

Beata Gazecka, Wiesława Popławska

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Zakład Roślin Oleistych w Poznaniu

## Ocena skuteczności metody uzyskiwania niskoglukozynolanowych linii restorujących dla systemu CMS *ogura* poprzez kultury mikrospor rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.)

### Effectiveness evaluation of the method of low glucosinolate restoring lines development for CMS *ogura* system with oilseed rape microspore cultures

Genowo-cytoplazmatyczna męska sterylność CMS *ogura* jest jedną z form CMS, które mogą być wykorzystane do tworzenia odmian mieszańcowych rzepaku. Czynnikiem ograniczającym możliwość wykorzystania CMS *ogura* jest brak niskoglukozynolanowych linii z genem restorerem. W badaniach oceniono skuteczność metody uzyskiwania linii restorujących o niskiej zawartości glukozyzolanów z zastosowaniem kultur mikrospor. Przebadano wartość uzyskanych linii podwojonych haploidów z allelami genu restorera pod względem zawartości glukozyzolanów oraz płodności pyłku. Zawartość glukozyzolanów w nasionach roślin pokoleniu A<sub>2</sub> rosnących w warunkach polowych okazała się wielokrotnie niższa od zawartości tych związków w pokoleniu A<sub>1</sub> pochodzącym ze szklarni. Wyniki te sugerują, że w celu wprowadzenia homozygotycznych, niskoglukozynolanowych linii restorujących dla CMS *ogura* selekcję należy przeprowadzić w warunkach polowych w pokoleniu A<sub>2</sub>.

Gene-cytoplasmic male sterility CMS *ogura* is one of CMS types which can be used for hybrid varieties development of oilseed rape. The factor limiting the possibility of CMS *ogura* utilization is the lack of low glucosinolate lines with restorer gene. The possibility of low glucosinolate restoring lines development for CMS *ogura* system with microspore cultures was investigated. Selected doubled haploid lines were evaluated with respect to glucosinolate content and pollen grain viability. Glucosinolate content in A<sub>2</sub> progeny of doubled haploid lines with restorer gene alleles selected in the field conditions was several times lower than in A<sub>1</sub> progeny obtained in greenhouse. The obtained results suggest that selection of low glucosinolate restoring lines should be done in the field conditions on A<sub>2</sub> progeny.

## Wstęp

Genowo-cytoplazmatyczna męska niepłodność CMS *ogura* jest systemem w pełni kontrolującym zapylenie krzyżowe u rzepaku. Wykorzystanie systemu CMS *ogura* do tworzenia odmian mieszańcowych zrestorowanych dotychczas było

niemożliwe, ponieważ bardzo trudno jest uzyskać linie z genem restorerem i jednocześnie zawierające wymaganą dla współczesnych odmian rzepaku cechę jakościową, niską zawartość glukozyolanów (Bartkowiak-Broda 1991).

W celu uzyskania formy restorującej do produkcji mieszańców opartych o system CMS *ogura* w Zakładzie Roślin Oleistych IHAR w Poznaniu podjęto krzyżowania pomiędzy liniami rzepaku o niskiej zawartości glukozyolanów i wyjściową linią restorującą, heterozygotyczną pod względem alleli genu restorującego, bezerukową, ale o wysokiej zawartości glukozyolanów. Uzyskane rekombinanty pokolenia F<sub>1</sub> poddano selekcji na obecność genu restorera z zastosowaniem markera izoenzymatycznego PGI-2 (Delourme i Eber 1992) i analizom chemicznym na zawartość glukozyolanów w nasionach. Na podstawie uzyskanych wyników wybrano trzy genotypy z genem restorerem o obniżonej zawartości glukozyolanów i podjęto próbę otrzymania z nich linii restorujących o niskiej zawartości glukozyolanów poprzez wyprowadzenie linii homozygotycznych drogą kultur mikrospor.

## Materialy i metody

---

Materiał wyjściowy do badań stanowiły trzy rekombinanty rzepaku ozimego pokolenia F<sub>1</sub> (R7, R10, R14) pomiędzy męskonieplodnymi podwójnie ulepszonymi („00”), a więc o niskiej zawartości glukozyolanów liniami CMS *ogura* oraz restorującą linią (R), uzyskaną w ramach umowy licencyjnej pomiędzy IHAR i INRA we Francji. Linia ta jest heterozygotyczna pod względem alleli genu restorera oraz charakteryzuje się wysoką zawartością glukozyolanów, 60 µM/g nasion. Pochodzenie mieszańcowego pokolenia F<sub>1</sub>:

- linie CMS *ogura* „00” rośliny z genem restorerem
- R7: o 9386/1/95p x o R/6
- R10: o 9420/2/95p x o R/2
- R14: o 9424/2/95p x o R/2

