



## Wykorzystanie pyłku do badania zróznicowania genetycznego na przykładzie łubinu andyjskiego *Lupinus mutabilis* Sweet

Ewa Sawicka-Sienkiewicz<sup>1</sup>, Halina Augustyniak<sup>2</sup>,  
Grzegorz Pietkiewicz<sup>2</sup>, Sławomir Bartkowiak<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Katedra Hodowli Roślin i Nasiennictwa Akademii Rolniczej, Wrocław

<sup>2</sup>Zakład Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Instytutu Biologii  
Molekularnej i Biotechnologii UAM, Poznań

<sup>3</sup>Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań

### Application of pollen for studies on genetic diversity with the using of the Andean lupin (*Lupinus mutabilis* Sweet) as example

#### Summary

The cultivated American species *Lupinus mutabilis* was selected in order to assess its possibilities of being introduced as an alternative high protein crop in Polish conditions. The realized programme involved identification of earlier maturing and higher yielding genotypes as well as interspecific hybridization with lupins belonging to section *Albus*, which includes the oldest cultivated species *Lupinus albus*.

Recent reports (1) on determination of DNA polymorphism by the PCR method indicate usefulness of direct application of small amounts of pollen. The advantage of this method is the precisely determined and physiologically stable material used for the analysis. Furthermore, pollen can be preserved above the hygroscopic substance at -20°C for a long time and small amounts of pollen (20-100 grains) can be used for the analysis without any damage to the plant material.

For PCR reaction, ten selected primers were used. A polyacrylamide gel comparison of the PCR products revealed that random primers as well as primers which amplified a fragment of the whole gene can be applied to analyse the DNA of polymorphism of *L. mutabilis* and *L. albus*. The conclusion is that it is possible to differentiate within both groups of species by application of pollen to DNA analysis.

#### Key words:

Andean lupin, *Lupinus mutabilis* hybrids with *L. albus*, pollen PCR, genetic diversity.

#### Adres do korespondencji

Ewa Sawicka-Sienkiewicz,  
Katedra Hodowli Roślin  
i Nasiennictwa,  
Akademia Rolnicza,  
ul. Cybuśkiego 34,  
50-205 Wrocław.

## 1. Wstęp

U roślin kwiatowych można wyróżnić dwie fazy rozwoju: diploidalną fazę wzrostu wegetatywnego prowadzącą do powiększenia rozmiarów i wytwarzania charakterystycznych organów, oraz fazę rozmnażania generatywnego doprowadzającą do powstania pręcików i słupków zawierających haploidalne gamety: komórki jajowe i ziarna pyłku. W dojrzałym ziarnie pyłku komórka generatywna może ulec podziałowi przed kiełkowaniem pyłku lub w samej łagiewce pyłkowej, natomiast komórka wegetatywna nie ulega podziałowi i u wielu roślin degeneruje (1,2).

Ziarna pyłku po odwodnieniu wchodzą w okres spoczynku, ale zachowują zdolność kiełkowania. Okres spoczynku ziaren pyłku jest bardzo zróżnicowany u różnych gatunków roślin. Ziarno pyłku zanim zacznie kiełkować znacznie powiększa swoją objętość pobierając płyn z powierzchni słupka (1,3). Funkcjonalne ziarna pyłku są zdolne do przetrwania i kiełkowania na znamieniu „zgodnych” roślin oraz do ich zapłodnienia (4). W przypadku wystąpienia zaburzeń podziału mejotycznego mogą powstać jądra restytucyjne w I lub II podziale, tworząc niezredukowane gamety (2n). Zaburzenia te odgrywają istotną rolę przy powstawaniu i tworzeniu poliploidów. Ważna dla zmienności genetycznej w naturze, jak i w hodowli roślin, jest zachodząca podczas podziału mejotycznego wymiana chromatyd siostrzanych (*crossing-over*) prowadząca do rekombinacji cech (5).

Pyłek jako organizm był obiektem szeregu manipulacji mających na celu modyfikowanie haploidalnego poziomu genomu rośliny. Manipulacje te dotyczyły tetrad, mikrospor jak i dojrzałych ziaren pyłku. W przypadku wcześniejszych stadiów rozwojowych prowadzono hodowlę *in vitro* tetrad i ich protoplastów, a kultury mikrospor od szeregu lat są drogą uzyskiwania roślin o gametycznej liczbie chromosomów. W przypadku dojrzałych ziaren pyłków, które, jak się okazało, były biotechnologicznie konserwatywne, przeprowadzono szereg doświadczeń z ich napromienianiem wywołując tą drogą zmiany mutacyjne.

