

IWONA WIŚNIEWSKA**ANDRZEJ RAFALSKI**

Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

Chromosomowa lokalizacja markerów tolerancyjności na glin u żyta

The chromosomal location of markers of aluminium tolerance in rye

W badaniach mających na celu lokalizację fragmentów DNA na chromosomach żyta wykorzystuje się zwykle zestaw linii addycyjnych pszenica-żyto i bardziej stabilne zestawy linii substytucyjnych pszenżyta. Pochodzenie fragmentu DNA z określonego chromosomu żyta potwierdza jego hybrydyzacja z DNA linii addycyjnej przy jednoczesnym obniżeniu intensywności sygnału do analogicznej linii substytucyjnej pszenżyta. Spontaniczna utrata chromosomów żyta w liniach addycyjnych stwarza konieczność weryfikacji posiadanego materiału. Obecność addycji chromosomów żyta w pszenicy Chinese Spring potwierdzono metodą hybrydyzacji przy użyciu dwóch sond molekularnych charakterystycznych dla żytniej sekwencji powtarzającej się typu rozproszonego. Wyniki analiz DNA 103 pojedynczych siewek linii addycyjnych przy użyciu obu sond były zgodne i wykazały znaczne zróżnicowanie obecności DNA żyta. Do badań nad lokalizacją fragmentów DNA na chromosomach żyta wybrano DNA pojedynczych siewek linii addycyjnych, które z sondami charakteryzującymi żyto dawały silny i podobny sygnał hybrydyzacyjny. Spośród 18 fragmentów różnicujących tolerancyjne i wrażliwe formy żyta 4 wykazywały wzrost intensywności hybrydyzacji do DNA linii addycyjnej z chromosomami 4R przy jednoczesnym obniżeniu tego efektu dla substytucji 4R/4D. W pozostałych przypadkach nie obserwowano zmian intensywności sygnału hybrydyzacyjnego lub różnice ujawniające się w liniach addycyjnych i substytucyjnych nie były ze sobą zgodne.

Słowa kluczowe: hybrydyzacja, lokalizacja na chromosomach, markery, tolerancyjność na glin, żyto

The hybridization to DNA of the set of wheat-rye addition lines is the technique commonly used for chromosomal location of DNA based markers in rye. The other approach is the hybridization to the DNA of available set of substitution lines of triticale. Because of the tendency to spontaneous loss of alien chromosomes in wheat-rye addition lines, their presence was verified by Southern dot-blot hybridization using two DNA probes characteristic of rye specific dispersed repetitive sequence. Both probes revealed identical or similar hybridization signals during the analysis of DNA obtained from 103 single seedlings of wheat-rye addition lines. These results confirmed the total or partial loss of rye DNA in some seedlings. The DNA of single seedlings which showed strong and uniform hybridization signal was selected for chromosomal location of rye fragments. The DNA of the set of D/R substitution lines of triticale was also included in these experiments. Four of 18 fragments used as the probes showed increase of hybridization signal to DNA of 4R addition line of wheat with simultaneous decrease of the signal to DNA of 4R/4D substitution line of triticale. The hybridization pattern of the remaining

fragments was not informative because of similar intensity of signals to all additions and substitutions or of not consistent differences in intensity of signals to some additions and substitutions.

Key words: aluminium tolerance, chromosomal location, hybridization, markers, rye

WSTĘP

Głównym czynnikiem hamującym rozwój roślin na glebach kwaśnych jest toksyczne działanie jonów glinu. Wpływ toksycznego działania jonów glinu przejawia się zahamowaniem wzrostu wierzchołków korzeni, co prowadzi w konsekwencji do niedoboru składników pokarmowych i podwyższonej wrażliwości na warunki stresowe (Anioł, 1981). Żyto jako zboże o wysokiej tolerancyjności na toksyczne działanie jonów glinu jest najlepszym dawcą tej cechy dla innych roślin, takich jak pszenżyto i pszenica. Do genomu pszenicy cechy żyta wprowadzane mogą być drogą introgresji fragmentów chromosomów żyta.

