

**ANDRZEJ RAFALSKI**<sup>1</sup>  
**MAGDALENA ŻURAWSKA**<sup>1</sup>  
**IRENA KOLASIŃSKA**<sup>2</sup>  
**IWONA WIŚNIEWSKA**<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin

<sup>2</sup> Zakład Genetyki i Hodowli Roślin

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

## Molekularna analiza linii męskosterylnych, dopełniaczy sterylności i restorerów płodności żyta

### The molecular analysis of male-sterile, maintainer and restorer lines of rye

Analiza molekularna obejmowała linie męskosterylne (P), ich płodne analogi dopełniające sterylność (N) oraz restorery płodności (R) pochodzące z hodowli IHAR oraz firm hodowlanych: Danko Hodowla Roślin Sp. z o.o., Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o. Przedstawione badania stanowią wstępny etap prac zmierzających do identyfikacji markerów genów przywracających płodność mieszańcom otrzymanym z wykorzystaniem źródła sterylności typu "Pampa". Głównym celem analizy było sprawdzenie, czy stosowana technika różnicuje linie restorery płodności, linie męskosterylne i dopełniające sterylność będące komponentami wytworzonych mieszańców (P×R) żyta. Zastosowanie znacznej liczby starterów stworzyło również możliwość wytypowania tych starterów semi-specyficznych, które wydają się być najbardziej przydatne w dalszych etapach badań. Współczynniki dystansu genetycznego jak również analiza skupień przeprowadzona w oparciu o wszystkie uzyskane wyniki (1482 fragmenty DNA) wskazują na wyraźne odróżnienie grupy linii restorerów od pozostałych linii. Otrzymane wyniki potwierdzają również pokrewieństwo genetyczne między liniami męskosterylnymi (P) i ich płodnymi analogami (N).

**Słowa kluczowe:** heterozja, linie, markery restoracji, semi-specyficzny PCR, żyto

The molecular analysis included male-sterile (P), their analogous maintainer (N) and restorer (R) inbred lines of rye originating from the Plant Breeding and Acclimatisation Institute, Danko Plant Breeding Co. Ltd. and Poznań Plant Breeding Co. Ltd. Presented data are the results of a preliminary study on identification of markers of fertility restoration for male sterility of "Pampa" type. The aim of this study was to document the utility of proposed PCR technique for differentiation the components of rye hybrids: male sterile, maintainer and restorer lines. The use of considerable number of starters gave also a possibility to select semi-specific primers that seem to be the most useful for further studies. The evaluation of indices of dissimilarity among accessions and cluster data was based on the analysis of 1482 DNA fragments. The results indicated essential genetic differences

between restorer and non-restorer inbred lines. The data presented also confirmed a high level of similarity between male sterile lines and their normal analogues.

**Key words:** heterosis, inbred lines, markers of restoration, semi-specific PCR, rye

#### WSTEP

Charakterystyczną cechą żyta (*Secale cereale* L.) jest mechanizm samoniezgodności utrudniający samozapylenie. W niektórych populacjach żyta znaleziono jednak geny samopłodności, co umożliwiło wyprowadzanie linii wsobnych żyta na dużą skalę. Efekt heterozji u żyta, objawiający się wzrostem plonu, jest podobny do tego efektu u kukurydzy i znacznie wyższy niż u zbożowych roślin samopylnych takich jak pszenica i jęczmień (Melchinger i Gumber, 1997). Heterozyjna hodowla żyta jest najbardziej zaawansowana w Niemczech, gdzie kilkanaście zarejestrowanych mieszańców jest uprawianych na 60% arealu tego zboża. Między innymi, dzięki wysokiemu udziałowi odmian mieszańcowych w uprawie, plony żyta w Niemczech są 2-3-krotnie wyższe niż w krajach takich jak Polska, Rosja i Białoruś, gdzie uprawiane są odmiany populacyjne (Geiger i Miedaner, 1999; Arseniuk i Oleksiak 2003). Analiza genetycznego zróżnicowania odmian populacyjnych pochodzących z firmy Danko wykazała, że ich genetyczne zróżnicowanie jest kilkakrotnie mniejsze od różnic między komponentami mieszańców (Rafalski i in. 2002). Stąd wydaje się, że hodowla odmian mieszańcowych stwarza znaczne większe możliwości dalszego postępu hodowli żyta.

