

ANDRZEJ RAFALSKI**MAŁGORZATA GAWEL****IWONA WIŚNIEWSKA**

Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

Analiza zróżnicowania genetycznego komponentów mieszańców żyta

The analysis of genetic diversity of components of rye hybrids

Badania zróżnicowania genetycznego obejmowały 26 mieszańców matecznych i 8 restorerów oraz 17 linii męskosterylnych i 13 linii dopełniających. Badane materiały pochodziły z trzech ośrodków heterozyznej hodowli żyta: Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin (IHAR), Poznańskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o. (PHR) i Hodowli Roślin DANKO Sp. z o.o. (Danko). Analizę dystansu genetycznego składników mieszańców przeprowadzono techniką PCR z zastosowaniem starterów semi-specyficznych ukierunkowanych na powielanie fragmentów genów żyta. Ocenę dystansu genetycznego mieszańców i restorerów przeprowadzono na podstawie analizy 317, a analizę linii 370 fragmentów DNA. Zarówno ocena dystansu genetycznego badanych materiałów jak też wyniki analizy skupień wskazują, że prowadzona niezależnie w trzech ośrodkach hodowla doprowadziła do wytworzenia nieco odmiennych pul genowych.

Słowa kluczowe: heterozja, mieszańce, linie, semi-specyficzny PCR, żyto

The genetic diversity among 26 maternal single crosses, 8 restorers, 17 male sterile inbred lines and 13 nonrestorer inbred lines was evaluated using PCR marker analysis. These materials were the components of rye hybrids investigated in the preofficial trials at the Plant Breeding and Acclimatization Institute (IHAR), Danko Breeding Co. Ltd (Danko) and Poznań Breeding Co. Ltd (PHR) during the growing seasons 2001–2002. For the evaluation of genetic diversity of rye breeding materials the semi-specific PCR system using primers targeting intron-exon sequences of plant genes was applied. The evaluation of genetic diversity among maternal hybrids and restorers was based on analysis of 317 DNA fragments, and the genetic distances among inbred lines were calculated from analysis of 370 DNA fragments. Both the estimated data of genetic distances of materials and the cluster analysis based on PCR data, indicated that hybrid components from different breeding centres exhibited somewhat different genetic characters.

Key words: heterosis, hybrids, inbred lines, rye, semi-specific PCR

WSTĘP

Wprowadzenie heterozyjnej hodowli żyta stało się możliwe dzięki wykryciu zjawiska genowo-cytoplazmatycznej męskosterylności (Geiger i Schnell, 1970). Jakkolwiek opisano szereg innych źródeł męskiej sterylności u żyta to tylko męskosterylność typu „Pampa” (P) ma dotychczas znaczenie praktyczne. Męskosterylność typu P jest dość łatwo wprowadzana, gdyż genotypy utrzymujące sterylność na tej cytoplazmie występują dość powszechnie we wszystkich populacjach wykorzystywanych przez hodowlę europejskie. Znaczną trudność stwarza natomiast znalezienie zapylaczy przywracających płodność (restorerów) o korzystnych cechach hodowlanych. Stąd, jako zapylacze stosuje się populacje, linie lub zestawy linii o korzystnych cechach agronomicznych, lecz często ograniczonej zdolności do przywracania płodności. Trudności wynikają również z tego, że na poziom płodności mieszańców wpływ ma zarówno genotyp restorera jak też cechy linii męskosterylnych oraz znaczny wpływ czynników środowiskowych (Geiger i Miedaner, 1996; Kolasińska, 2001). Niepełne przywracanie płodności prowadzi do obniżenia plonu ziarna mieszańców, a w niesprzyjających warunkach pogodowych sprzyja zakażeniom sporyszem.

