

ANDRZEJ RAFALSKI¹**IWONA WIŚNIEWSKA**¹**KRZYSZTOF KLIMONT**²¹Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin²Zakład Nasiennictwa i Nasionoznawstwa

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

Zmiany obrazu fragmentów DNA po traktowaniu nasion jęczmienia promieniowaniem laserowym*

The changes of amplified DNA fragment profiles after laser irradiation of barley seeds

Nasiona dwóch odmian jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) Klimek i Rataj naświetlano trzema dawkami promieniowania laserowego. Analizę DNA otrzymanego z siewek badanych odmian przeprowadzono metodą PCR z zastosowaniem starterów częściowo komplementarnych do sekwencji styku intron-egzon genów roślinnych. Porównanie profili powielonych fragmentów DNA wykazało u obu badanych odmian wyraźny polimorfizm między siewkami z nasion kontrolnych a siewkami z nasion poddanych naświetlaniu. Otrzymane wyniki wskazują, że naświetlanie nasion wywołuje zmiany na poziomie DNA ujawniające się w okresie wegetatywnego rozwoju roślin. Trwałość niektórych zmian DNA sugeruje mutagenne działanie promieniowania laserowego.

Słowa kluczowe: jęczmień, nasiona, PCR, promieniowanie laserowe

The seeds of two varieties of barley (*Hordeum vulgare* L.), Klimek and Rataj were irradiated with three doses of laser radiation. The semi-specific primers targeting consensus sequences of intron-exon junction of plant genes were used for PCR analysis of DNA prepared from seedlings of these varieties. The comparison of amplification profiles of DNA fragments of both varieties revealed distinct polymorphism between control seedlings and seedlings from the laser treated seeds. The obtained results indicate, that the irradiation of seeds generates some changes of DNA structure, which appear during vegetative growth of plants. The persistence of some changes on DNA level suggests the mutagenic effects of laser radiation.

Key words: barley, PCR, seeds, laser radiation

* Praca finansowana w ramach projektu KBN 5PO6B 037 13

WSTĘP

Zainteresowanie działaniem promieniowania laserowego wynika z szeregu doniesień o korzystnym wpływie tego promieniowania na wartość siewną nasion oraz plonowanie roślin uzyskanych z nasion poddanych naświetlaniu (Zubał, 1990; Dziambai Koper, 1992). Dostarczenie energii drogą napromieniowania wpływa prawdopodobnie na procesy fizjologiczne podczas kiełkowania nasion, lecz mechanizm tego działania nie jest poznany. Podkreśla się również, że stymulujące działanie czynnika fizycznego jest bezpieczne, bo nie wywołuje żadnych zmian środowiskowych.

Wpływ działania światła laserowego może mieć charakter bardziej trwały, gdyż zmiany obserwuje się w różnych okresach generatywnego rozwoju roślin wyprowadzonych z nasion traktowanych promieniowaniem laserowym. Przy wyższych dawkach nie jest wykluczone działanie mutagenne promieniowania laserowego (Injuszin, 1977; Rybiński i in., 1993).

Badania zmian na poziomie DNA wywołanych działaniem promieniowania laserowego nie były dotychczas prowadzone. Możliwość szybkiej analizy różnic genetycznych stwarzają metody oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR). Jedną z metod PCR jest system z zastosowaniem starterów o sekwencji częściowo komplementarnej do semikonserwatywnych sekwencji styku intron-egzon genów roślinnych. Uniwersalność i czułość tej metody sprawdzono w badaniach dystansu genetycznego linii wsobnych kukurydzy i żyta, tożsamości odmianowej grochu i soi oraz w poszukiwaniach markerów tolerancyjności na glin u żyta (Rafalski i in., 2000).

Celem niniejszej pracy było wykorzystanie tej metody dla wykrycia ewentualnych różnic genetycznych między siewkami wyprowadzonymi z nasion kontrolnych i z nasion poddanych napromieniowaniu.

MATERIAŁ I METODY

Materiał stanowiły nasiona dwóch odmian jęczmienia Rataj i Klimek poddane naświetlaniu promieniowaniem lasera helowo-neonowego konstrukcji Kopera i Drygały (1993). Analiza DNA obejmowała próby kontrolne badanych odmian oraz nasiona naświetlane 2, 4 i 6 dawkami promieniowania przygotowane do oceny laboratoryjnej i polowej w latach 1998–2000.

