

Marcin Matuszczak, Jan Krzymański

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Zakład Roślin Oleistych w Poznaniu

Poszukiwanie markerów RAPD różnicujących linie rzepaku ozimego o różnych cechach chemicznych

Search for RAPD markers polymorphic between winter oilseed rape lines having different chemical characteristics

Słowa kluczowe: rzepak ozimy, linie DH, kwas erukowy, glukozynolany, markery RAPD, mapy genetyczne

Key words: winter oilseed rape, *Brassica napus* L., DH lines, erucic acid, glucosinolates, RAPD markers, genetic mapping

Zastosowano metodę RAPD do uzyskania informacji o zróżnicowaniu genetycznym czterech linii DH rzepaku ozimego. Linie te różnią się zawartością kwasu erukowego oraz glukozynolanów w nasionach. W przeprowadzonych analizach użyto 38 starterów do RAPD (Operon) i znaleziono 116 markerów różnicujących. Na podstawie uzyskanych wyników wykonano analizę pokrewieństwa badanych linii, a jej wyniki porównano z posiadanymi rodowodami. Dokonano oceny przydatności każdej pary linii rodzicielskich do tworzenia mapy genetycznej rzepaku ozimego i stwierdzono, że zróżnicowanie genetyczne badanych linii jest wystarczające do tego celu. Dotyczy to zwłaszcza pary linii DH-JN-86 i DH-ER₂-13/1p, która wykazywała najniższy stopień pokrewieństwa. Przeanalizowano też różne strategie prowadzenia dalszych badań. Wykazano, że dokonanie odpowiednio dużej liczby wstępnych analiz linii rodzicielskich oraz wyselekcjonowanie do dalszych prac tylko tych starterów do RAPD, które generują przynajmniej cztery markery, pozwoli na znaczne przyspieszenie tworzenia mapy genetycznej rzepaku, nawet dla bardziej spokrewnionej pary linii DH-JN-86 i DH-MI-11.

The RAPD method was used to characterize genetic background of four winter oilseed rape DH lines. The studied lines have different levels of erucic acid and glucosinolates in seeds. 38 RAPD primers (Operon) were used and 116 markers were found. These markers can be used to distinguish and characterize studied lines. On the basis of obtained data the phylogenetic relations among DH lines were analyzed and results were compared with known pedigrees. Each pair of parental lines was tested for the potential usability as a source of mapping population. These tests appear to be positive as the genetic differentiation among investigated lines is sufficient. The best results were obtained for the pair of DH-JN-86 and DH-ER₂-13/1p lines with the most distant relations. Some strategies for further studies were also considered. It was demonstrated that initial analyses of parental lines and the selection of primers that are able to generate at least four markers can make all mapping experiments much easier and faster by decreasing of the total number of analyses. In this way also the lines that are more closely related (such as DH-JN-86 and DH-MI-11 lines) can be mapped successfully.

Obecnie w hodowli rzepaku na świecie coraz większe znaczenie mają techniki analizy materiału genetycznego, dostarczające dane o zmienności genetycznej. Przełom w badaniach genomu stanowi metoda PCR (ang.: *polymerase chain reaction*), która umożliwia wykonanie analiz stosunkowo małym kosztem, szybko i przy wykorzystaniu niewielkiej ilości materiału wyjściowego. Przykładem zastosowania reakcji PCR do generowania markerów molekularnych jest technika RAPD (ang.: *random amplified polymorphic DNA*) (Welsh i McClelland 1990; Williams i in. 1990). W tej technice stosuje się namnażanie losowo wybranych fragmentów genomu poprzez zastosowanie w reakcji 10-nukleotydowych starterów o przypadkowo dobranych sekwencjach. Dla danego startera uzyskuje się unikalne wzory prążków na żelu, charakterystyczne dla danego genotypu, przy pomocy których można stwierdzić istniejące różnice pomiędzy liniami hodowlanymi na poziomie DNA. W ten sposób można łatwo otrzymać dużą liczbę markerów molekularnych.

Dla uzyskania całościowego obrazu genomu rzepaku sporządza się genetyczne mapy sprzężeń między poszczególnymi cechami i uzyskanymi markerami. Aby mapy te były użyteczne dla polskich hodowców istotne jest by markery charakteryzowały linie hodowlane i odmiany wykorzystywane w polskiej hodowli. Istnieją już bowiem mapy genetyczne rzepaku sporządzone w innych laboratoriach (Landry i in. 1991; Lydiate i in. 1993; Chyi i in. 1994; Ferreira i in. 1994; Cloutier i in. 1995; Parkin i in. 1995; Sharpe i in. 1995; Uzunova i in. 1995; Foisset i in. 1996), jednak ich zastosowanie dla polskich odmian jest możliwe tylko w ograniczonym zakresie. Wielu markerów umieszczonych na tych mapach nie można odnaleźć w naszych populacjach. Konieczne jest więc wzbogacenie istniejących danych o markery charakterystyczne dla polskich odmian.

Warunkiem potrzebnym do wykonania mapy genetycznej organizmu jest znalezienie odpowiedniej populacji segregującej o dużym zróżnicowaniu cech fenotypowych oraz genotypowych. Linie rodzicielskie wykorzystane do utworzenia takiej populacji muszą zostać najpierw odpowiednio scharakteryzowane, aby możliwy był wybór najbardziej zróżnicowanej pary do krzyżowania. Brane są pod uwagę różne kryteria wyboru. Linie te muszą być zróżnicowane pod względem tych cech fenotypowych, które mają zostać zmapowane, takich jak na przykład cechy chemiczne nasion. Drugim istotnym czynnikiem decydującym o wyborze danej pary jest odległość genetyczna rodziców wyrażająca się ilością polimorficznych fragmentów genomu — ma to wpływ na liczbę wykrywanych markerów molekularnych, a tym samym na dokładność mapy genetycznej oraz szybkość jej tworzenia. W celu oceny odległości genetycznej badanych linii najlepiej posłużyć się markerami, które będą wykorzystywane do tworzenia mapy gene-

tycznej. Dzięki temu już na etapie poszukiwania rodziców można gromadzić potencjalne markery do projektowanej mapy.

Celem niniejszej pracy jest ocena zróżnicowania genetycznego posiadanych wyjściowych linii rzepaku ozimego o różnych cechach chemicznych dla określenia ich przydatności do stworzenia segregującej populacji, która będzie wykorzystana do opracowania mapy genetycznej.

Materiały i metody

Materiał roślinny

Badano cztery linie rzepaku ozimego: DH-JN-86 o wysokiej zawartości glukozynolanów i niskiej zawartości kwasu erukowego w nasionach (G0), DH-MI-11 o niskiej zawartości glukozynolanów i kwasu erukowego w nasionach (00), oraz DH-ER₂-13/1p i DH-ER₂-277 o niskiej zawartości glukozynolanów i wysokiej zawartości kwasu erukowego w nasionach (0E). Wszystkie testowane linie były podwojonymi haploidami (ang.: *doubled haploid*, DH). Linie te otrzymano w procesie androgenezy *in vitro* (Nałęczyńska i Cegielska 1984; Nałęczyńska 1991; Cegielska-Taras i in. 1999) z materiałów rzepaku ozimego pochodzących z hodowli jakościowej prowadzonej w Zakładzie Roślin Oleistych w Poznaniu (Krzymański 1970a; 1993) oraz z francuskiej odmiany Jet Neuf (linia DH-JN-86). Uzyskane linie DH były utrzymywane z pokolenia na pokolenie przez zapylenie wsobne pod izolatorem.