Pomimo wymienionych trudności związanych z mieszańcową hodowlą żyta, wysoki efekt heterozji obserwowany u mieszańców powoduje, że stają się one znacznie bardziej atrakcyjne niż odmiany populacyjne. Hodowla heterozyjna żyta jest najbardziej zaawansowana w Niemczech, gdzie kilkanaście odmian mieszańcowych uprawianych jest na ponad 60% areалу żyta. Jednocześnie średni plon ziarna żyta w Niemczech był w roku 1995 około dwukrotnie wyższy niż w Polsce i Białorusi i prawie trzykrotnie wyższy niż w Rosji (Madej, 1996). W Polsce w ostatnich latach (1999–2001) do Rejestru Odmian Roślin Uprawnych przyjęto cztery mieszańce żyta i rozpoczęto komercyjną produkcję nasion tych mieszańców. Podobnie jak w kukurydzy, w heterozyjnej hodowli żyta stwierdzono, że dla uzyskania maksymalnego efektu heterozji celowe jest wyprowadzenie komponentów rodzicielskich z odmiennych pul genowych. Sukcesy niemieckiej mieszańcowej hodowli żyta wynikają między innymi z wykorzystania odmiennych genetycznie materiałów pochodzących z grup „Petkus” i „Carsten” (Geiger i Miedaner, 1999). W Polsce hodowla mieszańców żyta prowadzona jest w trzech ośrodkach hodowlanych: w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie (IHAR), w Hodowli Roślin Danko Sp. z o.o. (Danko) i w Poznańskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o. (PHR).

Celem przedstawionych badań było sprawdzenie przydatności metody PCR z zastosowaniem starterów semi-specyficznych w badaniach genetycznego różnicowania komponentów mieszańców i populacyjnych odmian żyta. Ocena różnicowania materiałów pochodzących z trzech ośrodków hodowlanych miała również na celu oszacowanie, czy niezależnie prowadzona hodowla doprowadziła do powstania odrębnych pul genowych, które mogłyby zostać wykorzystane w dalszych wspólnych programach hodowlanych. Efekt heterozji u mieszańcowych odmian żyta zależy głównie od dystansu genetycznego między liniami tworzącymi męskosterylny mieszaniec mateczny a zapylaczem. Stąd, pierwszy blok badanych materiałów obejmował mieszańce i zapylacze

pochodzące z trzech ośrodków hodowlanych, natomiast drugi linie dopełniające i ich męskosterylne analogi.

MATERIAŁ I METODY

W pierwszym etapie badań przeprowadzono ocenę dystansu genetycznego 16 mieszańców maticznych i 5 restorerów z hodowli IHAR, 5 mieszańców i 2 restorerów z Danko oraz 5 mieszańców i jednego restorera z PHR. Drugi etap doświadczeń obejmował 12 linii męskosterylnych i 6 dopełniaczy pochodzących z hodowli IHAR, 4 linie męskosterylne i 2 linie dopełniające pochodzące z Danko oraz jedną linię męskosterylną i 5 linii dopełniających z PHR.

Preparatykę DNA przeprowadzano według metodyki opisanej przez Davisa i wsp. (1986). DNA otrzymywano z liści 20–30 siewek rosnących na pożywce płynnej przez 5–7 dni. Stężenie DNA oznaczano fluorymetrycznie zgodnie z instrukcją fluorymetru TKO 100 (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA).

Powielanie fragmentów DNA przeprowadzano w termocyklerze UNO II (Biometra, Göttingen, Niemcy). Powielania prowadzono w układzie zawierającym w objętości 20 µl: 15 ng DNA roślinnego, 1 × bufor, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 1,2 µM startera i 1 jednostkę termostabilnej polimerazy (MBI Fermentas, Wilno). Powielanie przy użyciu starterów semi-specyficznych przeprowadzano 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 tę 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. Powielania kończono 10 min. inkubacją w temperaturze 72°C.

Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym w buforze TBE i wizualizowano przy użyciu bromku etydyny. Fotografie rozdziałów 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:

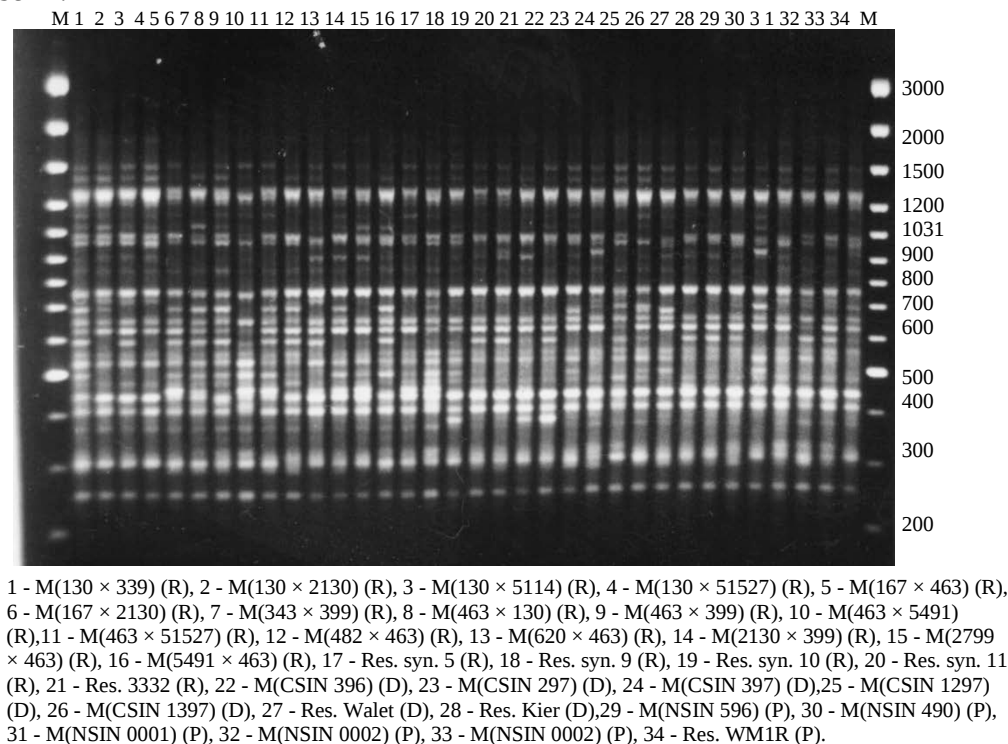
$$DG_{(a,b)} = 1 - (2N_{(a,b)} / (N_{(a)} + N_{(b)})),$$

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

WYNIKI

Powielenie DNA 34 mieszańców i restorerów przeprowadzono stosując startery 15 i 18 nukleotydowe. Przykład rozdziału elektroforetycznego produktów powielenia przedstawia rysunek 1. Współczynniki dystansu genetycznego wyliczono na podstawie analizy 317

fragmentów DNA. Szczegółowe dane obejmowały 561 współczynników dystansu genetycznego. Zakres genetycznego zróżnicowania komponentów mieszańców w obrębie ośrodków hodowli żyta oraz różnice między materiałami pochodzącymi z tych ośrodków przedstawiono w tabeli 1.



Rys. 1. Wyniki powielania DNA mieszańców matecznych (M) i restorerów (Res) przy użyciu startera ET18/15 (5'ACTTACTTGGCACCG3'). M — wzorzec wielkości DNA (pary zasad). Materiały IHAR — (R), materiały Danko — (D), materiały z PHR — (P)

Fig. 1. Amplification of DNA of male sterile single crosses (M) and restorers (Res) using primer ET18/15 (5'ACTTACTTGGCACCG3'). M — DNA size standard. Accessions from IHAR — (R) accessions from Danko — (D) accessions from PHR — P