W obrębie żyta, podobnie jak u innych zbóż, obserwuje się znaczne zróżnicowanie reakcji genotypów żyta na działanie jonów. Różnice w reakcji linii i segregantów F_2 żyta na działanie jonów glinu w warunkach testu laboratoryjnego (Anioł, 1981) umożliwiły wytypowanie jako potencjalnych markerów tolerancyjności około 30 fragmentów DNA powielonych techniką PCR z zastosowaniem starterów semi-specyficznych (Rafalski i in., 1996). W badaniach tych stosowano zmodyfikowaną procedurę analizy zestawów segregantów F_2 opisaną przez Michelmores i wsp. (1991). W celu zwiększenia prawdopodobieństwa identyfikacji fragmentów sprzężonych z cechą tolerancyjności, powielanie przeprowadzono na DNA matrycowym otrzymanym z 3 par linii rodzicielskich oraz segregantów F_2 , pochodzących z krzyżowań tych linii. Porównanie spektrum obejmowało 4 lub 6 form wrażliwych i tę samą liczbę form tolerancyjnych. Jako potencjalne markery wybierano fragmenty takiej samej wielkości różnicujące co najmniej cztery formy tolerancyjne lub wrażliwe. Analiza wyników powielania przy użyciu 84 starterów semi-specyficznych o długości od 10 do 18 zasad umożliwiła wytypowanie fragmentów, które zostały powielone z DNA linii i segregantów tolerancyjnych lub ujawniały się tylko u form wrażliwych.

Celem prac prowadzonych obecnie jest lokalizacja wyizolowanych fragmentów DNA różnicujących wrażliwe i tolerancyjne formy żyta na chromosomach żyta. Powszechnie stosowaną metodą umożliwiającą przypisanie markerów do określonych chromosomów jest ich hybrydyzacja z zestawem linii addycyjnych pszenica-żyto (Gallego i in., 1998). Brak wyrównanej reakcji siewek linii addycyjnych na toksyczne działanie jonów glinu oraz różnice w intensywności sygnału hybrydyzacyjnego z sondami molekularnymi pochodzącymi z powielonych fragmentów żyta wskazywał na konieczność weryfikacji obecności DNA żyta w pszenicy Chinese Spring. Stąd, celem pierwszego etapu badań był wybór siewek linii addycyjnych o potwierdzonej obecności chromosomów żyta. W badaniach nad lokalizacją fragmentów DNA na chromosomach żyta wykorzystano również linie substytucyjne pszenżyta, w których chromosomy żytnie zastąpione są homeologicznymi chromosomami z genomu D pszenicy. Badania te stanowią etap

poprzedzający określenie sprzężeń markerów z genami tolerancyjności na toksyczne działanie jonów glinu.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do wytworzenia sond charakterystycznych dla żyta stanowiły dwie odmiany pszenicy: Chinese Spring i Korweta oraz dwie odmiany żyta: Dańkowskie Złote i Amilo.

Sondy molekularne utworzono z ponad 30 fragmentów DNA, które różnicowały tolerancyjne i wrażliwe na toksyczne działanie jonów glinu linie i segreganty F₂ żyta.

Do chromosomowej lokalizacji markerów użyto DNA zestawu linii addycyjnych pszenicy Chinese Spring z chromosomami żyta Blanco oraz pszenicy Grana z chromosomami żyta Dańkowskie Złote. Do badań tych włączono również DNA otrzymane z zestawu linii substytucyjnych pszenżyta Presto z chromosomami pszenicy Begra.

Preparatykę DNA przeprowadzono wg metodyki opisanej przez Davisa i wsp. (1986). Ilość DNA oznaczano fluorymetrycznie zgodnie z instrukcją fluorymetru TKO 100 (Hoefer Scientific Instruments).

Amplifikację fragmentów DNA przeprowadzano w układzie zawierającym w objętości 20 µl: 15 ng DNA roślinnego, 1 × 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) w warunkach opisanych uprzednio (Rafalski i in., 2002). Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym w buforze TBE i wizualizowano przy użyciu bromku etydyny.