Preparatykę DNA przeprowadzano według metodyki opisanej przez Davisa i wsp. (1986). DNA otrzymywano z liści 20–25 siewek rosnących na pożywce płynnej przez 5–7 dni. Stężenie DNA oznaczano fluorymetrycznie zgodnie z instrukcją fluorymetru TKO 100 (Hoefer Scientific Instruments).

Amplifikację fragmentów DNA przeprowadzano w układzie zawierającym w objętości 20 µl: 10 ng DNA roślinnego, 1 x bufor (MBI Fermentas, Wilno), 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 1–1,2 µM startera i 1 jednostkę termostabilnej polimerazy (MBI Fermentas). Amplifikacja była prowadzona dwustopniowo, w pierwszych siedmiu cyklach temperatura przyłączania startera była o 2°C wyższa od wyliczonej na podstawie sekwencji i długości startera, a w następnych 33 cyklach temperaturę podwyższano o

dalsze 4°C. We wszystkich cyklach powielania denaturację przeprowadzano przez 40 sek. w temperaturze 94°C, przyłączanie startera trwało 1 min., a wydłużanie łańcuchów DNA 2 min. w 72°C.

Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym w buforze TBE i wizualizowano przy użyciu bromku etydyny. Fotografie rozdzielów elektroforetycznych analizowano przy użyciu programu "Fragment NT" (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). Przy użyciu tego programu tworzone macierz wyników przedstawioną systemem dwójkowym, gdzie obecność fragmentu o określonej wielkości oznaczano jako "1", a brak tego fragmentu jako "0". Wyniki te stanowiły podstawę do wyliczenia, przy użyciu programu "Excel", współczynników dystansu genetycznego według wzoru:

$$DG_{(a,b)} = 1 - (2N_{(a,b)} / (N_{(a)} + N_{(b)})),$$

gdzie $2N_{(a,b)}$ oznacza liczbę pasm wspólnych dla genotypów a i b, natomiast $(N_{(a)} + N_{(b)})$ liczbę wszystkich pasm występujących w obu genotypach (Nei i Li, 1979).

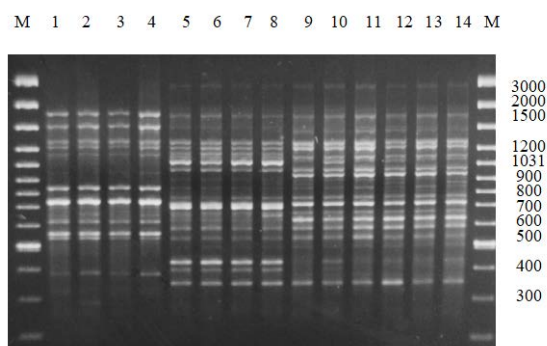
WYNIKI

Wyniki oceny dystansu genetycznego badanych prób pochodzą z doświadczeń PCR, w których stosowano startery o sekwencjach ukierunkowanych na styki intron-egzon genów roślinnych. Przedstawione wyniki pochodzą z 13 doświadczeń, w których zastosowano cztery startery z grupy ET18 (5'ACTTACCTG*****3'), trzy startery z grupy ET15 (5'ACTTACCTG*****3'), trzy startery z grupy IT15 (5'*****CAGGTAAG3') i trzy startery IT10 (5'ACGTCCA***3').

Przykłady rozdzielów elektroforetycznych fragmentów DNA powielonych przy użyciu takich starterów przedstawiono na rysunkach 1 i 2. Różnice spektrum powielonych fragmentów DNA między próbkami kontrolnymi a próbkami z nasion traktowanych promieniowaniem widoczne są na obu rysunkach. Różnice te bardziej wyraźne są na rysunku 2, gdzie powielenie dość ograniczonej liczby fragmentów uzyskano przy użyciu startera IT2/10. W tabelach 1–2 przedstawiono wyniki wyliczeń dystansu genetycznego (Nei i Li, 1979) uzyskane w doświadczeniach prowadzonych w latach 1998–2000. Wyraźny dystans genetyczny między próbkami kontrolnymi a próbkami traktowanymi laserem wskazuje, że działanie to wywołuje zmiany na poziomie DNA. W obu badanych odmianach wzrastające dawki promieniowania powodują niewielki wzrost dystansu genetycznego w stosunku do prób kontrolnych.

