



Ocena introgresji genomu rzepaku (*Brassica napus* L.) do linii restorera dla CMS-ogura z wykorzystaniem markerów molekularnych

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

Introgression of *Brassica napus* genome into restorer lines for CMS-ogura estimated with the use of molecular markers

Summary

The object of research were double low restorer lines of CMS-ogura. The restorer gene was introgressed into rapeseed genotype from radish (*Raphanus sativus*) through intergeneric hybridisation. The obtained recombinants of rapeseed with the restorer gene comprise a DNA fragment originating from radish, which is bigger than the locus of the restorer gene. It disturbs the first meiotic behaviour in PMC. In addition, it has an impact on the fertility and yielding ability of restorer lines. Moreover, the restorer gene in the obtained recombinant is tightly linked with a gene responsible for high content of undesirable compounds in seeds – glucosinolates.

Elimination of the unnecessary DNA fragment is performed by backcrosses with double low lines of winter rapeseed. The changes in rapeseed genome which are a result of backcrosses are investigated by the use of molecular and isozyme markers.

Key words:

Brassica napus, restorer gene, introgression, molecular, isozyme markers.

Adres do korespondencji

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

1. Wstęp

Badania i hodowla podwójnie ulepszonych linii restorerów dla systemu genowo-cytoplazmatycznej męskiej niepłodności typu *ogura* u rzepaku są w ostatnich latach podstawowym tematem. Brak linii restorerów o odpowiednich cechach jakościowych i agronomicznych był dotychczas czynnikiem limitującym wykorzystanie tego systemu do tworzenia odmian mieszańcowych zrestorowanych rzepaku ozimego i jarego.

W związku z tym, że w obrębie gatunku *Brassica napus* nie występują geny restorery dla tego typu męskiej niepłodności gen ten został wprowadzony do rzepaku z genotypu rzodkwi (*Raphanus sativus* L.) poprzez krzyżowanie międzygatunkowe (1). Uzyskane rekombinanty rzepaku z genem restorerem zawierają znacznie większy odcinek DNA pochodzący od rzodkwi niż locus genu restorera. Powoduje to zaburzenia pierwszego podziału mejotycznego w KMP, a zatem wpływa na płodność i plenność linii restorerów (2). Ponadto w uzyskanym wyjściowym rekombinancie gen restorer jest ściśle sprzężony z genem odpowiedzialnym za wysoką zawartość w nasionach niepożądanych związków zwanych glukozynolanami. Eliminacji zbędnego odcinka DNA pochodzącego od rzodkwi, dokonuje się poprzez wielokrotne krzyżowanie wsteczne z ustabilizowanymi genetycznie męskopłodnymi podwójnie ulepszonymi liniami rzepaku ozimego, a następnie selekcję niskoglukozynolanowych rekombinantów zawierających gen restorer (3). Ponadto u wyselekcjonowanych linii restorerów o niskiej zawartości glukozynolanów ($< 20 \mu\text{M/g}$ nasion) zaobserwowano częstą utratę izoenzymatycznego markera genu restorera PGI-2 (4). Fakt ten, wskazywałby na możliwość dalszych zmian modyfikacyjnych zachodzących w obszarze introgresji genomu rzodkwi, polegających na utracie alleli rzodkwi *Pgi-2* wraz ze ściśle z nim sprzężonym fragmentem DNA odpowiedzialnym za wysoką zawartość glukozynolanów.

Celem przeprowadzonych badań było zagadnienie sprzężenia w formach niskoglukozynolanowych genu restorera z markerem izoenzymatycznym PGI-2 (5) oraz markerami molekularnymi typu PCR-RAPD (6) i PCR-SCAR występującymi w grupie sprzężeń z genem restorerem, a także ocena introgresji genomu rzepaku do linii restorera dla CMS-ogura.

2. Materiały i metody

Materiał do badań stanowiły rośliny pokolenia F_2 , F_3 i F_4 posiadające sterylną cytoplazmę typu *ogura*, będące potomstwem mieszańców pomiędzy podwójnie ulepszonymi liniami CMS *ogura* i wyjściową linią restorera **R**. Wyjściowa linia restorera była heterozygotyczna pod względem alleli genu restorera, bezerukowa, ale o wysokiej zawartości glukozynolanów – $60 \mu\text{M/g}$ nasion.

Selekcję genotypów z allelami genu restorera prowadzono na podstawie ekspresji fenotypowej oraz za pomocą markera izoenzymatycznego PGI-2 według metody opracowanej przez Shields'a i in. (7) oraz Vellajos'a (8).

