

ANALYSIS OF SEQUENCE POLYMORPHISM OF SCR CLASS I AND II ALLELES AND STUDY REGULATION OF THEIR EXPRESSION

ANALÝZA SEKVENCÍ ALEL GENU SCR TŘÍDY I A II A STUDIUM REGULACE JEJICH EXPRESE

Jana ŽALUDOVÁ, Božena KUKOLÍKOVÁ, Kateřina ŠIMÁČKOVÁ, Lenka HAVLÍČKOVÁ and Vladislav ČURN*

Biotechnological centre, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia, Studentská 13, České Budějovice, Czech Republic, e-mail: vcurn@seznam.cz, Tel.: 00420387772586, Fax: 0042387772588

ABSTRACT

Self-incompatibility (AI) is a widespread mechanism used by flowering plants to prevent inbreeding depression and helps create and maintain genetic diversity within a species. Oilseed rape (*Brassica napus* L.) and especially its modern varieties are characterized by high level of self-fertility. In an effort to increase the production current breeding is focused on the production of inbred lines for making the F₁ hybrids and the self-incompatibility can be an interesting tool for production self-sterile lines. In *Brassica napus*, we found two recessive alleles of a gene *SCR II*. Different expression of both alleles does not correspond to phenotypic manifestation of self-incompatibility and we can assume that it is prevailed by repressor gene that does not lie on the S-locus. This is also reason, why the *SCR* gene cannot serve as a molecular marker of self-incompatibility in *Brassica napus*, although many authors believe that this gene is essential in AI reaction. *Brassica napus* belong to plants with complex genetic constitution, is composed by two genomes, A and C, which give the possibility of different interactions and makes it difficult to study compared with diploid *B. rapa* and *B. oleracea*. In further study it is therefore important to focus on the interactions between genes *SCR*, *SRK* and *SLG*, and their influence on others, such as supressor gene systems.

KEYWORDS: Self-incompatibility, *Brassica napus*, *SLG*, *SCR*, *SRK*

ABSTRAKT

Autoinkompatibilita (AI) je rozšířený mechanismus používaný kvetoucími rostlinami k předcházení inbrední deprese a pomáhá vytvořit a udržet genetickou diverzitu uvnitř druhu. Řepka olejná (*Brassica napus* L.) je fakultativně cizosprašná, samosprašnost ale u moderních odrůd zcela převažuje. Ve snaze zvýšit produkci je šlechtění zaměřeno na produkci linií využitelných pro tvorbu F₁ hybridů a autoinkompatibilita by zde mohla najít významné uplatnění. U *Brassica napus* byly

nalezeny dvě recesivní alely genu *SCR II*, které jsou navzájem v proměnlivém vztahu dominance a recesivity. Různá exprese obou alel neodpovídá fenotypovému projevu autoinkompatibility a dá se předpokládat, že je ovládána dosud neidentifikovaným represorovým genem, který neleží na S-lokusu. Z tohoto důvodu nemůže gen *SCR* sloužit jako molekulární marker autoinkompatibility u *Brassica napus*, přestože je podle mnoha výzkumů nezbytný v AI reakci. *Brassica napus* patří mezi rostliny se složitým genetickým založením, je tvořena dvěma genomy, což dává možnost různým interakcím a znesnadňuje studium oproti diploidním druhům *B. rapa* a *B. oleracea*. V dalším studiu autoinkompatibility je proto důležité se zaměřit na sledování interakcí mezi geny *SCR*, *SRK* a *SLG* a jejich ovlivňování jinými, např. supresorovými systémy.

KLÍČOVÁ SLOVA: autoinkompatibilita, *Brassica napus*, *SLG*, *SCR*, *SRK*

DETAILED ABSTRACT

Self-incompatibility in *Brassica* species is controlled by a single (multiallelic) dominant genetic locus called the S locus and is of the sporophytic type (Bateman, 1955; de Nettancourt, 1977; Ockendon, 1974). The self-incompatibility response relies on a series of complex cellular interactions between the self-incompatible pollen and pistil and represents the most widespread strategy preventing inbreeding and promoting outcrossing. In sporophytic self-incompatibility system is self-incompatible behaviour of pollen determined by the genotype of the pollen parent. *SRK*, *SP11/SCR* and *SLG* are the determinants that initiate the allele-specific rejection of self-incompatible pollen. *SLG* and *SRK* are female determinants encoding S proteins in the pistil (Silva and Goring, 2001). The extracellular domain of *SRK* shares a high degree of sequence similarity with *SLG* implying that both genes co-evolved and that *SLG* perhaps is the result of a duplication of the *SRK* extracellular domain. *SRK* is primary determinant of self-incompatibility in the pistil, however, the claim for *SLG* in this response has been somewhat controversial. Several tightly linked genes that play a role in controlling self-incompatibility have been identified in the S locus region. The term S haplotype has been adopted to designate the different S alleles for this group of multi-allelic genes in the S locus region. Since both *SLG* and *SRK* are highly polymorphic, the S haplotypes of both genes can be divided into two classes based on sequence similarities between the *SLG* proteins and between the *SRK* proteins. Class I S haplotypes possess highly polymorphic *SLG* and *SRK* genes, and show a strong self-incompatibility phenotype. Class II S haplotypes, however, possess *SLG* and *SRK* genes that are less polymorphic, exhibit a weaker self-incompatibility phenotype and are recessive to class I alleles. The male determinant of self-incompatibility, termed *SP11* or *SCR*, was identified at the same time by Suzuki et al. (1999) and Schopfer et al. (1999) and is expressed in anthers. However, other components are required to carry out cellular responses leading to pollen rejection such as *THL1*, *THL2* or *ARC1* proteins (Shiba et al., 2004). Interesting is also occurrence of some dominant and recessive interactions between S alleles, because many of the S alleles are codominant. How does the dominant–recessive relationship between these S haplotypes emerge was described by Tarutani et al. (2010) in recent study of small non-coding RNA (sRNA) controlling methylation of promoter regions of recessive *SP11* alleles in the anther tapetum. The aims of this study was the identification and characterization of

functional alleles of *SCR* gene occurring in AI oil seed rape lines and assess the role of the *SCR* gene in the incompatible reaction.