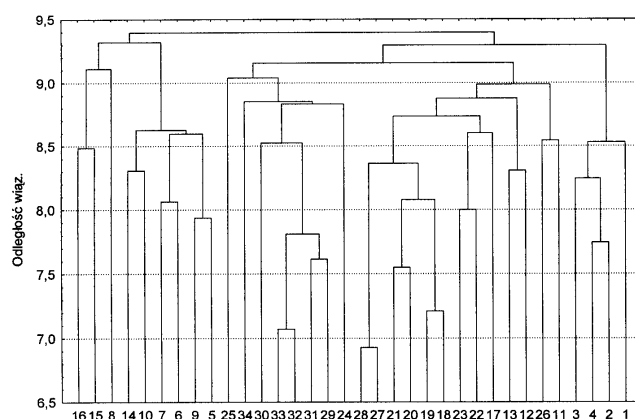
Współczynniki dystansu genetycznego 16 mieszańców pochodzących z IHAR wynoszą od 0,153 do 0,264 (średnio 0,206). Dystans genetyczny mieszańców z firmy Danko jest nieco niższy i wynosi od 0,150 do 0,228 (średnio 0,190), a dla mieszańców z PHR od 0,126 do 0,216 (średnio 0,160). Dystans genetyczny między mieszańcami pochodzącymi z różnych ośrodków był nieco wyższy niż zróżnicowanie materiału w obrębie poszczególnych hodowli. Średni dystans genetyczny między mieszańcami pochodzącymi z PHR i Danko wynosił 0,194, natomiast różnice między mieszańcami IHAR a mieszańcami z PHR i Danko były nieco wyższe i wynosiły odpowiednio 0,213 i 0,219. Jakkolwiek mieszańce pochodzące z trzech ośrodków heterozyjnej hodowli żyta liczbowo były reprezentowane w różnym stopniu, to wyniki dystansów między hodowlami

wskazują, że materiały te tworzą nieco odrębne pule genowe. Wyniki analizy skupień uzyskane na podstawie otrzymanych danych potwierdzają tę sugestię.

Tabela 1

Zróżnicowanie genetyczne komponentów mieszańców żyta w ośrodkach hodowli i różnice między ośrodkami
The genetic diversity of components of rye hybrids in breeding centres and their differences between breeding centres

Komponenty Components	Ośrodki hodowli Breeding centres	Zakres zróżnicowania Range of diversity	Średni współczynnik dystansu Average dissimilarity index
Mieszańce mateczne Maternal single crosses	Danko	0,150–0,228	0,190
	PHR	0,126–0,216	0,160
	IHAR	0,153–0,264	0,206
	Danko–PHR	0,175–0,231	0,194
	Danko–IHAR	0,173–0,265	0,219
	IHAR–PHR	0,179–0,251	0,213
Linie wsobne Inbred lines	Danko	0,158–0,270	0,239
	PHR	0,183–0,301	0,237
	IHAR	0,175–0,325	0,248
	Danko–PHR	0,213–0,323	0,277
	Danko–IHAR	0,233–0,366	0,283
	IHAR–PHR	0,218–0,375	0,265



Mieszańce i restorery w kolejności jak na rysunku 1; Accessions numbered like in Fig. 1

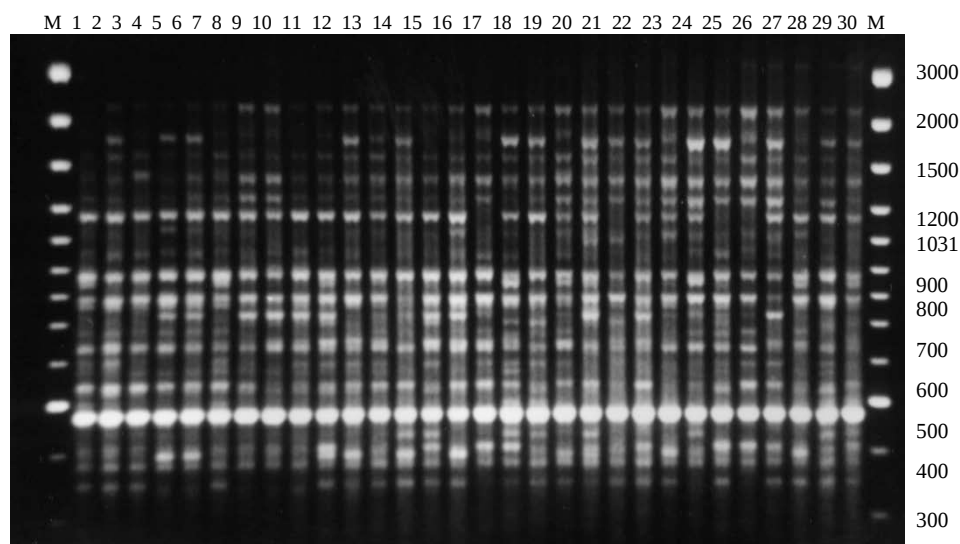
Rys. 2. Diagram podobieństwa badanych mieszańców i restorerów wyliczony metodą średnich połączeń na podstawie analizy 317 fragmentów DNA