Analizie PCR-RAPD poddano DNA wyekstrahowane z młodych liści niskoglukozynolanowych rekombinatów, wyselekcjonowanych w pokoleniu F_2 według zmodyfikowanej metody Doyle i Doyle (9). W analizie RAPD zastosowano cztery markery: OPC 02, OPD 02 oraz RAPD 6, RAPD 7 (6). Dodatkowo wykonano analizę DNA wykorzystując technikę SCAR i specyficzny starter SCAR D 02 według metody Paran'a i Michelmore'a (10).

Analizy zawartości glukozynolanów wykonano metodą sililowych pochodnych glukozynolanów za pomocą chromatografu gazowego firmy Perkin Elmer (11)

3. Wyniki i dyskusja

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono silne sprzężenie izoenzymatycznych alleli *Pgi-2* z genem restorerem w materiale wyjściowym, a zatem o wysokiej zawartości glukozynolanów (5). Współczynnik rekombinacji pomiędzy genem restorerem i markerem PGI-2 był bardzo niski i wynosił $0,25 \pm 0,02\%$. Obserwacje sposobu dziedziczenia genu restorera CMS-*ogura* wykazały, że został on wprowadzony z genotypu rzodkwi do genotypu rzepaku wraz z izoenzymatycznym markerem PGI-2. Marker ten pozwala nie tylko na stwierdzenie obecności genu restorera w wyprowadzanych rekombinantach linii restorerów, 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.

Badania nad możliwością wykorzystania markerów do selekcji form z genem restorerem i niską zawartością glukozynolanów przeprowadzono ze względu na trudności uzyskania tego typu rekombinatów oraz w związku z tym, że selekcja metodami klasycznymi jest długotrwała.

Na podstawie wykonanych analiz izoenzymatycznych przy użyciu markera PGI-2 na obecność genu restorera dla 740 rekombinatów pokolenia F_2 otrzymanego z mieszańców pomiędzy niskoglukozynolanowymi liniami CMS-*ogura* i wyjściową linią restorera określono częstotliwość sprzężenia markera z genem restorerem. Był on wysoki, wynosił 99,2%. W badaniach wykazano również wysoce istotną przydatność izoenzymu PGI-2 do selekcji homo- i heterozygot pod względem alleli genu restorera także u form niskoglukozynolanowych (tab. 1).

Dla 1035 roślin badanych pokoleń F_3 i F_4 fenotypowo męskopłodnych posiadających sterylną cytoplazmę wykonano także analizę na obecność markera izoenzymatycznego PGI-2. U 78 roślin stwierdzono utratę markera PGI-2, co jest jednoznaczne z brakiem w ich genotypach alleli rzodkwi *Pgi-2*. W dokonanej ocenie ekspresji fenotypowej potwierdzono, że wszystkie badane rośliny są męskopłodne, a zatem posiadają allele genu restorera pomimo utraty przez niektóre z nich marke-

ra PGI-2. W przeprowadzonej analizie zawartości glukozynolanów wykazano, że wszystkie genotypy pozbawione markera PGI-2 charakteryzują się niską zawartością tych związków w przedziale od 4,8 do 19,5 $\mu\text{M/g}$ nasion (tab. 2).

Tabela 1

Charakterystyka genetyczna badanej populacji

Pokolenie	Liczba analizowanych roślin	<i>Rfo Rfo</i>	<i>Rfo rfo</i>	<i>rfo rfo</i>	Utrata markera PGI-2
F ₂	740	86	325	329	–
F ₄	613	430	95	38	49
F ₃	422	153	209	31	29
suma dla F ₃ , F ₄	1035	583	04	69	78

Rfo Rfo – homozygota dominująca pod względem alleli genu restorera,

Rfo rfo – forma heterozygotyczna pod względem alleli genu restorera,

rfo rfo – homozygota recesywna pod względem alleli genu restorera.

Tabela 2

Zawartość glukozynolanów w nasionach roślin z utraconym markerem PGI-2

Linia nr polowy 1999	Liczba roślin z utraconym markerem PGI-2	Zawartość glukozynolanów ($\mu\text{M/g}$ nasion)
2403	5	12,6
2415	3	17,1
2417	3	17,8
2962/10	1	18,5
2425	11	12,5
2551	8	13,0
2427	1	13,4
2553	5	4,8
2965	2	6,8
2973/4	1	15,4
2973/8	1	16,3
2557	1	9,1
2455	8	10,1
2581	5	7,7
3001/5	1	19,5
2707	2	16,2
2990/4	1	6,4
2990/5	1	6,9
2996	10	6,4
2521	1	10,6
Razem	78	

Fakt ten, wskazywałby na możliwość dalszych zmian modyfikacyjnych, zachodzących w obszarze introgresji genomu rzodkwi, polegających na zachowaniu genu restorera przy jednoczesnej utracie alleli rzodkwi *Pgi-2* wraz ze ściśle z nim sprzężonym fragmentem DNA determinującym wysoką zawartość glukozynolanów. W po-

koleniach wcześniejszych, tj. F_1 i F_2 zjawisko utraty przez genotyp markera PGI-2 z zachowaniem genu restorera było sporadyczne i występowało u 1,2% roślin badanych populacji (12). W badanych pokoleniach F_3 i F_4 niskoglukozyolanowe linie restorera, które utraciły marker izoenzymatyczny stanowiły 7,8% badanej populacji.

