

IWONA WIŚNIEWSKA¹**ANDRZEJ RAFALSKI**¹**LUCJAN MADEJ**²¹Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin²Zakład Genetyki i Hodowli Roślin

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

Analiza zmienności genetycznej linii żyta i ich wyrównania

The analysis of genetic diversity of rye inbred lines and their uniformity

Sprawdzono przydatność metody PCR do oceny dystansu genetycznego linii żyta (*Secale cereale* L) oraz genetycznego wyrównania dwóch linii. W porównaniu ze starterami o sekwencji przypadkowej (RAPD) startery ukierunkowane na sekwencje styku intron-egzon generują bardziej złożone i polimorficzne obrazy powielonych fragmentów DNA. Obrazy powielenia przy użyciu niektórych starterów 18-nukleotydowych były zbyt złożone, co może utrudniać analizę komputerową obrazu i ocenę dystansu genetycznego linii. Wyraźne i polimorficzne obrazy powielonych fragmentów DNA badanych linii uzyskiwano przy użyciu starterów o długości 12–15 zasad. Stwierdzenie wyraźnych różnic w obrazach powielonych fragmentów DNA między pojedynczymi siewkami badanych linii wskazuje na to, że proponowana metoda może być stosowana do oceny wyrównania linii wsobnych i odmian żyta.

Słowa kluczowe: dystans genetyczny, linie wsobne, PCR, żyto

The usefulness of PCR systems for detection of genetic diversity among inbred lines of rye (*Secale cereale* L) and for evaluation of homogeneity of two inbreds was investigated. In comparison to RAPD primers, the primers targeting the sequences of intron-exon junction generated more complex and polymorphic patterns of amplified DNA fragments. Some primers 18 bases in length generated too complex patterns of DNA fragments, which may cause the difficulties in their computer analysis. Clear and polymorphic banding patterns were generated with the use of primers 12–15 bases in length. The evaluation of genetic differences between single plants of the lines indicated that this approach is useful for assessment of homogeneity level of varieties or inbred lines.

Key words: genetic distance, inbred lines, PCR, rye

WSTĘP

Rozwój biologii molekularnej stworzył podstawy do wspomagania hodowli w badaniach nad wykorzystaniem istniejącej zmienności genetycznej poprzez systemy markerów bezpośrednio związanych ze strukturą DNA.

Ze względu na mniejszą pracochłonność i koszty analizy, metody oparte na reakcji termostabilnej polimerazy (PCR) zastępują techniki hybrydyzacyjne (RFLP). W technikach opartych na łańcuchowej reakcji polimerazy wykorzystuje się coraz częściej szybki wzrost informacji o sekwencjach genomu, które mogą być celem dla przyłączania starterów o sekwencjach komplementarnych. Weining i Langridge (1991) wprowadzili system określany jako półdowolny (semirandom), w którym startery o sekwencjach częściowo komplementarnych do sekwencji styku intron-egzon stosowano w kombinacjach ze starterami o sekwencji dowolnej. W badaniach genomu żyta dobre rezultaty uzyskano również stosując startery komplementarne do sekwencji repetytywnych rozproszonych charakterystycznych dla tego gatunku (Rogowsky i in., 1992). Możliwe jest łączenie starterów o sekwencji częściowo ustalonej ze starterami flankującymi sekwencje repetytywne rozproszone żyta (Rafalski i in., 1997).

Celem badań było sprawdzenie przydatności systemu PCR z zastosowaniem starterów ukierunkowanych na sekwencje styku intron-egzon do oceny genetycznego zróżnicowania linii żyta oraz ich wyrównania. Badania takie umożliwić powinny ocenę, czy stosowana metoda umożliwia podział materiałów hodowlanych żyta na odmienne pule genowe oraz czy ocena dystansu genetycznego linii pozwala przewidywać efekt heterozji na poszczególnych etapach tworzenia mieszańca.