Izolacja DNA

Całkowity DNA dla każdej linii wyizolowano według zmodyfikowanej metody Doyle i Doyle (1990) z CTAB (ang.: *cetyltrimethylammonium bromide*). Pobrane młode liście rzepaku schładzano lodem i rozcierano na proszek w porcelanowych moździerzach z ciekłym azotem. Sproszkowane liście zalewano ogrzonym do temperatury 65°C buforem ekstrakcyjnym 2×CTAB [2% (w/v) CTAB, 100 mM Tris-HCl (ang.: *tris(Hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride*) (pH 8,0), 20 mM EDTA (ang.: *ethylenediaminetetraacetic acid*), 1,4 M NaCl, 1% (w/v) PVP (ang.: *polyvinylpyrrolidone*), 1% (v/v) β-merkaptetanol]. Próby traktowano przez 30 minut w 65°C, a następnie, po wymieszaniu z 1 objętością mieszaniny chloroform-oktanol 24:1 (v/v), wirowano 10 minut przy 11500 × g. Pobierano fazę wodną i wytrącano z niej DNA przez dodanie 2/3 objętości izopropanolu, a po oddzieleniu osadu oczyszczano go za pomocą 70% etanolu. Następnie, w celu usunięcia frakcji RNA, próby DNA rozpuszczano w buforze TE zawierającym 40 µg/ml RNA-zy A i hydrolizowano RNA przez 1 godzinę w 37°C.

Po ponownym wytrąceniu i oczyszczeniu, osad DNA rozpuszczano w buforze TE, a następnie sprawdzano stężenie i jakość matrycy za pomocą elektroforezy w 0,8% żelu agarozowym.

Analizy RAPD

Wyizolowane próby DNA analizowano za pomocą metody RAPD (Foisset i in. 1996). Mieszanina reakcyjna (12,5 μ l) zawierała następujące składniki: dNTP (ang.: *deoxynucleotides*) (MBI Fermentas) o stężeniu 150 μ M każdy, 10-nukleotydowy starter (Operon) o stężeniu 0,2 μ M, MgCl₂ o stężeniu 1,9 mM, 0,4 jednostek *Taq* polimerazy (Eurobio) wraz z buforem oraz 12,5 ng genomowego DNA. Reakcje prowadzono zgodnie z następującym profilem termicznym: wstępna denaturacja w 95°C przez 30 sek.; 45 cykli: denaturacja w 95°C przez 30 sek., hybrydyzacja w 35°C przez 1 min., polimeryzacja w 72°C przez 2 min. 30 sek.; końcowa polimeryzacja w 72°C przez 5 min. Produkty reakcji rozdzielano za pomocą elektroforezy w 1,8% żelu agarozowym, wybarwiano w bromku etydydy i obserwowano w świetle UV. Jako wzorzec wielkości fragmentów zastosowano DNA faga Lambda trawione enzymami restrykcyjnymi *HindIII* i *EcoRI* (MBI Fermentas).

Analiza pokrewieństwa

Analizy pokrewieństwa dokonano wykorzystując pakiet programów PHYLIP 3.5 (Felsenstein 1993) Pokrewieństwo obliczano na podstawie polimorficznych prążków uzyskanych w reakcjach PCR-RAPD. Badano w ten sposób cztery wymienione wyżej linie rzepaku ozimego. Do analizy wykorzystano dane uzyskane przy użyciu 32 starterów, obejmujące 108 markerów typu RAPD (tab. 1). Odrzucono startery, które nie dawały żadnych markerów dla czterech linii oraz te, dla których dane były niepełne. Dane wyjściowe zostały zapisane w postaci zero-jedynkowej. Jedyńska oznaczała występowanie prążka dla danej linii, zaś zero jego brak. Analiza składała się z kilku etapów, przy czym na każdym z nich wykorzystywano inny program pakietu PHYLIP:

1. Program SEQBOOT: Za pomocą tego programu przetworzono dane wyjściowe tak, by uzyskać zwielokrotnione zestawy danych (Felsenstein 1985). Utworzono 100 takich zestawów.
2. Program GENDIST: Programem tym obliczono dystanse genetyczne między liniami na podstawie częstości występowania genów. Program ten wykorzystuje wzór do obliczania odległości genetycznej zaproponowany przez Nei (1972).
3. Program NEIGHBOR: Za pomocą tego programu, na podstawie danych o dystansach genetycznych, utworzono drzewa pokrewieństwa. Wykorzystano metodę UPGMA (ang.: *unweighted pair group arithmetic average clustering*).

Tabela 1

Zestawienie starterów użytych w analizach RAPD oraz liczby uzyskanych w ten sposób markerów typu RAPD — *Summary of primers used for RAPD analyses and the number of RAPD markers obtained in this way*

Starter Primer	Liczba pewnych markerów, które różnicują <i>Number of reliable markers that differentiate</i>						
	dowolną z badanych linii <i>any of studied lines</i>	DH-JN-86, DH-MI-11 (G0, 00)	DH-JN-86, DH-ER ₂ - 13/1p (G0, 0E)	DH-JN-86, DH-ER ₂ -277 (G0, 0E)	DH-MI-11, DH-ER ₂ - 13/1p (00, 0E)	DH-MI-11, DH-ER ₂ -277 (00, 0E)	DH-ER ₂ - 13/1p DH- ER ₂ -277 (0E, 0E)
OPA-11*	3	1	2	1	3	2	1
OPA-14*	4	1	4	4	3	3	0
OPA-16*	5	1	4	4	5	5	0
OPC-02*	2	1	1	1	2	2	0
OPC-04*	1	1	0	0	1	1	0
OPC-18*	4	3	4	3	1	0	1
OPD-02*	2	1	1	0	2	1	1
OPD-08*	2	1	1	2	0	1	1
OPF-15*	3	2	1	2	3	2	1
OPG-02*	4	1	3	2	4	3	1
OPG-05*	2	1	1	1	2	2	0
OPG-11*	5	3	4	1	3	2	3
OPJ-07*	4	2	4	4	2	2	0
OPK-01*	2	1	1	1	2	2	0
OPL-12*	3	0	2	3	2	3	1
OPL-13	0	0	0	0	0	0	0
OPN-01*	3	2	2	2	0	2	2
OPP-05	0	0	0	0	0	0	0
OPP-07*	2	0	2	2	2	2	0
OPP-08*	2	1	1	1	2	2	0
OPV-07*	1	1	1	1	0	0	0
OPW-01*	7	6	4	7	1	1	2
OPW-02*	6	3	5	4	4	3	1
OPW-03	0	0	—	0	—	0	—
OPW-04	3	2	—	3	—	1	—
OPW-05*	7	4	5	3	5	3	2
OPW-06	2	0	—	2	—	2	—
OPW-07*	1	1	0	0	1	1	0
OPW-09*	6	4	4	5	4	3	1
OPW-11*	2	1	1	2	0	1	1
OPW-12*	2	2	0	0	2	2	0
OPW-15*	3	1	3	2	2	1	1
OPW-16*	2	1	1	1	2	2	0
OPW-17*	7	4	4	5	2	3	3
OPY-04*	2	1	1	1	2	2	0
OPY-10*	3	1	2	2	1	3	2
OPY-13*	6	3	3	4	6	3	3
OPY-15	3	—	1	3	—	—	2
Razem markerów <i>Total of markers</i>	116	58	73	79	71	68	30
Razem starterów <i>Total of primers</i>	38	37	35	38	34	37	35
Średnio marker/starter <i>Mean marker/ primer</i>	3,05	1,57	2,09	2,08	2,09	1,84	0,86

