



Praktyczne zastosowanie markerów molekularnych w hodowli heterozyznej rzepaku ozimego (*Brassica napus* L. var. *oleifera*)

Wiesława Popławska, Alina Liersch, Iwona Bartkowiak-Broda
Zakład Roślin Oleistych, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Poznań

The practical use of molecular markers in hybrid breeding of winter oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *oleifera*)

Summary

Breeding of oilseed rape hybrid varieties in Poland is based on CMS *ogura* hybridization system. The marker assisted selection is used in selection of parental lines of F₁ hybrids. The markers of alleles of restorer gene *Rfo* are the most important in breeding programs. Also, the investigations on genetic distance of hybrid parental lines using molecular markers are undertaken aiming at its application for preliminary selection of F₁ combinations.

Key words:

winter oilseed rape, CMS *ogura*, genetic distance, molecular markers.

1. Wstęp

Dynamicznie rozwijająca się w ostatnich latach biologia molekularna stworzyła nowe sposoby analizowania zmienności genetycznej. Do niedawna bowiem prace genetyczne, jak i hodowlane opierały się wyłącznie na opisie fenotypowej ekspresji genów. Efektywność selekcji i badań genetycznych prowadzonych na tym poziomie jest ograniczona ze względu na zależności istniejące pomiędzy fenotypem i środowiskiem oraz genotypem i środowiskiem. Badania genotypów na poziomie molekularnym pozwalają na wyeliminowanie tych zależności.

Adres do korespondencji

Wiesława Popławska,
Zakład Roślin Oleistych,
Instytut Hodowli
i Aklimatyzacji Roślin,
ul. Strzeszyńska 36,
60-479 Poznań;
e-mail:
wiesp@nico.ihar.poznan.pl

Analiza polimorfizmu cząsteczek białkowych – izoenzymów oraz polimorfizmu DNA znalazła praktyczne zastosowanie w hodowli odmian mieszańcowych rzepaku. Hodowla wykorzystująca tylko metody klasyczne jest bowiem długotrwała i kosztowna, nie zapewnia dostatecznie szybkiego postępu hodowlanego.

Analiza polimorfizmu izoenzymów i DNA jest stosowana w selekcji linii restorerów dla systemu genowo-cytoplazmatycznej męskiej sterility CMS *ogura*, wykorzystywanej do hodowli odmian mieszańcowych rzepaku. Ponadto markery molekularne wykorzystywane są do określania dystansu genetycznego linii rodzicielskich mieszańców pokolenia F₁ w celu dokonania wstępnej selekcji kombinacji mieszańcowych, zanim zostaną wysiane w doświadczeniach polowych dla oceny ich wartości gospodarczej. W wielu badaniach wykazano bowiem, że im większe jest zróżnicowanie genetyczne linii rodzicielskich mieszańców, tym efekt heterozji jest większy. Także w wyniku krzyżowania linii o dużym dystansie genetycznym z większą częstotliwością uzyskuje się plenne mieszańce (1,2).

2. Selekcja linii restorerów dla systemu CMS *ogura*

Do hodowli odmian mieszańcowych pokolenia F₁ rzepaku ozimego w wielu ośrodkach hodowlanych w świecie, także w Polsce wykorzystywany jest system genowo-cytoplazmatycznej męskiej sterility CMS *ogura*. Wadą tego systemu są trudności z uzyskaniem plennych, o pożądanych cechach jakościowych, a zatem niskoglukozynolanowych linii restorerów, które jednocześnie powinny charakteryzować się pełną i stabilną ekspresją zdolności do restorowania.

Gen restorer *Rfo* został przeniesiony do genomu rzepaku z genomu rzodkwi (*Raphanus sativus* L.) poprzez krzyżowanie międzyrodzajowe między liniami rzepaku z cytoplazmą typu *ogura* oraz *Raphanobrassica* będącą nośnikiem tego genu (3). Jednak uzyskany materiał wyjściowy do hodowli charakteryzował się wysoką zawartością glukozynolanów, którą jest bardzo trudno obniżyć ze względu na ścisłe sprzężenie genu restorera z jednym z genów warunkujących wysoką zawartość tych związków (4). Także plenność form wyjściowych jest obniżona w wyniku zaburzeń, spowodowanych włączeniem do genomu rzepaku zbyt dużego odcinka informacji genetycznej pochodzącej od rzodkwi (5). W badaniach prowadzonych przez Delourme (4) i Popławską (6) wykazano, że możliwe jest wyeliminowanie tych cech poprzez wielokrotne krzyżowanie wsteczne form wyjściowych linii restorerów z ustabilizowanymi genetycznie męskopłodnymi, podwójnie ulepszonymi liniami rzepaku, a tym samym, dalsza eliminacja informacji genetycznej pochodzącej od rzodkwi. Ze względu na trudności w uzyskaniu wartościowych rekombinantów oraz w związku z tym, że selekcja metodami klasycznymi jest długotrwała podjęto badania nad możliwością wykorzystania markerów molekularnych do selekcji form z genem restorerem.