Podejmowane były próby traktowania pyłku mutagenami fizycznymi, jednak ze względu na pewne niedogodności techniczne metoda ta nie została zaakceptowana. Pyłek traktowano także niskimi dawkami promieniowania jonizującego w celu „zniesienia” specyficznej reakcji samoniezgodności lub niezgodności krzyżówkowej. Natomiast po zastosowaniu wysokich dawek promieniowania gamma uzyskiwano fragmentację DNA, co próbowano wykorzystać do wprowadzenia odporności na patogeny (6).

W klasycznym systemie płciowego rozmnażania roślin obie komórki generatywne ziarna pyłku są niezbędne do uzyskania kolejnego pokolenia oraz zapewnienia wzrostu i rozwoju wczesnym stadiom zarodkowym, dla ostatecznego uzyskania dojrzałego zarodka. W niektórych przypadkach pyłek jest potrzebny tylko do tworzenia bielma, gdyż dochodzi do zapłodnienia komórki centralnej woreczka zalążkowego. Na skutek apomiksji czyli rozwoju zarodka bez zapłodnienia tworzą się haploidy na drodze partenogenezy lub apogamii. Haploidy można otrzymywać rów-

niez przez krzyżowanie międzygatunkowe lub międzyrodzajowe, a następnie hodowlę *in vitro* niedojrzałych zarodków (7,8).

W metodzie kultury *in vitro* rozwinęła się technika androgenезы. Wykorzystano tu zjawisko totipotencji młodych mikrospor do odtworzenia rozwoju całej rośliny o gametycznej liczbie chromosomów. Zjawisko eliminacji chromosomów występujące w wyniku krzyżowań oddalonych znalazło także praktyczne zastosowanie jako metoda otrzymywania haploidów szczególnie u zbóż. Na przykład po zapyleniu *Hordeum vulgare* x *Hordeum bulbosum* otrzymano zarodki, które po wyłożeniu na odpowiednią pożywkę mineralną, rozwijają się w normalne haploidalne rośliny formy macecznej. Po podwojeniu liczby chromosomów uzyskujemy dihaploidy czyli homozygotyczne linie DH. Haploidy znalazły szerokie zastosowanie przy tworzeniu linii homozygotycznych w hodowli heterozyznej, w analizie powinowactwa genetycznego chromosomów u roślin poliploidalnych, w badaniu struktury genetycznej komórki, a także w badaniu dziedziczenia cech po jednym rodzicu oraz w badaniu zależności genetyczno-ewolucyjnych (9,7,6).

Ziarna pyłku, mikrogametofity roślin kwiatowych zawierające zredukowaną, haploidalną liczbę chromosomów stanowią najprostszy układ do różnego rodzaju modelowych badań genetycznych na poziomie molekularnym. W pyłku wykazano ekspresję dwóch grup genów: 60% to geny sporofitu i 20% to geny charakterystyczne tylko dla gametofitu (10).

W ostatnich latach nastąpił szybki rozwój technik badania DNA, struktury genu, a także technik badania poziomu polimorfizmu DNA. Analiza polimorfizmu kwasów nukleinowych umożliwia nie tylko ocenę zróżnicowania genetycznego, ale również prowadzi do pełniejszej charakterystyki materiału roślinnego. Dużym przełomem w analizie zmienności genetycznej było zastosowanie reakcji PCR. Od początku lat dziewięćdziesiątych metoda oparta na reakcji PCR jest stosowana z pełnym powodzeniem w badaniach polimorfizmu DNA u roślin (11). Jest to prosta metoda o licznych i różnorodnych modyfikacjach. Metoda PCR jest, jak dotąd, najczulszą ze stosowanych technik detekcji poszukiwanych loci. Z dotychczasowych prac wynika, że stosując techniki oparte na reakcji PCR, czy analizie powstałych fragmentów restrykcyjnych, można z łatwością odróżnić gatunki i wykazać różnorodność genotypów. Analizy z zastosowaniem każdej z tych technik wymagają w zależności od badanego materiału zastosowania odpowiedniej metody izolacji DNA. Na podstawie przeprowadzonych badań w naszych laboratoriach wykazano, że żadna z tych technik nie daje zadowalających wyników w przypadku izolacji DNA z ziaren pyłku. W porównaniu z innymi tkankami zawartość DNA w pyłku jest duża (od 0,01 do 1,35% suchej masy), jednak tradycyjne metody izolacji DNA zaadaptowane do ekstrakcji DNA z ziaren pyłku nie dają z reguły zadowalających wyników, czyli odpowiedniej ilości i jakości DNA (12). Przyczyna tego tkwi w specyficznej budowie ziarna pyłku, przede wszystkim w budowie zewnętrznej warstwy pyłku – egzyny. Głównym składnikiem egzyny jest sporopoleina, jeden z najodporniejszych związków na degradację polimerów w przyrodzie, mało wrażliwy na wysoką temperaturę,