Przypadki braku danych zaznaczono myślnikiem — *The „no data” cases are indicated with the dash*

Startery wykorzystane do analizy pokrewieństwa między liniami oznaczono gwiazdką

Primers used for analysis of phylogenetic relations are marked with the asterisk

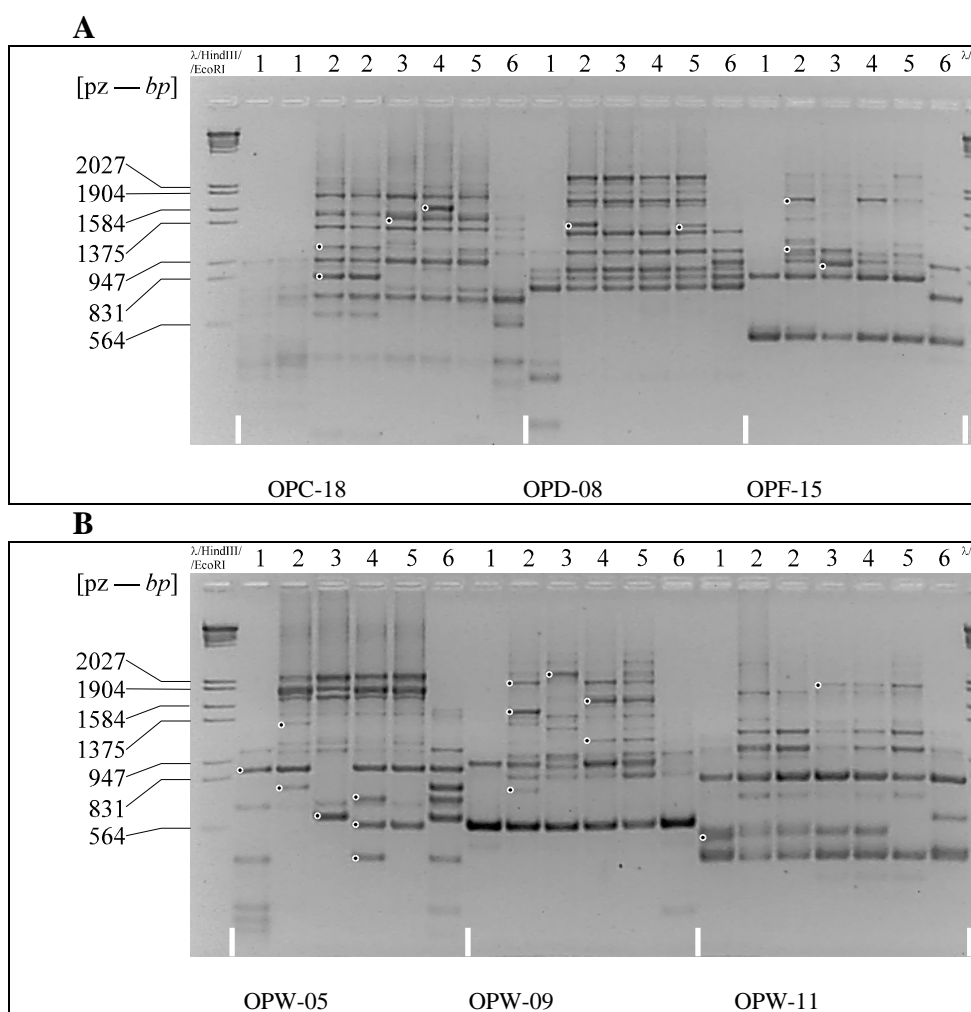
4. Program CONSENSE: Stosując ten program ustalono jedno wspólne drzewo pokrewieństwa na podstawie drzew uzyskanych ze 100 różnych zestawów danych (Margush i McMorris 1981).

Po zakończeniu obliczeń uzyskane drzewo pokrewieństwa przedstawiono w postaci graficznej wykorzystując program DRAWGRAM.

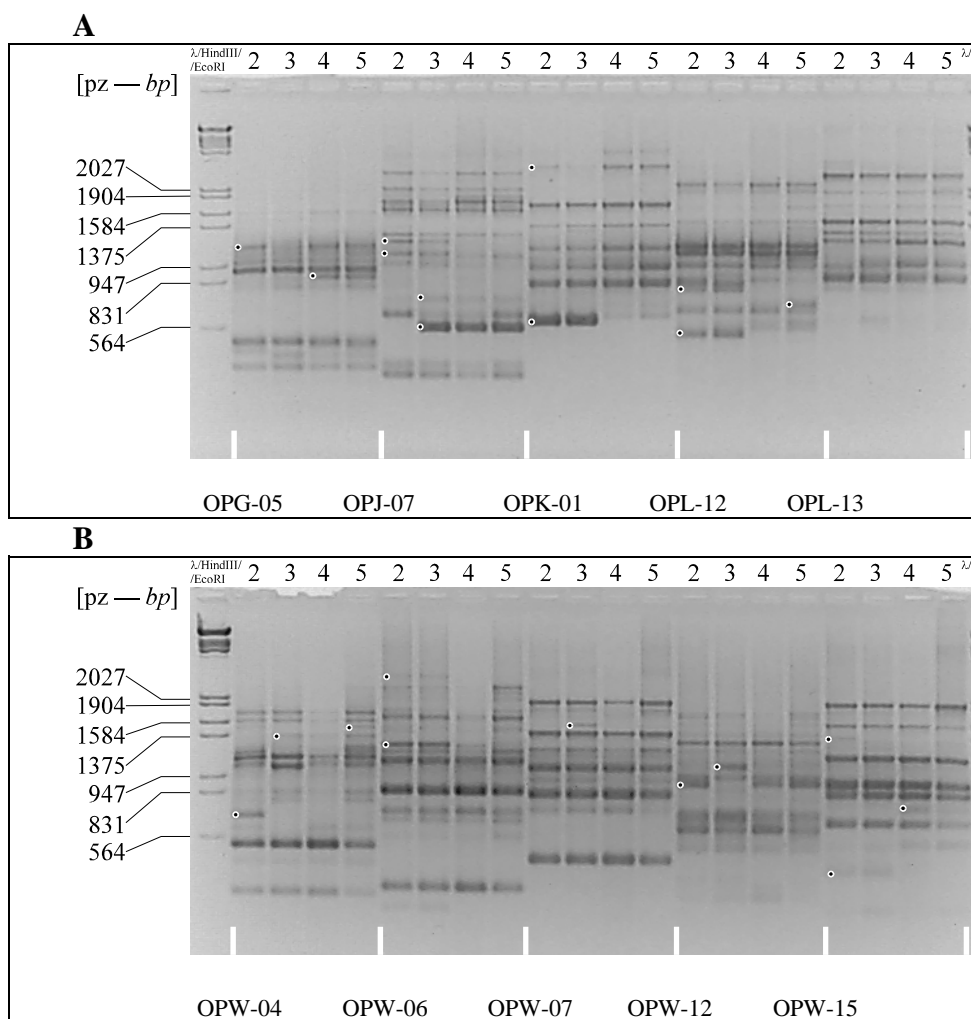
Wyniki

Analizy DNA czterech linii rzepaku ozimego wykonano za pomocą metody RAPD (rys. 1 i 2). Wykorzystano 38 starterów do RAPD firmy Operon (tab. 1). Ogółem znaleziono 195 prążków polimorficznych dla badanych linii. Po odrzuceniu prążków mniej czytelnych pozostało 116 markerów różnicujących przynajmniej jedną parę wybraną spośród czterech testowanych linii (tab. 1). Startery OPL-13, OPP-05 i OPW-03 nie generowały żadnych markerów. Maksymalną liczbę siedmiu markerów uzyskano wykorzystując startery OPW-01, OPW-05 i OPW-17. Średnia liczba markerów określonych jako pewne, uzyskiwanych przy użyciu jednego startera, wyniosła dla badanych linii 3,05 markera na starter.