Wyizolowane fragmenty DNA znakowano dUTP-digoksygeniną według procedury opisanej przez producenta zestawu do znakowania i detekcji (DIG DNA labeling and detection kit: Roche, Mannheim, Niemcy). Mieszanina do znakowania zawierała w 20 µl około 50 ng znakowanego fragmentu DNA. Inkubację prowadzono przez 18 godzin. Znakowanie DNA wyizolowanych fragmentów przy wykorzystaniu łańcuchowej reakcji polimerazy przeprowadzono wg metody opisanej przez Saiki i wsp. (1985).

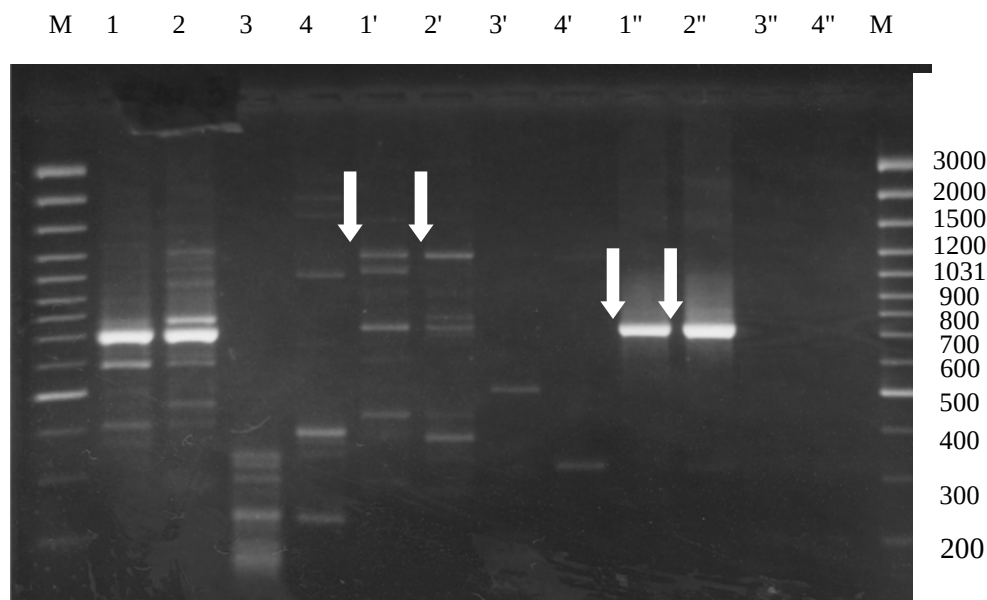
Zdenaturowane próbki DNA nakładano na membrany hybrydyzacyjne przy użyciu urządzenia Bio-Dot (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). DNA linii addycyjnych pszenicy i zestawu linii substytucyjnych pszenżyta nakładano w ilości 40 i 80 ng natomiast DNA wrażliwych i tolerancyjnych linii i segregantów F₂ żyta w ilości 25 i 50 ng.

Hybrydyzację, detekcję immunologiczną i reakcję wybarwiania przeprowadzano według instrukcji producenta zestawu (Roche, Mannheim). Modyfikacja procedury polegała na zmniejszeniu ilości odczynnika blokującego do 0,5% i dodaniu do buforu hybrydyzacyjnego sonikowanego DNA pszenicy Chinese Spring w stężeniu 5 µg/ml przy hybrydyzacji do DNA linii addycyjnych pszenicy i zestawu linii substytucyjnych pszenżyta. Hybrydyzację przeprowadzono przez 18 godzin w temperaturze 68°C. Płukania pohybrydyzacyjne przeprowadzono według metodyki opisanej przez Metzlaffa (1986).

