

Cechy organizacji i ekspresji S-locus u samozgodnych i samoniezgodnych roślin kapusty warzywnej (*Brassica oleracea* L.)

Marek Szklarczyk^{1*}, Wojciech Wesołowski¹, Beata Domnicz¹, Magdalena Simlat²

¹Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii Ogrodnictwa, Al. 29-Listopada 54, 31-425 Kraków

²Katedra Fizjologii, Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny, ul. Łobzowska 24, 31-140 Kraków

Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kollątaja w Krakowie

* E-mail: marek.szklarczyk@urk.edu.pl

Wstęp

Samoniezgodność jest mechanizmem uniemożliwiającym roślinie zapylenie jej własnym pyłkiem, stymulując tym samym obcopylność. Samoniezgodność u roślin z rodziny *Brassicaceae* jest kontrolowana przez pojedynczy multialleliczny locus S (S-locus). Zawiera on m.in. gen kodujący kinazę receptorową (SRK) obecną w znamieniu słupka oraz gen kodujący białko SCR (zwane też SP11) obecne w ścianie ziaren pyłku (Kitashiba i Nasrallah 2014, Yamamoto i Nishio 2014). Gdy receptor SRK i jego ligand SCR pochodzą z tego samego allelu S-locus, indukuje to kaskadę reakcji biochemicznych skutkujących zahamowaniem kiełkowania łagiewki pyłkowej. W materiałach kapusty odnajduje się także rośliny, u których mechanizm samoniezgodności nie działa – tzw. samozgodne. Mapowanie genetyczne przeprowadzone przez autorów wykazało kolokalizację QTL samozgodności i S-locus. Nieznana pozostaje natura zmian w S-locus prowadzących do samozgodności – ich poznanie było celem tej pracy.

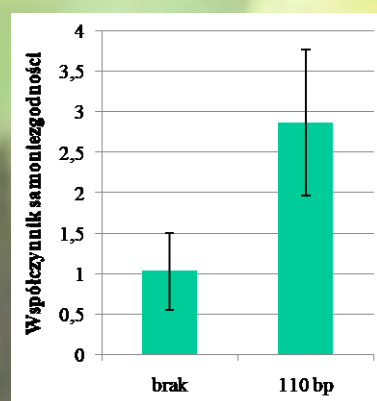
Materiały i metody

Analizami objęto dwie populacje kapusty warzywnej głowiastej (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) – 651 oraz I1. Pierwsza z nich reprezentowała pokolenie F2 a druga pokolenie BC1. Obydwie populacje powstały z krzyżowań rośliny samoniezgodnej i samozgodnej oraz wykazywały segregację pod względem tych cech. Fenotyp roślin wyrażano współczynnikiem samoniezgodności będącym średnią liczbą nasion w łuszczykach danej rośliny po jej samozapyleniu w otwartym kwiecie. Dla wybranych roślin samoniezgodnych i samozgodnych z tych populacji wykonano PCRY ze starterami zakotwiczonymi w sekwencjach locus samoniezgodności (S-locus). Otrzymane produkty amplifikacji sekwencjonowano w serwisie zewnętrznym.

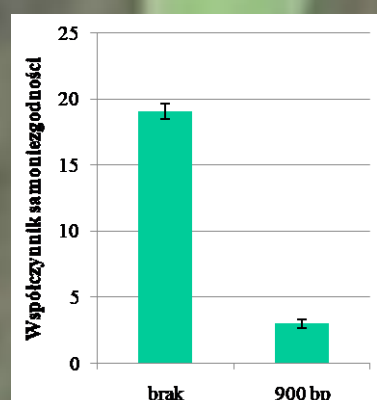
Wyniki

Genotypowanie badanych populacji markerami dla poszczególnych genów S-locus (SRK, SLG i SCR/SP11) uwidoczniło związki pomiędzy wartością współczynnika samoniezgodności oraz typem profilu markerowego. Przykładowo:

- w populacji 651 rośliny z amplifikacją produktu dla genu SCR cechowała wyższa wartość tego współczynnika w porównaniu do roślinami bez amplifikacji (ryc. 1).
- w populacji I1 rośliny z amplifikacją produktu dla genu SRK cechowała niższa wartość współczynnika samoniezgodności w porównaniu do roślinami bez amplifikacji (ryc. 2).