Uzyskane rekombinanty F<sub>1</sub> charakteryzowały się zawartością glukozyolanów: R7 — 39,8 µM/g nasion, R10 — 39,9 µM/g nasion, R14 — 32,6 µM/g nasion (tab. 1). Z roślin tych kombinacji wyprowadzono przy wykorzystaniu metody kultur mikrospor linie podwojonych haploidów (DH). Androgenezę *in vitro* oraz regenerację roślin przeprowadzono według metody ustalonej przez Cegielską-Taras i Szałę (1997). Wczesną selekcję genotypów z genem restorerem dokonano wykorzystując izoenzymatyczny marker tego genu — PGI-2 (Delourme i Eber 1992). Analizy izoenzymatyczne prowadzono według metody podanej przez Shields a i in. (1983) oraz Vallejos a (1983). Zawartość glukozyolanów w nasionach oznaczono metodą chromatografii gazowej silolowych pochodnych glukozyolanów (Michalski i in. 1995).

## Wyniki

Z rekombinantów pokolenia  $F_1$  R7, R10, R14 wyprowadzono w sumie 201 linii podwojonych haploidów. Wyprowadzone w szklarni w 1997 r. pokolenie  $A_1$  przebadano na obecność genu restorera we wczesnym stadium rozwoju roślin (4–5 liści) przy pomocy markera PGI-2. W 45 liniach DH stwierdzono obecność tego markera. Z tych linii zebrano nasiona, w których oznaczono zawartość glukozynolanów.

Otrzymane wyniki zawartości glukozynolanów w pokoleniu  $A_1$  są bardzo zróżnicowane między liniami, a także między klonami i wynoszą od 22,0  $\mu\text{M/g}$  nasion do 115,5  $\mu\text{M/g}$  nasion przy bardzo dużych współczynnikach zmienności dla poszczególnych genotypów wyjściowych R7, R10, R14 (tab. 1). Większość otrzymanych androgenicznych roślin (48) charakteryzowała zawartość glukozynolanów powyżej 60  $\mu\text{M/g}$  nasion, tylko 11 roślin spośród trzech kombinacji wyjściowych odznaczało się zawartością glukozynolanów poniżej 60  $\mu\text{M/g}$  nasion (tab. 2). Uzyskano tylko jedną linię DH ze stosunkowo niską zawartością glukozynolanów — 22,0  $\mu\text{M/g}$  nasion.

Tabela 1

Zawartość glukozynolanów w nasionach pokolenia wyjściowego  $F_1$  oraz w liniach DH — pokolenie  $A_1$  — *Glucosinolate content in starting progeny  $F_1$  and DH lines-progeny  $A_1$*

Dawca pokolenie $F_1$  <i>Donor generation <math>F_1</math></i>	Zawartość glukozynolanów [ $\mu\text{M/g}$ nasion] <i>Glucosinolate content [<math>\mu\text{M/g}</math> of seeds]</i>					
	Pokolenie $F_1$ <i>Generation <math>F_1</math></i>	Pokolenie $A_1$ — <i>Generation <math>A_1</math></i>				
	średnia <i>mean</i>	liczba roślin <i>number of plants</i>	maximum	minimum	średnia <i>mean</i>	wsp. zm. <i>c. v.</i>
R 7	39,8	30	111,9	22,0	66,7	25,8
R 14	32,6	19	99,1	40,8	78,3	20,3
R 10	39,9	20	115,5	36,9	77,0	30,1

Ze względu na to, że zawiązywanie nasion na otrzymanych roślinach pokolenia  $A_1$  z genem restorerem było bardzo słabe, przebadano również żywotność ziaren pyłku tych roślin. Średni procent żywotności ziaren pyłku był zbliżony w liniach DH otrzymanych z dwóch pierwszych kombinacji R7 i R10 i wynosił odpowiednio 80,6% i 84,3%. Natomiast dawca mikrospor R14 okazał się kombinacją, z której wyprowadzone linie DH charakteryzowały się nieco lepszym średnim procentem żywotności ziaren pyłku wynoszącym 90,0% (tab. 3).

Tabela 2

Rozkład zawartości glukozynolanów w nasionach uzyskanych liniach DH  
*Distribution of glucosinolate content in obtained DH lines*

Dawca <i>Donor</i>	Liczba androgenicznych roślin o zawartości glukozynolanów <i>Number of plants with glucosinolate content</i>	
	< 60 $\mu\text{M/g}$ nasion < 60 $\mu\text{M/g}$ of seeds	> 60 $\mu\text{M/g}$ nasion > 60 $\mu\text{M/g}$ of seeds
R7	7	23
R10	1	9
R14	3	16
Razem — <i>Total</i>	11	48

Tabela 3

Obserwacje żywotności ziaren pyłku [%] w liniach DH  
*Investigations of pollen grain viability in per cent in DH lines*

Dawca — <i>Donor</i>	Minimum	Maximum	Średnia — <i>Mean</i>
R7	20,2	99,2	80,6
R10	32,2	99,3	84,3
R14	64,0	100,0	90,0