Fig. 2. Association among single crosses (M) and restorers (Res) of rye revealed by UPGMA cluster analysis of 317 DNA fragments

Wyniki analizy skupień badanych komponentów mieszańców przedstawia rysunek 2. Wyraźnie wyodrębnioną grupę stanowią mieszańce i restorer pochodzący z PHR. Mieszańce pochodzące z hodowli IHAR tworzą dwie grupy w przeciwległych rejonach

dendrogramu, przy czym wspólną cechą czterech mieszańców w prawej części dendrogramu jest występowanie w ich składzie tej samej linii matecznej. Odrębną grupę tworzą restorery z hodowli IHAR, w grupie tej znalazły się również dwa restorery populacyjne pochodzące z firmy Danko. Badane mieszańce i restorery z Danko nie tworzą wyraźnie wyodrębnionej grupy.

Analiza linii obejmowała 30 obiektów. Przykład elektroforetycznego rozdziału powielonych fragmentów DNA przedstawia rysunek 3. Współczynniki dystansu genetycznego linii (435 wyników) wyliczone zostały na podstawie analizy 380 fragmentów DNA. Zakres genetycznego zróżnicowania i średnie wartości współczynników przedstawiono w tabeli 1. W liniach pochodzących z firmy Danko współczynniki dystansu genetycznego wynosiły od 0,158 do 0,270, a w materiałach z PHR od 0,183 do 0,301. Najniższe wartości wykazują dystanse między liniami męskosterylnymi i ich analogami. Dystanse genetyczne linii pochodzących z hodowli w IHAR wynoszą od 0,175 do 0,325. W przypadku czterech par linii będących analogami dystanse genetyczne są również niskie i wynoszą około 0,2, a w przypadku dwóch pozostałych par są nieco wyższe i wynoszą około 0,24. Najniższy dystans genetyczny (0,158) wyliczono dla analogów pochodzących z hodowli Danko.



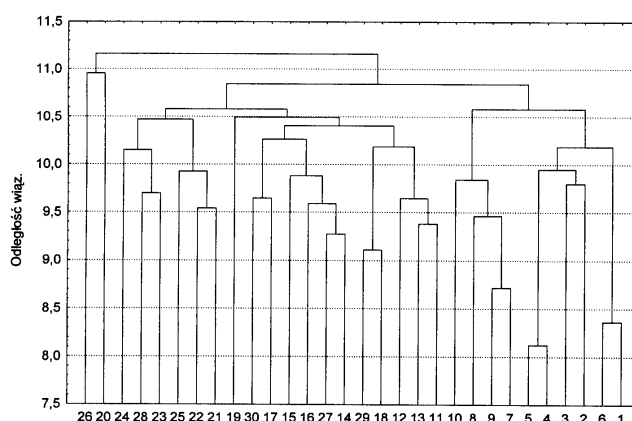
Linie żyta: 1 - S105P/91(D), 2 - S67P/94(D), 3 - S76P/95(D), 4 - S93N/95(D), 5 - S93P/95(D), 6 - S105N/91(D), 7 - NS426P(P), 8 - NS426N(P), 9 - NS456N(P), 10 - NS66N/85(P), 11 - NS267N/88, 12 - NS79N/85, 13 - 130P(R), 14 - 167P(R), 15 - 343P(R), 16 - 463P(R), 17 - 482P(R), 18 - 620P(R), 19 - 2799P(R), 20 - 5491P(R), 21 - 2130P(R), 22 - 399P(R), 23 - 5114P(R), 24 - 51524P(R), 25 - 2130N(R), 26 - 463N(R), 27 - 399N(R), 28 - 5114N(R), 29 - 620N(R), 30 - 482N(R)

