

JAN BOCIANOWSKI¹**ŁUKASZ STĘPIEŃ**^{2*}¹ Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych, Akademia Rolnicza w Poznaniu² Instytut Genetyki Roślin, Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

* Stypendysta Fundacji na rzecz Nauki Polskiej (FNP) na rok 2005

Porównanie pięciu miar zróżnicowania genetycznego polskich odmian pszenicy ocenianych na podstawie danych z analiz markerów mikrosatelitarnych

Comparison of five measures of genetic diversity of Polish wheats estimated on the basis of microsatellite markers

Celem pracy było zbadanie zgodności wyników oceny zróżnicowania genetycznego polskich odmian pszenicy za pomocą pięciu miar: Jaccarda, Kulczyńskiego, Sokala i Michenera, Nei'a, Rogersa. Materiał do badań stanowiły 53 polskie odmiany pszenicy. Zróżnicowanie genetyczne odmian oceniano na podstawie 164 markerów molekularnych typu SSR. Stwierdzono największe wartości miary zróżnicowania genetycznego Jaccarda. Stwierdzono istotne dodatnie skorelowanie miar Jaccarda, Kulczyńskiego, Sokala i Michenera oraz Nei'a. Miara Rogersa oceny zróżnicowania genetycznego pozwala uzyskać wyniki odmienne od pozostałych porównywanych miar.

Słowa kluczowe: markery mikrosatelitarne, pszenica, zróżnicowanie genetyczne

The aim of this study was to represent genetic distance among Polish wheat cultivars. The paper presents five methods of estimation of genetic distance based on coefficients proposed by Jaccard, Kulczyński, Sokal and Michener, Nei, Rogers. Material for the study involved 53 Polish wheat cultivars. The genetic distance of cultivars was estimated on the basis of 164 microsatellite alleles. The largest values of genetic diversity were obtained for the Jaccard's distance. Significant positive correlation coefficients were obtained for the Jaccard's, Kulczyński's, Sokal and Michener's and Nei's distances. The results obtained for the Rogers' distance were different from other compared distances.

Key words: genetic distance, microsatellite markers, wheat

WSTĘP

Poprawa cech użytkowych roślin uprawnych, głównie plonu oraz odporności na patogeny, stanowi cel wielu prac hodowlano-genetycznych. Może być ona zrealizowana m.in. poprzez zastosowanie odpowiednich krzyżowań form rodzicielskich. Należy

jednakże dysponować odpowiednim materiałem do tychże krzyżowań. Jednym z ważnych kryteriów doboru rodziców do krzyżowania jest ich zróżnicowanie genetyczne i fenotypowe. Najbardziej obiecujące potomstwo pochodzi często z krzyżowań rodziców zróżnicowanych zarówno genetycznie, jak i fenotypowo (Burkhamer i in., 1998; Heckenberger i in., 2005; Mądry i in., 2005). Najczęściej wybór materiału do krzyżowań odbywa się na poziomie fenotypowym. Zdarza się jednak, że badane odmiany nie są istotnie zróżnicowane pod względem obserwowanych cech fenotypowych. Niekoniecznie czyni to odmiany materiałem bezużytecznym do dalszych krzyżowań, gdyż pomimo braku zróżnicowania fenotypowego, mogą charakteryzować się znacznym zróżnicowaniem genetycznym (Dillmann i in., 1997). Wykrycie zróżnicowania genetycznego jest możliwe poprzez zastosowanie markerów, m.in. molekularnych. W ostatnich latach opublikowano wiele prac z zakresu wykorzystania markerów molekularnych do oceny zróżnicowania genetycznego roślin uprawnych (Burkhamer i in., 1998; Kim i Ward, 2000; Huang i in., 2002). Spośród dostępnych systemów markerowych, największą popularność zdobyły markery typu RAPD (ang. Randomly Amplified Polymorphic DNAs) (Kuczyńska i in., 2001; Myśków i in., 2001), a także SSR (Simple Sequence Repeats), czyli markery mikrosatelitarne (Plaschke i in., 1995; Pestsova i in., 2000; Huang i in., 2002; Roeder i in., 2002). Zwłaszcza te ostatnie, z uwagi na dużą zdolność do wykrywania polimorfizmu, precyzję oznaczeń, czułość i prostotę detekcji, stanowią przydatne narzędzie do badania zróżnicowania genetycznego materiałów hodowlanych, a także powiązań filogenetycznych pomiędzy nimi.