Początkowo, w hodowli był wykorzystywany, wykryty przez Delourme i Eber (7) izoenzymatyczny marker genu restorera PGI-2. Marker ten pozwala nie tylko na

stwierdzenie obecności genu restorera, ale dzięki kodominującemu charakterowi umożliwia odróżnianie form homozygotycznych (*Rfo Rfo*) od heterozygotycznych (*Rfo rfo*) pod względem alleli tego genu. System izoenzymatyczny PGI-2 pozwala także na odróżnianie genotypów, które utraciły marker typowy dla *B. napus*, ale posiadają allele genu restorera. W tym przypadku profile zymogramów są takie same jak dla genotypów *Raphanus sativus* z genem restorerem.

W liniach restorerach o wysokiej zawartości glukozyolanów występowało silne sprzężenie izoenzymatycznych alleli *Pgi-2* z genem restorerem. Współczynnik rekombinacji pomiędzy genem restorerem i markerem PGI-2 był bardzo niski i wynosił przykładowo dla populacji badanej w INRA-Francja $0,25 \pm 0,02\%$ (7), a dla populacji badanej w Zakładzie Roślin Oleistych IHAR $1,2\%$ (6).

W wyniku introgresji genomu ustabilizowanych genetycznie niskoglukozyolanowych linii rzepaku ozimego (poniżej $15 \mu\text{M/g}$ nasion) do genomu linii restorerów powstały nowe rekombinacje takie, które wraz z utratą odcinka DNA determinującego wysoką zawartość glukozyolanów utraciły także marker PGI-2 oraz takie, w których genomie marker ten został zachowany. Jednak w badanych populacjach prawie połowa linii restorerów charakteryzująca się niską zawartością glukozyolanów utraciła także allel *Pgi-2* (8). Zatem marker PGI-2 stał się nieprzydatny w hodowli.

W związku z tym podjęto badania mające na celu określenie innego markera, silniej sprzężonego z genem restorerem. W badaniach wykonanych przez Delourme i in. (9,10) stwierdzono sprzężenie czterech oligonukleotydowych markerów typu PCR-RAPD – OPC 02₁₁₅₀, OPD 02₁₀₀₀, OPF 06₁₂₀₀, OPG 02₇₀₀ z genem restorerem występującym w genomach francuskich linii rzepaku ozimego o różnej zawartości glukozyolanów.

Na podstawie badań pochodzących z polskiej hodowli populacji 102 linii restorerów o bardzo niskiej zawartości glukozyolanów stwierdzono w 100% przypadków sprzężenie genu restorera z markerem RAPD OPC 02₁₁₅₀ (8). Wynik ten wskazuje na możliwość wykorzystania tego markera w selekcji linii restorerów o pożądanej niskiej zawartości glukozyolanów.

Również do badań na obecność alleli genu restorera stosuje się specyficzny starter SCAR D 02. Starter ten uzyskano poprzez wyizolowanie z żelu pojedynczych, polimorficznych fragmentów DNA, wygenerowanych w wyniku reakcji RAPD przy udziale startera OPD 02. Produkt amplifikacji uwidacznia się w postaci pojedynczego, wyraźnego prążka związanego z określonym locus. Obecność prążka lub jego brak umożliwia jednoznaczny identyfikację genotypów z genem restorerem oraz genotypów pozbawionych tego genu. Obecność tego markera także stwierdzono we wszystkich badanych liniach, zawierających allele genu restorera (11).

Linie restorery są prowadzone na sterylnej cytoplazmie typu *ogura*. Fakt ten pozwala na sprawdzanie czystości wybranych linii restorerów za pomocą specyficznego dla sterylnej cytoplazmy *ogura* markera mitochondrialnego DNA typu PCR-SCAR według metody podanej przez Krishnasamy i Makaroff (12), zmodyfikowanej przez Mikołajczyk i in. (13).