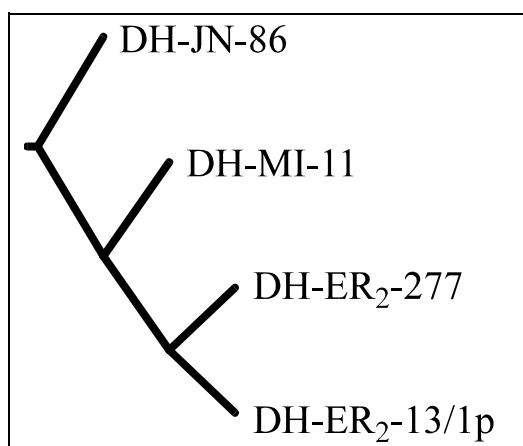
Korzystając z uzyskanych danych wykonano analizę statystyczną mającą na celu ustalenie relacji pokrewieństwa między liniami rzepaku ozimego (rys. 3 i tab. 2) i porównano wyniki z danymi o rodowodach tych linii (rys. 4). Wykazano, że najbliższe spokrewnione są linie DH-ER₂-13/1p i DH-ER₂-277, o wysokiej zawartości kwasu erukowego i niskiej zawartości glukozyolanów w nasionach. Obliczony dystans genetyczny między tymi liniami wyniósł 0,3. Jest to zgodne z uzyskanymi danymi o ich pochodzeniu. W latach 80-tych w Zakładzie Roślin Oleistych w Poznaniu wykonano krzyżowanie odmiany Skrzyszowicki z rzepakiem dwuzerowym. Następnie prowadzono selekcję na wysoką zawartość kwasu erukowego, po czym skrzyżowano uzyskany materiał z odmianą Bridger. W wyniku dalszej selekcji na wysoką zawartość kwasu erukowego w nasionach powstał wspólny przodek obu badanych linii DH. Największy dystans genetyczny wynoszący 1,13 charakteryzuje parę linii DH-JN-86 i DH-ER₂-13/1p, które różnią się zarówno zawartością glukozyolanów, jak i kwasu erukowego w nasionach. Linie te planuje się użyć jako rodziców dla otrzymania segregującej populacji linii DH i wykorzystać w mapowaniu genomu. Linia DH-JN-86 wywodzi się z zeroerukowej odmiany Jet Neuf, która powstała ze skrzyżowania odmian Primor oraz Nain de Hamburger. Odmiana Primor powstała zaś w wyniku wielokrotnego krzyżowania wstecznego kanadyjskiej odmiany jarej Oro z francuską odmianą Major. Przodkowie linii DH-JN-86 różnią się więc całkowicie od wymienionych wcześniej przodków linii DH-ER₂-13/1p, co pozwala wyjaśnić tak duży dystans genetyczny uzyskany w obliczeniach.



Rys. 1. Analizy RAPD wyjściowych linii rzepaku ozimego. Rozdział produktów reakcji PCR-RAPD prowadzono za pomocą elektroforezy w 1,8% żelu agarozowym. Linie rzepaku oznaczone zostały następująco: 1 - Darmor, 2 - DH-JN-86, 3 - DH-MI-11, 4 - DH-ER₂-13/1p, 5 - DH-ER₂-277, 6 - Yudal. Linie Darmor i Yudal umieszczono dla porównania. Zastosowano startery firmy Operon - ich oznaczenia umieszczone zostały pod zdjęciami A i B. Prążki polimorficzne oznaczono kropkami. Wzorec wielkości fragmentów - DNA faga lambda hydrolizowany enzymami restrykcyjnymi *EcoRI* oraz *HindIII* (w parach zasad - pz) — RAPD analyses of initial oilseed rape lines. PCR-RAPD products were separated using 1.8% agarose gel electrophoresis. Rapeseed lines are designated as follows: 1 - Darmor, 2 - DH-JN-86, 3 - DH-MI-11, 4 - DH-ER₂-13/1p, 5 - DH-ER₂-277, 6 - Yudal. Darmor and Yudal lines were used to compare it with the studied ones. Primers were originated from Operon - their symbols are placed below photograph A and B. Molecular size marker - phage lambda DNA digested with endonucleases *EcoRI* and *HindIII* (in base pairs - bp)



Rys. 2. Analizy RAPD wyjściowych linii rzepaku ozimego. Rozdział produktów reakcji PCR-RAPD prowadzono za pomocą elektroforezy w 1,8% żelu agarozowym. Linie rzepaku oznaczone zostały następująco: 2 - DH-JN-86, 3 - DH-MI-11, 4 - DH-ER₂-13/1p, 5 - DH-ER₂-277. Zastosowano startery firmy Operon - ich oznaczenia umieszczone zostały pod zdjęciami A i B. Pążki polimorficzne oznaczono kropkami. Wzorec wielkości fragmentów - DNA faga lambda hydrolizowany enzymami restrykcyjnymi *EcoRI* oraz *HindIII* (w parach zasad - pz) — RAPD analyses of initial oilseed rape lines. PCR-RAPD products were separated using 1.8% agarose gel electrophoresis. Rapeseed lines are designated as follows: 2 - DH-JN-86, 3 - DH-MI-11, 4 - DH-ER₂-13/1p, 5 - DH-ER₂-277. Primers were originated from Operon - their symbols are placed below photograph A and B. Molecular size marker - phage lambda DNA digested with endonucleases *EcoRI* and *HindIII* (in base pairs - bp)