rozkład przez grzyby czy bakterie. Sporopoleina sprawia, że ściana pyłku jest sprężysta, co w znacznym stopniu utrudnia wyizolowanie wysokocząsteczkowego DNA. W ostatnich latach pojawiły się doniesienia (13-16) z których wynika, że do badań polimorfizmu DNA metodą PCR mogą być użyte ziarna pyłku. Ten materiał roślinny charakteryzuje się określonym, stabilnym stanem fizjologicznym, i ponadto może być przechowywany po zbiorze przez dłuższy czas w temp.  $-20^{\circ}\text{C}$  przy użyciu substancji higroskopijnej. Do analizy wykorzystuje się nieznaczne ilości materiału (20-100 ziaren pyłku), a obiekt badań nie ulega żadnym uszkodzeniom. Pyłek zawiera nie tylko DNA jądrowy, ale i DNA plastydowy i mitochondrialny. W ziarnach pyłku mitochondria różnią się wielkością i liczbą w zależności od rozmieszczenia. W komórkach generatywnych są znacznie mniejsze niż w cytoplazmie komórki wegetatywnej. Drugim komponentem cytoplazmatycznym w pyłku są plastydy, które zawierają chloroplastowy DNA. Pojedyncze ziarna pyłku mogą zawierać ponad 100 plastydów z jednym genomem chloroplastowym (13). Tak zatem pojedyncze ziarno pyłku zawiera obok genomu jądrowego wiele powtórzeń genomów mitochondrialnych i chloroplastowych pochodzących z rośliny macierzystej.

Uzyskanie mieszańców międzygatunkowych w obrębie rodzaju *Lupinus* napotyka na szereg barier wynikających z ich różnych źródeł pochodzenia. Prowadzone od lat badania nad adaptacją łubinu andyjskiego (*Lupinus mutabilis*) napotykają na szereg kłopotów, związanych z obcocyfnością i niestabilnością plonowania. (17-19). W celu rozwiązania tego problemu podjęto między innymi próbę otrzymania mieszańców międzygatunkowych (20). W toku dalszych prac okazało się jednak, że wprowadzenie nasiona po skrzyżowaniu łubinu andyjskiego z gatunkami należącymi do sekcji *Albus* uzyskuje się stosunkowo łatwo, to trudność stwarza ocena morfologiczna otrzymanego potomstwa. Stało się to bodźcem do podjęcia badań mających na celu poszukiwanie markerów molekularnych, które niezależnie od warunków środowiska pomogłyby w identyfikacji materiałów kolekcyjnych posiadanych mutantów czy mieszańców (21,22).

Do pełnej charakterystyki kolekcji łubinu andyjskiego i jego mieszańców podjęto próbę zbadania polimorfizmu DNA przy wykorzystaniu w reakcji PCR samej zawiesiny pyłku bez izolacji DNA.

## 2. Materiały i metody

Materiał stanowiły ziarna pyłku zebrane z kwitnących roślin na poletkach w Zakładzie Doświadczalnym Swojec (AR Wrocław) w sezonie wegetacyjnym 1999 r. Pyłek pozyskiwano z zebranych kwiatów, które suszono w temperaturze pokojowej przez 24 h, następnie wytrzeptywano pyłek z przesuszonych pylników i umieszczano go w szklanych lub plastikowych probówkach, które przechowywano przez rok w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  nad chlorkiem wapnia lub żelazem krzemionkowym.

