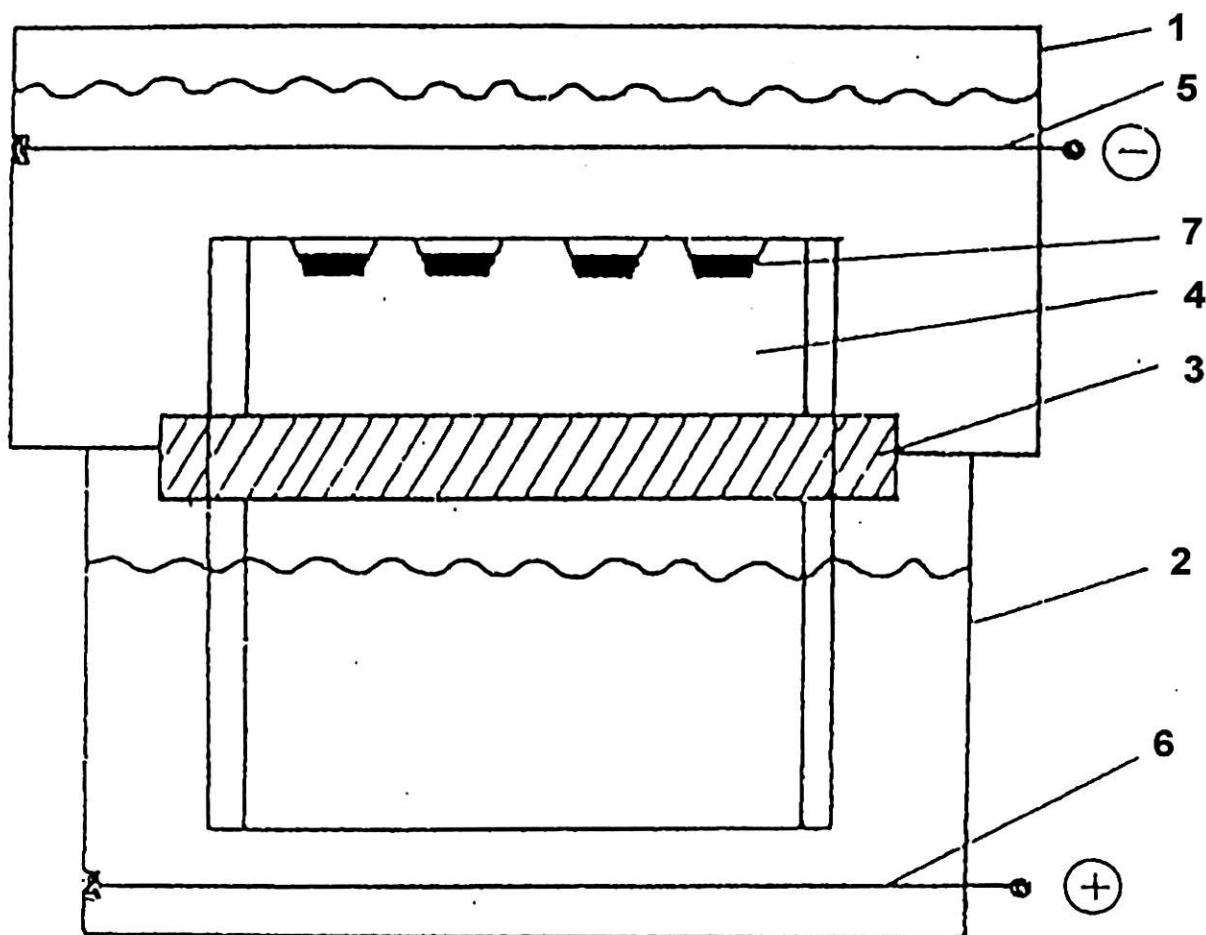
Użyteczność izozymów jako markerów biochemiczno-genetycznych wynika z tego iż:

- są niezależne od czynników środowiska zewnętrznego;
- są stabilne ontogenetycznie;
- obydwa allele w jednakowym stopniu decydują o zdolności do wytwarzania określonego izozymu to znaczy, że w heterozygotcie występują oba typy białek charakteryzujących formy rodzicielskie. Zjawisko to określa się jako kodominacja lub współdominowanie;
- rozdziału izozymów można dokonać za pomocą technik elektroforetycznych, które są bardzo wygodne ze względu na to, że można przeprowadzać serie analiz dysponując już niewielką ilością próbki.