MATERIAŁ I METODY

Materiał stanowiło 18 linii wywodzących się z jednej puli genowej linii matecznych. Większość linii wchodzi w skład mieszańców żyta w hodowli heterozyjnej prowadzonej w IHAR Radzików. Ocenę genetycznego wyrównania linii przeprowadzono na pojedynczych siewkach linii 4475 i 2130.

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 lub z pojedynczych siewek. 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). Powielanie prowadzono w termocyklerze UNO II (Biometra, Getynga). 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 etydy. Fotografie rozdzielów elektroforetycznych po zeskanowaniu analizowano przy użyciu programu "Fragment NT" (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). Przy użyciu tego programu tworzone macierz wyników przedstawioną w układzie binarnym, 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). Na podstawie tych wyników przeprowadzono również analizę skupień metodą średnich połączeń (UPGMA) przy użyciu programu "Statistica 5" (StatSoft, Kraków, Polska), w którym wykorzystano metodykę podaną przez Sneatha i Socala (1973).

WYNIKI

Sekwencje starterów reakcji PCR oparte były na występowaniu na styku intron-egzon genów roślinnych sekwencji semikonserwatywnych (Brown, 1986). Sekwencje o długości 9 zasad na końcu 5' i sekwencje o długości 7 zasad na końcu 3' styku intron-egzon oraz ich sekwencje komplementarne uzupełniono 3, 5, 6 i 9 oligonukleotydami o sekwencji przypadkowej tworząc serie starterów o długości od 10 do 18 zasad powielających w kierunku intronów (IT) lub w kierunku egzonów genów (ET).

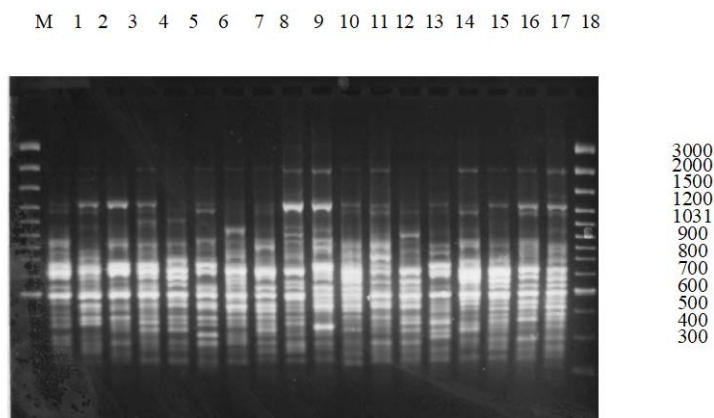
5' Startery IT		Startery ET 3'
CAGGTAAGT	Intron	TGCAGGT
GTCCATTCA		ACGTCCA
3' Startery ET		Startery IT 5'

Sekwencje semikonserwatywne starterów reakcji PCR.

Wstępną ocenę genetycznego zróżnicowania linii żyta przeprowadzono przy użyciu starterów 18 i 15 nukleotydowych z grupy ET. Doświadczenia wykazały, że stosowane startery reakcji PCR ujawniają wyraźne różnice między liniami wywodzącymi się z tej samej puli genowej. Niektóre startery z grupy ET18 generowały obrazy zbyt złożone, których analiza komputerowa może być trudna (rys. 1). Dość przejrzyste obrazy fragmentów DNA uzyskiwano przy użyciu innych starterów z tej grupy lub starterów typu ET15 (rys. 2).

