

Jan Krzymański, Teresa Piętka, Marcin Matuszczak, Krzysztof Michalski
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Zakład Roślin Oleistych w Poznaniu

Próba użycia ultradźwięków do łamania sprzężeń cech u rzepaku

Attempt to use ultrasound to break genetic linkage between traits of oilseed rape (*Brassica napus*)

Słowa kluczowe: sprzężenie genetyczne, ultradźwięki, rzepak, glukozynolany, CMS *ogura*, restorer

Key words: genetic linkage, ultrasound, oilseed rape, rapeseed, *Brassica napus*, CMS *ogura*, restorer

Pojęto próbę przełamania silnego sprzężenia występującego u rzepaku pomiędzy wysoką zawartością glukozynolanów a genem restorem dla systemu cytoplazmatyczno-genetycznej męskiej niepłodności typu CMS *ogura*. Moczone w ciągu 18 godzin nasiona traktowano ultradźwiękami w dawce DL 50. Uzyskano istotny wzrost częstotliwości występowania segregantów niskoglukozynolanowych.

An attempt was done to use ultrasound to break strong genetic linkage occurring in oilseed rape (*Brassica napus*) between high glucosinolate content and restorer gene for cytoplasmic-genetic male sterility CMS *ogura*. Seeds soaked in water during 18h were treated with ultrasound in DL 50 doses. Significant increase of low glucosinolate segregants was obtained.

W pracach hodowlanych i badaniach genetycznych często spotykamy się z trudnościami jakie powodują niekorzystne, trudne do przełamania sprzężenia cech pożądaných z cechami niekorzystnymi. Na przykład powiązanie żółtego koloru nasion z rzepikowym pokrojem roślin lub skłonnością do kiełkowania nasion w łuszczynie, trudności z przeniesieniem zmienionego składu kwasów tłuszczowych z form jarych do ozimych, oddzielenie genu restorera CMS *ogura* od jednego z genów warunkujących wysoką zawartość glukozynolanów (Popławska i in. 1999). W celu zwiększenia ilości korzystnych segregantów podjęto próby z zastosowaniem ultradźwięków.

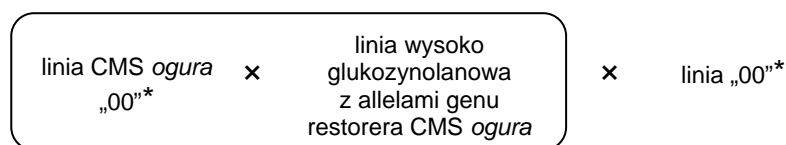
Węgleński i Fikus (1996) podają, że ultradźwięki mogą fragmentować wielkocząsteczkowy DNA. W czasie reperacji w komórce uszkodzonych chromosomów należy spodziewać się rozluźnienia sprzężeń między cechami. Problem ewentualnego mutagennego oddziaływania ultradźwięków został omówiony w publikacjach Watts i in. (1972), Khokhar i Oliver (1975), Thacker i Baker (1976), Moutschen i in. (1986), Barnett i in. 1997, a Fucic i in. (2000) stwierdzili, że zasto-

sowanie ultradźwięków zwiększa częstotliwość mutacji pod wpływem promieniowania jonizującego. Khokhar i Oliver badali uszkodzenia chromosomów w strefie wierzchołkowej korzeni bobiku po napromieniowaniu ultradźwiękami. Nie stwierdzili istotnego wzrostu liczby konwencjonalnych aberracji chromosomowych, lecz istotna liczba komórek wykazała zmostkowane, zaglomerowane lub bryłowe chromosomy.

W pracy zostały przedstawione wyniki próby zastosowania ultradźwięków do przełamania sprzężeń cech u rzepaku.

Material i metody

Do doświadczenia użyto nasiona zebrane z 21 roślin pokolenia F₁ następującej kombinacji krzyżowań:



* oznacza linie podwójnie ulepszone o ekstremalnie niskiej zawartości glukozynolanów alifatycznych

Część nasion z każdej rośliny poddano działaniu ultradźwięków. Nasiona moczone przez 18 godzin w wodzie traktowano dawką, która powodowała utratę zdolności kiełkowania w 50 procentach (DL = 50). Jesienią 1997 roku wysiano po jednym rzędzie nasion traktowanych ultradźwiękami i po dwa rzędy nasion nietraktowanych. W czasie kwitnienia zapyłono wosownie 290 roślin z nasion traktowanych ultradźwiękami oraz 781 roślin z nasion nietraktowanych. Nasiona zebrane z roślin pokolenia F₂ przeanalizowano na zawartość glukozynolanów i wyselekcjonowano 46 roślin, których nasiona zawierały tych związków poniżej 18 μM/g nasion.