W ostatnich latach, do Rejestru Odmian Roślin Uprawnych zostały przyjęte polskie odmiany mieszańcowe żyta — Luco, Klawo, Stach, Konto i Koko z Hodowli Roślin Smolice oraz Nawid i Gradan będące efektem współpracy firm Danko Hodowla Roślin i Poznańskiej Hodowli Roślin. Hodowla i produkcja nasion mieszańców jest prowadzona przy wykorzystaniu systemów genetycznych — cytoplazmatyczno-genowej męskiej niepłodności typu "Pampa" i przywracania męskiej płodności (Geiger i Schnell, 1970).

Obecnie głównym zadaniem w hodowli odmian mieszańcowych żyta jest wyhodowanie efektywnych restorerów płodności. Do tego celu bardzo przydatna wydaje się być identyfikacja markerów genotypów o wysokiej zdolności przywracania płodności stwarzająca możliwość kumulacji genów restoracji.

#### MATERIAL I METODY

Materiał do badań stanowiło 9 linii przywracających płodność, 10 linii męskosterylnych i 9 linii dopełniających sterylność pochodzących z Pracowni Żyta IHAR, 2 linie męskosterylne i ich płodne analogi pochodzące z firmy Danko oraz jedna linia męskosterylna i jej płodny analog pochodzące z Poznańskiej Hodowli Roślin.

DNA otrzymywano z 15-20 siewek każdej z linii rosnących na pożywce płynnej przez 6–8 dni według procedury opisanej przez Davisa i wsp. (1986). Stężenie DNA oznaczano fluorymetrycznie zgodnie z instrukcją fluorymetru TKO 100 (Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA).

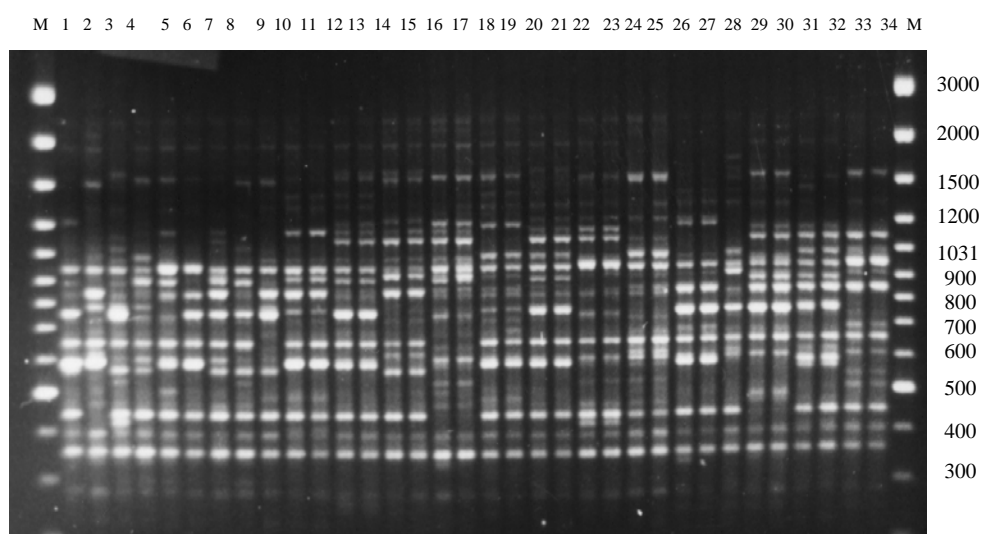
Powielanie fragmentów DNA przeprowadzono w termocyklerze UNO II (Biometra, Göttingen, Niemcy). Powielania prowadzono w układzie zawierającym w objętości 20  $\mu$ l: 15 ng DNA roślinnego, 1  $\times$  bufor, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 1–1,2  $\mu$ M startera i 1 jednostkę termostabilnej polimerazy (MBI Fermentas, Wilno). Powielanie przy użyciu starterów semi-specyficznych przeprowadzono 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 tą podwyższano o dalsze 4°C. We wszystkich cyklach powielania denaturację przeprowadzono 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.