Tabela 1

## Charakterystyka materiału stanowiącego źródło pyłku

Numer próby	Gatunek/mieszaniec	Oznaczenie materiału	Uwagi
1	<i>Lupinus mutabilis</i>	Mut-45	Mutant z populacji 21756 (SHR Wiatrowo 098902) po traktowaniu nasion dawką 200 Gy <sup>137</sup> Cs
2	<i>L. mutabilis</i>	Mut-628	Mutant z populacji 21756 (SHR Wiatrowo 098902) po traktowaniu nasion dawką 400 Gy <sup>137</sup> Cs
3	<i>L. mutabilis</i>	XM-5	Wyselekcjonowana populacja w Niemczech
4	<i>L. mutabilis</i>	LM-34	Wyselekcjonowana populacja z Francji
5	<i>L. mutabilis</i>	LM-13	Wyselekcjonowana populacja z Francji
6	<i>L. mutabilis</i>	KW	Mutant epigonalny Roemera (Niemcy) otrzymany po działaniu EMS
7	<i>L. albus</i> cv. 'Wat'	520	Odmiana uprawna Wat
8	<i>L. graecus</i>	562	095606 SHR Wiatrowo
9	<i>L. termis</i> 518	530	095631 SHR Wiatrowo
10	<i>L. albus</i> x <i>L. mutabilis</i> Mut-136	522	Forma mateczna – <i>L. albus</i> Wat, forma ojcowska – mutant z populacji 21756 po dawce 400 Gy <sup>137</sup> Cs
11	<i>L. mutabilis</i> XM-5 x <i>L. vavilovii</i> 519	546	Forma mateczna <i>L. mutabilis</i> populacja XM-5 x 546 <i>L. vavilovii</i> (095631 SHR Wiatrowo)

Do badań wybrano 11 prób przechowywanego pyłku z roślin, wśród których większość należała do przedstawicieli *Lupinus mutabilis* Sweet, oraz gatunków z sekcji Albus (*Lupinus albus*, *L. graecus*, *L. termis*, *L. vavilovii*). W dwóch przypadkach pyłek pochodził z mieszańców międzygatunkowych. W tabeli 1 podano charakterystykę materiału, z którego pobierano pyłek do badań.

Do reakcji PCR stosowano następujące startery oznaczone jako:

- S II – 5' GAG GAA GAA TAT GAA AAA GAG AAA 3'  
 S-8 – 5' GGT AGG GTT CTA TAG TTG TTG TTT 3'  
 nad 9-1 – 5' ATT GGA AGA GAA GAA GCG GAA CT 3'  
 nad 9-2 – 5' AGC ATT TCC TAT TGA TTT GTG CC 3'  
 PSST-1 – 5' CAC CAT GGC TCT TCT AAC AAG AAC G 3'  
 PSST-2 – 5' AGA GCA GGG GCC ATT TTA TT 3'  
 R I – 5' TTC ATG ATA ACT TGA CGG ATC G 3'  
 R II – 5' GAA CAT CTA AGG GCA TCA CAG AC 3'  
 S-1 – 5' CTA GAA CGA CAA GTT AGT TTT GGA 3'  
 S -2 – 5' TTT GGA GGT AGT TTC GCA CTA GGA 3'

Do analizy DNA metodą PCR pobierano około 20 ziaren pyłku. W uzasadnionych przypadkach prowadzono także reakcję reamplifikacji. Skład mieszaniny reakcyjnej w 25 ml był następujący: zawiesina pyłku w wodzie – 5 µl, 10 x stężonego buforu do PCR z (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 2,5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub> (MBI Fermentas) – 2,5 µl, 2,5 mM mieszaniny dNTP – 2,5 µl, po 2 µl starterów (10 µM), 1 U polimerazy firmy Fermentas o stężeniu 5U/µl.

W przypadku zastosowania starterów nad9 i PSST, ich stężenie wyjściowe wynosiło 5 µM.

Profil termiczny dla starterów S-1/S-2, R I/R II oraz S II i S 8 był następujący:

96°C – 10 min, 72°C – pauza i 45 cykli: 94°C – 1 min, 65°C – 1 min, 72°C – 1 min 30 s, 72°C – 10 min.

Natomiast profil termiczny dla starterów nad9 obejmował:

97°C – 10 min, 72°C – pauza i 30 cykli: 95°C – 1 min, 55°C – 1 min, 72°C – 2 min, 72°C – 10 min.

Profil termiczny dla starterów PSST przedstawiał się następująco:

95°C – 5 min, 72°C – pauza i 30 cykli: 95°C – 1 min, 55°C – 1 min, 72°C – 1 min, 72°C – 3 min.