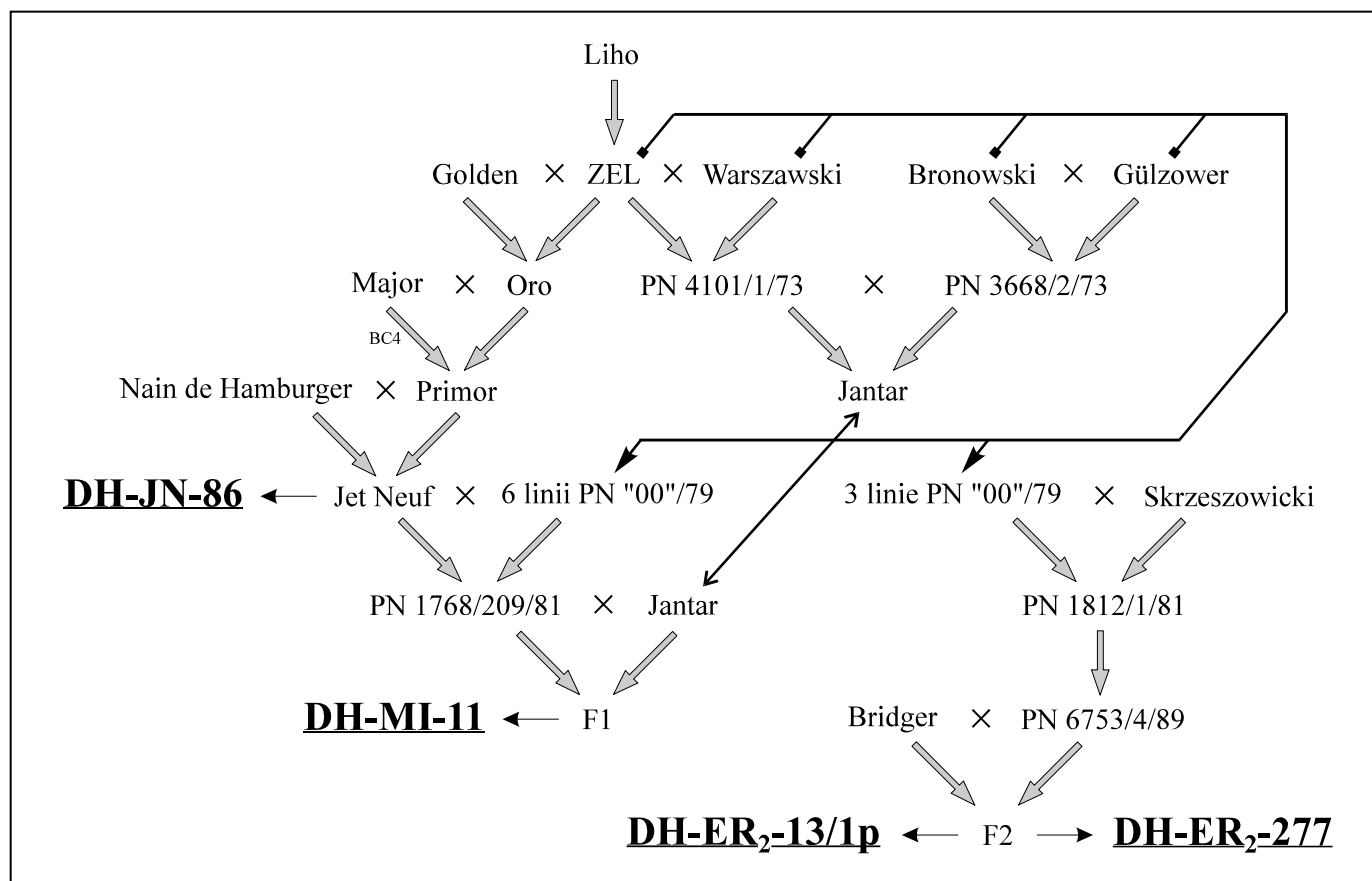


Rys. 3. Relacje pokrewieństwa między badanymi liniami ustalone przy pomocy pakietu PHYLIP (programy SEQBOOT, GENDIST, NEIGHBOR i CONSENSE), na podstawie danych uzyskanych z analiz RAPD. Kladogram został utworzony metodą UPGMA — *Phylogenetic relations among studied lines established with the use of PHYLIP package (SEQBOOT, GENDIST, NEIGHBOR and CONSENSE programs), on the basis of RAPD analyses data. Cladogram is based on UPGMA cluster analysis*

Tabela 2

Odległości genetyczne między badanymi liniami, wyliczone metodą opracowaną przez Nei, przy pomocy programu GENDIST z pakietu PHYLIP, oraz ich porównanie ze średnią liczbą markerów uzyskiwanych z jednego startera — *Nei's genetic distances between each pair of lines counted with the GENDIST program of PHYLIP package and the comparison with the mean number of markers obtained from one primer*

Para linii rodzicielskich rzepaku <i>Pair of rapeseed parental lines</i>	Dystans genetyczny <i>Genetic distance</i>	Średnia ilość markerów na jeden starter <i>Mean number of markers per one primer</i>
DH-ER ₂ -13/1p i DH-ER ₂ -277 (0E i 0E)	0,3001	0,86
DH-JN-86 i DH-MI-11 (G0 i 00)	0,7309	1,57
DH-MI-11 i DH-ER ₂ -277 (00 i 0E)	0,9209	1,84
DH-JN-86 i DH-ER ₂ -277 (G0 i 0E)	1,0712	2,08
DH-MI-11 i DH-ER ₂ -13/1p (00 i 0E)	1,0712	2,09
DH-JN-86 i DH-ER₂-13/1p (G0 i 0E)	1,1268	2,09



Rys. 4. Uproszczony schemat rodowodów badanych linii DH — *Simplified scheme of pedigrees of studied DH lines*

Średni stopień pokrewieństwa wykazała para linii DH-JN-86 i DH-MI-11, które różnią się poziomem glukozyzolanów zawartych w nasionach i zostały skrzyżowane w celu uzyskania segregującej populacji F_2 do mapowania. Dystans genetyczny między tymi liniami wynosił tylko 0,73. Ta niższa wartość może wynikać z tego że w rodowodzie obu linii znajduje się wspólny przodek — odmiana Jet Neuf. Linia DH-MI-11 wywodzi się bowiem z linii dwuzerowej, do której na pewnym etapie selekcji w formie rodzicielskiej matecznej została wkrzyżowana odmiana Jet Neuf. Wyższe wartości odległości genetycznej otrzymano porównując dwie linie o wysokiej zawartości kwasu erukowego w nasionach z dwoma pozostałymi liniami (tab. 2). Dwie spośród utworzonych w ten sposób par wykazują różnice jedynie w zawartości kwasu erukowego, a dystans genetyczny wyniósł dla nich 1,07 i 0,92. Jedna para (DH-JN-86 i DH-ER₂-277) różni się natomiast zarówno poziomem kwasu erukowego i glukozyzolanów — jednak dystans genetyczny jest dla niej mniejszy od maksymalnego i wynosi tylko 1,07. Można stwierdzić, że relacje pokrewieństwa ocenione na podstawie uzyskanych markerów odpowiadają rzeczywistym relacjom między badanymi liniami. Im bliższy był wspólny przodek tym mniejsze były wyliczane odległości genetyczne.

Dla poszczególnych par linii rodzicielskich wykonano też zestawienie liczby wykrytych markerów molekularnych typu RAPD (tab. 1). Dla dwóch par, które brane są pod uwagę jako potencjalne pary rodzicielskie do mapowania genomu rzepaku, znaleziono 58 (linie DH-JN-86 i DH-MI-11) oraz 73 (linie DH-JN-86 i DH-ER₂-13/1p) markery różnicujące (w tabelach 1 i 2 pary te wyróżniono przez wytłuszczenie odpowiedniej kolumny lub wiersza). Interesującym parametrem, charakteryzującym przydatność danej pary do mapowania, jest średnia liczba markerów uzyskanych z jednego startera. Dla wyżej wymienionych par liczby te wynoszą odpowiednio 1,57 i 2,09. Wartości te są u wszystkich badanych par silnie skorelowane z wyliczonymi dla nich dystansami genetycznymi ($r = +0,9972$), przy czym jest to raczej zależność logarytmiczna niż liniowa — dla par mniej spokrewnionych, mimo obserwowanych różnic w dystansie genetycznym, różnice w wydajności pozyskiwania markerów nie są aż tak znaczne (tab. 2).