Ryc. 1. Średni współczynnik samoniezgodności dla roślin z populacji 651 o różnych profilach markera bazującego na sekwencji SCR/SP11 (brak – brak produktu PCR, 110 bp – produkt o wielkości 110 bp).

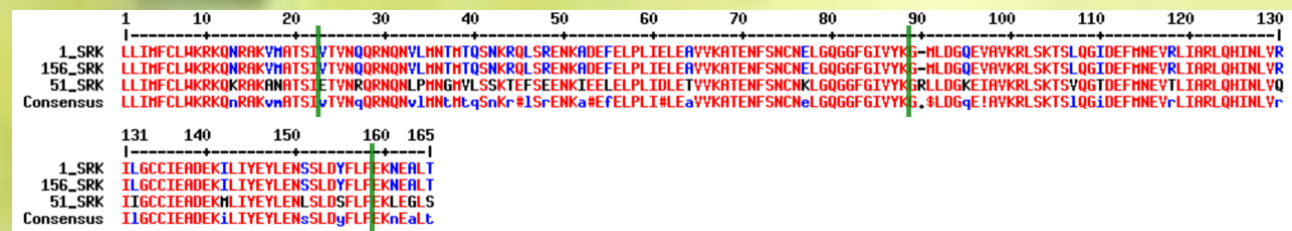


Ryc. 2. Średni współczynnik samoniezgodności dla roślin z populacji I1 o różnych profilach markera bazującego na sekwencji SRK (brak – brak produktu PCR, 900 bp – produkt o wielkości 900 bp).

Gen SRK

W obrębie powielonych fragmentów genu SRK odnaleziono: egzon 2, intron 2, egzon 3, intron 3, egzon 4, intron 4 oraz egzon 5. Sekwencje uzyskane z roślin samoniezgodnych populacji 651 (51) i I1 (156) oraz z rośliny samozgodnej z populacji 651 (1) poddano uliniowieniu w celu identyfikacji rejonów polimorficznych. Długość otrzymanych sekwencji wynosiła 917 bp dla rośliny nr 51 oraz 964 bp dla roślin nr 1 oraz 156. Zestawienie sekwencji nukleotydowych nie wykazało różnic pomiędzy roślinami 1 i 156, wykazało natomiast odmiennosć rośliny 51, przy czym rejony różnicujące w dużej mierze pokrywały się z lokalizacją intronów. Ogółem pomiędzy sekwencjami roślin 1/156 i 51 odnotowano 114 polimorfizmów sekwencyjnych. Sekwencje SRK nie powielono z samozgodnych roślin populacji I1.

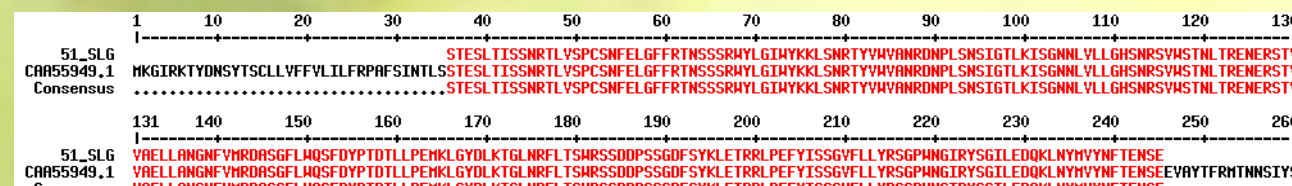
Z uzyskanych sekwencji SRK manualnie usunięto introny otrzymując wirtualne cDNA, które z kolei poddano wirtualnej translacji do odpowiednich sekwencji aminokwasowych (ryc. 3). Analiza homologii wykazała, że samozgodna roślina z populacji 651 (1) i samoniezgodna roślina z populacji I1 (156) reprezentują S-haplotyp S-45. Z kolei sekwencja SRK samoniezgodnej rośliny z populacji 651 (51) reprezentowała haplotyp S-3.



