

IWONA BARTKOWIAK-BRODA

ALINA LIERSCH

MARCIN MATUSZCZAK

KATARZYNA MIKOŁAJCZYK

WIESŁAWA POPLAWSKA

JOANNA WOLKO

JOANNA NOWAKOWSKA

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Kierownik Tematu: prof. dr hab. Iwona Bartkowiak-Broda Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin —

Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie, Oddział w Poznaniu, ul. Strzeszyńska 36,

60-479 Poznań, tel. 61 8233721, e-mail: ibart@nico.ihar.poznan.pl

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.802.19.2018, Zadanie 48.

Badanie genomu rzepaku ozimego przy wykorzystaniu markerów molekularnych

The investigations of winter rapeseed genome with the use of molecular markers

Słowa kluczowe: fenotyp, genom, markery molekularne, rzepak ozimy (*Brassica napus* L.)

Rzepak oleisty, *Brassica napus* L. var. *oleifera* Metzg., stanowi ważną, drugą po soi, uprawną roślinę oleistą klimatu umiarkowanego. Hodowany jest głównie ze względu na olej nasion, wykorzystywany w przemyśle spożywczym, a także jako surowiec w przemyśle chemicznym, farmaceutycznym oraz w technologii produkcji biopaliw płynnych. Pozostała po ekstrakcji (bądź wytłoczeniu) oleju śruta poekstrakcyjna/makuch jest źródłem wysokobiałkowej paszy dla zwierząt hodowlanych.

Ze względu na coraz szersze wykorzystanie oleju i białka z nasion rzepaku programy hodowli ukierunkowane są na wytwarzanie odmian i form hodowlanych cechujących się przede wszystkim wysoką plennością, odpornością na stresy abiotyczne i biotyczne, a także określonymi cechami jakościowymi, jak zróżnicowana zawartość kwasów tłuszczowych w oleju nasion, wysoka zawartość tłuszczu i białka, niska zawartość włókna. Poszukiwane są również nowe źródła zmienności genetycznej, poszerzające zawężoną, wskutek intensywnej hodowli odmian podwójnie ulepszonych, pulę genową

rzepaku; otrzymywane są one między innymi na drodze resyntezy z gatunków ancestralnych, tj. *Brassica rapa* i *Brassica oleracea*.

W IHAR — PIB, Oddział Poznań, w wyniku wieloletnich prac badawczych wytworzone zostały wartościowe unikalne formy hodowlane rzepaku: podwójnie ulepszone odmiany populacyjne, formy rodzicielskie mieszańców F_1 dla hodowli heterozyjnej realizowanej w oparciu o system CMS *ogura*, linie o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych w oleju nasion, ekstremalnie niskiej zawartości glukozyolanów i niskiej zawartości włókna paszowego (nasiona o żółtej barwie), a także linie hodowlane otrzymane w wyniku resyntezy z gatunków ancestralnych. Wraz z odmianami polskimi i zagranicznymi, stanowią cenną kolekcję obejmującą zróżnicowany materiał roślinny. Dla pełnego wykorzystania tych materiałów w dalszej hodowli twórczej niezbędne jest prowadzenie badań podstawowych, umożliwiających poznanie zależności strukturalnych i funkcjonalnych analizowanych genomów.

Celem badań prowadzonych w ramach zadania jest charakterystyka molekularna oraz określenie zróżnicowania genetycznego kolekcji form hodowlanych rzepaku, obejmującej istotne gospodarczo linie i odmiany hodowlane. Badania te umożliwią poznanie struktury genomów, stopnia pokrewieństwa między nimi, a także identyfikację markerów genetycznych, charakterystycznych dla określonych form hodowlanych (fingerprinting). Szczególnie istotne są badania nad lokalizacją rejonów genomu odpowiedzialnych za plon (efekt heterozji u odmian mieszańcowych) i jego składniki. Uzyskane wyniki będą stanowiły podstawę do analiz strukturalnych i funkcjonalnych genomów służących efektywnej i skutecznej selekcji w hodowli twórczej.