WYNIKI

Analiza tolerancji na glin pojedynczych siewek zestawu linii addycyjnych pszenicy Chinese Spring z addycjami chromosomów żyta Blanco metodą testu laboratoryjnego wykazała, że reakcja siewek w obrębie każdej addycji jest zróżnicowana, a wyniki testowania są niejednoznaczne. Gdy sondy hybrydowano do DNA otrzymanego z 12–15 siewek każdej linii addycyjnej, interpretację wyników utrudniały stale występujące różnice sygnału hybrydacyjnego. Wyniki te sugerowały, że jakkolwiek linie addycyjne kontrolowane były cytologicznie na etapach poprzedzających namnażanie, to podczas namnażania materiału nastąpiła częściowa lub całkowita eliminacja chromosomów żytnich w niektórych roślinach. Dlatego też należało zweryfikować możliwość zastosowania tego zestawu do lokalizacji potencjalnych markerów na określonych chromosomach żyta.

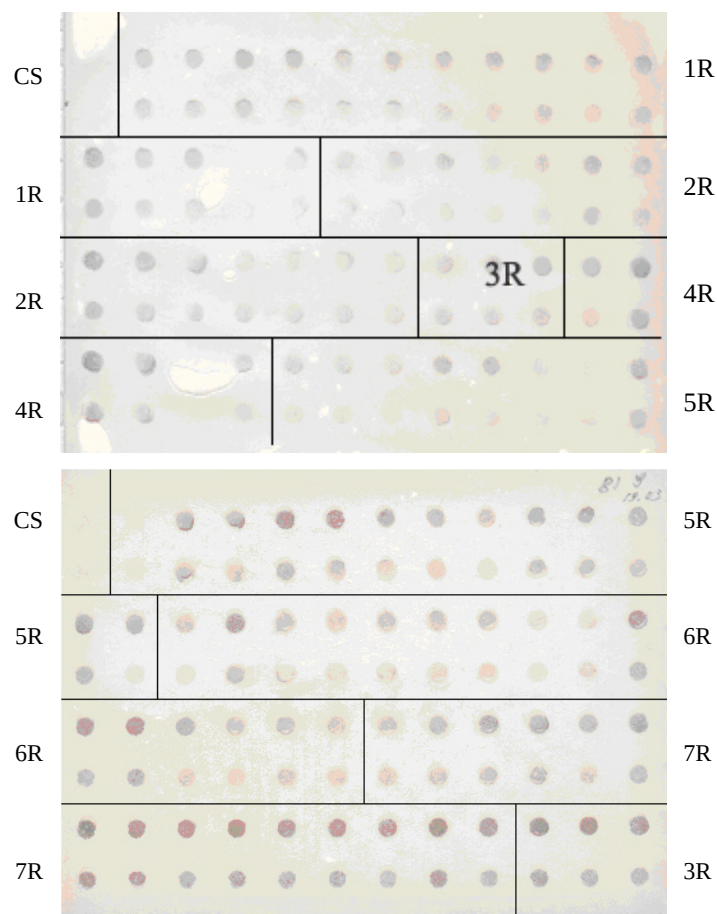
Powielenie DNA otrzymanego z dwóch odmian pszenicy (Chinese Spring i Korweta) oraz dwóch odmian żyta (Dańkowskie Złote i Amilo) przy użyciu starterów flankujących powtarzającą się sekwencję charakterystyczną dla żyta (Rogowsky i in., 1992) umożliwiło wytypowanie fragmentów DNA występujących wyłącznie w życie (rys. 1).