Analizy na zawartość glukozynolanów wykonano za pomocą chromatografii gazowej pochodnych siliolowych (Michalski i in. 1995). Rośliny samosiewów usuwano używając markerów genetycznych związanych z częścią sekwencji mitochondrialnego DNA warunkującego męską sterility typu *ogura* (Mikołajczyk i in. 1998; Krishnasamy, Makaroff 1993).

Dla sprawdzenia hipotezy, że uzyskane stosunki segregacji nie różnią się w sposób istotny obliczono statystykę χ^2 . Wynosi ona $\chi^2 = 4,927$ oraz $\chi^2_{\text{adj}} = 4,203$, co znaczy, że prawdopodobieństwo prawdziwości hipotezy wynosi $P < 0,05$, a więc należy stwierdzić, że otrzymane stosunki segregacji różnią się w sposób istotny. Częstość występowania roślin niskoglukozynolanowych we wzorcowej populacji wyniosła 1 : 28,93, natomiast po traktowaniu ultradźwiękami 1 : 15,26.

Tabela 1

Wyniki selekcji w pokoleniu F₂ — *Selection results in F₂ generation*

Kombinacja <i>Combination</i>	Glukozynolany — <i>Glucosinolates</i>		Suma <i>Total</i>
	>18 µM/g nasion — <i>seed</i>	< 18 µM/g nasion — <i>seed</i>	
Traktowane ultradźwiękami <i>Ultrasound treated</i>	271	19	290
Nietraktowane — <i>Not treated</i>	754	27	781
Suma — <i>Total</i>	1025	46	1071

Wnioski

Otrzymane wyniki potwierdzają przypuszczenie, że zastosowanie ultradźwięków może być pomocne w przełamaniu sprzężenia cech w segregujących pokoleniach rzepaku.

Literatura

- Barnett S.B., Rott H.D., Ter Haar G.R., Ziskin M.C., Maeda K. 1997. The sensitivity of biological tissue to ultrasound. *Ultrasound Med. Biol.* 23 (6): 805-812.
- Fucic A., Markucic D., Mijic A., Jazbec A.M. 2000. Estimation of genome damage after exposure to ionizing radiation and ultrasound used in industry. *Environ. Mol. Mutagen.* 36 (1): 47-51.
- Khokhar M.T., Oliver R. 1975. An investigation of chromosome damage in *Vicia faba* root tips after exposure to 1-5 MHz ultrasonic radiation. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 28 (4): 373-383.
- Krishnasamy S., Makaroff C. 1993. Characterization of the radish mitochondrial *orf B* locus: possible relationship with male sterility in *ogura* radish. *Curr. Genet.* 24: 156-163.
- Michalski K., Kołodziej K., Krzymański J. 1995. Quantitative analysis of glucosinolates in seeds of oilseed rape. Effect of sample preparation on analytical results. *Proc. 9th Intern. Rapeseed Congress, Cambridge, UK 4-7.07.1995, vol. 1: 6-8.*
- Mikołajczyk K., Matuszczak M., Piętka T., Bartkowiak-Broda I., Krzymański J. 1998. Zastosowanie markerów DNA do badań odmian składników mieszańcowych rzepaku. *Rośliny Oleiste XIX: 463-471.*
- Moutschen J., Demoulin A., Gilot-Delhalle J., Richell M., Lambotte R. 1986. Low doses of pulsed ultrasound and chromosomal abnormalities in male mouse germ cells. *Hum. Reprod.* 1 (7): 427-431.
- Popławska W., Bartkowiak-Broda I., Ogrodowczyk M., Jędrzejowska H. 1999. Badania nad metodą hodowli linii restorerów dla genowo-cytoplazmatycznej męskiej niepłodności typu CMS *ogura* u rzepaku ozimego. *Rośliny Oleiste XX (1): 29-42.*

- Thacker J., Baker N.V. 1976. The use of *Drosophila* to estimate the possibility of genetic hazard from ultrasound irradiations. *Br. J. Radiol.* 49 (580): 367-371.
- Watts P.L., Hall A.J., Fleming J.E. 1972. Ultrasound and chromosome damage. *Br. J. Radiol.* 45 (533): 335-339.
- Węgleński P., Fikus M. 1996. Rekombinowanie i klonowanie DNA, W *Genetyka Molekularna*, Praca zbiorowa PWN, str. 159.