Zmiany profilu powielonych fragmentów DNA mogą mieć charakter trwały lub przejściowy. W celu sprawdzenia, czy różnice w spektrum powielonych fragmentów DNA są trwałe, w latach 1999 i 2000 analizą objęto również DNA siewek uzyskanych z potomstwa roślin traktowanych laserem (6 dawek) i potomstwa roślin kontrolnych jęczmienia odmiany Klimek. Porównanie spektrum powielonych fragmentów wykazało istnienie dystansu genetycznego również między tymi próbkami. Indeks dystansu genetycznego wyliczony na podstawie analizy 214 fragmentów DNA wynosił 0,17 i był

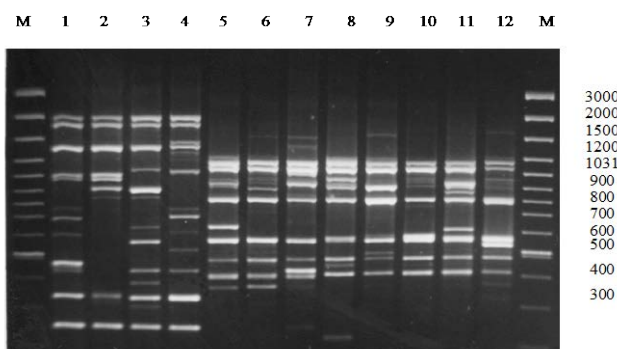
niższy od indeksu dystansu między kontrolą a próbami naświetlanymi, z których DNA uzyskiwano bezpośrednio po traktowaniu laserem.



M — wzorzec wielkości DNA (ilość par nukleotydów). Odmiana Rataj: 5 — kontrola, 6 — laser 2 dawki, 7 — laser 4 dawki, 8 — laser 6 dawek. Odmiana Klimek: 9 — potomstwo z nasion kontrolnych, 10 — potomstwo z nasion traktowanych laserem, 11 — kontrola, 12 — laser 2 dawki, 13 — laser 4 dawki, 14 — laser 6 dawek
M — DNA size markers. Variety Rataj: 5 — control, 6 — laser 2 doses, 7 — laser 4 doses, 8 — laser 6 doses. Variety Klimek: 9 — progeny of control plants, 10 — progeny from laser treated seeds, 11 — control, 12 — laser 2 doses, 13 — laser 4 doses, 14 — laser 6 doses

Rys. 1. Wyniki powielania DNA z siewek badanych odmian jęczmienia przy użyciu startera ET36/15 ($5'ACCTACCTGGGGCTC^3$). Fragment pogrubiony jest komplementarny do sekwencji styku intron-egzon

Fig.1. Amplification of DNA of two varieties of barley with the use of primer ET36/15 ($5'ACCTACCTGGGGCTC^3$). The bases that match intron-exon sequence are shown in bold type



M — wzorzec wielkości DNA (ilość par nukleotydów). Odmiana Rataj: 5 — kontrola, 6 — laser 2 dawki, 7 — laser 4 dawki, 8 — laser 6 dawek. Odmiana Klimek: 9 — kontrola, 10 — laser 2 dawki, 11 — laser 4 dawki, 12 — laser 6 dawek.
M — DNA size markers. Variety Rataj: 5 — control, 6 — laser 2 doses, 7 — laser 4 doses, 8 — laser 6 doses. Variety Klimek: 9 — control, 10 — laser 2 doses, 11 — laser 4 doses, 12 — laser 6 doses

Rys.2. Wyniki powielania DNA z siewek badanych odmian jęczmienia przy użyciu startera IT2/10 ($5'ACGTCCAGGT^3$). Fragment pogrubiony jest komplementarny do sekwencji styku intron-egzon

Fig.2. Amplification of DNA of two varieties of barley with the use of primer IT2/10 ($5'ACGTCCAGGT^3$). The bases that match intron-exon sequence are shown in bold type

Tabela 1

Indeksy dystansu genetycznego siewek jęczmienia odmiany Rataj otrzymanych z nasion traktowanych laserem. Dane uzyskane z analizy 331 fragmentów DNA