Dyskusja

Maksymalna wydajność pozyskiwania markerów różnicujących parę linii rzepaku wyniosła 2,09 markera na starter (tab. 1 i 2). Wartość ta została wyliczona na podstawie wszystkich uzyskanych danych i odpowiada wydajności jaką uzyskano w przeprowadzonych wstępnych analizach linii rodzicielskich. Jest to wartość dość niska jeżeli weźmiemy pod uwagę, że do wykonania mapy genetycznej potrzebne jest zbadanie przynajmniej 100 osobników z danej

populacji. W związku z tym dokonano analizy uzyskiwanych wydajności przy selektywnym wyborze stosowanych starterów. Jako kryterium wyboru (N) zastosowano liczby markerów typu RAPD uzyskanych dla danej pary przy użyciu danego startera (tab. 1). Określono liczby starterów (S) i markerów (M) dla odpowiednich wartości kryterium (N). Starter był akceptowany gdy liczba generowanych przez niego markerów była $\geq N$. Następnie wyliczono parametry $\%M_X$, M_S , S_{100} , RS_{100} i $AN_{100/100}$ zgodnie z następującymi wzorami:

$$\% M_X = (M_{MAX} - M) / M_{MAX} \times 100\%;$$

$$M_S = M/S;$$

$$S_{100} = 100 \times S / M;$$

$$RS_{100} = S_{100} \times S_{MAX} / S;$$

$$AN_{100/100} = (100 \times S_{100}) + (2 \times RS_{100}),$$

gdzie S_{MAX} i M_{MAX} to liczby starterów i markerów dla kryterium $N=0$.

Uzyskane wyniki (tab. 3) wskazują, że korzystając ze wstępnej analizy linii rodzicielskich można znacznie zwiększyć wydajność tworzenia mapy genetycznej na etapie badania populacji segregującej. Korzystne jest wybranie do analizy populacji tylko tych starterów, które pozwalają wyróżnić dla danej pary przynajmniej cztery markery. Dla takiego kryterium wyboru uzyskano najniższą wartość parametru $AN_{100/100}$, który określa liczbę analiz niezbędnych do zmapowania 100 markerów na populacji segregującej złożonej ze 100 osobników. Parametr ten stanowi wypadkową dwóch innych parametrów: S_{100} — który określa liczbę starterów używanych na etapie badania populacji segregującej do zmapowania 100 markerów (w tym przypadku zakłada się, że populacja ta będzie złożona z 100 osobników); startery są selekcjonowane spośród tych, które użyto we wstępnej analizie linii rodzicielskich; RS_{100} — który określa wyjściową liczbę losowo wybranych starterów, która zapewni odpowiednią liczbę starterów spełniających kryterium selekcji i pozwoli w ten sposób na zmapowanie 100 markerów; taka liczba starterów musi zostać użyta w czasie wstępnej analizy dwóch linii rodzicielskich.

Oszczędność analiz, które należy wykonać pochodzi stąd, że są tylko dwie linie rodzicielskie oraz aż 100 egzemplarzy do przebadania w populacji segregującej. Selekcja starterów pozwala na zastosowanie mniejszej ich liczby do badania dużej populacji. W związku z tym wraz ze wzrastającym poziomem selekcji starterów ogólna liczba analiz maleje. Dopiero bardzo wysoki poziom selekcji powoduje, że parametr $AN_{100/100}$ ponownie zaczyna rosnąć (tab. 3). Wiąże się to z koniecznością wykonania zbyt wielu analiz wstępnych by znaleźć odpowiednią liczbę starterów spełniających warunki kryterium N.

Tabela 3

Analiza uzyskiwanych wydajności pozyskiwania markerów przy selektywnym wyborze stosowanych starterów dla par linii DH-JN-86 i DH-ER₂-13/1p (A) oraz linii DH-JN-86 i DH-MI-11 (B) — *Analysis of effectiveness in gathering of markers with the use of selected primers for the pair of DH-JN-86 and DH-ER₂-13/1p (A) and the pair of DH-JN-86 and DH-MI-11 (B) rapeseed lines*

A — DH-JN-86 i DH-ER₂-13/1p

Minimalna akceptowana liczba markerów generowanych przez starter – kryterium wyboru starterów (N) — <i>Minimum number of collected markers obtained from one primer – the primer selection criterion (N)</i>	0	1	2	3	4	5
Ogółem liczba starterów odpowiadających kryterium (S) <i>Total of primers that fulfil the criterion (S)</i>	35	30	18	13	10	2
Ogółem liczba markerów generowanych przez wyselekcjonowane startery (M) <i>Total of markers that were obtained from the selected primers (M)</i>	73	73	61	51	42	10
Procent markerów odrzuconych w wyniku selekcji starterów (% M _x) <i>Percent of markers that were discarded because of the primers selection (% M_x)</i>	0,00	0,00	16,44	30,14	42,47	86,30
Średnia markerów na jeden starter (M _s) — <i>Mean of markers per one primer (M_s)</i>	2,09	2,43	3,39	3,92	4,20	5,00
Liczba wyselekcjonowanych starterów niezbędnych do uzyskania 100 markerów <i>Number of selected primers needed to obtain 100 markers (S₁₀₀)</i>	47,95	41,10	29,51	25,49	23,81	20,00
Ogólna liczba starterów jakie trzeba wstępnie przebadac aby stosując tylko wyselekcjonowane startery uzyskać 100 markerów (RS ₁₀₀) <i>Total number of primers that must be investigated to obtain 100 markers with the use of selected primers only (RS₁₀₀)</i>	47,95	47,95	57,38	68,63	83,34	350,00
Ogólna liczba analiz potrzebnych do zmapowania 100 markerów przy wykorzystaniu populacji o wielkości 100 osobników (AN _{100/100}) <i>Total number of analyses that must be done to have 100 markers mapped with the use of 100 individuals (AN_{100/100})</i>	4891	4206	3066	2686	2548	2700

tabela 3 c.d.

B — DH-JN-86 i DH-MI-11

Minimalna akceptowana liczba markerów generowanych przez starter – kryterium wyboru starterów (N) — <i>Minimum number of collected markers obtained from one primer</i> 0150 - <i>the primer selection criterion (N)</i>	0	1	2	3	4	5
Ogółem liczba starterów odpowiadających kryterium (S) <i>Total of primers that fulfil the criterion (S)</i>	37	31	13	8	4	1
Ogółem liczba markerów generowanych przez wyselekcjonowane startery (M) <i>Total of markers that were obtained from the selected primers (M)</i>	58	58	40	30	18	6
Procent markerów odrzuconych w wyniku selekcji starterów (% M_X) <i>Percent of markers that were discarded because of the primers selection (%M_X)</i>	0,00	0,00	31,03	48,28	68,97	89,66
Średnia markerów na jeden starter (M_S) <i>Mean of markers per one primer (M_S)</i>	1,57	1,87	3,08	3,75	4,50	6,00
Liczba wyselekcjonowanych starterów niezbędnych do uzyskania 100 markerów <i>Number of selected primers needed to obtain 100 markers (S_{100})</i>	63,79	53,45	32,50	26,67	22,22	16,67
Ogólna liczba starterów jakie trzeba wstępnie przebadac, aby stosując tylko wyselekcjonowane startery uzyskać 100 markerów (RS_{100}) <i>Total number of primers that must be investigated to obtain 100 markers with the use of selected primers only (RS_{100})</i>	63,79	63,79	92,50	123,35	205,54	616,79
Ogólna liczba analiz potrzebnych do zmapowania 100 markerów przy wykorzystaniu populacji o wielkości 100 osobników ($AN_{100/100}$) <i>Total number of analyses that must be done to have 100 markers mapped with the use of 100 individuals ($AN_{100/100}$)</i>	6507	5473	3435	2914	2633	2901

Dla pary linii DH-JN-86 i DH-ER₂-13/1p, zaplanowana w ten sposób ogólna liczba indywidualnych analiz, przy optymalnym wariancie selekcji starterów, powinna wynieść około 2570. Z tego 168 analiz (z użyciem 84 różnych starterów) powinno być wykonanych na dwóch liniach rodzicielskich, z wydajnością 2,09 markera na starter. Liczba znalezionych markerów powinna wynieść około 175. W wyniku selekcji starterów należy wybrać 24, które spełniają warunek i generują 4 lub więcej markerów. Stosując te startery należy przebadać populację 100 osobników, wykonując w ten sposób kolejne 2400 analiz, z wydajnością 4,20 markera na starter. Liczba zmapowanych w ten sposób markerów powinna wynieść około 100.