Skanowane obrazy rozdziałów elektroforetycznych analizowano przy użyciu programu Fragment NT i przekształcono w układ binarny, gdzie brak fragmentu o określonym ciężarze cząsteczkowym zapisywano jako 0, a obecność fragmentu oznaczono jako 1. Indeksy podobieństwa lub dystansu genetycznego między liniami wyliczono według wzoru Nei i Li (1979). Analizę skupień i graficzne przedstawienie wyników przeprowadzono przy użyciu programu Statistica.

#### WYNIKI

Otrzymane wyniki genetycznego zróżnicowania badanych linii uzyskano z powieleń przy użyciu 70 starterów semi-specyficznych o długości od 10 do 18 zasad. Zarówno analiza obrazów powielania jak i wyliczenie współczynników dystansu genetycznego przeprowadzone w oparciu o wszystkie uzyskane wyniki (1482 fragmenty DNA) wskazują na wyraźne odróżnienie grupy linii restorerów od pozostałych badanych linii. Analizowane linie restorery tworzą grupę genetycznie dość zróżnicowaną, a średni dystans między nimi wynosi 0,269. Nieco większy dystans genetyczny między liniami restorerowymi a pozostałymi liniami wynoszący średnio 0,339 wskazuje na obecność fragmentów różnicujących obie grupy linii. Przykłady elektroforetycznego rozdziału produktów powielania przedstawione na rysunkach 1 i 2 wskazują na wyraźnie odmienny obraz powielenia linii restorerów (ścieżki 1–9) od obrazu powielenia linii męskosterylnych i dopełniających. Linie męskosterylne pochodzące z trzech ośrodków heterozyjnej hodowli żyta, z wyjątkiem linii 130P, były analizowane wraz z ich normalnymi analogami tj. liniami dopełniającymi (N). Podobieństwo obrazów powielenia linii P i ich analogów linii N jest widoczne na rysunkach 1 i 2. Współczynniki dystansu genetycznego wskazują, że między parami tych linii dystanse genetyczne są najmniejsze i wynoszą od 0,057 do 0,125 (średnio 0,098). Genetyczne zróżnicowanie analizowanego zestawu linii restorerów powoduje, że jakkolwiek obraz ich powielenia jest odmienny od obrazu powielenia pozostałych linii, to trudno jest zidentyfikować fragmenty charakterystyczne tylko dla linii restorerów.



M — wzorec wielkości DNA, 1-34 — linie żyta: 1-Res1(R), 2-Res2(R), 3-Res3(R), 4-Res4(R), 5-Res5(R), 6-Res6(R), 7-Res7(R), 8-Res8(R), 9-Res9(R), 10-904N(R), 11-904P(R), 12-2130N(R), 13-2130P(R), 14-399N(R), 15-399P(R), 16-463N(R), 17-463P(R), 18-5114N(R), 19-5114P(R), 20-620N(R), 21-620P(R), 22-482N(R), 23-482P(R), 24-103N(R), 25-103P(R), 26-343N(R), 27-343P(R), 28-130P(R), 29-S93N(D), 30-S93P(D), 31-S105N(D), 32-S105P(D), 33-426N(P), 34-426P(P).