Celem pracy było porównanie pięciu miar statystycznych do oceny zróżnicowania genetycznego 53 odmian pszenicy na podstawie obserwacji 164 alleli, otrzymanych przy użyciu 23 markerów molekularnych typu SSR.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiły 53 odmiany i linie pszenicy, jare i ozime, znajdujące się w Krajowym Rejestrze Odmian Roślin Uprawnych: SMH2168, Olimpia, Soraja, Sukces, Opatka, Nutka, Koksa, Jasna, Ismena, Nawra, Eta, Tonacja, Izolda, Rywalka, Kamila, Kris, Finezja, Clever, Bogatka, Smuga, Nadobna, Kobiera, Trend, Mewa, Piko, Rubens, Zyta, Rapsodia, Turnia, Sakwa, Helia, Hezja, Zorza, Slade, Wanda, Liryka, Mobela, Almari, Jubilatka, Torka, Wilga, Olma, Kaja, Ulka, Jawa, Elena, Gama, Banti, Polna, Mikula, Rysa, Symfonia i Tortija. Odmianą referencyjną była Chinese Spring, która we wcześniejszych pracach została dobrze scharakteryzowana przy pomocy tych samych markerów SSR, co użyte w niniejszej pracy (Huang i in., 2002).

Z siedmiodniowych listków izolowano genomowe DNA przy użyciu metody z CTAB (Stępień i in., 2003). Na każdą próbę składało się pięć roślin. Ekstrakty były doprowadzane do stężenia 100 ng/μl i przechowywane w -20°C. Do analiz użyto 23 markery mikrosatelitarne, opracowane i zmapowane przez zespół Dr. M. Roeder, IPK, Gatersleben, Niemcy. Były to: gwm3, gwm18, gwm46, gwm95, gwm155, gwm160, gwm186, gwm190, gwm192, gwm261, gwm325, gwm337, gwm357, gwm389, gwm437, gwm458, gwm459, gwm513, gwm577, gwm619, gwm631, gwm680, Taglgap. Jeden z pary starterów był

znakowany fluorescencyjnie. Amplifikację przeprowadzano w termocyklerze MJ Research PTC-200. Detekcję alleli mikrosatelitarnych przeprowadzano przy użyciu sekwenatora płytowego ABI PRISM 377 (Applied Biosystems). Do oznaczania długości fragmentów użyto oprogramowania GENESCAN 3.0, a allele mikrosatelitarne rejestrowano przy pomocy programu GENOTYPER 2.0 (Applied Biosystems).

W celu oszacowania zróżnicowania genetycznego badanych odmian pszenicy zastosowano pięć następujących miar zróżnicowania genetycznego.

Miara Jaccarda (Jaccard, 1908):

$$D_{J,AB} = \frac{N_A + N_B - 2N_{AB}}{N_A + N_B - N_{AB}},$$

gdzie $D_{J,AB}$ oznacza zróżnicowanie genetyczne według Jaccarda między obiektami A i B, N_A — liczbę alleli obiektu A, N_B — liczbę alleli obiektu B, N_{AB} — liczbę alleli wspólnych u obiektów A i B.

Miara Kulczyńskiego (Kulczyński, 1927):

$$D_{K,AB} = 1 - \frac{N_{AB}(N_A + N_B)}{2N_A N_B},$$

gdzie $D_{K,AB}$ oznacza miarę zróżnicowania genetycznego według Kulczyńskiego między obiektem A i B.