Rys. 3. Wyniki powielania DNA 30 linii żyta przy użyciu startera IT31/15 (5'GAAGCCGAGGTAAG³). M — wzorec wielkości DNA. Materiały IHAR — (R), materiały Danko — (D), materiały z PHR — (P)

Fig. 3. Amplification of DNA of 30 inbred lines of rye using primer IT31/15 (5'GAAGCCGAGGTAAG³). M — DNA size standard. Inbred lines from IHAR — (R) inbred lines from Danko — (D) inbred lines from PHR — (P)

Średnia wartość współczynników dystansu genetycznego między liniami pochodzącymi z IHAR a liniami z firmy Danko wynosi 0,283, a między liniami z IHAR a liniami z PHR 0,265. Wartości współczynników dystansu genetycznego między liniami z PHR a liniami z firmy Danko były niższe i wynosiły średnio 0,277. Wartości te są we wszystkich trzech przypadkach wyższe od średnich wartości współczynników zróżnicowania genetycznego linii w obrębie poszczególnych hodowli.

Z dendrogramu (rys. 4) wynika, że linie pochodzące z trzech ośrodków hodowlanych tworzą wyraźnie odrębne grupy. Wyjątek stanowi pochodząca z hodowli IHAR linia męskosterylna 130P (13), która na dendrogramie znalazła się w grupie linii pochodzących z PHR. Odmienność genetyczna tej linii ujawniła się również w badaniach zróżnicowania mieszańców, gdyż jak wspomniano powyżej, mieszańce których linią mateczną była linia 130P, tworzyły wyraźnie odmienną grupę.



Linie w kolejności jak na rysunku 3; Inbred lines numbered like in Fig. 3

Rys. 4. Diagram podobieństwa badanych linii żyta wyliczony metodą średnich połączeń na podstawie analizy 380 fragmentów DNA

Fig. 4. Association among inbred lines of rye revealed by UPGMA cluster analysis of 380 DNA fragments

DYSKUSJA

W przypadku takich roślin jak żyto zalety systemu PCR z zastosowaniem starterów semi-specyficznych ukierunkowanych na sekwencje genów roślinnych są szczególnie widoczne. Wynika to najprawdopodobniej z dużego udziału sekwencji powtarzających się, które w genomie żyta stanowią ponad 90% (Flavell i in., 1974). Startery o sekwencji przypadkowej (RAPD) powielają DNA takich sekwencji występujących w genomie w znacznej liczbie kopii, tworząc obraz o małym udziale pasm polimorficznych. Podobnie wyjaśnić można przyczyny, dzięki którym startery semi-specyficzne dość łatwo ujawniają wewnątrzgatunkowy polimorfizm w roślinach zbożowych o dużych i złożonych genomach takich jak pszenica i pszenżyto (Gaweł i in., 2002).

W badaniach genetycznego zróżnicowania komponentów mieszańców żyta stosowano startery ET i IT o długości 15 i 18 zasad. Niektóre 18-nukleotydowe startery z grupy ET generowały bardzo złożone i polimorficzne obrazy fragmentów DNA. Jakkolwiek doświadczenia takie dostarczały znacznej liczby informacji o zróżnicowaniu genetycznym badanych materiałów, to ich interpretacja i analiza komputerowa była dość trudna. Dość polimorficzne i klarowne obrazy powielonych fragmentów uzyskiwano stosując startery 15 nukleotydowe i niektóre startery ET18.