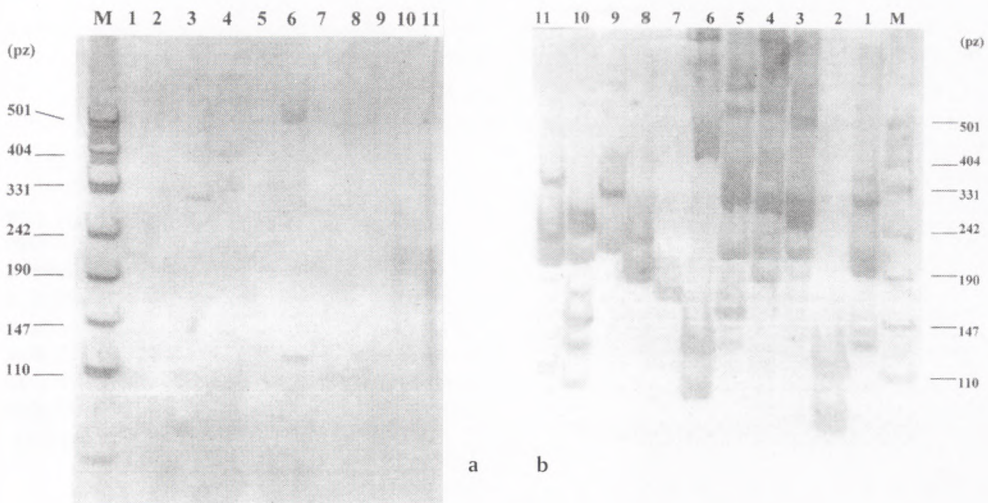
Amplifikację prowadzono w termocyklerze firmy Biometra.

Produkty amplifikacji rozdzielano na 7% żelu poliakrylamidowym z 4% żelem zagęszczającym o rozmiarach 20 × 20 cm w buforze TBE (23) około 3,5 godz. przy 20 mA. Na żel nakładano przeważnie 15 µl mieszaniny PCR badanych prób oraz wzorzec M1 – pUC-19/Msp I (firmy DNA Gdańsk). Po rozdziale żel utrwalano 1 godz. w mieszaninie 10% etanolu i 30% kwasu octowego i następnie przemywano 3 × 10 min wodą dejonizowaną. Po tym czasie żel zanurzano na 10 min w 1% HNO<sub>3</sub> i płukano kolejno 5 min w wodzie dejonizowanej, a następnie 1 godz. w 0,2% AgNO<sub>3</sub> zawierającym 1 µl/ml 37% formaldehydu. Następnie żel ponownie płukano 5 min w H<sub>2</sub>O. Prążki uwidaczniano w 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> zawierającym 0,5 µl/ml 37% formaldehydu. Po wybarwieniu żel przemywano 10% kwasem octowym i fotografowano w aparacie BioDoc firmy Biometra.

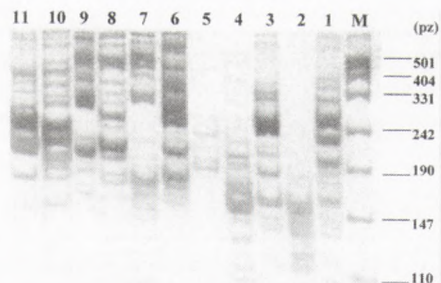
### 3. Wyniki i dyskusja

Zastosowanie zawiesiny pyłku do reakcji PCR umożliwia wykrycie zarówno polimorfizmu DNA badanych materiałów, jak i detekcję poszczególnych genów zarówno kodowanych przez jądrowy DNA jak i mitochondrialny DNA.

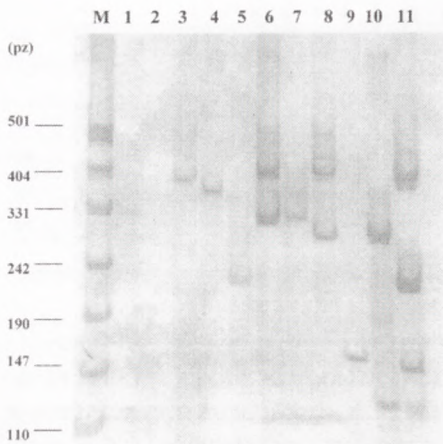
W niektórych przypadkach w celu lepszej wizualizacji wyników konieczny był, jak się okazało zabieg reamplifikacji. Jest to zilustrowane na rysunku 1 (A. amplifikacja, B. reamplifikacja). Startery zastosowane do amplifikacji DNA (S-1/S-2) obejmują ekson 11 genu prosysteminy. Obraz zróżnicowania materiału przejawiający się w amplifikacji różnej wielkości fragmentów (rys. 1) DNA wskazuje, że ten fragment genu w przypadku przedstawicieli łubinów sekcji Albus jak również różnych genotypów *L. mutabilis* jest bardzo zróżnicowany. Znaczne podobieństwo w wielkości i rozkładzie amplifikowanych fragmentów wykazuje tylko pyłek *L. albus* odmiany Wat i *L. albus* Wat będący formą mateczną w mieszańcu z *L. mutabilis* Mut-136. Na zróżnicowanie genetyczne materiału wskazują również obrazy produktów amplifikacji otrzymane przy zastosowaniu pojedynczych, losowych (*random*) starterów oznaczonych jako S-8 i S II (rys. 2,3). Pewne podobieństwo przy zastosowaniu startera S-8 jest widoczne dla *L. mutabilis* Mut-628 i LM-34, natomiast przy starterze S-II takie podobieństwo można zauważyć dla *L. mutabilis* Mut-628 i XM-5.