Miara Sokala i Michenera (Sokal i Michener, 1958):

$$D_{SM,AB} = \frac{N - N_{AB} - N_{00}}{N},$$

gdzie $D_{SM,AB}$ oznacza miarę zróżnicowania genetycznego według Sokala i Michenera między obiektami A i B, N_{00} — liczbę przypadków niewystępowania tych samych alleli równocześnie u obiektów A i B.

Miara Nei'a (Nei, 1972):

$$D_{N,AB} = 1 - \frac{2N_{AB}}{N_A + N_B},$$

gdzie $D_{N,AB}$ oznacza zróżnicowanie genetyczne według Nei'a pomiędzy obiektami A i B.

Miara Rogersa (Rogers, 1972):

$$D_{R,AB} = \frac{|N_{A0} - N_{0B}|}{N},$$

gdzie $D_{R,AB}$ oznacza miarę zróżnicowania genetycznego według Rogersa między obiektami A i B, N_{A0} — liczbę alleli obiektu A i równocześnie nieobecnych u obiektu B, N_{0B} — liczbę alleli obiektu B i równocześnie nieobecnych u obiektu A.

Obliczono wszystkie miary zróżnicowania genetycznego pomiędzy wszystkimi parami badanych odmian i linii pszenicy. Dla każdej z miar zróżnicowania genetycznego obliczono wartość minimalną, wartość średnią, wartość maksymalną oraz współczynnik zmienności. Określono współczynniki korelacji pomiędzy miarami zróżnicowania

genetycznego. Istotność współczynników korelacji testowano na poziomie istotności $\alpha = 0,001$.

WYNIKI I DYSKUSJA

W wyniku przeprowadzonych badań z zastosowaniem 23 par starterów, amplifikujących fragmenty mikrosatelitarne z pojedynczych loci, wykryto 164 allele. Wszystkie 23 markery pozwoliły na identyfikację polimorfizmu pomiędzy badanymi odmianami pszenicy. Liczba prezentowanych w poszczególnych loci alleli była różna i zależała od markera, wahając się od 3 do 13. Średnia liczba alleli na marker wyniosła 7,23.

W tabeli 1 przedstawiono charakterystyki statystyczne badanych miar zróżnicowania genetycznego. Stwierdzono największe wartości miary zróżnicowania genetycznego Jaccarda, przy równoczesnej najmniejszej jej zmienności (11,88%). Miary: Kulczyńskiego oraz Nei'a okazały się niemal identyczne pod względem wartości charakterystyk pozycyjnych oraz współczynników zmienności. Szczególną uwagę należy zwrócić na fakt, iż na podstawie trzech powyższych miar najmniejsze zróżnicowanie genetyczne uzyskano dla odmian Zyta i Sukces, natomiast najbardziej zróżnicowane były Helia z Kobierą. Podobieństwo odmian Zyta i Sukces tłumaczyć może fakt, iż wywodzą się one z tej samej kombinacji krzyżówkowej (Jubilatka \times SMH2182). Wartości miar Sokala i Michenera miały nieco większą zmienność niż miary Jaccarda, Kulczyńskiego oraz Nei'a. Na podstawie tych miar najmniej zróżnicowanymi odmianami były Zyta i Sukces. Jednakże największe zróżnicowanie stwierdzono dla Izoldy z SMH2182 oraz Piko z SMH2182. Znaczne zróżnicowanie Piko i SMH2182 nie powinno dziwić w kontekście ich pochodzenia; Piko to odmiana niemiecka, a SMH2182 — polski ród hodowlany. Odmiany te pochodzą z różnych dwóch puli genowych. Zdecydowanie różne od pozostałych wyniki uzyskano przy zastosowaniu miary Rogersa. Objawia się to poprzez zdecydowanie najmniejszą wartość średnią oraz największą wartość współczynnika zmienności (125,8%) miar zróżnicowania genetycznego. Najmniej zróżnicowane genetycznie przy zastosowaniu miary Rogersa okazało się 760 par odmian (zróżnicowanie równe 0). Najbardziej zróżnicowane genetycznie okazały się odmiany Ulka z Tonacją oraz Rysa z Tonacją.

