

Raps als Modell zur Untersuchung der „fixierten Heterosis“ bei allopolyploiden Pflanzen

Franziska Wespel^{1*} und Heiko C. Becker¹

Zusammenfassung

Allopolyploidie spielte bei der Evolution der Pflanzen eine große Rolle. Die hohe Leistung allopolyploider Pflanzen kann unter anderem mit günstigen Wechselwirkungen zwischen den homeologen Genen der Elternlinien („fixierte Heterosis“) erklärt werden. Durch eine vergleichende QTL-Analyse zwischen resynthetisiertem Raps (*Brassica napus*) und seinen diploiden Elternlinien (*Brassica rapa* und *Brassica oleracea*) sollen Loci detektiert werden, die zur Ausprägung von fixierter Heterosis beitragen. Hierzu wurden drei segregierende RIL-Populationen entwickelt und auf ihre Biomasseleistung hin untersucht. Für die Markeranalyse werden AFLP-Marker sowie Mikrosatelliten verwendet, um einen Vergleich mit anderen Arbeitsgruppen zu ermöglichen.

Abstract

We propose an experimental approach to quantify “fixed heterosis” in resynthesized *Brassica napus* and to detect loci contributing to “fixed heterosis” via comparative QTL mapping in *B. napus* and its parental species *B. rapa* and *B. oleracea*. To identify the contribution of individual genes to the fixed heterosis by QTL mapping, three segregating RIL populations were developed and analyzed for early biomass. The marker analysis will be performed with AFLPs and SSR markers allowing a comparison with results of groups working with *Brassica* and *Arabidopsis*.

Key words: fixed heterosis, allopolyploidy, QTL-analysis, *Brassica*, early biomass

Die spontane Hybridisierung verwandter Arten durch Kombination ihrer Genome (Allopolyploidie) spielte bei der Evolution der Pflanzen eine wichtige Rolle. Trotzdem sind die Mechanismen für den Erfolg der Allopolyploiden noch kaum verstanden (OSBORN et al. 2003, SOLTIS and SOLTIS 2000). Ein Grund für ihren Erfolg könnten die positiven Interaktionen zwischen den homologen Chromosomen sein. Positive Interaktionen zwischen den homeologen Loci sollten auch bei homozygoten Genotypen zu einer Mehrleistung der Allopolyploiden im Vergleich zu ihren Elternlinien führen (Abbildung 1). Da diese epistatischen Interaktionen im Gegensatz zur klassischen Heterosis nicht in der F1 aufspalten, werden sie als „fixierte Heterosis“ bezeichnet (ABEL et al. 2005). *Brassica napus* (mit seiner Genomzusammensetzung AACCC) ist ein optimales Modellsystem, um fixierte Heterosis mit Hilfe eines QTL-Mappings genauer zu untersuchen, da hier neue Resynthesen einfach aus den diploiden Elternarten *B. rapa* (AA) und *B. oleracea* (CC) hergestellt werden können.

Für die Untersuchungen wurden eine *Brassica rapa* var. *trilocularis* Linie (RO18 = A₁A₁) vom John Innes Center, eine *Brassica rapa* var. *oleifera* Linie (6748-1430 = A₂A₂) von Agri Food Canada und zwei *Brassica oleracea* var. *alboglabra* Linien (A12 = C₃C₃ and S2C3-4-1 = C₄C₄) (John Innes Center and Crucifer Genet. Cooper.) verwendet. Die Linien sind entweder Doppelhaploide oder Inzuchtlinien. Die vier Linien wurden anhand der fixierten Elternmittelheterosis von 49,9% und 70,5% ausgewählt, die die daraus resynthetisierten Genotypen A₁A₁C₃C₃ and A₂A₂C₄C₄ aufzeigten.

So wurden, um den Beitrag einzelner Gene zur fixierten Heterosis mit QTL-Mapping zu messen, drei segregierende

A: Klassische Heterosis

$$\frac{X \ y \ Z}{X \ y \ Z} \times \frac{x \ Y \ z}{x \ Y \ z} \rightarrow \frac{X \ y \ Z}{x \ Y \ z}$$

Hybrid

B: Fixierte Heterosis

$$\frac{X \ y \ Z}{X \ y \ Z} + \frac{x \ Y \ z}{x \ Y \ z} \rightarrow \frac{X \ y \ Z}{X \ y \ Z} \frac{x \ Y \ z}{x \ Y \ z}$$

Allopolyploid

Abbildung 1: Vergleich von klassischer und fixierter Heterosis

Populationen aus rekombinanten Inzuchtlinien (RIL) in F5/F6 erstellt. Zwei in den diploiden Elternlinien, die je für das A- und C-Genom aufspalten (A₁A₂, C₃C₄) und eine Dritte, die aus der korrespondierenden Allopolyploiden (A₁A₂C₃C₄) erstellt wurde. Diese spaltet für Loci in beiden Genomen auf. In den diploiden Populationen wurden 150 RIL genotypisiert und phänotypisiert und in der allopolyploiden waren es 222 RIL, um eine vergleichbare Detektionsstärke zu gewährleisten.