### **Stosowane techniki**

Powszechnie stosowana techniką do rozdziału cząsteczek izozymów jest elektroforeza.

Aparat do elektroforezy na żelu skrobiowym (SGE) przedstawia ryc. 1 [5]. Zjawisko elektroforezy polega na wędrówce w polu elektrycznym cząsteczek obdarzonych ładun-



RYC. 1. Schemat naczynia do elektroforezy słabej; 1 – komora górna wypełniona buforem, 2 – komora dolna z buforem, 3 – uszczelka, 4 – płytki szklane ze spolimeryzowanym żelem wciśnięte w uszczelkę, 5, 6 – elektrody z drutu platynowego, 7 – miejsce nałożenia próbki [4]

kiem elektrycznym. Częsteczki te są rozpuszczone lub zawieszono w roztworze elektrolitu. Elektrolit, którym jest bufor o określonym pH, nasycza nośnik czyli żel.

W zależności od wypadkowego ładunku powierzchniowego, naładowane cząsteczki mogą się poruszać pod wpływem pola elektrycznego w kierunku elektrody o ładunku przeciwnym niż ładunek cząsteczki (anody lub katody). Wypadkowy ładunek danej cząsteczki jest zdeterminowany przede wszystkim przez stężenie jonów  $H^+$  w roztworze i może być modyfikowany przez oddziaływania z drobnocząsteczkowymi jonami lub makromolekułami buforu.

**Szybkość ruchu cząsteczek** podczas elektroforezy zależy od:

- różnicy potencjałów między elektrodami;
- oporu środowiska (lepkości);
- stężenia elektrolitów środowiska, pH, temperatury.

Najbardziej istotne dla analiz biochemicznych są zależności istniejące pomiędzy prędkością ruchu cząsteczki, a jej molekularnymi parametrami, to jest: ładunkiem cząsteczki i wielkością cząsteczki.

Różnice ruchliwości są bowiem podstawą analitycznych i preparatywnych rozdzielaczy substancji technikami elektroforetycznymi. W zależności od rodzaju rozdzielanego izozymu wybiera się najbardziej optymalną spośród trzech podstawowych technik elektroforetycznych [6]. Najczęściej stosowaną jest elektroforeza na żelu skrobiowym (SGE ang. starch gel electrophoresis). Technika ta pozwala na rozdział białek nie tylko na skutek różnic w ruchliwości elektroforetycznej, ale również różnic w wielkości cząsteczek na zasadzie sączenia molekularnego. W tym celu przeprowadza się częściową hydrolizę skrobi w taki sposób, aby uzyskać stopień spęcznienia ziaren umożliwiający ich działanie jako sita molekularnego.

Drugą często stosowaną w biochemii metodą jest elektroforeza w żelu poliakrylamidowym (PAGE ang. polyacrylamid gel electrophoresis). Reakcja polimeryzacji akrylamidu z czynnikiem sieciującym daje w efekcie żel o porowatej strukturze. W zależności od stężenia składników użytych do polimeryzacji można osiągnąć różne rozmiary porów w żelu. Łatwo jest więc uzyskać gradient żelu poliakrylamidowego, stąd wysoka zdolność rozdzielcza tej techniki.

Inną techniką jest ogniskowanie izoelektryczne (IEF ang. isoelectric focusing). Elektroforezę prowadzi się w środowisku o trwałym gradiencie pH utworzonym pomiędzy anodą i katodą. Cząsteczki amfoteryczne poddane elektroforezie zatrzymują się w momencie gdy osiągną strefę gradientu o pH równym wartości punktu izoelektrycznego tych cząsteczek, tj. gdy ich wypadkowy ładunek wyniesie 0. Zatem cząsteczki o jednakowym punkcie izoelektrycznym gromadzą się razem.