Ryc. 3. Uliniowanie sekwencji białka SRK otrzymanych poprzez wirtualną translację dla roślin: samozgodnej z populacji 651 (1), samoniezgodnej z populacji 651 (51) i samoniezgodnej z populacji I1 (156). Zielonymi liniami oddzielono sekwencje kodowane przez sąsiadujące egzony.

Gen SLG

Sekwencja genu SLG została powielona u obydwu typów roślin z populacji I1 oraz u samoniezgodnych roślin z populacji 651. W drugim przypadku sekwencja SLG reprezentowała typ S-3 odnaleziony w rekordzie sekwencyjnym CAA55949.1 (ryc. 4). U roślin z populacji I1 jednoznaczna identyfikacja sekwencji SLG nie była możliwa. Sekwencje SLG nie powielono u samozgodnych roślin z populacji 651.

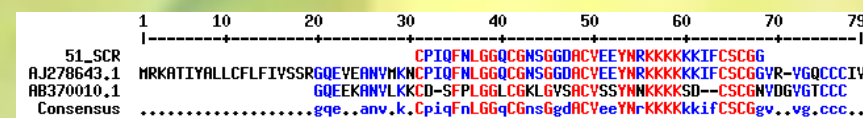


Ryc. 4. Uliniowanie sekwencji białka SLG otrzymanych poprzez wirtualną translację odpowiednich sekwencji nukleotydowych: z rośliny samoniezgodnej z populacji 651 (51) oraz z rekordu sekwencyjnego CAA55949.1.

Gen SCR/SP11

W roślinach samoniezgodnych z populacji 651 (np. 51) zidentyfikowano fragment DNA mający długość 116 nt i wykazujący identyczność z analogicznym odcinkiem genu SCR z haplotypu S-3 *Brassica oleracea* (znalezionym w rekordzie sekwencyjnym AJ278643.1).

Zgodnie z oczekiwaniami wirtualna translacja znalezionej sekwencji genu SCR wykazała pełną zgodność jej sekwencji aminokwasowej z analogicznym regionem białka SCR z haplotypu S-3 *B. oleracea* (AJ278643.1). Sekwencje te wykazywały także podobieństwo do białka SCR z *B. rapa* (AB370010.1) (ryc. 5).



Ryc. 5. Uliniowanie sekwencji białka SCR otrzymanych poprzez wirtualną translację odpowiednich sekwencji nukleotydowych: z rośliny samoniezgodnej z populacji 651 (51) oraz z rekordów sekwencyjnych AJ278643.1 oraz AB370010.1 (*B. rapa*).

Podsumowanie i wnioski

1. Rośliny samoniezgodne z populacji 651 cechuje haplotyp S-3. Świadczą o tym analizy sekwencyjne genów SRK, SLG i SCR/SP11.
2. Rośliny samoniezgodne z populacji I1 cechuje haplotyp S-45. Wskazuje na to typ sekwencji SRK znaleziony u tych roślin.
3. Samozgodny S-haplotyp roślin z populacji 651 powstał prawdopodobnie poprzez mutację haplotypu S-45. Wskazuje na to typ sekwencji SRK znaleziony u tych roślin.
4. W obrębie sekwencji uzyskanych dla roślin samozgodnych z populacji 651 nie znaleziono sekwencji SLG, z kolei w sekwencjach roślin samozgodnych z populacji I1 nie znaleziono sekwencji SRK. Wskazuje to, iż dysfunkcja tych genów odpowiada za samozgodność u roślin z wymienionych populacji.

Literatura

Kitashiba H, Nasrallah JB (2014) Self-incompatibility in Brassicaceae crops: lessons for interspecific incompatibility. *Breed Sci* 64: 23–37

Yamamoto M, Nishio T (2014) Commonalities and differences between *Brassica* and *Arabidopsis* self-incompatibility. *Hort Res* 1: 14054