Für die phänotypischen Daten der QTL-Analyse wurde die frühe Biomasse der RIL bestimmt. Das Merkmal frühe Biomasse wurde gewählt, da aufgrund der hohen Inzuchtgeneration der getesteten Linien Schwierigkeiten bei Blühverhalten, Fertilität und Saatgutentwicklung erwartet wurden. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus. Jeweils acht Pflanzen je RIL wurden in vier Wiederholungen in einer unvollständigen Gitteranlage, die mit Plabplan (UTZ 1994) erstellt wurde, getestet. Die Ernte der oberirdischen Biomasse erfolgte

¹ Georg-August-Universität, Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Von-Siebold-Straße 8, D-37075 GÖTTINGEN

* Ansprechpartner: Dipl. Agr. Biol. Franziska WESPEL, fwespel@gwdg.de

Tabelle 1: Adjustierte Mittelwerte (Mean), Grenzwerte bei 5% (LSD), Extremwerte (Min, Max) und Ergebnisse der Varianzanalyse für die bestimmten Merkmale Frischmasse (FM), Trockenmasse (TM) und Wachstumsrate (FM 2-FM 1, TM 2-TM 1) in den drei RIL Populationen

Merkmale	Mean	LSD	Min	Max	Var. komp.	F-Wert
A₁A₂						
FM 1	1.04	0.39	0.31	1.90	0.0487	3.25 **
TM 1	0.07	0.03	0.02	0.13	0.0002	2.95 **
FM 2	2.30	0.67	0.87	3.68	0.2452	5.10 **
TM 2	0.17	0.05	0.05	0.26	0.0012	4.82 **
FM 2 - FM 1	1.26	0.71	0.48	2.16	0.0853	2.21 **
TM 2 - TM 1	0.09	0.05	0.03	0.17	0.0005	2.30 **
C₃C₄						
FM 1	0.84	0.23	0.40	1.26	0.0179	3.52 **
TM 1	0.06	0.02	0.03	0.09	0.0001	2.83 **
FM 2	1.69	0.41	1.05	2.48	0.0596	3.79 **
TM 2	0.13	0.03	0.08	0.18	0.0004	3.52 **
FM 2 - FM 1	0.85	0.42	0.34	1.60	0.0129	1.57 **
TM 2 - TM 1	0.07	0.03	0.02	0.13	0.0001	1.54 ns
A₁A₂C₃C₄						
FM 1	1.40	0.57	0.19	2.44	0.1313	4.10 **
TM 1	0.09	0.04	0.02	0.18	0.0006	3.86 **
FM 2	2.96	1.10	0.87	5.39	0.4143	3.62 **
TM 2	0.20	0.08	0.06	0.38	0.0023	3.79 **
FM 2 - FM 1	1.57	1.13	0.22	3.46	0.0713	1.43 *
TM 2 - TM 1	0.11	0.10	0.00	0.49	0.0005	1.41 *

** signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01, * signifikant bei 0,05 und + signifikant bei 0,10

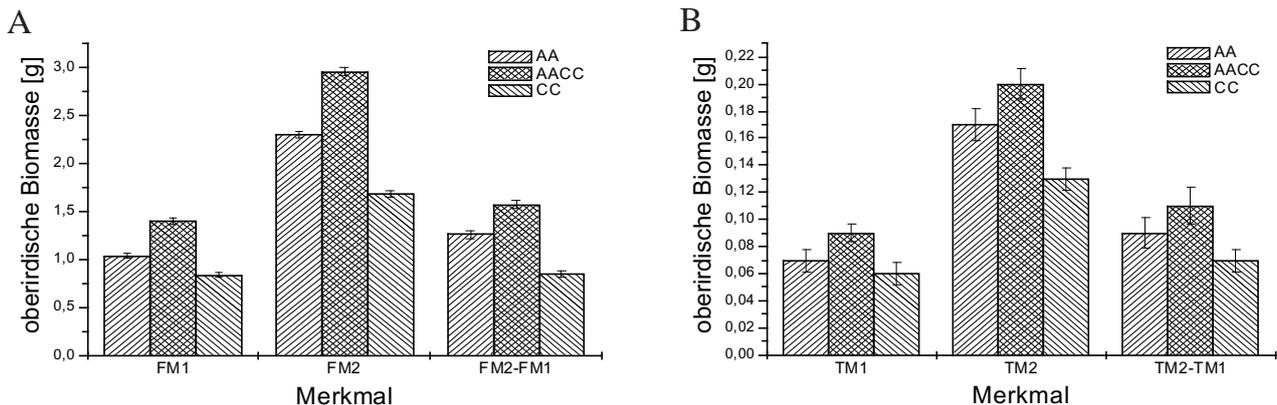


Abbildung 2: Vergleich der adjustierten Mittelwerte für Frischmasse (A) und Trockenmasse (B) in den RIL-Populationen A1A2, A1A2C3C4 und C3C4; (Konfidenzintervall 95%)

18 und 22 Tage nach der Aussaat. Als Merkmale wurde die Frischmasse (FM), Trockenmasse (TM) zu beiden Erntezeitpunkten erfasst und die absolute Wachstumsrate (FM2-FM1, TM2-TM1) zwischen beiden Ernteterminen bestimmt. Die Varianzanalyse und Korrelationen wurden mit Plabstat (UTZ 2004) berechnet.

Zwischen den verschiedenen Genotypen der drei untersuchten Populationen wurde bei allen Merkmalen bis auf TM1-TM2 in C₃C₄ ein signifikanter Unterschied beobachtet (Tabelle 1).

Vergleicht man das Mittel der A₁A₂ und C₃C₄ Linien mit dem Mittel der A₁A₂C₃C₄ Linien, so wiesen letztere eine größere Biomasse für die Frisch- und Trockenmasse an beiden Erntezeitpunkten auf (Abbildung 2).

In allen drei RIL-Populationen waren Frisch- und Trockenmasse beider Erntezeitpunkte hochkorreliert. Ebenso sind die Ergebnisse der beiden Erntezeitpunkte mit 0,72 bis 0,81 miteinander korreliert (Tabelle 2).

Der Trockensubstanzgehalt betrug zum ersten Erntezeitpunkt 6,7% bei A₁A₂, 7,1% bei C₃C₄ und 7,1% bei A₁A₂C₃C₄. Zum zweiten Erntezeitpunkt war der Trockensubstanzgehalt bei A₁A₂ 7,4%, bei C₃C₄ 7,7% und 7,1% bei A₁A₂C₃C₄.

In unserem Projekt wurden für die Biomasseversuche und den Vergleich mit den Resynthesen diploide Linien statt autotetraploide verwendet, da die Autotetraploiden weniger fertil und wüchsig waren als die Diploiden. So haben ABEL und BECKER (2007) beobachtet, dass tetraploide Linien einen um 2-64% geringeren Biomasse aufwiesen als die korrespondierenden diploiden Linien. Dies könnte auf Meiosestörungen hindeuten und Schwierigkeiten bei der Entwicklung der RILs und auch bei der Markeranalyse und Interpretation der Ergebnisse verursachen.

Des Weiteren hatten die Diploiden und Allopolyploiden einen ähnlichen Trockensubstanzgehalt, was mit den Beob-

Tabelle 2: Korrelationen zwischen Trockenmasse und Frischmasse

Variable	FM 1	TM 1	FM 2
TM 1	0.95 **		
FM 2	0.79 **	0.73 **	
TM 2	0.73 **	0.72 **	0.96 **
C3C4			
TM 1	0.95 **		
FM 2	0.78 **	0.72 **	
TM 2	0.73 **	0.72 **	0.95 **
A1A2C3C4			
TM 1	0.97 **		
FM 2	0.81 **	0.78 **	
TM 2	0.80 **	0.80 **	0.97 **

** Signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01, * signifikant bei 0,05 und + signifikant bei 0,10

achtungen von ABEL und BECKER (2007) übereinstimmt, die ebenfalls keinen signifikanten Effekt des Ploidiegrades auf den Trockensubstratgehalt feststellen konnten.