The indeces of dissimilarity of barley seedlings var. Rataj grown from the laser treated seeds. The data are based on analysis of 331 DNA fragments

	Kontrola Control	Laser 2 dawki Laser 2 doses	Laser 4 dawki Laser 4 doses	Laser 6 dawek Laser 6 doses
Kontrola Control	0	0,16	0,18	0,22
Laser 2 dawki Laser 2 doses			0,16	0,21
Laser 4 dawki Laser 4 doses				0,16

Tabela 2

Indeksy dystansu genetycznego siewek jęczmienia odmiany Klimek otrzymanych z nasion traktowanych laserem. Dane uzyskane z analizy 319 fragmentów DNA

The indeces of dissimilarity of barley seedlings var. Klimek grown from the laser treated seeds. The data are based on analysis of 319 DNA fragments

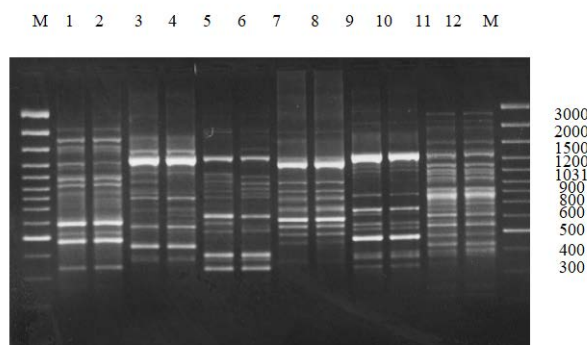
	Kontrola Control	Laser 2 dawki Laser 2 doses	Laser 4 dawki Laser 4 doses	Laser 6 dawek Laser 6 doses
Kontrola Control	0	0,21	0,23	0,26
Laser 2 dawki Laser 2 doses			0,17	0,23
Laser 4 dawki Laser 4 doses				0,18

DYSKUSJA

Wpływ działania promieniowania laserowego interpretowany jest zwykle jako efekt czynnika fizycznego dostarczającego energię powodującą przerwanie stanu spoczynku nasion, wzrost energii i zdolności ich kiełkowania oraz przyspieszenie tempa wzrostu koleoptylów (Drozd i Szajsner, 1997). Jakkolwiek mechanizm działania promieniowania nie jest poznany, obserwowane efekty interpretuje się zmianami stanu fizjologicznego nasion po przekształceniu energii fizycznej w chemiczną (Drozd i in., 1997). Zmiany stanu fizjologicznego nie powinny wpływać na podstawową strukturę DNA, a tym samym na spektrum fragmentów powielonych techniką PCR. Jednak działanie promieniowania laserowego porównywane jest również z działaniem mutagenów chemicznych, gdzie przy odpowiednich dawkach obserwuje się wpływ stymulujący (Rybiński i in., 1993). Wykrycie znacznych różnic, wyliczonych jako dystans genetyczny między próbami kontrolnymi a próbami z nasion poddanych napromienianiu jest jednak dość zaskakujące tym bardziej, że DNA otrzymywano nie z nasion, lecz z części zielonych siewek wyprowadzonych z tych nasion.

Obserwowane różnice w spektrum powielonych fragmentów DNA, jakkolwiek są trudne do wyjaśnienia wydają się być dość dobrze udokumentowane. Stosowane startery reakcji PCR nie ujawniają polimorfizmu między formami identycznymi lub blisko

spokrewnionymi. Porównanie spektrum DNA dwóch pokrewnych rodów soi przy użyciu 12 starterów wykazało obecność tylko dwóch pasm polimorficznych spośród 146 powielonych fragmentów DNA (Rafalski i in., 2000). Podobnie porównanie dwóch rodów wiechliny łąkowej, u których zjawisko apomiksji powoduje stabilizację układu genetycznego wykazało, że ich dystans genetyczny wyliczony z doświadczeń PCR (ponad 400 fragmentów DNA) wynosi tylko 0,04. Przykład powielania DNA badanych rodów wiechliny przy użyciu sześciu starterów z grupy IT15 przedstawiono na rysunku 3.