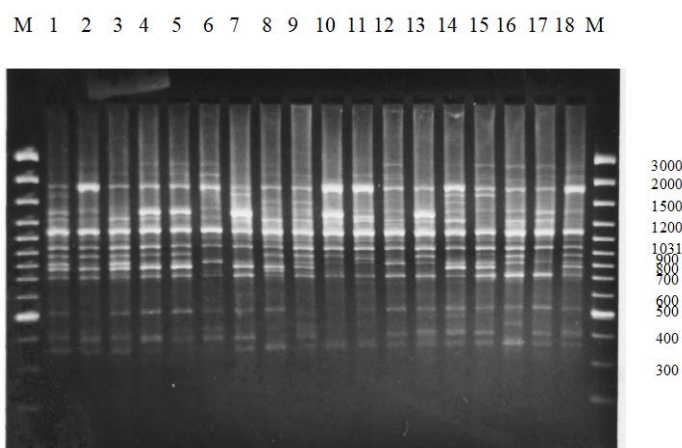
Ocenę wyrównania genetycznego linii żyta przeprowadzono analizując DNA pojedynczych siewek dwóch linii. Na podstawie obserwacji cech morfologicznych linia 2130 określana jest przez hodowców jako wyrównana natomiast cechy morfologiczne linii 4475 wskazują na jej wewnętrzne zróżnicowanie. Analiza PCR metodą RAPD nie dała wyników umożliwiających precyzyjne wyliczenie dystansu genetycznego pomiędzy roślinami badanych linii, gdyż obrazy powielonych fragmentów były mało zróżnicowane (rys. 3). Badania przy użyciu starterów ukierunkowanych na sekwencje styku intron-egzon wykazały wyraźne zróżnicowanie w obrębie obu linii (rys. 4). Otrzymane wyniki nie są zgodne z obserwacjami morfologicznych cech obu linii, gdyż średni dystans genetyczny

między siewkami obu linii był podobny i wynosił 0,26–0,28. Ocenę potwierdza analiza skupień przeprowadzona metodą średnich połączeń (UPGMA) na podstawie otrzymanych wyników (rys. 5).



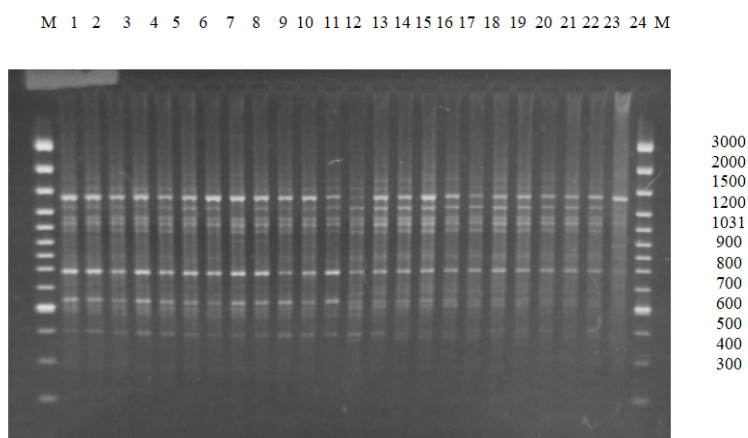
Rys. 1. Wyniki powielania DNA badanych linii żyta przy użyciu startera ET11/18 (5'ACCTACCTGCCGCATCCG³). M-wzorzec wielkości DNA (ilość par nukleotydów), ścieżki 1 — 18, linie żyta

Fig. 1. Amplification of DNA of rye inbreds with the use of primer ET11/18 (5'ACCTACCTGCCGCATCCG³). M-DNA size marker, lanes 1 — 18, inbred lines of rye



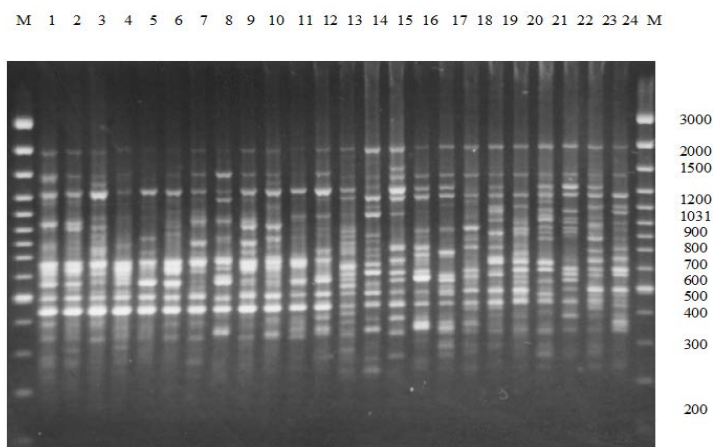
Rys. 2. Wyniki powielania DNA badanych linii żyta przy użyciu startera ET31/15 (5'ACCTACCTGGGCCAG³). M-wzorzec wielkości DNA (ilość par nukleotydów), ścieżki 1 — 18, linie żyta