In den Biomasseversuchen wiesen die Allopolyploiden eine signifikant höhere Biomasse auf als die Diploiden (Abbildung 2), somit ist das von uns ausgewählte Material geeignet, um QTL für fixierte Heterosis zu identifizieren. Für eine QTL-Analyse ist es außerdem notwendig, dass es Unterschiede zwischen den RILs einer Mappingpopulation gibt. So war hier die Variation innerhalb einer Population hochsignifikant und die Linien der A₁A₂ Population zeigten eine höhere Variabilität als die RIL der C₃C₄ Population. Dies stimmt mit der von ABEL et al. (2005) bestimmten genetischen Distanz nach Jaccard von 0,741 für A₁ und A₂ und von 0,313 für C₃ und C₄ überein.

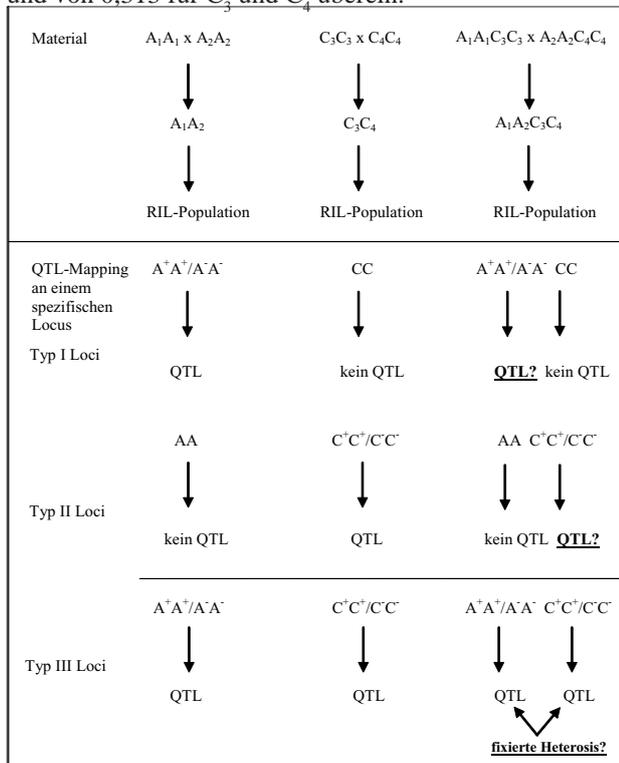


Abbildung 3: Prinzipien des QTL-Mappings um fixierte Heterosis zu analysieren (Erläuterungen siehe Text).

Für die Markeranalysen wurden AFLP und SSR Marker verwendet. AFLPs sind eine günstige und schnelle Methode, um DNA-Polymorphismen zu detektieren und eine Frameworkmap zu erstellen (VOS et al. 1995). Die zusätzlich verwendeten SSR-Marker sind möglichst gleichmäßig über das Genom verteilt, um ein Alignment mit anderen Kopplungskarten zu ermöglichen und die Chromosomen zuordnen zu können. So wurden schon in früheren Studien (SAAL et al. 2001) Mikrosatellitenmarker in *B. oleracea*, wie auch in *B. rapa* und *B. napus*, angewandt, um erfolgreich die homeologen Beziehungen aufzuzeigen. Eine Kopplungskarte, basierend auf molekularen Markern, die es erlauben, zwischen homologen und homeologen Regionen zu unterscheiden, ist notwendig für eine vergleichende Analyse in *Brassica*-Arten.