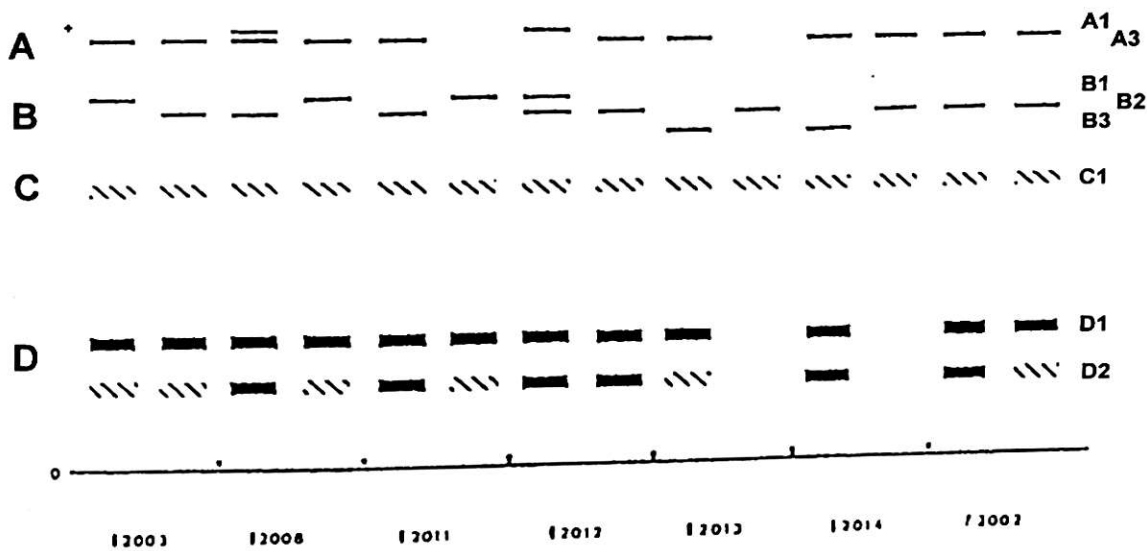
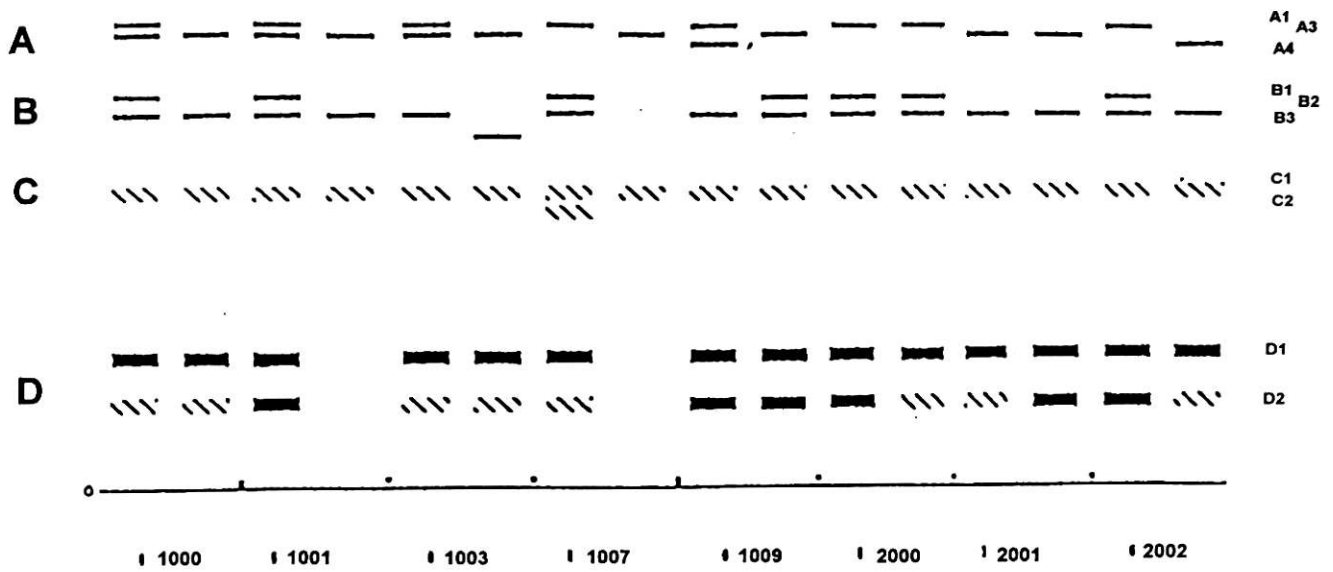
Po zakończeniu rozdzielania żele utrwala się, a następnie stosując specjalne techniki barwne, uzyskuje się obraz elektroforetycznego rozdzielania białek w postaci określonego układu prążków na żelu tzw. elektroforogram inaczej zymogram. Techniki wizualizacji otrzymanych zymogramów są różne dla różnych izoenzymów [6].