Fig. 2. Amplification of DNA of rye inbreds with the use of primer ET31/15 (5'ACCTACCTGGGCCAG³). M-DNA size marker, lanes 1 — 18, inbred lines of rye



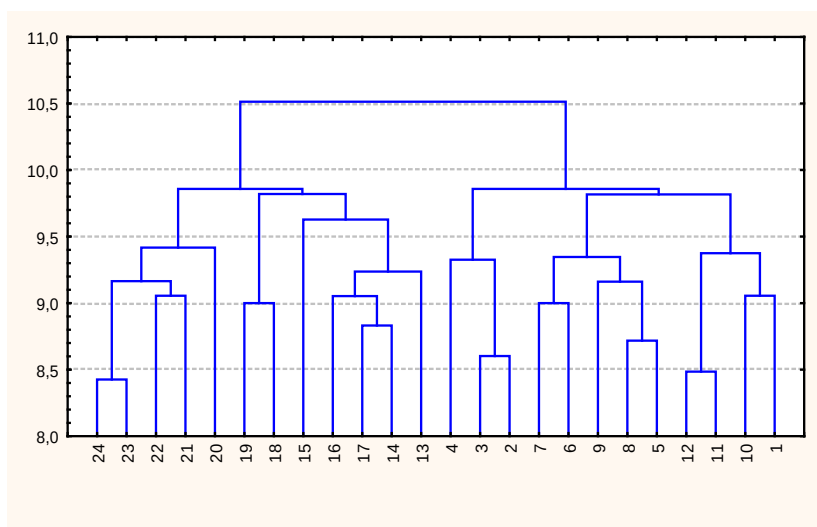
Rys. 3. Wyniki powielania DNA pojedynczych siewek linii 4475 (ścieżki 1–12) i siewek linii 2130 (ścieżki 13–24) przy użyciu startera RAPD3 (5' TCGGGAGGGT³).
M-marker ciężaru cząsteczkowego)

Fig. 3. Amplification of DNA from single seedlings of inbred 4475 (lanes 1–12) and seedlings of inbred 2130 (lanes 13–24) with the use of primer RAPD3 (5' TCGGGAGGGT³).
M-DNA size marker



Rys. 4. Wyniki powielania DNA pojedynczych siewek linii 4475 (ścieżki 1–12) i siewek linii 2130 (ścieżki 13–24) przy użyciu startera ET11/18 (5' ACCTACCTGCCGCATCCG³).
M — wzorzec wielkości DNA (ilość par nukleotydów)

Fig. 4. Amplification of DNA from single seedlings of inbred 4475 (lanes 1–12) and seedlings of inbred 2130 (lanes 13–24) with the use of primer ET11/18 (5' ACCTACCTGCCGCATCCG³).
M-DNA size marker



Rys. 5. Diagram podobieństwa siewek linii 4475 (1–12) i siewek linii 2130 (13–24) wyliczony metodą średnich połączeń (UPGMA) na podstawie analizy 305 fragmentów DNA
Fig. 5. Associations between seedlings of inbred 4475 (1–12) and seedlings of inbred 2130 revealed by UPGMA cluster analysis calculated from analysis of 305 DNA fragments