Obliczona wydajność pozyskiwania markerów oraz liczba potrzebnych do wykonania analiz wydają się pozwalać na uzyskanie odpowiedniej mapy, w możliwym do zaakceptowania czasie. Dotyczy to zwłaszcza pary linii DH-JN-86 i DH-ER₂-13/1p, o większym dystansie genetycznym oraz średniej liczbie markerów uzyskanych z jednego startera. Warto zauważyć, że dla pary linii DH-JN-86 i DH-MI-11, charakteryzującej się dużo większym pokrewieństwem i niższą wydajnością pozyskiwania markerów, odpowiednia selekcja starterów po etapie wstępnym pozwala zredukować liczbę koniecznych analiz do poziomu podobnego jak dla pary mniej spokrewnionej (tab. 3). Wymagane jest jedynie bardziej intensywne poszukiwanie starterów na etapie wstępnym (należy użyć ponad 200 starterów i wykonać ponad 400 analiz). Ponieważ etap wstępny stanowi zawsze mniejszą część ogółu analiz, procentowy wzrost nakładów nie jest zbyt duży, co pozwala uzyskać mapę o podobnym nasyceniu także dla pary bardziej spokrewnionej.

Założona w obliczeniach liczba 100 zmapowanych markerów, a także populacja segregująca złożona ze 100 osobników, stanowią absolutne minimum. Mapa genetyczna złożona ze 100 markerów, zawierająca 19 grup sprzężeń, pozwala uzyskać średnio 5 markerów na jedną grupę sprzężeń. Nie jest to wiele, jednak przy założeniu, że znaczna część markerów będzie odpowiadać markerom na istniejących już mapach — takie nasycenie markerami pozwoli przynajmniej zorientować tą mapę względem pozostałych (Foisset i in. 1996). Oczywiście nic nie stoi na przeszkodzie by wykonać dalsze analizy w celu znalezienia kolejnych markerów i pełniejszego nasycenia tworzonej mapy.

Należy dodać, że ostateczna liczba markerów umieszczonych na mapie może okazać się niższa od liczby markerów uzyskanych w badaniach wstępnych. W przypadku markerów typu RAPD mogą wystąpić problemy z powtarzalnością. Niektóre prążki mogą też okazać się nieczytelne przy badaniu populacji segregującej. Aby zachować powtarzalność oraz uniknąć artefaktów należy brać pod uwagę tylko prążki o odpowiedniej intensywności. Prążki mało wyraźne oraz takie, które wykazują dużą zmienność intensywności w badanej populacji muszą zostać odrzucone, gdyż nie stanowią one wiarygodnych markerów, co zostało wykazane w licznych wcześniejszych pracach (Penner i in. 1993; Ellsworth i in. 1993;

Bielawski i in. 1995; Khandka i in. 1997; Perez i in. 1998). Dla pewnych markerów mogą też wystąpić zaburzenia segregacji utrudniające interpretację wyników. Sytuacja taka może wystąpić w przypadku, gdy do mapowania wykorzystana zostanie populacja linii DH. Podczas procesu androgenezy *in vitro* (Nałęczńska i Cegielska 1984; Nałęczńska 1991; Chen i in. 1994; Cegielska-Taras i in. 1999) dokonuje się w tej populacji selekcja roślin, co w praktyce objawia się odchyleniami od prawidłowej segregacji mendelowskiej dla markerów w niektórych rejonach genomu — markery takie będą musiały zostać odrzucone przed ostatecznym opracowaniem mapy genetycznej lub też trzeba będzie zastosować dodatkowe obliczenia dla uzyskania prawidłowych wyników (Cloutier 1994; Foisset i in. 1996). Populacja F_2 , chociaż wymaga większej liczby osobników do uzyskania tej samej precyzji co populacja linii DH dla markerów o charakterze dominującym, wolna jest od wspomnianych wyżej zaburzeń spowodowanych niepożądaną selekcją (Cloutier i in. 1995).

Wskazane jest także aby ustalić wielkość badanej populacji w zależności od sposobu dziedziczenia cech chemicznych — pozwoli to na uchwycenie pełnego spektrum zmienności badanych cech. Na podstawie obserwowanych stosunków segregacji w populacji F_2 stwierdzono, że poziom kwasu erukowego w nasionach rzepaku jest zależny od dwóch par genów. W związku z tym liczebność roślin w klasach o najniższym oraz najwyższym poziomie kwasu erukowego wynosi 1/16 populacji F_2 oraz 1/4 populacji linii DH (Harvey i Downey 1964; Krzymański i Downey 1969; Krzymański 1970a). W populacji złożonej ze 100 osobników można wyróżnić wszystkie istniejące klasy roślin — również te, które charakteryzują się wartościami skrajnymi dla tej cechy. Nie jest więc potrzebne zwiększanie badanej populacji ze względu na cechę poziomu kwasu erukowego w nasionach. Są jednak cechy chemiczne uwarunkowane wspólnym działaniem większej ilości genów. Przykładem jest cecha poziomu glukozyzolanów w nasionach rzepaku. Na podstawie rozkładów częstotliwości ilustrujących segregację tej cechy w pokoleniu F_2 ocenia się, że ma ona charakter ilościowy. Dodatkowo obliczone wartości wariancji wskazują, że cecha ta jest warunkowana przez niedużą liczbę genów, zaś nowsze badania dowodzą, iż są to przynajmniej cztery pary genów. Przy takim założeniu liczebność roślin w klasach o minimalnym i maksymalnym poziomie glukozyzolanów może stanowić jedynie 1/256 populacji F_2 oraz 1/64 populacji linii DH (Krzymański 1970a; 1970b; Kondra i Stefansson 1970; Magrath i in. 1993; Rücker i Röbbelen 1994; Krzymański i in. 1999). Wynika z tego, że populacja F_2 złożona ze 100 osobników nie jest wystarczająco liczna, aby uchwycić wszystkie istniejące grupy segregujących roślin. Tym samym aby uwzględnić wpływ wszystkich czterech genów, liczebność badanej populacji F_2 powinna wynosić przynajmniej 256 osobników. Zastrzeżenie to nie dotyczy populacji linii DH. W związku z tym, że wszystkie rośliny w takiej populacji są homozygotyczne, liczba istniejących klas jest mniejsza. Liczba roślin w klasach

charakteryzujących się wartościami skrajnymi dla danej cechy stanowi 1/64 badanej populacji i jest większa niż w przypadku populacji F₂. Można więc wyróżnić wszystkie istniejące klasy roślin już w populacji złożonej ze 100 osobników.