W badaniach genomu różnych gatunków roślin w tym także rzepaku obok wcześniej wykorzystywanych markerów molekularnych typu RFLP, RAPD, SCAR stosuje się markery typu AFLP, CAPS, STR, a także coraz powszechniej, w wyniku rozwoju wysokowydajnych technik badawczych nowej generacji — SNP (Olejniczak, Mikołajczyk, 2013). Markery molekularne znajdują zastosowanie do mapowania genetycznego, mapowania asocjacyjnego, identyfikacji rodziców i potomstwa, identyfikacji danej próby, zarówno na poziomie indywidualnym, jak i populacyjnym (Plieske i Struss, 2001). Mogą więc służyć nie tylko do określania wzajemnych zależności między osobnikami w badanej populacji lub kolekcji, lecz także do precyzyjnej identyfikacji danego genotypu na zasadzie odcisku palca (ang. fingerprinting) (Plieske i Struss, 2001; Hasan i in., 2006). W badaniach genomu rzepaku prowadzonych w wielu ośrodkach na świecie określono *loci* QTL, a także rejonu zasocjowane z cechami związanymi z plonem nasion, składnikami plonu, cechami fenologicznymi, odpornością na patogeny oraz istotnymi gospodarczo cechami jakościowymi, jak zawartość oleju, kwasu erukowego i glukozyolanów w nasionach (Basunanda i in., 2007). Analiza genomów różnych odmian rzepaku przy użyciu markerów molekularnych umożliwia określenie dystansu genetycznego pomiędzy osobnikami danej populacji, jak również stopnia pokrewieństwa; przy wysokim nasyceniu markerami możliwe jest poznanie aranżacji badanych genomów i wytypowanie regionów odpowiedzialnych za istotne cechy fenotypowe, a ponadto precyzyjne określenie rejonów genomu pochodzących z różnych źródeł genetycznych oraz identyfikację

markerów do selekcji form wykazujących cechy odmian podwójnie ulepszonych w nowym kontekście genetycznym (Basunanda i in., 2007). Ponadto, markery molekularne zostały wykorzystane do mapowania porównawczego *loci* QTL wpływających na efekt heterozji biomasy siewek i struktury plonu populacji segregujących rzepaku (Basunanda i in., 2010), jak również do określania struktury populacji i analiz asocjacyjnych (Hasan i in., 2008), a także w genomice strukturalnej i porównawczej, z wykorzystaniem *A. thaliana* (Delourme i in., 2006; Hasan i in., 2008; Basunanda i in., 2010).

Skuteczna selekcja w hodowli twórczej opiera się, w coraz szerszym zakresie, na analizach genomów. Umożliwiają one wyznaczenie zróżnicowania genetycznego w obrębie badanych form hodowlanych, wytypowanie markerów genetycznych znajdujących zastosowanie w procesie hodowlanym (ang. Marker Assisted Selection, MAS), a także określenie zestawu markerów charakterystycznych dla danego genotypu (ang. fingerprinting) (Plieske i Struss, 2001; Hasan i in., 2006).

Material roślinny: wytypowany do badań w realizowanym zadaniu stanowią: linie hodowlane i odmiany populacyjne rzepaku, linie męskosterylne, posiadające cytoplazmę typu *ogura*, linie restorery z genem *Rfo*, formy ich rekombinantów z liniami zmutowanymi o podwyższonej zawartości kwasu oleinowego (C18:1) w oleju nasion oraz o obniżonej zawartości kwasu linolenowego (C18:3), linie żółtonasienne, jak również wartościowe formy *B. napus* otrzymane w wyniku resyntezy. W sumie 2 kolekcje po 25 genotypów: kolekcja PB14-17 badana w latach 2014–2017 oraz kolekcja PB2017-2020 przewidziana do badań w latach 2017–2020.

Charakterystyka molekularna: genotypy badanych roślin określane są przy użyciu markerów genetycznych typu AFLP, a także z zastosowaniem markerów *loci* mikrosatelitarnych (SSR).

Składniki mieszańca F₁, linie restorery z genem *Rfo* i linie męskosterylne z cytoplazmą typu *ogura*, a także mieszańce zrestorowane są monitorowane przy użyciu odpowiednich markerów SCAR w systemie multiplex PCR (Mikołajczyk i in., 2011).

Genotypy wysokooleinowe i ich rekombinanty są charakteryzowane przy pomocy kodominującego markera typu CAPS, identyfikującego dwie formy zmutowane genu desaturazy *FAD2*, *BnaA.FAD2* w genomie *A Brassica. napus*, kodującego enzym regulujący zawartość kwasu oleinowego w oleju nasion (Falentin i in., 2007).

Genotypy niskolinolenowe i ich rekombinanty są identyfikowane z zastosowaniem opracowanych markerów typu SNaPshot, specyficznych dla niezmutowanych i zmutowanych alleli genów desaturazy *FAD3* w genomach A i C *B. napus*, odpowiednio *BnaA.FAD3* i *BnaC.FAD3*, jak również przy użyciu nowoczesnego, unikalnego testu genetycznego, określonego jako ‘multiplex fluorescencyjny’.

Charakterystyka fenotypowa: 2 kolekcje genotypów po 25 obiektów są poddane systematycznym obserwacjom fenotypowym w doświadczeniach polowych w powtórzeniach, w 6 środowiskach (2 miejscowości × 3 lata). Badane są następujące cechy: elementy struktury plonu, cechy fenologiczne, zawartość kwasów tłuszczowych (C18:1, C18:3), glukozyolanów, a w przypadku form resyntetycznych również kwasu erukowego (C22:1).