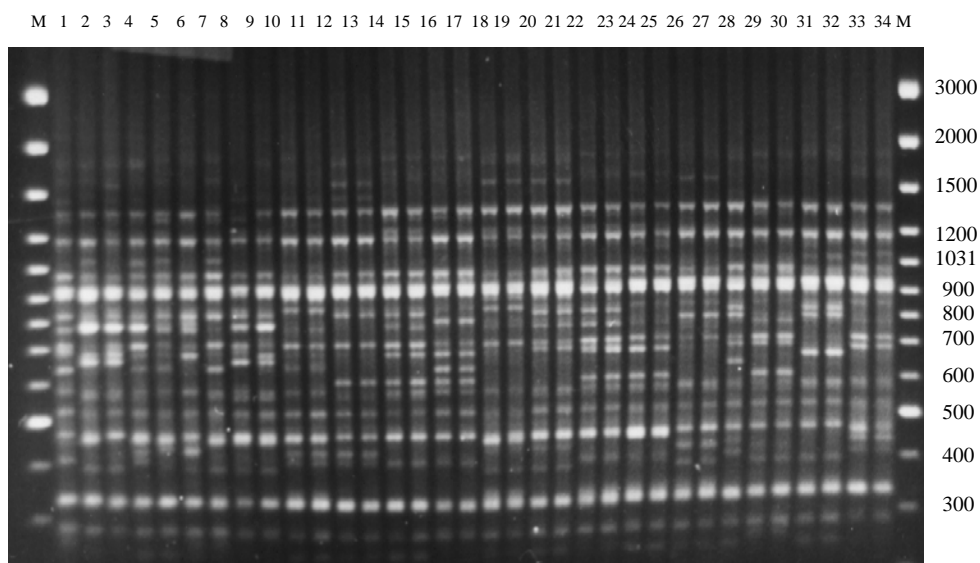
**Rys. 1. Wyniki powielania DNA linii przywracających płodność(Res), linii męskosterylnych (P) i linii dopełniających(N) pochodzących z IHAR(R), Danko(D) i PHR(P) przy użyciu startera IT29/12 ( $5^{\prime}$ CGTCAACCTGCA $3^{\prime}$ ).**

M — DNA size standard. 1-34 — inbred lines of rye: accessions from the Plant Breeding and Acclimatisation Institute (R), Danko Breeding Co.(D), and Poznan Breeding Co. (P).

**Fig. 1. Amplification of DNA of restorer (Res), male sterile (P) and maintainer (N) inbred lines of rye using primer IT29/12 ( $5^{\prime}$ CGTCAACCTGCA $3^{\prime}$ ).**

Analiza obrazów powielenia przy użyciu programu komputerowego i ich przekształcenie w układ binarny (0,1) stwarza możliwość wytypowania fragmentów DNA, których częstość występowania w liniach przywracających płodność jest inna niż w pozostałych badanych liniach. Wyniki analizy skupień (rys. 3) potwierdzają odrębność analizowanego zestawu linii restorerów od pozostałych linii. Linie te tworzą wyraźnie odrębną grupę w prawej części dendrogramu. Dendrogram obrazuje również pokrewieństwo linii męskosterylnych i ich normalnych analogów, które tworzą pary o najmniejszych dystansach genetycznych. Odrębną grupę tworzą trzy linie męskosterylne i ich analogi pochodzące z Danko i Poznańskiej Hodowli Roślin.

Amplifikacje badanych materiałów przeprowadzono przy użyciu starterów semi-specyficznych powielających w kierunku intronów (intron targeting, IT) lub eksonów (exon targeting, ET) o długości od 10 do 18 nukleotydów. Stworzyło to możliwość porównania efektywności działania poszczególnych grup starterów.