Wnioski

1. Metoda RAPD pozwala uzyskać polimorficzne prążki, które różnicują badane linie rzepaku ozimego.
2. Analiza pokrewieństwa wykonana na podstawie uzyskanych markerów jest zgodna z danymi o rodowodach badanych linii.
3. Testowane linie rzepaku ozimego mogą posłużyć do stworzenia populacji segregującej, która będzie wykorzystywana do opracowania mapy genetycznej.
4. Wstępna analiza linii rodzicielskich w celu selektywnego wyboru starterów do badania populacji segregującej może znacznie zwiększyć wydajność tworzenia mapy genetycznej.
5. Intensywne poszukiwanie starterów na etapie wstępnym wraz z późniejszą ich selekcją, pozwala na wykorzystanie do mapowania także bliżej spokrewnionych par linii rodzicielskich.
6. Określono, że należy zmapować przynajmniej 100 markerów w oparciu o populację segregującą złożoną ze 100 osobników.
7. Przy powyższych założeniach optymalna jest selekcja do analiz populacji segregującej tylko tych starterów, które na etapie wstępnym generowały przynajmniej cztery markery.
8. W przypadku mapowania cechy ilościowej jaką jest zawartość glukozy-nolanów w nasionach, niezbędne jest zwiększenie segregującej populacji F₂ do 256 osobników, aby uchwycić wpływ wszystkich genów

Literatura

- Bielawski J.P., Noack K., Pumo D.E. 1995. Reproducible amplification of RAPD markers from vertebrate DNA. *Biotechniques*, 18 (5): 856-860.
- Cegielska-Taras T., Szala L., Nałęczynska A., Kołodziej K., Ogrodowczyk M. 1999. Selection for high erucic - acid content in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) on microspore-derived embryos. *Journal of Applied Genetics*, 40, 4: 305-315.

- Chen Z.Z., Snyder S., Fan Z.G., Loh W.H. 1994. Efficient production of doubled haploid plants through chromosome doubling of isolated microspores in *Brassica napus*. *Plant Breeding – Zeitschrift Für Pflanzenzüchtung*, 113 (3): 217-221.
- Chyi Y.S., Hoenecke M.E., Sernyk J.L. 1994. Chromosome locations of the *Sr* gene in the three *Brassica* species. *Cruciferae Newsletter*, 16: 41.
- Cloutier S. 1994. Cartographie génétique comparative de deux types de populations de canola (*Brassica napus* L.). Praca doktorska. University of Montreal, Kanada.
- Cloutier S., Cappadocia M., Landry B.S. 1995. Study of microspore-culture responsiveness in oilseed rape (*Brassica napus* L.) by comparative mapping of a F₂ population and two microspore-derived populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 841-847.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Ellsworth D.L., Rittenhouse K.D., Honeycutt R.L. 1993. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques*, 14 (2): 214-217.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783-791.
- Felsenstein J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Ferreira M.E., Williams P.H., Osborn T.C. 1994. RFLP mapping of *Brassica napus* using doubled haploid lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 89 (5): 615-621.
- Foisset N., Delourme R., Barret P., Hubert N., Landry B.S., Renard M. 1996. Molecular-mapping analysis in *Brassica napus* using isozyme, RAPD and RFLP markers on a doubled-haploid progeny. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 1017-1025.
- Harvey B.L., Downey R.K. 1964. The inheritance of erucic acid content in rapeseed (*Brassica napus*). *Canadian Journal of Plant Science*, 44: 104-111.
- Khandka D.K., Tuna M., Tal M., Nejidat A., Golan-Goldhirsh A. 1997. Variability in the pattern of random amplified polymorphic DNA. *Electrophoresis*, 18 (15): 2852-2856.
- Kondra Z.P., Stefansson B.R. 1970. Inheritance of the major glucosinolates of rapeseed (*Brassica napus*) meal. *Canadian Journal of Plant Science*, 50: 643-647.
- Krzymański J. 1970a. Genetyczne możliwości ulepszenia składu chemicznego nasion rzepaku ozimego. *Hodowla Roślin, Aklimatyzacja i Nasiennictwo*, 14 (2): 95-133.
- Krzymański J. 1970b. Inheritance of thioglucoside content by rapeseed. *Journées Internationales sur le Colza*, Paris: 212-218.
- Krzymański J. 1993. Osiągnięcia i nowe perspektywy prac badawczych nad roślinami oleistymi w Polsce. *Postępy Nauk Rolniczych*, 5: 7-14.
- Krzymański J., Downey R.K. 1969. Inheritance of fatty acid composition in winter forms of rapeseed, *Brassica napus*. *Canadian Journal of Plant Science*, 49: 313-319.
- Krzymański J., Piętka T., Michalski K., Krótka K. 1999. Studies of winter oilseed rape (*Brassica napus* L. very low in aliphatic glucosinolate content. *GCIRC Bulletin*, 16: 64-71.
- Landry B.S., Hubert N., Etoh T., Harada J.J., Lincoln S.E. 1991. A genetic map for *Brassica napus* based on restriction fragment length polymorphism detected with expressed DNA sequences. *Genome*, 35: 543-552.
- Lydiat D.J., Sharpe A.G., Lagercrantz U., Parkin I. 1993. Mapping the *Brassica* genome. *Outlook on Agriculture*, 2: 85-92.
- Magrath R., Herron C., Giamoustaris A., Mithen R. 1993. The inheritance of aliphatic glucosinolates in *Brassica napus*. *Plant Breeding*, 111: 55-72.

- Margush T., McMorris F.R. 1981. Consensus n-trees. *Bulletin of Mathematical Biology*, 43: 239-244.
- Nałęczńska A. 1991. Zastosowanie podwojonych haploidów w hodowli rzepaku. *Hodowla Roślin Aklimatyzacja i Nasiennictwo*, 35 (1/2): 1-40.
- Nałęczńska A., Cegielska T. 1984. Doubled haploids production in *Brassica napus* L. by in vitro androgenesis. *Genetica Polonica*, 25 (3): 271-276.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283-292.
- Parkin I.A.P., Sharpe A.G., Keith D.J., Lydiate D.J. 1995. Identification of the A and C genomes of amphidiploid *Brassica napus* (oilseed rape). *Genome*, 38: 1122-1131.
- Penner G.A., Bush A., Wise R., Kim W., Domier L., Kasha K., Laroche A., Scoles G., Molnar S.J., Fredak G. 1993. Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods and Applications*, 2 (4): 341-345.
- Perez T., Albornoz J., Dominguez A. 1998. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Molecular Ecology*, 7 (10): 1347-1357.
- Rücker B., Röbbelen G. 1994. Inheritance of total and individual glucosinolate contents in seeds of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Breeding*, 113: 206-216.
- Sharpe A.G., Parkin I.A.P., Keith D.J., Lydiate D.J. 1995. Frequent nonreciprocal translocations in the amphidiploid genome of oilseed rape (*Brassica napus*). *Genome*, 38 (6): 1112-1121.
- Uzunova M., Ecke W., Weissleder K., Röbbelen G. 1995. Mapping the genome of rapeseed (*Brassica napus* L.). I. Construction of an RFLP linkage map and localization of QTLs for seed glucosinolate content. *Theoretical and Applied Genetics*, 90 (2): 194-204.
- Welsh J., McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Research.*, 18 (24): 7213-7218.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research.*, 18 (22): 6531-6535.