DYSKUSJA

Podobnie jak w przypadku linii kukurydzy (Rafalski i in., 1998) w badaniach zmienności genetycznej linii żyta startery ukierunkowane na sekwencje styku intron-egzon generują bardziej złożone i polimorficzne obrazy fragmentów DNA niż startery RAPD. W badaniach zmienności genetycznej linii kukurydzy i ocenie tożsamości odmianowej partii nasiennych grochu (Rafalski i in., 2001), najlepsze wyniki uzyskiwano stosując startery 18-nukleotydowe. W ocenie dystansu genetycznego linii żyta niektóre z tych starterów generują zbyt złożone obrazy fragmentów DNA. Mniej złożone i łatwiejsze do analizy komputerowej obrazy generują startery krótsze o długości 12–15 zasad. Wynika to najprawdopodobniej z heterogenności linii żyta. Analiza prób zawierających DNA z 20–25 siewek ujawnia zarówno polimorfizm między badanymi liniami jak też różnice pomiędzy pojedynczymi roślinami badanych linii. Stąd, wydaje się istotne dobranie zestawu starterów generujących umiarkowanie złożone obrazy powielonych fragmentów DNA.

W badaniach żyta, którego genom jest wyjątkowo bogaty w sekwencje repetytywne (Rogowsky i in., 1992), istotne jest również ukierunkowanie powielania na fragmenty genów z wyłączeniem heterochromatynowych odcinków DNA, które nie podlegają transkrypcji. Proponowany system spełnia te wymagania a jednocześnie jest równie prosty i tani jak powszechnie stosowana metoda RAPD. Jednocześnie, możliwość stosowania kombinacji starterów typu ET lub IT ze starterami komplementarnymi do fragmentów sekwencji repetytywnych żyta stwarza możliwość obniżenia kosztów analizy (Rafalski i in., 1997).

WNIOSKI

1. W badaniach zmienności genetycznej linii żyta i ich wyrównania startery komplementarne do sekwencji styku intron-egzon generują znacznie bardziej złożone i polimorficzne obrazy powielonych fragmentów DNA niż startery RAPD.
2. Stosowany system umożliwia powielanie fragmentów genów z wyłączeniem heterochromatynowych odcinków DNA.
3. Do oceny zmienności genetycznej materiałów wyjściowych i linii żyta konieczny jest wybór zestawu starterów generujących umiarkowanie złożone, polimorficzne i łatwe do analizy komputerowej obrazy powielonych fragmentów DNA.

LITERATURA

- Brown J.W. 1986. A catalogue of splice junction and putative branch point sequences from plant introns. *Nucleic Acids Res.* 14: 9549 — 9559.
- Davis L.G., Dibner M. D., Battey J. F. 1986. *Basic methods in molecular biology*, Elsevier Sci. Publ., New York: 42 — 43.
- Nei M., Li W.H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269 — 5273.
- Rafalski A., Wiśniewska I., Anioł A. 1997. Semirandom approach to screening for molecular markers of aluminium tolerance in rye. Poster. „Eucarpia” — Section Cereals Meeting, Sept. 22–23, Tulln, Austria: 61.
- Rafalski A., Gidzińska M., Wiśniewska I. 1998. Systemy PCR w badaniach dystansu genetycznego linii kukurydzy. *Biul. IHAR*. 208: 131 — 140.
- Rafalski A., Wiśniewska I. 2001. Ocena tożsamości odmian grochu siewnego techniką PCR. *Biul. IHAR*. 217: 279 — 286.
- Rogowsky P.M., Shepherd K.W., Langridge P. 1992. Polymerase chain reaction-based mapping of rye involving repeated DNA sequences. *Genome* 35: 621 — 626.
- Sneath P. H. A., Socal R. R. 1973. *Numerical Taxonomy*. W. H. Freeman, San Francisco
- Weining S., Langridge P. 1991. Identification and mapping of polymorphism in cereals based on the polymerase chain reaction. *Theor. Appl. Genet.* 82: 209 — 216.