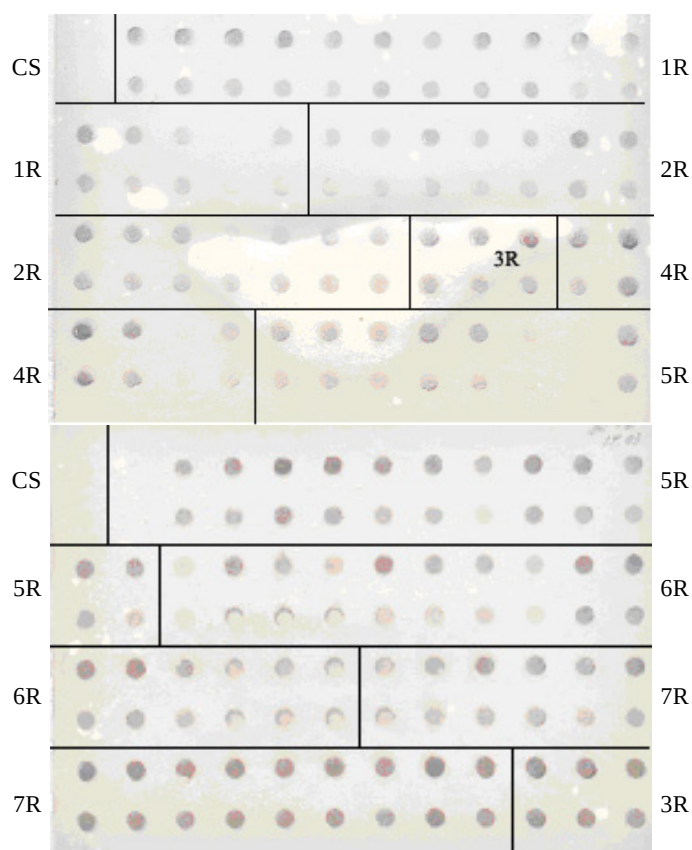
Rys. 1. Wyniki powielania DNA odmian żyta i pszenicy przy użyciu starterów flankujących sekwencje repetytywne żyta. 1 — Dańkowskie Złote, 2 — Amilo, 3 — Chinese Spring, 4 — Korweta. M — wzorzec wielkości DNA (ilość par zasad), linie 1–4: starter 1 (5'AAGCTTTAGCATGATCCTT^{3'}), linie 1'–4': starter 2 (5'GTTATTTAGAGTAACTTAAG^{3'}), linie 1''–4'': startery 1+2

Fig. 1. Amplification of DNA of varieties of rye and wheat using primers flanking disperse repetitive sequence of rye. 1 — Dańkowskie Złote, 2 — Amilo, 3 — Chinese Spring, 4 — Korweta. M-DNA size marker, lines 1–4: primer 1 (5'AAGCTTTAGCATGATCCTT^{3'}), lines 1'–4': primer 2 (5'GTTATTTAGAGTAACTTAAG^{3'}), lines 1''–4'': primers 1 + 2

Z dwóch takich fragmentów utworzono sondy molekularne specyficzne dla tego gatunku. Przy użyciu obu sond przeprowadzono hybrydyzacje do DNA 141 pojedynczych siewek obu zestawów linii addycyjnych pszenicy. Wyniki hybrydyzacji przy użyciu obu sond były identyczne lub bardzo podobne (rys. 2, 3). W przypadku pszenicy Chinese Spring z chromosomami żyta Blanco u części roślin brak sygnału hybrydyzacyjnego (jak w próbie pszenicy Chinese Spring) lub słaby sygnał hybrydyzacyjny wskazywał na całkowitą lub częściową utratę chromosomów żyta. Analiza ta umożliwiła dobór do badania chromosomowej lokalizacji markerów zestawu DNA z pojedynczych roślin, u których wyniki hybrydyzacji potwierdzają obecność chromosomów żyta.