Wynikiem przeprowadzonych badań było wyselekcjonowanie 2 linii DH o wysokiej żywotności pyłku: linii R7/175 E o żywotności pyłku wynoszącej 91,4% oraz linii R10/715C,D wykazującej żywotność pyłku 96,5%; i zawartości glukozynolanów zbliżonej do ich zawartości w linii restorującej. Z linii tych wyprowadzono pokolenie A<sub>2</sub> w warunkach polowych w 1998 roku. Przeprowadzono badania zawartości glukozynolanów na zebranych nasionach pokolenia A<sub>2</sub> z tych linii u których zawartość ta była wielokrotnie niższa od wyników uzyskanych w pokoleniu A<sub>1</sub> (tab. 4).

Tabela 4

Porównanie zawartości glukozynolanów w nasionach dwóch linii DH w pokoleniu A<sub>1</sub> i w pokoleniu A<sub>2</sub> — *Comparison of glucosinolate content in seeds of two DH lines in A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> progeny*

Numer linii DH <i>Number of DH line</i>	Pokolenie A <sub>1</sub> /szkl. 97 $\Sigma$ glukozynolanów [ $\mu\text{M/g}$ nas.] <i>Generation A<sub>1</sub>/greenh. 97</i> $\Sigma$ glucosinolates [ $\mu\text{M/g}$ of seeds]	Pokolenie A <sub>2</sub> /pole98 $\Sigma$ glukozynolanów [ $\mu\text{M/g}$ nas.] <i>Generation A<sub>2</sub>/field 98</i> $\Sigma$ glucosinolates [ $\mu\text{M/g}$ of seeds]
	R7/175E/96s	63,3
R10/715C,D/96s	51,9	6,6

Uzyskane wyniki sugerują, że dla przyspieszenia selekcji niskoglukozyolanowych linii restorujących nie można prowadzić jej na pokoleniu  $A_1$ , ale dopiero na pokoleniu  $A_2$ . Pokolenie uzyskanych linii podwojonych haploidów  $A_1$  należy traktować jako pokolenie wyjściowe do dalszej selekcji. Podobny wniosek został przedstawiony przez Kott (1998) w wyniku przeprowadzonych w Kanadzie badań nad wykorzystaniem podwojonych haploidów w hodowli rzepaku. Ponadto ze względu na selekcyjonowaną cechę — zawartość glukozyolanów, podlegającą w dużej mierze modyfikującemu wpływowi środowiska (Bartkowiak-Broda 1983), selekcję należy prowadzić na nasionach otrzymanych z roślin rosnących w warunkach polowych.

Są to pierwsze wyniki, które wymagają potwierdzenia poprzez przebadanie większej ilości linii DH pokolenia  $A_2$  w warunkach polowych i szklarniowych. Jeżeli wyniki dotąd otrzymane zostaną potwierdzone i okaże się, że można uzyskać homozygotyczne linie z genem restorerem dla CMS *ogura* o bardzo niskiej zawartości glukozyolanów, metoda ta może zostać włączona do programów hodowli odmian mieszańcowych rzepaku.

## Literatura

---

- Bartkowiak-Broda I. 1991. Studia nad systemami męskiej niepłodności u rzepaku *Brassica napus* L. var. oleifera. Hodowla Roślin Aklimatyzacja i Nasiennictwo, 35: 1-60.
- Bartkowiak-Broda I., Krzymański J., Ogródowczyk M. 1983. Inheritance of glucosinolate content and composition in seeds of winter rape (*Brassica napus* L.). Proceedings of 6th International Rapeseed Conference, Paris: 305-310.
- Cegielska-Taras T., Szała L. 1997. Regeneracja roślin z mikrosporowych zarodków rzepaku ozimego. Rośliny Oleiste, XVIII (1): 21-30.
- Delourme R., Eber F. 1992. Linkage between an isozyme marker and a restorer gene in radish cytoplasmic male sterility of rapeseed (*Brassica napus* L.). Theor. Appl. Genet. 85: 222-228.
- Kott L. S. 1998. Application of doubled haploid technology in breeding of oilseed *Brassica napus*. Ag. Biotech News and Information, vol. 103: 69-73.
- 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 International Rapeseed Congress, Cambridge UK, vol. 3: 911-913.
- Shields C. R., Orton C. J., Stuber C. W. 1983. In: Tanksley S. D. and Orton T. J. (Eds) Isozymes in plants genetics and breeding, Part A, Elsevier Sciences Publishers, B. V., Amsterdam: 443-458.
- Vallejos C. E. 1983. Enzyme activity staining. In: Tanksley S. D. and Orton T. J. (Eds) Isozymes in plants genetics and breeding, Part A, Elsevier Sciences Publishers, B. V., Amsterdam: 469-516.