Ustalono, że introgresja genu restorera z genomu rzodkwi do genomu rzepaku związana jest z przeniesieniem znacznie dłuższego odcinka chromosomu rzodkwi niż locus jakie zajmuje ten gen (13). W związku z tym podjęto próby dokładnego oszacowania wielkości segmentu chromosomu z locus genu restorera poprzez określenie jak największej liczby markerów molekularnych DNA w tym obszarze. W wyniku badań przeprowadzonych na wyjściowej linii z genem restorerem dla CMS-ogura stwierdzono ściśle sprzężenie (brak rekombinacji między genem restorerem i markerami) czterech markerów typu PCR-RAPD z tym genem (6).

Celem przeprowadzonych badań dla roślin pokolenia F_2 było stwierdzenie, czy markery te pozostają sprzężone z genem restorerem także w rekombinantach o niskiej zawartości glukozyolanów.

Materiał do badań stanowiło 9 rekombinantów rzepaku ozimego pokolenia F_2 z genem restorerem, wyselekcjonowanych na podstawie zawartości glukozyolanów w ich nasionach, która mieściła się w przedziale od 12,9 do 22,3 $\mu\text{M/g}$ nasion. Dla średnio dziesięciu roślin z każdej linii najpierw wykonano analizę izoenzymatyczną za pomocą izoenzymu PGI-2. Wśród 80 przebadanych roślin u 52 stwierdzono obecność markera PGI-2 (tab. 3). Dla tych samych roślin wykonano badania za pomocą markerów PCR-RAPD.

W badaniach wykorzystano cztery startery: OPC 02, OPD 02 o znanej sekwencji nukleotydów (6) oraz RAPD 6, RAPD 7 (określone w Laboratorium Biologii Molekularnej INRA we Francji), których sekwencja nie została jeszcze oficjalnie opublikowana. Wszystkie wymienione startery wykazały polimorfizm badanego materiału roślinnego, potwierdzony obecnością charakterystycznych prążków, z których każdy odpowiada fragmentowi DNA o ściśle określonej długości, a jednocześnie jest związany z locus alleli genu restorera.

W grupie 80 analizowanych genotypów w 52, tych samych u których stwierdzono wcześniej allele genu restorera i markera PGI-2, potwierdzono obecność markerów PCR-RAPD. Udowodniono tym samym istnienie silnego sprzężenia czterech markerów molekularnych użytych w badaniach z locus genu restorera dla wszystkich analizowanych genotypów (tab. 3).

Tabela 3

Zawartość glukozyolanów oraz wyniki analiz z użyciem markerów RAPD i izoenzymu PGI-2 dla rekombinantów z genem restorerem wyselekcjonowanych w pokoleniu F₂

Genotyp	Zawartość glukozyolanów (μM/g nasion)	Liczba badanych roślin	Liczba roślin z:					
			PGI +	PGI -	OPD 02+	OPC 02+	RAPD 6+	RAPD 7+
8022/6/97	17,4	10	10	0	10	10	10	10
8027/5/97	20,0	10	5	5	5	5	5	5
8035/5/97	20,2	10	3	7	3	3	3	3
8041/4/97	22,3	10	9	1	9	9	9	9
8043/9/97	12,9	7	3	4	3	3	3	3
8086/10/97	18,4	10	7	3	7	7	7	7
8391/1/97	20,2	6	4	2	4	4	4	4
8376/5/97	13,6	10	6	4	6	6	6	6
8434/4/97	20,0	7	5	2	5	5	5	5
suma		80	52	28	52	52	52	52

W jednej reakcji RAPD wykrywa średnio nawet do dziesięciu loci i nie zawsze odczyt jej rezultatów jest prosty. Aby wyeliminować ograniczenia techniki RAPD i zagwarantować większą powtarzalność wyników wstępnie wyselekcjonowane linie z genem restorerem poddano dodatkowej analizie wykorzystując technikę SCAR (*Sequences Characterized Amplified Region*) i specyficzny starter SCAR D 02. Obecność tego markera także stwierdzono we wszystkich badanych genotypach, zawierających allele genu restorera.