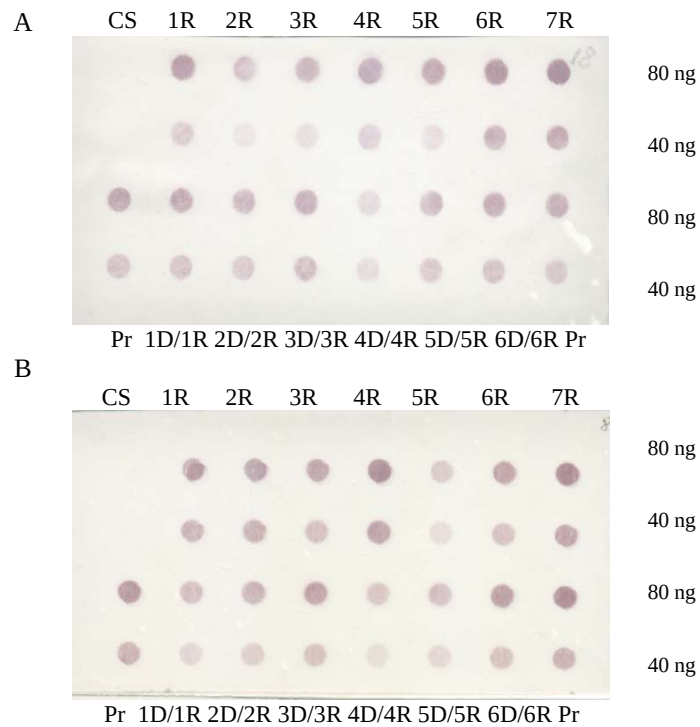
Rys. 2. Wyniki hybrydyzacji DNA pojedynczych siewek linii addycyjnych pszenicy Chinese Spring z chromosomami żyta Blanco (CS/B) z charakterystyczną dla żyta sondą A
Fig. 2. The results of hybridization of DNA of single seedlings wheat-rye addition lines (CS/Blanco) using rye specific probe A



Rys. 3. Wyniki hybrydyzacji DNA pojedynczych siewek linii addycyjnych pszenicy Chinese Spring z chromosomami żyta Blanco (CS/B) z charakterystyczną dla żyta sondą B
Fig. 3. The results of hybridization of DNA of single seedlings wheat-rye addition lines (CS/Blanco) using rye specific probe B

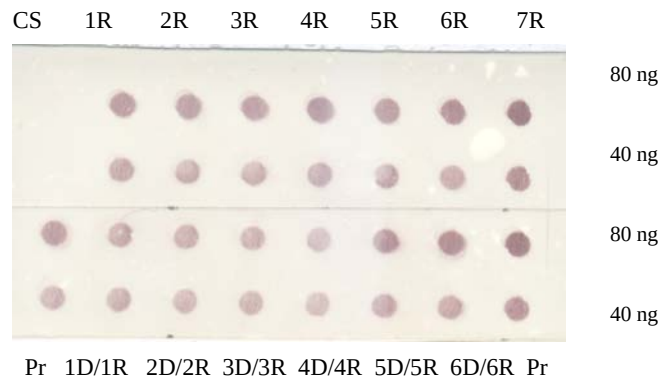
Zastosowanie w tych badaniach drugiego zestawu linii addycyjnych (pszenica Grana z chromosomami Dańkowskie Złote) nie było możliwe, gdyż w przeciwieństwie do Chinese Spring, DNA pszenicy Grana hybrydyzuje z większością sond z taką samą intensywnością sygnału jak wyprowadzony z niej zestaw linii addycyjnych (dane nie prezentowane). Stąd, za celowe uznano włączenie do badań nad chromosomową lokalizacją markerów zestawu linii substytucyjnych pszenżyta Presto, mimo że posiadany zestaw jest niepełny (brak substytucji 7D/7R).

Przeprowadzone dotychczas doświadczenia z zastosowaniem 18 sond utworzonych z fragmentów DNA różnicujących tolerancyjne i wrażliwe formy (linie i segreganty F_2 żyta) wykazały w czterech przypadkach wyraźny wzrost intensywności hybrydyzacji sond z linią addycyjną zawierającą chromosomy 4R przy jednoczesnym osłabieniu hybrydyzacji do DNA linii substytucyjnej pszenżyta 4D/4R. Przykłady działania dwóch takich sond przedstawia rysunek 4.