Rys. 1A. amplifikacja; 1B. reamplifikacja. Obraz amplifikacji rejonu genu prosysteminy (eksonu 11) przy zastosowaniu do reakcji PCR pyłków starterów SI/SII. 1 – *L. termis*, 2 – *L. mutabilis XM-5* x *L. vavilovii*, 3 – *L. albus* odmiana Wat, 4 – *L. albus* x *L. mutabilis Mut-136*, 5 – *L. mutabilis Mut-45*, 6 – *L. mutabilis Mut-628*, 7 – *L. mutabilis XM-5*, 8 – *L. mutabilis LM-34*, 9 – *L. graecus*, 10 – *L. mutabilis KW*, 11 – *L. mutabilis LM-13*; M – marker mas cząsteczkowych DNA.



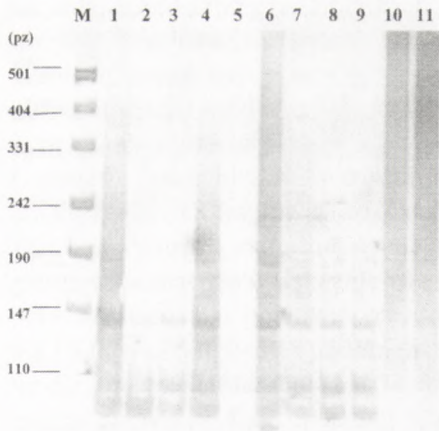
Rys. 2. Obraz powstawania polimorficznych fragmentów przy zastosowaniu do reakcji PCR pyłków startera S8. 1 – *L. termis*, 2 – *L. mutabilis XM-5* x *L. vavilovii*, 3 – *L. albus* odmiana Wat, 4 – *L. albus* x *L. mutabilis Mut-136*, 5 – *L. mutabilis Mut-45*, 6 – *L. mutabilis Mut-628*, 7 – *L. mutabilis XM-5*, 8 – *L. mutabilis LM-34*, 9 – *L. graecus*, 10 – *L. mutabilis KW*, 11 – *L. mutabilis LM-13*; M – marker mas cząsteczkowych DNA.



Rys. 3. Obraz powstawania polimorficznych fragmentów przy zastosowaniu do reakcji PCR pyłków startera SII. 1 – *L. termis*, 2 – *L. mutabilis* XM-5 x *L. vavilovii*, 3 – *L. albus* odmiana Wat, 4 – *L. albus* x *L. mutabilis* Mut-136, 5 – *L. mutabilis* Mut-45, 6 – *L. mutabilis* Mut-628, 7 – *L. mutabilis* XM-5, 8 – *L. mutabilis* LM-34, 9 – *L. graecus*, 10 – *L. mutabilis* KW, 11 – *L. mutabilis* LM-13; M – marker mas cząsteczkowych DNA.

Bogaty obraz produktów otrzymanych po amplifikacji przy zastosowaniu wysokiej temperatury *annealing* sugeruje, że amplifikacji mogły podlegać nie tylko sekwencje niekodujące, ale również i kodujące. Uzyskane wyniki wskazują również na możliwość wykorzystania pojawiających się fragmentów do przygotowania starterów typu SCAR czy CAPS.

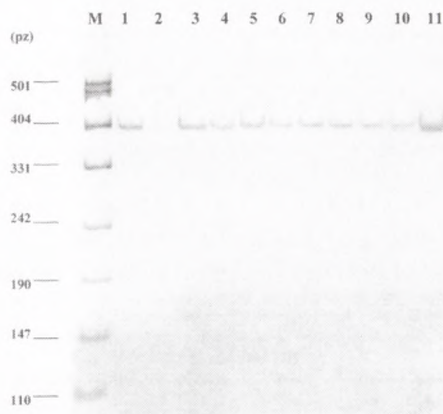
Brak polimorficznych prążków obserwuje się w zasadzie przy zastosowaniu starterów R1/R2 (rys. 4), za pomocą których amplifikuje się fragment wielu kopii 18S rRNA kukurydzy. Należy podkreślić, że w odróżnieniu od poprzednio użytych starterów, w tym przypadku obraz jest praktycznie identyczny u wszystkich badanych łubinów, a różnice dotyczą tylko intensywności poszczególnych prążków. Stosunkowo bogaty obraz amplifikowanych fragmentów w przypadku badanych łubinów może być wynikiem niewłaściwie dobranego profilu amplifikacji przy użyciu tych starterów.