Uzyskany zymogram z charakterystycznym układem prążków należy następnie odpowiednio zinterpretować pod kątem genetycznym, a więc określić liczbę loci genowych, liczbę alleli, obliczyć parametry genetyczne oraz wnioskować na temat zmienności genetycznej badanych populacji. Można również określić sposób dziedziczenia (odziedziczalność) izoenzymu, porównując wzór prążków na zymogramie uzyskanym z bielma (tkanka haploidalna rośliny macierzystej) z zymogramem uzyskanym z igieł jednorocznych siewek (tkanka diploidalna pokolenia F<sub>2</sub>).

### **Interpretacja genetyczna**

Interpretacja genetyczna elektroforetycznego obrazu prążków na żelu polega na określeniu parametrów genetycznych takich jak:

- Procent polimorficznych loci w populacji i częstość alleli.



RYC. 2. Zymogram z bielma 15 drzew świerka (*Picea abies* L.). Każde drzewo reprezentowane jest przez dwie próbki [7]

W zależności od badanego locus obserwuje się duże zróżnicowanie częstości alleli. Na przykład u *Picea abies* K. esterazy kodowane są przez cztery loci, co na zymogramie uzyskanym z bielma widoczne jest w postaci czterech oddzielnych regionów oznaczonych jako A, B, C, D. Poszczególne prążki w każdym z regionów odpowiadają różnym allelom danego locus genowego (ryc. 2) [7].

Obecna na prawie wszystkich zymogramach kombinacja prążków A1 A3 wskazuje na ściśle połączenie tego układu alleli na chromosomie, co oznacza, że dziedziczone są jako jedna jednostka. Gdy połączenie zostanie przypadkowo przerwane przez crossing over,

wówczas pojawia się białkowy produkt innego genu, a ilustruje to układ prążków A1A4 (ryc. 2). Częstość alleli obliczamy ze wzoru:

$$p = \frac{1}{L}$$

gdzie:

- $p$  – częstość alleli;
- $1$  – liczba loci poliformicznych;
- $L$  – liczba loci analizowanych.

Badając kilka populacji oblicza się średnią częstość alleli w danym locus.

- Heterozygotyczność obserwowana w danym locus jest cechą populacji, którą można obliczyć z częstości alleli. Określa ją formuła:

$$H_{ob} = 1 - p_i^2$$

gdzie:

- $H_{ob}$  – heterozygotyczność obserwowana;
- $p_i$  – częstość  $i$ -tego allelu w danym locus.

Średnia heterozygotyczność w locus jest sumą  $H_{ob}$  z wszystkich analizowanych loci, włącznie z loci monomorficznymi, gdzie  $H_{ob}=0$ .

Współczynnik heterozygotyczności jest to proporcja heterozygot w określonej populacji w stosunku do proporcji przewidywanej przy założeniu równowagi Hardego-Weinberga [9].

Heterozygotyczność obserwowana w populacji porównuje się z heterozygotycznością oczekiwaną. Parametry te nie różnią się istotnie, jeżeli zgodnie z prawem Hardego-Weinberga w dużej, panmiktycznej populacji frekwencja genów i genotypów jest stała z pokolenia na pokolenie.