Tabela 1

Charakterystyka statystyczna rozpatrywanych miar zróżnicowania genetycznego odmian pszenicy
Statistical characteristic of genetic distances of wheat cultivars

Miara zróżnicowania genetycznego Genetic distance	Wartość minimalna Min. value	Wartość średnia Mean value	Wartość maksymalna Max. value	Współczynnik zmienności Coefficient of variability
Jaccarda	0,148	0,778	0,959	11,88
Kulczyńskiego	0,08	0,646	0,922	18,15
Sokala i Michenera	0,024	0,204	0,384	21,83
Nei'a	0,08	0,646	0,922	18,14
Rogersa	0	0,004	0,024	125,80

W tabeli 2 przedstawiono wartości współczynników korelacji pomiędzy miarami zróżnicowania genetycznego uzyskanymi prezentowanymi metodami. Miary Jaccarda,

Kulczyńskiego, Sokala i Michenera oraz Nei'a były skorelowane istotnie i silnie dodatnio (na poziomie $\alpha = 0,001$). Miara Rogersa okazała się miarą niezwiązaną z żadną z pozostałych.

Tabela 2

Wartości współczynników korelacji pomiędzy miarami zróżnicowania genetycznego odmian pszenicy
Correlation coefficients between genetic distances of wheat cultivars

Miara zróżnicowania genetycznego Genetic distance	Jaccarda	Kulczyńskiego	Sokala i Michenera	Nei'a
Kulczyńskiego	0,991*			
Sokala i Michenera	0,835*	0,836*		
Nei'a	0,991*	1,000*	0,842*	
Rogersa	-0,017	-0,025	0,153	-0,021

* Oznacza istotny współczynnik korelacji na poziomie istotności $\alpha = 0,001$

* Denotes significant correlation coefficients at the level $\alpha = 0,001$

Miary zaproponowane przez Jaccarda, Kulczyńskiego oraz Nei'a oparte są na obserwacjach tak zwanych podwójnych obecności alleli, stąd wyniki uzyskane przy ich zastosowaniu są podobne. Hierarchiczne grupowanie odmian metodą średnich połączeń na podstawie tych miar jest niemal identyczne (wyniki nie publikowane). Przy ocenie zróżnicowania genetycznego z zastosowaniem miary Sokala i Michenera wykorzystujemy dodatkowo liczebności niewystępowania tych samych alleli równocześnie u obu porównywanych obiektów, co objawia się zdecydowanie różną oceną zróżnicowania odmian niż przy użyciu miar D_J , D_K i D_N . Odmienne zróżnicowanie odmian otrzymano także przy zastosowaniu miary Rogersa.

Bardzo cenna z hodowlanego oraz poznawczego punktu widzenia byłaby ocena zróżnicowania rozpatrywanych odmian i linii pszenicy na podstawie obserwacji markerów innych typów, np. AFLP, CAPS, RFLP, STS. Badania takie pozwoliłyby odpowiedzieć na pytanie, czy typ markerów wpływa na ocenę zróżnicowania genetycznego obiektów (Powell i in., 1996; Patzak, 2001).

WNIOSKI

1. Miary zaproponowane przez Jaccarda, Kulczyńskiego oraz Nei'a pozwalają uzyskać podobne wyniki oceny zróżnicowania genetycznego odmian. Najmniej zróżnicowane na poziomie genetycznym według tychże miar były odmiany Zyta i Sukces.
2. Miara Rogersa do oceny zróżnicowania genetycznego pozwala uzyskać wyniki wyraźnie odmienne od pozostałych porównywanych miar.
3. Zastosowana w pracy metoda wykorzystująca detekcję alleli mikrosatelitarnych okazała się bardzo skuteczna, przy zastosowaniu 23 starterów otrzymano 164 polimorficzne allele.