Rys. 4. Wyniki hybrydyzacji sond utworzonych z fragmentów DNA o ciężarze 627 par zasad (A) i 990 par zasad (B), wyizolowanych z tolerancyjnych form żyta

Fig. 4. The results of hybridization of DNA probes prepared from fragments 627 bp (A), 990 bp (B), specific for tolerant form of rye



Rys. 5. Wynik hybrydyzacji sondy utworzonej z fragmentu DNA o ciężarze 686 par zasad wyizolowanym z tolerancyjnych form żyta

Fig. 5. The result of hybridization of DNA probe prepared from fragment 686 bp specific for tolerant form of rye

W przypadku pozostałych sond wyniki są niejednoznaczne, co wskazuje, że wyizolowane fragmenty nie są unikalne. W większości przypadków nie obserwuje się różnic w intensywności sygnału hybrydacyjnego sond do DNA zestawu linii addycyjnych i substytucyjnych (rys. 5). W niektórych przypadkach zróżnicowanie sygnału obserwowano tylko w liniach addycyjnych lub też różnice w intensywności sygnału do DNA linii addycyjnych i linii substytucyjnych nie były ze sobą zgodne.

DYSKUSJA

Zastosowanie linii addycyjnych pszenicy stwarza możliwość przypisania potencjalnych markerów tolerancyjności do określonych chromosomów żyta. Głównym problemem tych badań jest nietrwałość addycji objawiająca się skłonnością do utraty chromosomów żyta. Stąd konieczna okazała się weryfikacja posiadanych materiałów. Weryfikację taką przeprowadza się zwykle metodami cytologicznymi (Łukaszewski, 1988). Przedstawiona praca wskazuje, że po namnożeniu materiału obecność obcych chromosomów w pszenicy można stosunkowo szybko potwierdzić metodą hybrydacji przy użyciu sond charakterystycznych dla żyta. Wyniki hybrydacji przy użyciu dwóch różnych sond były bardzo zbieżne i umożliwiły wybór do doświadczeń pojedynczych roślin z potwierdzoną obecnością chromosomów żytnich. Do badań tych wybrano DNA tych roślin, które z dwiema sondami charakteryzującymi żyto wykazywały silny i podobny sygnał hybrydacyjny. Badany materiał tj. linie addycyjne pszenicy jest również interesujący z tego względu, że wyniki hybrydacji wykazały całkowitą utratę chromosomów żytnich u niewielkich roślin. Znaczna liczba badanych roślin wykazywała słaby sygnał hybrydacyjny z sondami żytnimi, co sugeruje obecność niewielkich fragmentów chromosomów żyta.

Metoda zastosowana do weryfikacji obecności chromosomów żyta w liniach addycyjnych została zastosowana do lokalizacji fragmentów DNA powielonych techniką PCR na chromosomach żyta.

Obecność DNA charakterystycznego dla żyta w genomie pszenicy Grana uniemożliwił zastosowanie tego zestawu do badań związanych z chromosomową lokalizacją markerów tolerancyjności. Przydatny w tych badaniach okazał się natomiast zestaw linii substytucyjnych pszenżyta. Brak miejsc komplementarnych do badanej sondy wynikający z zastąpienia chromosomów żyta chromosomami genomu D pszenicy powodował wyraźne obniżenie intensywności sygnału hybrydacyjnego.

Wszystkie sondy molekularne utworzone z wyizolowanych fragmentów nie hybrydowały z DNA pszenicy Chinese Spring. Zastosowanie nadmiaru specyficznego czynnika blokującego jest niezbędne w badaniach z zastosowaniem sond utworzonych z całkowitego DNA pokrewnego gatunku (Ananthawat-Jonsson i in., 1990; Rafalski i in., 2000). Znaczny nadmiar nieznakowanego DNA pszenicy Chinese Spring w buforze hybrydacyjnym skutecznie blokował również hybrydację sond otrzymanych z żyta.

Lokalizacja czterech fragmentów DNA charakteryzujących formy tolerancyjne na 4 chromosomie żyta jest zgodna z ostatnio uzyskanymi danymi. Badania przeprowadzone

przy zastosowaniu techniki AFLP wskazują, że w życie główny gen lub geny tolerancyjności zlokalizowane są na chromosomie 4R (Miftahudin i in., 2002).

