

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 48.

Tytuł zadania: **Badanie genomu rzepaku ozimego przy wykorzystaniu markerów molekularnych.**

Kierownik zadania: *prof. dr hab. I. Bartkowiak-Broda*

#### Cel zadania:

Charakterystyka molekularna oraz określenie zróżnicowania kolekcji odmian i linii rzepaku o znaczeniu gospodarczym

#### Materiały i metody:

Materiał roślinny stanowiły polskie i zagraniczne odmiany populacyjne rzepaku ozimego, a także genotypy rzepaku wytworzone i znajdujące się w kolekcji IHAR-PIB, Oddz. Poznań: mieszańce F<sub>1</sub> oraz linie CMS *ogura* i linie restorery *Rfo* dla systemu hybrydyzacji CMS *ogura*, linie podwojonych haploidów (DH), linie mutantów o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych w oleju nasion i ich rekombinanty, linia DH o żółtej barwie nasion, a także linia rzepaku otrzymana w wyniku resyntezy z gatunków podstawowych.

Wyizolowano genomowy DNA z 27 roślin z badanej kolekcji, a następnie prowadzono analizy molekularne. Stopień podobieństwa genetycznego badano z zastosowaniem markerów typu AFLP, w oparciu 10 kombinacji starterów i enzymy restrykcyjne *EcoR* I / *Mse* I oraz wybranych 48 *loci* mikrosatelitarnych (STR), ze znakowanymi fluorescencyjnie starterami metodą 'M13-tailing'. Występowanie męsko-sterylnej cytoplazmy typu *ogura* oraz genu restorera *Rfo* monitorowano przy użyciu analizy 'multiplex PCR', natomiast formy alleliczne genów desaturaz *Fad2* i *Fad3* identyfikowano, odpowiednio, z zastosowaniem kodominującego markera CAPS oraz allelo-specyficznych markerów funkcjonalnych typu SNaPshot. Produkty reakcji analizowano metodą elektroforezy w żelu agarozowym wybarwianym bromkiem etydyny oraz z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej; te ostatnie odczytywano stosując program PeakScanner.

Podobieństwo genetyczne (GS) badanych obiektów oszacowano stosując miarę Nei i Li. Współczynniki posłużyły do hierarchicznego grupowania linii metodą średnich połączeń. Wyniki przeprowadzonych grupowań przedstawiono w formie dendrogramów. Wszystkie obliczenia wykonano korzystając z pakietu statystycznego GenStat.

Przed założeniem doświadczeń polowych namnożono w szklarni materiał siewny i poddano kompleksowej analizie biochemicznej dla określenia zawartości tłuszczu, białka ogólnego, włókna pokarmowego, glukozyolanów oraz składu kwasów tłuszczowych w oleju nasion. Wybrano 25 genotypów i wysiano w dwóch doświadczeniach polowych (Łagiewniki i Borowo) w układzie bloków kompletnie zrandomizowanych, w czterech powtórzeniach. Wykonano ocenę bonitacyjną wschodów i stanu roślin przed zimą w skali 1-9 na wszystkich obiektach doświadczenia, określono obsadę roślin przed zimą oraz zawartość chlorofilu w roślinach.

#### Wyniki i dyskusja:

Określono stopień podobieństwa w obrębie badanej kolekcji genotypów rzepaku w wyniku analizy AFLP oraz STR. Zastosowano 10 kombinacji starterów AFLP i otrzymano 442 produkty amplifikacji, w tym 362 były polimorficzne. Jeden starter generował średnio 36,2 markera. Liczba polimorficznych fragmentów DNA dla pojedynczego startera wahała się od 16 do 48. W reakcji ze starterem E-ACC NED : M-CAC otrzymano największą liczbę polimorficznych fragmentów DNA — 48. Najwyższy poziom polimorfizmu — 97,43 otrzymano dla kombinacji starterów E-ACC NED : M-CTC. Poziom polimorfizmu dla poszczególnych kombinacji starterów wynosił około 81%. Wszystkie kombinacje starterów różnicowały badane genotypy rzepaku ozimego. Na podstawie analizy polimorfizmu markerów AFLP przeprowadzonej przy użyciu 258 różnicujących markerów otrzymanych w wyniku analiz za pomocą 7 par starterów AFLP na 26 badanych genotypach rzepaku utworzono dendrogram ich podobieństwa genetycznego; genotypy zostały przyporządkowane do poszczególnych grup zgodnie z ich pochodzeniem. Metoda AFLP jest używana do określania zróżnicowania genetycznego genotypów roślin w badaniach prowadzonych w wielu ośrodkach na świecie; w IHAR-PIB, Oddz. Poznań stosowana jest od kilku lat, a wprowadzona ostatnio metoda analizy barwionych fluorescencyjnie produktów reakcji z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej umożliwiła zwiększenie efektywności prowadzonych badań. Dzięki temu można poszerzać zakres analizowanych *loci* określanymi metodą AFLP, co zwiększa precyzyjność badań.

Wykonano analizę zróżnicowania w obrębie 27 genotypów rzepaku z badanej kolekcji przy użyciu par starterów dla 48 *loci* STR, przy czym jednoznaczne analizy można było przeprowadzić dla 15 spośród analizowanych genotypów oraz 35 *loci*. Dla każdego locus zidentyfikowano od 1 do 4 lub 6 polimorficznych produktów amplifikacji; niektóre były monomorficzne. Wyznaczono wstępnie dendrogram podobieństwa genetycznego, który częściowo odzwierciedlał pochodzenie badanych genotypów. Markery mikrosatelitarne, podobnie jak innego typu markery genetyczne, znajdują zastosowanie do mapowania genetycznego, mapowania asocjacyjnego, identyfikacji rodziców i potomstwa, identyfikacji danej próby, zarówno na poziomie indywidualnym, jak i populacyjnym; mogą służyć nie tylko do określania wzajemnych zależności między osobnikami w badanej populacji lub kolekcji, lecz także precyzyjnej identyfikacji danego genotypu na zasadzie odcisku palca (ang. *fingerprinting*). Rozpoczęte analizy z zastosowaniem uniwersalnych markerów *loci* STR stanowią o postępie w badaniach genomu rzepaku w IHAR-PIB, Oddz. Poznań.