LITERATURA

Burkhamer R. L., Lanning S. P., Martens R. J., Martin J. M., Talbert L. E. 1998. Predicting progeny variance from parental divergence in hard red spring wheat. *Crop Sci.* 38: 243 — 248.

- Dillmann C., Bar-Hen A., Guérin D., Charcosset A., Murigneux A. 1997. Comparison of RFLP and morphological distance between maize *Zea mays* L. inbred lines. Consequences for germplasm protection purposes. *Theor. Appl. Genet.* 95: 92 — 102.
- Heckenberger M., Bohnb M., Klein D., Melchinger A. E. 2005. Identification of essentially derived varieties obtained from biparental crosses of homozygous lines. II. Morphological distances and heterosis in comparison with simple sequence repeat and amplified fragment length polymorphism data in maize. *Crop Sci.* 45: 1132 — 1140.
- Huang X. Q., Boerner A., Roeder M. S., Ganal M. W. 2002. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 105: 699 — 707.
- Jaccard P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44: 223 — 270.
- Kim H. S., Ward R. W. 2000. Patterns of RFLP-based genetic diversity in germplasm pools of common wheat with different geographical or breeding program origins. *Euphytica* 115: 197 — 208.
- Kuczyńska A., Milczarski P., Surma M., Masojć P., Adamski T. 2001. Genetic diversity among cultivars of spring barley revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). *J. Appl. Genet.* 42(1): 43 — 48.
- Kulczyński S. 1927. Die Pflanzenassoziationen der Pieninen. *Bull. Intern. Acad. Pol. Sci. Lett. Cl. Sci. Math. Nat., B (Sci. Nat.)* 1927 (Suppl. 2): 57 — 203.
- Mądry W., Śmiałowski T., Ukalski K. 2005. Przewidywanie średnich cechy w populacjach potomstwa na podstawie parametrów biometryczno-genetycznych rodziców: modele i ich zastosowanie dla żyta ozimego. *Biul. IHAR* 235: 251 — 268.
- Mysków B., Masojć P., Banek-Tabor A., Szolkowski A. 2001. Genetic diversity of inbred rye lines evaluated by RAPD analysis. *J. Appl. Genet.* 42 (1): 1 — 14.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106: 283 — 292.
- Patzak J. 2001. Comparison of RAPD, STS, ISSR, and AFLP molecular methods used for assessment of genetic diversity in hop (*Humulus lupulus* L.). *Euphytica* 121: 9 — 18.
- Pestsova E., Korzun V., Goncharov N. P., Hammer K., Ganal M. W., Roeder M. S. 2000. Microsatellite analysis of *Aegilops tauschii* germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 101: 100 — 106.
- Plaschke J., Ganal M. W., Roeder M. S. 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 91: 1001 — 1007.
- Powell W., Morgante W. M., Andre C., Hanafrey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A. 1996. Comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2: 225 — 228.
- Roeder M. S., Wendehake K., Korzun V., Bredemeijer G., Laborie D., Bertrand L., Isaac P., Rendell S., Jackson J., Cooke R. J., Vosmann B., Ganal M. W. 2002. Construction and analysis of a microsatellite-based database of European wheat cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 106: 67 — 73.
- Rogers J. S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies in Genetics, University of Texas Publication* 7213: 145 — 153.
- Sokal R. R., Michener C. D. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kansas Sci. Bull.* 38: 1409 — 1438.
- Stępień Ł., Golka L., Chełkowski J. 2003. Leaf rust resistance genes of wheat: identification in cultivars and resistance sources. *J. Appl. Genet.* 44 (2): 139 — 149.