Marker ten może być wykorzystywany we wszystkich programach badawczych i hodowlanych, do których użyte zostały rośliny ze sterylną cytoplazmą typu *ogura*. W produkcji materiału siewnego odmian mieszańcowych rzepaku marker ten może być pomocny do oceny czystości uzyskanych nasion.

3. Badanie zmienności genetycznej linii rodzicielskich mieszańców pokolenia F₁ utworzonych na bazie systemu CMS *ogura* za pomocą markerów izoenzymatycznych

W Zakładzie Roślin Oleistych IHAR rozpoczęto badanie polimorfizmu linii rodzicielskich mieszańców pokolenia F₁ w celu oceny dystansu genetycznego między nimi. Pierwszą grupą badanych markerów są wykazujące polimorfizm białek markery izoenzymatyczne. Badania wykonywane są na liniach rodzicielskich 20 różnych mieszańców pokolenia F₁.

Badania wykonano według metody opracowanej przez Schieldsa i in. (14) oraz Vellajosa (15) za pomocą następujących systemów izoenzymatycznych: przy pH 6,1 – IDH – dehydrogenaza izocytrynianowa, MDH – dehydrogenaza jabłczanowa, 6PGD – dehydrogenaza 6-fosfoglukonowa oraz przy pH 7,0 – LAP – aminopeptydaza leucynowa, PGI – izomeraza glukofosforanowa, PGM – fosfoglukomutaza.

Na obecnym etapie badań stwierdzono, że istnieje możliwość rozróżnienia badanych linii rodzicielskich mieszańców pokolenia F₁ przy wykorzystaniu systemów izoenzymatycznych PGI-2, MDH, 6PGD. Ponadto wykazano niewielkie znaczenie w rozróżnianiu linii rodzicielskich mieszańców pokolenia F₁ systemów LAP (pH 7,0), PGM (pH 7,0) oraz IDH (pH 6,1), ponieważ wiele badanych obiektów miało identyczny profil izoenzymatyczny.

Badanie polimorfizmu białek enzymatycznych może być jednym ze sposobów wspomagających klasyczną selekcję linii rodzicielskich mieszańców pokolenia F₁, a także jest pomocne przy ocenie czystości wyprodukowanego materiału mieszańcowego.

Literatura

1. Delourme R., Foisset N., (1991), Proc. 8th International Rapeseed Congress, 4, 1055-1060.
2. Lefort-Busson M., Guillot-Lemoine B., Bartkowiak-Broda I., (1987), Proc. 7th International Rapeseed Congress, 1, 63-68.
3. Heyn F. W., (1976), Cruciferae Newsletter Eucarpia, 1, 15-16.
4. Delourme R., Eber F., Renard M., (1995), Proc. 9th International Rapeseed Congress, Cambridge UK (4-7.07. 1995), 1, 6-8.
5. Pellan-Delourme R., Renard M., (1988), Genome, 30, 234-238.
6. Popławska W., (2000), *Badania nad formami restorującymi genowo-cytoplazmatyczną męską niepłodność typu polima i ogura u rzepaku ozimego (Brasica napus L. var. Oleifera)*, praca doktorska, ZRO-IHAR.
7. Delourme R., Eber F., (1992), Theor. Appl. Genet., 85, 222-228.

8. Bartkowiak-Broda I., Popławska W., Fürguth A., (2003), *Rośliny oleiste-oil crops* (w druku).
9. Delourme R., Bouchereau A., Hubert N., Renard M., Landry B. S., (1994), *Theor. Appl. Genet.* 88, 741-748.
10. Delourme R., Foisset N., Horvais R., Barret P., Champagne G., Cheung W. Y., Landry B. S., Renard M., (1998), *Theor. Appl. Genet.*, 129-134.
11. Popławska W., Bartkowiak-Broda I., (2001), *Biotechnologia*, 1(52), 112-118.
12. Krishnasamy S., Makaroff C., (1993), *Curr. Genet.*, 24, 156-163.
13. Mikołajczyk K., Matuszczak M., Piętka T., Bartkowiak-Broda I., Krzymański J., (1998), *Rośliny Oleiste*, XIX (2), 463-471.
14. Schields C. R., Orton C. J., Stuber C. W., (1983), in: *Isozymes in plants genetics and breeding*, p. A, Eds. Tanksley S.D., Orton T.J., Elsevier Sciences Publishers, 443-458.
15. Vallejos C. E., (1983), in: *Isozymes in plants genetics and breeding*, p. A, Eds. Tanksley S.D., Orton T.J., Elsevier Sciences Publishers, 469-516.