M — wzorzec wielkości DNA, 1-34 — linie żyta: 1-Res1(R), 2-Res2(R), 3-Res3(R), 4-Res4(R), 5-Res5(R), 6-Res6(R), 7-Res7(R), 8-Res8(R), 9-Res9(R), 10-904N(R), 11-904P(R), 12-2130N(R), 13-2130P(R), 14-399N(R), 15-399P(R), 16-463N(R), 17-463P(R), 18-5114N(R), 19-5114P(R), 20-620N(R), 21-620P(R), 22-482N(R), 23-482P(R), 24-103N(R), 25-103P(R), 26-343N(R), 27-343P(R), 28-130P(R), 29-S93N(D), 30-S93P(D), 31-S105N(D), 32-S105P(D), 33-426N(P), 34-426P(P).

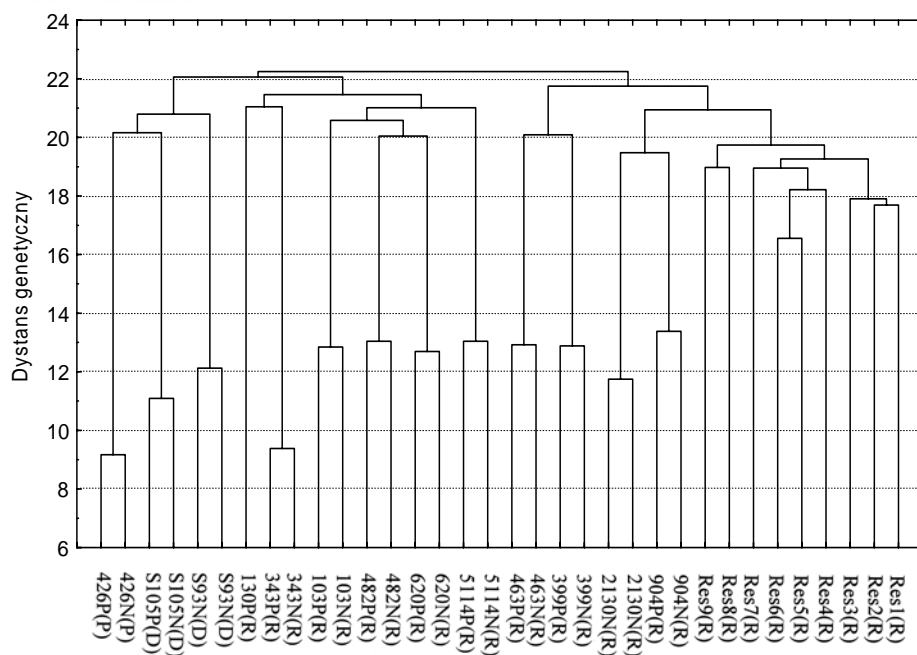
**Rys. 2. Wyniki powielania DNA linii przywracających płodność(Res), linii męskosterylnych(P) i linii dopełniających(N) pochodzących z IHAR(R), Danko(D) i PHR(P) przy użyciu startera IT30/12 ( $5^{\prime}$ GCCAAACCTGCA $3^{\prime}$ ).**

M — DNA size standard. 1-34 — inbred lines of rye: accessions from the Plant Breeding and Acclimatisation Institute (R), Danko Breeding Co.(D) and Poznan Breeding Co. (P).

**Fig. 2. Amplification of DNA of restorer (Res), male sterile (P) and maintainer (N) inbred lines of rye using primer IT30/12 ( $5^{\prime}$ GCCAAACCTGCA $3^{\prime}$ ).**

Obrazy powielenia części z 70 starterów były trudne do interpretacji w regionach fragmentów o ciężarach największych i najmniejszych. Stąd ocenę efektywności oparto na analizie 45 starterów reprezentujących 7 grup.

Jakkolwiek w obrębie każdej grupy obserwowano znaczne zróżnicowanie zarówno liczby powielonych fragmentów jak też udziału pasm polimorficznych, to wartości średnie były bardzo wysokie. Najwyższe średnie liczby powielonych fragmentów uzyskano stosując startery z grup IT12 (40 fragmentów) i IT18 (33 fragmenty) a najmniejszą liczbę fragmentów powielowały startery z grupy IT10 (25 fragmentów). Dwadzieścia pięć starterów reprezentujących grupy ET12, ET15 i ET18 powielowały średnio od 30 do 32 fragmentów DNA. We wszystkich grupach udział pasm polimorficznych był wysoki i wynosił od 79% (ET15) do 98% (IT18).