Opracowanie statystyczne otrzymanych wyników analiz fenotypowych i genotypowych jest przeprowadzane przy użyciu pakietu statystycznego GenStat v.7.1 oraz PeakScanner 1.0.

WYNIKI

Obie populacje PB14-17 i PB17-20 badane w doświadczeniach polowych wykazały istotne różnicowanie pod względem większości ocenianych cech agronomicznych i jakościowych, co uprawnia do wykorzystania tych materiałów do wykonania analiz asocjacyjnych z markerami molekularnymi.

Określono asocjacje genotyp/środowisko dla kolekcji genotypów PB14-17. Analizy asocjacyjne dla 7 cech ilościowych (wczesność i długość kwitnienia, MTN, liczba rozgałęzień i łuszczyń na roślinie oraz długość łuszczyzny i liczba nasion w łuszczyńce), a 779 markerami (2 markery typu SCAR-CMS i *Rfo*; 2 markery CAPS dla FAD2-HOR3 i HOR 4, 4 markery typu SNAPshot dla FAD3, 10 kombinacji starterów AFLP oraz 84 *loci* STR) były estymowane z użyciem analizy regresji. W sumie zaobserwowano 2861 asocjacji z przynajmniej jedną cechą w przynajmniej jednym środowisku. Dla sześciu środowisk zaobserwowano asocjacje 7 markerów DNA z cechami struktury plonu: dł. łuszczyzny (1 marker SSR, 2 markery AFLP), MTN (1 marker SSR i 2 markery AFLP) oraz dla liczby rozgałęzień (1 marker SSR).

Takim samym badaniom poddawana jest druga populacja PB17-20.

W wyniku dotychczasowych badań przeprowadzonych dla obu populacji z zastosowaniem markerów *loci* STR zdefiniowano pulę 85 *loci* mikrosatelitarnych dogodnych do badań podobieństwa i różnicowania genetycznego pomiędzy różnymi genotypami form hodowlanych rzepaku. Znaczna większość tych markerów była polimorficzna w obrębie badanych genotypów i wykazywała od dwóch do sześciu alleli na *locus*. Ponadto, analiza ta charakteryzuje się wysoką powtarzalnością, stanowi dogodne narzędzie do badań różnicowania genetycznego w obrębie kolekcji genotypów rzepaku oraz analiz asocjacyjnych z cechami fenotypowymi związanymi ze strukturą plonu oraz cechami jakościowymi, wpływającymi na wartość agronomiczną poszczególnych genotypów.

LITERATURA

- Basunanda P., Radoev M., Ecke W., Friedt W., Becker H. C., Snowdon R. J. 2010. Comparative mapping of quantitative trait loci involved in heterosis for seedling and yield traits in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 120: 271 — 281.
- Basunanda P., Spiller T., Hasan M., Gehringer A., Schondelmeier J., Lühs W., Friedt W., Snowdon R. J. 2007. Marker-assisted increase of genetic diversity in a double-low seed quality winter oilseed rape genetic background. *Plant Breeding* 126: 581 — 587.
- Delourme R., Falentin C., Huieau V., Clouei V., Horvais R., Gandon B., Specel S., Hanneon L., Dheu J. E., Deschamps M., Margale E., Vincourt P., Renard M. 2006. Genetic control of oil content in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 113: 1331 — 1345.
- Falentin C., Brégeon M., Lucas M.-O., Renard M. 2007. Genetic markers for high oleic content in plants. *International Patent Publication WO 2007/138444*.

- Hasan M., Seyis F., Badani A. G., Pons-Kühnemann J., Friedt W., Lühs W., Snowdon R., J. 2006. Analysis of genetic diversity in the *Brassica napus* L. gene pool using SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 793 — 802.
- Hasan M., Friedt W., Pons-Kühnemann J., Freitag N. M., Link K., Snowdon R. 2008. Association of gene-linked SSR markers to seed glucosinolates content in oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *napus*). *Theor. Appl. Genet.* 116 (8): 1035 — 1049.
- Mikolajczyk K., Bartkowiak-Broda I., Poplawska W., Spasibionek S., Dobrzycka A., Dabert M. 2011. A multiplex fluorescent PCR assay in molecular breeding of oilseed rape. In: *Plant Breeding*, Ed. by InTech Open Access Publisher (ed. Abdurakmonov I. Y.), Chapter 8: 185 — 200 pp. (352 pages).
- Nei M., Li W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269 — 5273.
- Olejniczak O., Mikołajczyk K. 2013. Zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli molekularnej rzepaku. *Rośliny Oleiste — Oilseed Crops XXXIV* (1): 7 — 26.
- Plieske J., Struss D. (2001) Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica*. I. development in *Brassica napus* and abundance in *Brassicaceae* species. *Theor. Appl. Genet.* 102 (5): 689 — 694.