Wykazano, metodą 'multiplex PCR', występowanie męko-sterylnej cytoplazmy CMS *ogura* w 11 z 27 badanych genotypów, a gen restorer *Rfo* – w 7 genotypach. Markery te są bardzo przydatne do jednoznacznej identyfikacji genotypów mieszańców  $F_1$ , a także rekombinantów linii z genem *Rfo*, które fenotypowo są identyczne z odmianami populacyjnymi; ich zastosowanie pozwoliło na precyzyjną identyfikację pożądanych genotypów.

Obecność zmutowanych homozygotycznych alleli *fad2A* wykryto metodą CAPS w trzech liniach, heterozygotycznych – w dwóch, natomiast zmutowanych homozygotycznych alleli *fad3A* i *fad3C* (metodą SNaPshot) – w dwóch genotypach; heterozygot nie stwierdzono. Zastosowane markery typu CAPS i SNaPshot umożliwiają jednoznaczną identyfikację form allelicznych genów desaturaz *Fad2* i *Fad3* w genomach A i C rzepaku odpowiedzialnych za cechy zawartości, odpowiednio, kwasu oleinowego i linolenowego w oleju nasion linii mutantów rzepaku ozimego, otrzymanych w IHAR-PIB, Oddz. Poznań. Dotąd należą one do nielicznych tego typu opublikowanych markerów funkcjonalnych.

Wykonana przed siewem ocena biochemiczna nasion rzepaku 25 badanych obiektów wykazała ich zróżnicowanie pod względem: procentowej zawartości tłuszczu w nasionach w zakresie od 38,5% do 53,4%, zawartości włókna NDF od 21,2% do 32,5%, zawartości włókna ADF od 14,1% do 30,4% oraz zawartości białka ogólnego w zakresie od 15,7% do 26,5%. Analiza chemiczna składu kwasów tłuszczowych nasion uwidoczniła również dużą zmienność zawartości: kwasu oleinowego (od 60,2% do 83,6%), kwasu linolowego (od 5,3% do 23,5%), kwasu linolenowego (od 3,3% do 11,5%). Duże zróżnicowanie badane obiekty wykazały także w zawartości sumy glukozydów (od 3,8  $\mu\text{mol g}^{-1}$  do 65,5  $\mu\text{mol g}^{-1}$ ) oraz glukozydów alkenowych (od 1,4  $\mu\text{mol g}^{-1}$  do 62,6  $\mu\text{mol g}^{-1}$ ). Analizy nasion wykonane uproszczoną metodą NIRS w pełni potwierdziły zróżnicowanie jakościowe nasion badanych genotypów. Przy wyborze genotypów do badań kierowano się zarówno pochodzeniem danych materiałów jak również obserwacjami ekspresji fenotypowej cech jakościowych takich jak zawartość glukozydów, profile kwasów tłuszczowych oraz zawartość białka i włókna.

Ocena punktowa wschodów i stanu roślin przed zimą wykonana w obu doświadczeniach polowych i na wszystkich obiektach wykazała statystycznie wysoce istotne ich zróżnicowanie. Istotne zróżnicowanie obiektów stwierdzono także w obsadzie roślin przed zimą na poletkach doświadczalnych oraz zawartości chlorofilu w liściach, która kształtowała się w zakresie od 45 do 56,2 jedn. SPAD.

#### Wnioski:

Uzyskane wyniki analiz molekularnych wykazują przydatność markerów molekularnych do określenia zmienności genetycznej rzepaku ozimego ze względu na dużą precyzję, powtarzalność, która jest porównywalna do badań przeprowadzonych tymi metodami w innych ośrodkach badawczych na roślinach z rodziny *Brassicaceae*. Badania te będą kontynuowane poprzez zwiększenie liczby badanych *loci* w analizie stopnia podobieństwa genetycznego pomiędzy liniami rzepaku ozimego w obrębie badanej kolekcji z zastosowaniem markerów typu AFLP i STR, jak również poprzez dążenie do uzyskania jednoznacznych i powtarzalnych wyników w analizie *loci* STR i wytypowanie markerów polimorficznych, a także monitorowanie w badanych genotypach obecności męko-sterylnej cytoplazmy (CMS) typu *ogura* i genu restorera *Rfo* oraz form allelicznych genów desaturaz *Fad2* i *Fad3* w genomach A i C *B. napus*. Analizy molekularne będą dalej prowadzone z jednoczesnym zwiększeniem liczby *loci* AFLP i STR w celu poznania struktury kolekcji linii rzepaku ozimego oraz tworzenia bazy danych, obejmującej molekularną charakterystykę badanych

genotypów. W kolejnym roku zostaną uwzględnione również inne, wartościowe gospodarczo linie rzepaku, rekomendowane przez hodowców do badań stopnia podobieństwa genetycznego oraz monitorowania obecności genu *Rfo* i CMS *ogura* w poszczególnych genotypach.

Badany w rozpoczętych doświadczeniach polowych materiał roślinny wykazuje duże zróżnicowanie fenotypowe niezbędne do analiz molekularnych oraz genotypowania. Obserwacje fenotypowe i fenologiczne będą prowadzone w kolejnym sezonie wegetacyjnym; do badań zostaną włączone również wartościowe genotypy rzepaku rekomendowane przez hodowców.