R — materiały pochodzące z IHAR; D — materiały pochodzące z Danko; P — materiały pochodzące z PHR

**Rys. 3. Diagram podobieństwa badanych linii wyliczony metodą średnich połączeń na podstawie analizy 1482 fragmentów DNA**

Accessions from the Plant Breeding and Acclimatization Institute (R), Danko Breeding Co. (D) and Poznań Breeding Co. (P)

**Fig. 3. Association among restorer (Res), male sterile (P) and maintainer (N) inbred lines of rye revealed by UPGMA cluster analysis of 1482 DNA fragments**

## DYSKUSJA

Wykorzystanie w heterozyznej hodowli żyta systemu genowo-cytoplazmatycznej męskiej sterylności typu "Pampa" umożliwia łatwe utrzymanie pełnej sterylności mieszańców matecznych, gdyż geny typu "nonrestorer" (dopełniania sterylności) są dość powszechne w europejskich populacjach żyta. Poważną wadą tego typu niepłodności są trudności w wyhodowaniu efektywnych restorerów płodności, głównie ze względu na złożony sposób dziedziczenia tej cechy (Geiger i Miedaner, 1996; Kolańska, 1998) oraz niską częstość występowania genów przywracania płodności w europejskich populacjach żyta (Geiger i Morgenstern, 1975). Niepełne przywrócenie płodności mieszańców otrzymanych przy wykorzystaniu CMS-Pampa stwarza zagrożenie zarówno obniżenia plonu odmian mieszańcowych jak również jego jakości, spowodowane większym zakażeniem sporyzmem (*Claviceps purpurea*). Badania wykazały, iż głównymi czynnikami wpływającymi na stopień przywrócenia płodności mieszańców są: genotyp

restorera, genotyp męskosterylnej formy matecznej i współdziałanie obu genotypów (Kolasińska, 2001, 2003; Madej i in., 1976). Ponadto niektórzy autorzy wykazali silny wpływ środowiska na stopień przywrócenia męskiej płodności (Scoles i Evans, 1979; Geiger i in., 1995). W hodowli efektywnych restorerów płodności żyta bardzo przydatna wydaje się być identyfikacja markerów genów o wysokiej zdolności przywracania płodności, stwarzająca możliwość kumulacji różnych genów restoracji.

Poszukiwanie molekularnych markerów sprzężonych z genami przywracania męskiej płodności żyta prowadzili Geiger i Miedaner (1996) przy zastosowaniu pracochłonnej metody RFLP. Autorzy ci zlokalizowali dwa główne geny (chromosomy 1R i 4R) oraz trzy dodatkowe geny (chromosomy 3R, 5R i 6R) modyfikujące przywracanie płodności. Dotychczas zidentyfikowane markery, podobnie jak izoenzymatyczny marker na chromosomie 1R (Wricke i in., 1993), nie są ściśle sprzężone z genami restoracji.

Ze względu na pracochłonność i koszty metod hybrydacyjnych (RFLP) w ostatnich latach poszukiwania markerów cech użytkowych roślin w coraz większym stopniu związane są z systemami opartymi na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) lub metodami mieszanymi takimi jak AFLP. Metoda PCR z zastosowaniem starterów semi-specyficznych jest jedną z alternatywnych technik wykorzystującą wzrost informacji o sekwencjach genomów roślinnych. Wiarygodność stosowanej techniki potwierdzają wyniki analizy (podobieństwo genetyczne) linii męskosterylnych i ich analogów. Większość użytych starterów powielala znaczną liczbę fragmentów DNA z wysokim udziałem pasm polimorficznych. Jakkolwiek zarówno złożoność jak i polimorfizm powieleń wynika w dużej mierze z genetycznego zróżnicowania badanych materiałów, to otrzymane wyniki umożliwiają wybór do dalszych badań zestawu 20–25 starterów, które najlepiej różnicowały linie restorery od pozostałych badanych linii. Powszechnie stosowaną metodą identyfikacji markerów jest proponowany przez Michelmore i wsp. (1991) system analizy zestawu segregantów pokolenia F<sub>2</sub>. Segreganty, których spektrum DNA ma być porównywane w jak największym stopniu wykazywać powinny różnice badanej cechy, w tym przypadku różnice w płodności (sterylności).