M — wzorec wielkości DNA (ilość par nukleotydów), ścieżki 1, 3, 5, 7, 9, 11 — ród 1, ścieżki 2, 4, 6, 8, 10, 12 — ród 2
M — DNA size markers, lanes 1, 3, 5, 7, 9, 11—strain 1, lanes 2, 4, 6, 8, 10, 12 — strain 2

Rys. 3. Wyniki powielania DNA dwóch rodów wiechliny łąkowej przy użyciu 6 starterów IT15
(5'*****CAGGTAAG³)

Fig. 3. Amplification of DNA of two strains of *Poa pratense* with the use of 6 starters IT15
(5'*****CAGGTAAG³)

Obserwowany polimorfizm wynikać może z rearanżacji trzeciorzędowej (superhelikalnej) struktury DNA, która zmienia możliwość przyłączania starterów reakcji PCR (Caetano-Annoles i in., 1993). Tego rodzaju zmiany mają charakter przejściowy i nie wyjaśniają różnic w spektrum fragmentów DNA, jakie ujawniają się w potomstwie. Cytologiczne obserwacje aberracji chromosomowych w zarodkach nasion poddanych naświetlaniu (Szajnsner, 1999) oraz liczne doniesienia o zmianach cech morfologicznych po naświetlaniu laserem wskazują na mutagenne działanie promieniowania. Dla tego typu działania promieniowania laserowego wprowadzono termin "mutageneza fotoindukcyjna" (Injuszin, 1977).

WNIOSKI

1. U obu badanych odmian jęczmienia, analiza DNA siewek uzyskanych z nasion poddanych działaniu promieniowania laserowego wykazała ich wyraźny dystans genetyczny w stosunku do siewek z nasion kontrolnych.
2. Przy wzrastających dawkach promieniowania obserwuje się niewielkie zwiększanie dystansu genetycznego w stosunku do prób kontrolnych.

3. Zmiany na poziomie DNA wywołane najwyższymi dawkami promieniowania mają charakter trwały, co wskazuje na mutagenne działanie promieniowania laserowego.

LITERATURA

- Caetano-Annoles G., Bassam B. J., Gresshoff P. M. 1993. Enhanced detection of polymorphic DNA by multiple arbitrary amplicon profiling of endonuclease-digested DNA: identification of markers tightly linked to supernodulation locus in soybean. *Mol. Gen. Genet.* 241: 57 — 64.
- Davis L. G., Dibner M. D., Battey J. F. 1986. *Basic methods in molecular biology*. Elsevier Sci. Publ., New York: 42 — 43.
- Drozd D., Szajsner H., Laszkiewicz E. 1999. Wykorzystanie biostymulacji laserowej w uprawie pszenicy jarej. *Biul. IHAR* 211: 85 — 90.
- Drozd D., Szajsner H., Jezierski A. 1997. Zastosowanie elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) do oceny promieniowania laserowego na ziarniaki pszenicy jarej. *Biul. IHAR* 204: 181 — 186.
- Drozd D., Szajsner H. 1997. Laboratoryjna ocena wczesnych faz rozwojowych pszenicy jarej poddanej działaniu promieniowania laserowego. *Biul. IHAR* 204: 187 — 190.
- Dziamba J., Koper R. 1992. The influence of laser irradiation of seeds on crop of spring wheat. *Seeds. Fragm. Agron.* 1 (33): 88 — 93.
- Injusz W. 1977. Technika laserowa w służbie rolnictwa. *Nowe Rolnictwo* 21 — 22: 21 — 26.
- Koper R., Dygała Z. 1993. Urządzenie do obróbki przedsiewnej nasion promieniem laserowym. Patent. UP.R.P. Nr 182 598.
- Nei M., Li W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 5269 — 5273.
- Rafalski A., Wiśniewska I., Gawęł M. 2000. Semirandom approach to genetic fingerprinting and screening for markers. 3rd Int. Crop. Sci. Congress, 17–20 Aug. Hamburg. Poster, materials: 221.
- Rybiński W., Patyna H., Przewoźny T. 1993. Mutagenic effect of laser and chemical mutagenes in barley. *Genet. Pol.* 34 (4): 337 — 343.
- Szajsner H. 1999. Reakcja genotypów pszenicy jarej na stresowe oddziaływanie promieniowania laserowego. I. Badania cytologiczne. *Zeszyty Naukowe A. R. we Wrocławiu.* 367: 45 — 65.
- Zubal P. 1990. Effect of laser treatment of seeds on yields of cereals and legumes. *Vedecke Prace*, 23: 141 — 156.