Wyniki te są zgodne z mapą genetyczną rzepaku (14), gdzie marker PGI-2 oraz polimorficzne fragmenty DNA syntetyzowane przy użyciu starterów OPC02, OPD02, RAPD 6, RAPD 7 są zlokalizowane w jednej grupie sprzężeń. Fakt ten potwierdza ściśle sprzężenie użytych markerów z genem restorerem również w przypadku utraty przez genom rośliny fragmentu DNA odpowiedzialnego za wysoką zawartość glukozyolanów.

4. Podsumowanie

Wszystkie genotypy, które utraciły część informacji genetycznej pochodzącej od rzodkwi – utrata markera PGI-2 – charakteryzują się niską zawartością glukozyolanów (< 20 μM/g nasion), co wskazuje na całkowite przerwanie sprzężenia genu restorera z genem warunkującym wysoką zawartość glukozyolanów. Linie te wymagają jednak oceny pod względem plenności, ponieważ w przeprowadzonych badaniach wykazano (4), że takie formy charakteryzują się niską plennością, w przypadku gdy są homozygotami (*Rfo Rfo*), gdyż wraz z markerem PGI-2 tracą fragment informacji genetycznej rzepaku. Markery typu PCR-RAPD, które pochodzą od rzodkwi, jak wykazano w przeprowadzonych badaniach, a także w bada-

niach innych autorów (4), występują także w genotypach o niskiej zawartości glukozyolanów.

W wyniku introgresji genomu ustabilizowanych genetycznie linii rzepaku do linii restorera mogą powstać różne rekombinacje: formy pozbawione odcinka DNA determinującego wysoką zawartość glukozyolanów, które utraciły sprzężony marker PGI-2 oraz markery PCR-RAPD, a także takie w których genomie markery te zostały zachowane. W drugim przypadku wynik ten wskazuje, że pozostała jeszcze znaczna część informacji genetycznej pochodzącej od rzodkwi.

Zatem dla uzyskania postępu w eliminacji zbędnej informacji genetycznej od rzodkwi konieczne jest przeprowadzenie badań za pomocą markerów molekularnych, które pozwolą ocenić wielkości introgresji genomu rzepaku co linii restorera dla CMS-*ogura*.

Literatura

1. Heyn F. W., (1976), *Cruciferae Newsletter Eucarpia*, 1, 15-16.
2. Pellan-Delourme R., Renard M., (1988), *Genome*, 30, 234-238.
3. Delourme R., Eber F., Renard M., (1995), *Proc. 9th International Rapeseed Congress*, Cambridge UK (July 4-7), 1, 6-8.
4. Delourme R., Horvais R., Vallée P., Renard M., (1999), *Proc. 10th Int. Rapeseed Congress*, Canberra-Australia, (September 26-29), CD-ROM.
5. Delourme R., Eber F., (1992), *Theor. Appl. Genet.*, 85, 222-228.
6. Delourme R., Bouchereau A., Hubert N., Renard M., Landry B. S., (1994), *Theor. Appl. Genet.*, 88, 741-748.
7. Shields C. R., Orton C. J., Stuber C. W., (1983), in: *Isozymes in Plants Genetics and Breeding*, part A, Eds. Tanksley S. D., Orton T. J., Elsevier Sciences Publishers, B. V., Amsterdam, 443-458.
8. Vallejos C. E., (1983), *Enzyme activity staining*, in: *Isozymes in Plants Genetics and Breeding*, part A, Eds. Tanksley S. D., Orton T. J., Elsevier Sciences Publishers, B. V., Amsterdam, 469-516.
9. Doyle J. J., Doyle J. L., (1990), *Focus*, 12, 13-15.
10. Paran I., Michelmore R. W., (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 85, 985-993.
11. Michalski K., Kołodziej K., Krzymański J., (1995), *Proc. 9th International Rapeseed Congress*, Cambridge UK (July 4-7), 3, 911-913.
12. Popławska W., (2000), *Badania nad formami restorującymi genowo-cytoplazmatyczną nieską nieplodność typu polima i ogura u rzepaku ozimego (Brassica napus L. var. Oleifera)*, Praca doktorska, ZRO-IHAR Poznań.
13. Delourme R., Foisset N., Horvais R., Barret P., Champagne G., Cheung W. Y., Landry B. S., Renard M., (1998), *Theor. Appl. Genet.*, 129-134.
14. Foisset N., Delourme R., Barret P., Hubert N., Landry B. S., Renard M., (1996), *Theor. Appl. Genet.*, 93, 1017-1025.