#### WNIOSKI

1. Analiza molekularna przeprowadzona techniką PCR z zastosowaniem starterów semi-specyficznych wykazała, że badane linie restorery płodności wykazują cechy odrębności genetycznej w stosunku do linii męskosterylnych i dopełniających sterylność.
2. Analizowane linie męskosterylne wykazują znaczny stopień pokrewieństwa genetycznego z ich analogami — liniami dopełniającymi sterylność.

#### LITERATURA

- Davis L. G., Dibner M. D., Battey J. F. 1986. Basic methods in molecular biology. Elsevier Sci. Publ., New York: 42 — 43.
- Geiger H. H., Schnell F. W. 1970. Cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.). Crop Sci. 10: 590 — 593.

- Geiger H. H., Morgenstern K. 1975. Angewandt-genetische Studien zur cytoplasmatischen Pollensterilität bei Winterroggen. *Theor. Appl. Gen.* 46: 269 — 276.
- Geiger H. H., Yuan Y., Miedaner T., Wilde P. 1995. Environmental sensitivity of cytoplasmic-genic male sterility (CMS) in *Secale cereale* L. In: Genetic mechanisms for hybrid breeding. Kück U. and G. Wricke (eds.). *Advances in Plant Breeding* 18: 7 — 17.
- Geiger H. H., Miedaner T. 1996. Genetic basis and phenotypic stability of male- fertility restoration in rye. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* 35: 27 — 38.
- Geiger H. H., Miedaner T. 1999. Hybrid type and heterosis. In: The genetics and exploitation of heterosis in crops. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI: 439 — 450.
- Kolasińska I. 1998. Wpływ genotypu komponentów matecznych na płodność pyłku mieszańców żyta (CMS-SC × restorer). *Biul. IHAR* 205/206: 5 — 14.
- Kolasińska I. 2001. Przywracanie płodności pyłku u mieszańców żyta CMS-Pampa × restorer. *Biul. IHAR* 218/219: 341 — 349.
- Kolasińska I. 2003. Male fertility restoration of rye crosses in the “Pampa” cytoplasm. *Plant Breed. Seed Sci.* 47, 1/2: 33 — 37.
- Madej L. 1976. The genetic characteristics of three sources of male sterility in rye (*Secale cereale* L). *Hod. Rośl. Aklim.* 20: 157 — 174.
- 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.
- Melchinger A. E., Gumber R. K. 1997. Overview of heterosis and heterotic groups in agronomic crops. In: Concepts and breeding of heterosis in crop plants, K. R. Lamkey and J. E. Staub (eds.). *CSSA Spec. Publ.* 25 ASA and CSSA, Madison, WI: 29 — 44.
- Michelmore R. W., Paran I., Kesseli 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. Ntl. Acad. Sci. USA* 88: 9829 — 9832.
- 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.
- Scoles G. J., Evans L. E. 1979. The genetics of fertility restoration in cytoplasmic male-sterile rye. *Can. J. Genet. Cytol.* 21: 417 — 422.
- Wricke G., Wilde P., Wehling P., Gieselmann Ch. 1993. An isozyme marker for pollen fertility restoration in the Pampa cms system of rye (*Secale cereale* L). *Plant Breeding* 111: 290 — 294.