Według Nei'a heterozygotyczność oczekiwaną określa się wzorem:

$$H_e = 1 - \sum_j p_j^2 \quad [7, 8]$$

Różnice pomiędzy  $H_{ob}$  i  $H_e$  świadczą o nielosowym kojarzeniu gamet, migracji, mutacji, selekcji lub dryfie genetycznym [7].

Z heterozygotycznością wiąże się zjawisko obciążenia genetycznego genami letalnymi. W populacji drzew iglastych występuje niewielka liczba (5-10) genów letalnych działających drastycznie [2]. Działanie genów letalnych jest niwelowane lub pomniejszone w heterozygotach.

- Indeks wsobności Wrighta jest względną miarą zmian poziomu heterozygotyczności w populacjach.

$$F = 1 - \frac{H_{ob}}{H_e} \quad [8, 9]$$

Współczynnik wsobności oznacza względne zmniejszenie się heterozygotyczności w grupie wybranych losowo osobników określonej populacji, wywołane kojarzeniem wspólnym [10]. W przypadku pełnej heterozygotyczności  $F=0$ , natomiast gdy populacja jest w pełni homozygotyczna  $F=1$ .

- Różnice genetyczne, czyli: indeks podobieństwa genetycznego (identyczność genetyczna) określamy wzorem:

$$I = \frac{\sum P_{jx} \cdot P_{jy}}{\frac{1}{2} \left[ \sum P_{jx}^2 + \sum P_{jy}^2 \right]} \quad [7, 8]$$

gdzie:

- $P_{jx}$  – frekwencja fenotypu  $j$  w populacji  $x$ ;  
 $P_{jy}$  – frekwencja fenotypu  $j$  w populacji  $y$ .

Dystans genetyczny (odległość genetyczną) opisujemy za pomocą równania:

$$D = \sqrt{1 - I} \quad [8,9]$$

Dwie populacje osiągają współczynnik podobieństwa równy 1, a dystans genetyczny równy 0, gdy obie mają wszystkie allele i ich częstości identyczne.

Aby określić sposób dziedziczenia (odziedziczalności) izozymu, analizuje się potomstwo powstałe z kontrolowanego zapylenia krzyżowego w obrębie badanych populacji. W interpretacji wyników odrzuca się zymogramy, na których pojawiają się prążki nie występujące u żadnego z rodziców, gdyż te osobniki potomne powstały prawdopodobnie w wyniku niekontrolowanego zapylenia.

Przy zastosowaniu kryterium  $\chi^2$  można stwierdzić czy izozymy dziedziczone są zgodnie z prawami Mendla [7].

Metodą rzadko występujących alleli można oszacować przepływ genów na plantacjach nasiennych, wsobność pozyskiwanych nasion, a także ocenić potomstwo drzew doborowych. W porównaniu z drzewostanami naturalnymi na plantacjach nasiennych zwykle obserwuje się nadmiar heterozygot oraz duże zanieczyszczenia puli pyłku pyłkiem z poza plantacji, procent drzew wsobnych ulega zmniejszeniu wraz z wiekiem drzewostanu [2].

W podsumowaniu raz jeszcze należy podkreślić, iż izozymy (warianty enzymowe) są konsekwencją zmienności genowej, czyli istnieniu różnych alleli, co w osobniku diploidalnym wyraża się albo homozygotą (jednolite allele), albo heterozygotą (dwa różne allele). Niektóre locie genowe są polimorficzne, to znaczy, że więcej niż jeden allel przypada na locus.

## Ocena struktury genetycznej drzew leśnych

Polimorfizm genowy na poziomie populacji wyraża się w istnieniu określonych proporcji różnych izozymów. Proporcje te zmieniają się w zależności od procesów selekcyjnych.