Rys. 4. Obraz amplifikacji fragmentów genów 18S rRNA przy zastosowaniu do reakcji PCR pyłków starterów R1/R2. 1 – *L. termis*, 2 – *L. mutabilis* XM-5 x *L. vavilovii*, 3 – *L. albus* odmiana Wat, 4 – *L. albus* x *L. mutabilis* Mut-136, 5 – *L. mutabilis* Mut-45, 6 – *L. mutabilis* Mut-628, 7 – *L. mutabilis* XM-5, 8 – *L. mutabilis* LM-34, 9 – *L. graecus*, 10 – *L. mutabilis* KW, 11 – *L. mutabilis* LM-13; M – marker mas cząsteczkowych DNA.



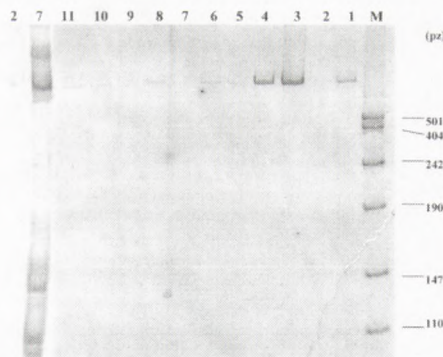
Rys. 5. Obraz amplifikacji 396 pz fragmentu genu podjednostki PSST mitochondrialnego kompleksu I przy zastosowaniu do reakcji PCR pyłków starterów: PSST-1, PSST-2. 1 – *L. termis*, 2 – *L. mutabilis XM-5* x *L. vavilovii*, 3 – *L. albus* odmiana Wat, 4 – *L. albus* x *L. mutabilis Mut-136*, 5 – *L. mutabilis Mut-45*, 6 – *L. mutabilis Mut-628*, 7 – *L. mutabilis XM-5*, 8 – *L. mutabilis LM-34*, 9 – *L. graecus*, 10 – *L. mutabilis KW*, 11 – *L. mutabilis LM-13*; M – marker mas cząsteczkowych DNA.



Na tle tych wyników, zupełnie odmiennie przedstawia się obraz amplifikacji fragmentu 396 pz genu podjednostki PSST, kodowanej przez jądro, a będącej składnikiem mitochondrialnego kompleksu I. Tak, jak widać na rysunku 5 z wyjątkiem pyłku mieszańca *L. mutabilis Mut-45* x *L. vavilovii*, wszędzie powstaje jeden fragment o oczekiwanej wielkości. Po reamplifikacji pyłku mieszańca *L. mutabilis Mut-45* x *L. vavilovii* pojawia się właściwy produkt obok produktu niespecyficznego. Dowodzi to, że pomimo zróżnicowania genetycznego badanych materiałów, wszędzie namnażany fragment podjednostki PSST jest jednakowej wielkości.

Podobnie przedstawia się obraz amplifikacji mitochondrialnego genu *nad9*, którego produkt ekspresji jest składnikiem mitochondrialnego kompleksu I (rys. 6), wszędzie powstaje jeden produkt z wyjątkiem pyłku mieszańca *XM-5* x *L. vavilovii* i samego *XM-5*. Po reamplifikacji pojawiają się odpowiednie produkty, chociaż można zauważyć inne produkty amplifikacji. Mniejsza intensywność produktu amplifikacji o wielkości 670 pz obserwowana u większości badanych łubinów może świadczyć o różnej zawartości mitochondriów w badanych pyłkach. Wynik analizy świad-

Rys. 6. Obraz amplifikacji mitochondrialnego genu *nad9* kodującego podjednostkę mitochondrialnego kompleksu I przy zastosowaniu do reakcji PCR pyłków starterów: *nad9-1*, *nad9-2*. 1 – *L. termis*, 2 – *L. mutabilis XM-5* x *L. vavilovii*, 3 – *L. albus* odmiana Wat, 4 – *L. albus* x *L. mutabilis Mut-136*, 5 – *L. mutabilis Mut-45*, 6 – *L. mutabilis Mut-628*, 7 – *L. mutabilis XM-5*, 8 – *L. mutabilis LM-34*, 9 – *L. graecus*, 10 – *L. mutabilis KW*, 11 – *L. mutabilis LM-13*; M – marker mas cząsteczkowych DNA (wyniki umieszczone w ścieżce 2 i 7 położonej przed ścieżką 11 dotyczą reamplifikacji).



czy jednak, że również i w tym przypadku namnaża się produkt o właściwej wielkości dla genu *nad9*.