Wyliczenia współczynników dystansu genetycznego komponentów mieszańców wskazują, że różnice między ośrodkami hodowli są nieco wyższe niż zróżnicowanie w obrębie każdej hodowli. W nieco wyższym stopniu ujawnia to analiza linii niż analiza mieszańców matecznych.

Zróżnicowanie mieszańców matecznych jak i linii jest znacznie większe niż różnice genetyczne między populacyjnymi odmianami żyta (Rafalski i in., 2002). Dotychczas wprowadzone odmiany mieszańcowe plonują znacznie lepiej niż odmiany populacyjne (Arseniuk i Oleksiak, 2001), a zróżnicowanie genetyczne komponentów mieszańców wskazuje na możliwość dalszego postępu w tej hodowli. Zarówno wyliczenia współczynników dystansu genetycznego między komponentami mieszańców pochodzących z trzech ośrodków heterozyjnej hodowli żyta, jak też wyniki analizy skupień wyraźnie wskazują, że prowadzona niezależnie selekcja doprowadziła do stworzenia materiałów o nieco odmiennych cechach genetycznych.

Przedstawione wyniki wskazują również na celowość współpracy między ośrodkami. Podstawę do ustaleń na ten temat stanowią szczegółowe wyniki analizy, tj. tabele współczynników dystansu genetycznego między wszystkimi badanymi obiektami (561 i 435 danych).

WNIOSKI

1. System PCR z zastosowaniem starterów semi-specyficznych stwarza możliwość szybkiej i dokładnej oceny zróżnicowania materiałów hodowlanych żyta.
2. Zarówno wyliczenia współczynników dystansu genetycznego między komponentami mieszańców pochodzących z trzech ośrodków heterozyjnej hodowli żyta, jak też wyniki analizy skupień wyraźnie wskazują, że prowadzona niezależnie selekcja doprowadziła do stworzenia materiałów o nieco odmiennych cechach genetycznych.

LITERATURA

- Arseniuk E., Oleksiak T. 2001. Rye production and breeding in Poland. Proc. EUCARPIA Rye Meeting, Radzików, Poland: 11 — 18.
- Davis L. G., Dibner M. D., Battey J. F. 1986. Basic methods in molecular biology. Elsevier Sci. Publ., New York: 42 — 43.
- Flavell R. B., Bennett M. D., Smith J. B., Smith D. B. 1974. Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. Biochemical Genetics 12: 257 — 269.
- Gaweł M., Wiśniewska I., Rafalski A. 2002. Semi-specific PCR for the evaluation of diversity among cultivars of wheat and triticale. Cell. Mol. Biol. Lett. 7: 577 — 582.

- Geiger H. H., Schnell F. W. 1970. Cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.). Crop Sci. 10: 590 — 593.
- Geiger H. H., Miedaner T. 1996. Genetic basis and phenotypic stability of male-fertility restoration in rye. Proc. Intl. Symp. on Rye Breeding and Genetics. Vort. Pflanzenzüchtg. 35: 27 — 38.
- Geiger H. H., Miedaner T. 1999. Hybrid rye and heterosis. In: The genetics and exploitation of heterosis in crops. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI: 439 — 450.
- Kolasieńska I. 2001. Przywracanie płodności pyłku u mieszańców żyta CMS-Pampa × restorer. Biul. IHAR 218/219: 341 — 349.
- Madej L. J. 1996. Worldwide trends in rye growing and breeding. In: Proc. Intl. Symp. on Rye Breeding and Genetics. Vortr. Pflanzenzüchtg 35: 1 — 6.
- 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., Madej L., Wiśniewska I., Gawel M. 2002. The genetic diversity of components of rye hybrids. Cell. Mol. Biol. Lett. 7: 471 — 475.