Na podstawie przeprowadzonych badań z zakresu genetyki populacyjnej wiadomo, że gatunki o szerokim zasięgu występowania (np. *Picea abies* K., *Pinus sylvestris* L., *Fagus sylvatica* L.) cechuje większe zróżnicowanie genetyczne wewnątrzgatunkowe i wewnątrzpopulacyjne, natomiast wykazują mniej zmienności pomiędzy populacjami [1]. Izoenzymowa analiza populacji pozwala na wyselekcjonowanie najlepiej przystosowanych form do danego regionu. Zmienność genetyczna jest niezbędna dla utrzymania długookresowej stabilności ekosystemu leśnego. Stopień zróżnicowania genetycznego determinuje zdolność populacji drzew do adaptacji do zmiennych warunków środowiska. Własności przystosowawcze określonych populacji przejawiają się w różnicach, jakie wykazują w doświadczeniach proveniencyjnych. Polimorfizm genetyczny jest zjawiskiem przystosowawczym przede wszystkim dlatego, że większa różnorodność genetyczna umożliwia lepsze wykorzystanie środowiska i utrzymanie homeostazy. Cecha ta nabiera istotnego znaczenia w obliczu nasilającej się antropopresji, a więc zanieczyszczenia środowiska przez emisje przemysłowe, wprowadzanie upraw monokulturowych, karczunek, faworyzowanie określonych proveniencji, względnie typów hodowlanych.

Izoenzymową analizę drzewostanu wykorzystuje się do badania zmian struktury genetycznej w populacji roślin występujących w środowisku skażonym emisjami przemysłowymi fluorków i SO<sub>2</sub>. Stwierdzono, że w badanych populacjach pula genów i genotypów ulega zubożeniu w porównaniu z populacjami tych samych gatunków występujących poza terenami emisji.

W związku z postępującym skażeniem środowiska i zagrożeniem niektórych gatunków przez emisje przemysłowe, konieczna jest ochrona ich puli genowej. Informacje uzyskane z badania polimorfizmu genetycznego populacji metodami izoenzymowymi wykorzystuje się w strategii zachowania zasobów genetycznych gatunków oraz utrzymaniu zdolności adaptacyjnej populacji drzew leśnych do wciąż zmieniających się warunków środowiska.

Ponadto posiadane dane dotyczące wielu polimorficznych loci umożliwiają rozpoczęcie sporządzania map chromosomowych, co otwiera nowe możliwości i perspektywy rozwoju w dziedzinie genetyki drzew leśnych.

*Z Zakładu Nasiennictwa Szkółkarstwa i Selekcji Drzew Leśnych  
Wydziału Leśnego Akademii Rolniczej w Krakowie*

## Literatura

1. **Adams W.T., Strauss S.H., Copes D.L. Griffin A.R.:** Population genetics of forest trees. Proceedings of the International Symposium of Population Genetics of Forest Trees. USA 1990.
2. **Białobok S., Boratyński A., Bugała W. (red.):** Biologia sosny zwyczajnej. Poznań - Kórnik: Sorus, 1993 (305-317).
3. **Clive A. S:** Taksonomia roślin i biosystematyka. Warszawa: PWN, 1993 (139-141).
4. **Feret P., Bergmann F.:** Gel electrophoresis of proteins and enzymes. [W:] Modern Methods in Forest Genetics. 1976 (50-77).



5. **Klein A., Kozik A.:** Analiza instrumentalna w biochemii. Kraków: U.J. 1989 (121-134).
6. **Konnert M., Maurer W.:** Isosymic investigations on Norway Spruce and European Silver Fir. A practical guide to separation methods and zymogram evaluation. From the German Federal - State Working Group. Conservation of Forest Gene Resources, 1995.
7. **Lundkvist K.:** Inheritance of esterases in needles and endoperms of Norway Spruce. Umea, 1977.
8. **Nei M., Roychoudry A.K.:** Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. Genetics 76, 1974 (379-390).
9. **Prus-Głowacki W.:** Badania nad zmiennością genetyczną w klasach wiekowych naturalnie odnawiającej się populacji sosny (*Pinus sylvestris* L.). Poznań:UAM, 1982.
10. **Więcko E.:** Słownik encyklopedyczny leśnictwa, drzewnictwa, ochrony środowiska, łowiectwa oraz dziedzin pokrewnych. Warszawa: SGGW, 1996.