Większość analizowanych fragmentów nie wykazywała jednoznacznej tendencji do hybrydyzacji z określonymi chromosomami, mimo że w sposób wyraźny różnicowały tolerancyjne i wrażliwe na glin linie żyta. Chromosomy żyta w stosowanym zestawie linii addycyjnych pochodzą jednak z odmiany, która nie była obiektem analizy tolerancyjności i identyfikacji markerów. Odmiana ta, jak również żytni genom pszenżyta Presto, może wykazywać znaczne różnice wewnątrzgatunkowe w stosunku do badanych przez nas linii.

Analizowane fragmenty DNA izolowane były po rozdziale produktów PCR na żelu agarozowym. Jakkolwiek w warunkach takiego rozdziału elektroforetycznego wykazują one jednorodność, to ograniczona rozdzielczość metody powoduje możliwość heterogenności wyizolowanych fragmentów. Możliwość sprawdzenia jednorodności analizowanego fragmentu stwarza zastosowanie analizy restrykcyjnej metodą CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences; Konieczny i Ausubel, 1993).

WNIOSKI

1. Metoda hybrydyzacji DNA-DNA okazała się użyteczna zarówno do weryfikacji obecności chromosomów żytnich w zestawie linii addycyjnych, jak również do lokalizacji powielonych fragmentów DNA na chromosomach żyta.
2. Wstępne wyniki wskazują, że cztery fragmenty DNA wyizolowane z form tolerancyjnych zlokalizowane są na czwartym chromosomie żyta.

LITERATURA

- Anamthawat-Jonsson K., Schwarzacher T., Leitch A. R., Bennett M. D., Heslop-Harrison J. S. 1990. Discrimination between closely related *Triticeae* species using genomic DNA as a probe. *Theor. Appl. Genet.* 79: 721 — 728.
- Anioł A. 1981. Metody określania tolerancyjności zbóż na toksyczne działanie jonów glinu. *Biul. IHAR* 143: 3 — 14.
- Davis L. G., Dibner M. D., Battey J. F. 1986. *Basic methods in molecular biology*. Elsevier Sci. Publ., New York: 42 — 43.
- Gallego F. J., Lopez-Solanilla E., Figueiras A. M., Benito C. 1998. Chromosomal location of PCR fragments as a source of DNA markers linked to aluminium tolerance genes in rye. *Theor. Appl. Genet.* 96: 426 — 434.
- Konieczny A., Ausubel F. A. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal* 4: 403 — 410.
- Łukaszewski A. J. 1988. A comparison of several approaches in the development of disomic alien addition lines of wheat. *Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp.* Cambridge, England: 363 — 367.
- Metzlaff M., Troebner W., Baldauf F., Schlegel R., Cullum J. 1986. Wheat specific repetitive DNA sequences — construction and characterisation of four different genomic clones. *Theor. Appl. Genet.* 72: 207 — 210.
- Michelmore, R. W., Paran, I., Kessell, R. V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9828 — 9832.
- Miftahudin, Scoles G. J., Gustafson, J. P. 2002. AFLP markers tightly linked to the aluminium-tolerance gene *Alt3* in rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 104: 626 — 631.
- Rafalski A., Wiśniewska I., Anioł A. 1996. Screening for molecular markers of aluminium tolerance in rye. *J. Appl. Genet.* 37A: 79 — 81.

- Rafalski A., Wiśniewska I., Sikora T., Łapiński B. 2000. Molecular probes for detection of wheat chromosomal fragments in rye. *Plant Breeding and Seed Science* 44: 27 — 38.
- Rafalski A., Madej L., Wiśniewska I., Gawel M. 2002. The genetic diversity of components of rye hybrids. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 7: 471 — 475.
- Rogowsky P. M., Shepard K. W., Langridge P. 1992. Polymerase chain reaction mapping of rye involving repeated DNA sequences. *Genome* 35: 621 — 626.
- Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction analysis of sickle-cell anemia. *Science* 230: 1350 — 1354.