#### 4. Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że zastosowanie do reakcji PCR samej zawiesiny pyłku daje właściwe produkty amplifikacji zarówno w przypadku starterów losowych, jak i starterów amplifikujących określone fragmenty genu lub cały gen.

Analizy przy zastosowaniu techniki PCR bezpośrednio na pyłku potwierdziły w przypadku niektórych badanych łubinów różnice fenotypowe obserwowane pomiędzy populacjami i mutantami łubinu andyjskiego (*Lupinus mutabilis* Sweet), oraz wybranymi przedstawicielami gatunków sekcji *Albus*.

Metoda badania polimorfizmu przy zastosowaniu zawiesiny pyłku stwarza duże możliwości do rozróżnienia populacji i mutantów łubinu andyjskiego przy zastosowaniu odpowiednich starterów.

#### Literatura

1. Śnieżko R., Winiarczyk K., (1993), *Wiadomości Botaniczne*, 37(1/2), 31-41.
2. Malinowski E., (1983), *Genetyka*, PWN, Warszawa.
3. Śnieżko R., (1994), *Wiadomości Botaniczne*, 38 (3/4), 21-35.
4. Śnieżko R., Winiarczyk K., (1996), *Acta Soc. Bot. Pol.*, 65, 1-2, 101-105.
5. Rogalska S., Maluszyńska J., Olszewska M. J., (1999), *Podstawy cytogenetyki roślin*, Wyd. Nauk., PWN, Warszawa.
6. Brunner H., (1985), *FAO/IAEA Agric. Biotech. Lab. Sieisbersdorf, Austria*, 1-62.
7. Niemirowicz-Szczytt K., (1997), *Acta Physiol. Plantarum*, 19, 155-167.
8. Szarejko I., (1997), *Zesz. Nauk. AR, Kraków*, 318, 23-39.
9. Kasha K. J., Kao K. N., (1970), *Nature*, 225, 874-876.
10. Mucalphy D. L., Sari-Gorla M., Mucalphy G. B., (1966), *Sex Plant Reprod.*, 9, 353-356.
11. Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V., (1990), *Nucleic Acids Res.*, 18, 6531-6535.
12. Stanley R. G., Linskens H. F., (1985), *Urs Freund Verlag, D-8919 Greinferberg/Ammersee*.
13. Petersen G., Johansen B., Segerg O., (1996), *Plant Mol. Biol.*, 31, 189-191.
14. Levin I., Gilboa N., (1997), *Biotechniques*, 23, 986-990.
15. Moore K. A., Kershaw M., Nicholson P., Crosswell J. E., Macnair M. R., *Mol. Ecol.*, w druku.
16. Bartkowiak S., Krajewska L., Wójtowicz B., (2000), *IGR PAN – Poznań III krajowa konferencja (15 czerwiec)*, 24-28.
17. Römer P., Caligari P. D. S., Rahim M. A., Huyghe C., Hardy A., Neves-Martins J., Sawicka-Sienkiewicz E., (1999), *Proc. the 8<sup>th</sup> Int. Lupin Conf. Asilomar, California, (11-16 May)*, 353-356.
18. Sawicka-Sienkiewicz E., Kadłubiec W., (1998), *Z. Probl. Post. Nauk Roln.*, 463, 451-460.
19. Sawicka-Sienkiewicz E., Kadłubiec W., (1999), *9<sup>th</sup> Int. Lupin Conf. (20-24 June)*, Klink, Germany, Abstracts, 293-294.
20. Sawicka-Sienkiewicz E. J., Brejdek E., (1999), *Proc. 8<sup>th</sup> Int. Lupin Conf. Asilomar, California, (11-16 May)*, 357-360.

21. Sawicka-Sienkiewicz E. J., Rurek M., Augustyniak H., (1998), Proceedings of 3<sup>rd</sup> European Conference on Grain Legumes, (14-19 November), Valladolid-Spain, 460.
22. Olczak T., Jańska H., Rurek M., Augustyniak H., Sawicka-Sienkiewicz E., (1999), Międzynarodowa Konferencja Przysiek, (2-3 września), „Łubin w polskim i europejskim rolnictwie”, streszczenia: 60-61.
23. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., (1989), *Molecular Cloning. A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York.