In den Populationen von A₁A₂ und C₃C₄ wurden bereits QTL für Biomasse detektiert (Daten werden hier nicht gezeigt) und wir hoffen, dieselben QTL in der A₁A₂C₃C₄ Population zu finden. Für die beobachteten QTL können drei verschiedene Fälle klassifiziert werden (Abbildung 3): QTL, die im A-Genom detektiert werden, aber nicht an der korrespondierenden Position im C-Genom (I). QTL, die im C-Genom detektiert werden, aber nicht an der entsprechenden Position des A-Genoms (II) und QTL die sowohl im A-Genom als auch im C-Genom an den korrespondierenden Positionen bestimmt werden. Das Prinzip des QTL-Mappings ist es, jene QTL, die jeweils im A- und C-Genom identifiziert wurden, mit denselben QTL in der allopolyploiden Situation zu vergleichen. Unter der Annahme von fixierter Heterosis sollten sich die Effekte bei der Allopolyploiden unterscheiden. Zumindest einige der QTL, die nur im A-Genom (I) detektiert wurden, sollten in der Allopolyploiden nicht mehr nachweisbar sein, da das C-Genom ein positives Allel mit maskierendem Effekt auf das andere Genom haben könnte. Entsprechend sollten einige der QTL, die im C-Genom (II) detektiert werden, verschwinden, da sie von positiven Allelen im A-Genom maskiert werden. QTL, die jedoch in beiden Genomen (III) detektiert werden, sollten nicht verschwinden, aber es sollte epistatische Effekte zwischen ihnen geben, da (A⁺A⁺C⁻C⁻ + A⁻A⁻C⁺C⁺) einen größeren Effekt haben sollte als (A⁺A⁺C⁺C⁺ + A⁻A⁻C⁻C⁻) (Tabelle 3). Da in unserem Versuch nur homozygote Linien verwendet wurden, können nur additive Effekte und additive x additive Epistasie auftreten. In der Annahme, dass nur additive Geneffekte (keine Epistasie/fixierte Heterosis) auftreten, sollten alle im A- und C-Genom detektierten QTL dieselben Effekte in der allopolyploiden Situation aufweisen. Sollte es jedoch Unterschiede geben, so ist dies ein Hinweis auf fixierte Heterosis. Diese Annahmen sind nur gültig, wenn der Effekt eines negativen Allels in einem Genom vollständig durch

Tabelle 3: Mögliche Allelkombinationen in der Allopolyploiden an zwei homeologen Loci und das erwartete Auftreten von fixierter Heterosis

Genotyp	fixierte Heterosis
A ⁺ A ⁺ C ⁺ C ⁺	nein
A ⁻ A ⁻ C ⁻ C ⁻	nein
A ⁺ A ⁺ C ⁻ C ⁻	ja
A ⁻ A ⁻ C ⁺ C ⁺	ja

ein positives Allel im anderen kompensiert werden kann, ansonsten wird der QTL nicht vollständig verschwinden, sondern nur einen geringeren Effekt haben.

Mit diesem Ansatz wird es möglich sein, zumindest einige QTL für fixierte Heterosis zu identifizieren, die dann in weiteren Forschungsvorhaben detaillierter untersucht werden können. Durch die Verwendung der SSR-Marker wird außerdem ermöglicht, unsere Ergebnisse mit den Ergebnissen von QTL-Mappings in anderen Arbeitsgruppen zu vergleichen, die mit *Brassica* oder *Arabidopsis* arbeiten. Dies alles wird dazu beitragen, den Einfluss der fixierten Heterosis auf den Erfolg von Allopolyploiden besser zu verstehen.

Danksagung

Stefan ABEL, Roland STÜBE, Torben SCHULZ-STREECK.

Diese Arbeit wird im Rahmen des Forschungsschwerpunktes „Heterosis in Plants“ von der DFG finanziert.

Literatur

ABEL, S. and H.C. BECKER, 2007: The effect of autopolyploidy on biomass production in homozygous lines of *Brassica rapa* and *Brassica oleracea*. *Plant Breeding* 126:642-643.

ABEL, S., C. MÖLLERS and H.C. BECKER, 2005: Development of synthetic *Brassica napus* lines for the analysis of „fixed heterosis“ in allopolyploid plants. *Euphytica* 146:157-163.

OSBORN, T.C., J.C. PIRES, J.A. BIRCHLER, D.L. AUGER, Z.J. CHEN, H.S. LEE, L. COMAI, A. MADLUNG, R.W. DOERGE, V. COLOT and R.A. MARTIENSSEN, 2003: Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends in Genetics* 19:141-147.

SAAL, B., J. PLIESKE, J. HU, C.F. QUIROS and D. STRUSS, 2001: Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica*. II. Assignment of rapeseed microsatellites to the A and C genomes and genetic mapping in *Brassica oleracea* L. *Theoretical and Applied Genetics* 102:695-699.

SOLTIS, P.S. and D.E. SOLTIS, 2000: The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:7051-7057.

UTZ, H.F., 1994: Plabplan, Computerprogramm zum Erstellen von Plänen für Block- und Gitteranlagen. Institut für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik der Universität Hohenheim, Stuttgart.

UTZ, H.F., 2004: PLABSTAT. Ein Computerprogramm zur statistischen Analyse von pflanzenzüchterischen Experimenten. Version 3. Institut für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik, Universität Hohenheim.

VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T.V.D. LEE, M. HORNES, A. FRITERS, J. Pot, J. PALEMAN, M. KUIPER and M. ZABEAU, 1995: AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23:4407-4414.