Analyses were performed in DH lines arising from F₁ hybrids after crossing of AI lines and OO quality donors. AI lines were derived from a purposefull screening of AI plants, which took place in the VÚOL in Opava. These lines are characterized by high stability of recessive type AI (Havel, 1996). DH lines were produced in the VURV Prague - Ruzyně in microspore cultures.

Only one allele of *SCR* gene was amplified from genomic DNA and this allele is known from previous studies to occur in tandem copy (Žaludová, 2007). The predominance of this allele in the genome is 2:1 and is therefore likely to be preferentially amplified. In cDNAs only two different alleles were identified from different crosses, even though the gene is highly polymorphic *SCR* (Shiba et al., 2001; Watanabe et al., 2000). Although differences were found from both alleles, these were mostly singlenucleotide mutation. However, it is very unlikely that such mutations could alter the specificity of expressed proteins, since the *SCR* is in some places very variable and change the specificity is determined by a larger number of mutations and deletions (Mishima et al., 2003). Two types of transcripts were found in one allele of *SCR II* and it was caused by alternative splicing, similarly as in *Brassica oleracea*, where it is assumed that AL-forms are later forms.

ÚVOD

Autoinkompatibilita (AI) je rozšířený mechanismus používaný kvetoucími rostlinami k předcházení inbrední deprese a pomáhá vytvořit a udržet genetickou diverzitu uvnitř druhu. Řepka olejná (*Brassica napus* L.) je fakultativně cizosprašná, samosprašnost ale u moderních odrůd zcela převažuje. Ve snaze zvýšit produkci je šlechtění zaměřeno na produkci linií využitelných pro tvorbu F₁ hybridů a autoinkompatibilita by zde mohla najít významné uplatnění.

Při zkoumání genetického založení AI se zjistilo, že je pod kontrolou S-lokusu, který má velký počet alel (de Nettancourt, 1977; Ockendon, 1974). Jednotlivé alely tohoto lokusu, S-alely, byly podle svého účinku rozděleny na dvě třídy, a to na třídy I a II, přičemž třída I se považuje za dominantní nad třídou II (Nasrallah et al., 1991). Na S-lokusu se dlouho hledaly geny, které mají zásadní vliv na průběh AI reakce. Zejména při studiu genomů *B. rapa* a *B. oleracea* byly objeveny dva geny, *SLG* a *SRK*, kterým se přikládá zásadní význam při řízení projevů autoinkompatibility, ovšem stále „chyběl“ gen pro pylový determinant. Ten byl objeven nedávno u *B. rapa* i u *B. oleracea*, přičemž splňoval všechny obecné požadavky, tj. lokalizace na S-lokusu a vysoký stupeň polymorfismu. *SCR* (S-locus cysteine-rich protein) (Schopfer et al., 1999), syn. *SP11* (Suzuki et al., 1999), je exprimován pouze v prašnicích. Patří ke skupině PCP proteinů a je považován za samčí determinant AI. Je produkován buňkami tapeta a váže se na protein genu *SLG* bez ohledu na S-haplotyp. Je v genové vazbě s geny *SLG* a *SRK* (Schopfer et al., 1999). U *B. rapa* bylo zjištěno, že *SCR* se exprimuje převážně v tapetu homozygotů třídy II. U heterozygotů třídy I a II je exprese třídy II potlačena (Shiba et al., 2002). Podobné alely *SCR* třídy I jako u rodu *Brassica* byly objeveny i u rodu *Raphanus* (Okamoto et al., 2004). Některé S-haplotypy z *B. rapa* a *B. oleracea* si zachovaly stejnou rozpoznávací specifitu ještě

po rozdělení druhů, což je důkaz transdruhové evoluce AI genů (Kimura et al., 2002). Alely *SLG* a *SRK* třídy II mají z fylogenetického hlediska odlišný původ než alely třídy I (Hinata et al., 1995; Kusaba et al., 1997). Obdobné pozorování bylo provedeno i u *SCR* (Shiba et al., 2002). Při mezidruhovém křížení *B. napus* a *B. oleracea* se na pozadí *B. napus*jevily S-alely *B. oleracea* jako dominantní (Ripley and Beversdorf, 2003). Další důležité informace nám může poskytovat struktura proteinu *SCR*. V primární struktuře bylo pozorováno 8 konzervativních cysteinů (odtud název cysteine rich protein), jeden tyrosin a glycin, a to u alel obou tříd (Schopfer et al., 1999; Suzuki et al., 1999). Toto umožňuje alelám *SCR* udržet si podobnou strukturu proteinu (Mishima et al., 2003).

Specifická je v AI reakci určena alelově specifickou interakcí mezi *SRK* receptorem a *SCR* ligandem. Z toho vyplývá, že *SRK* a *SCR* se musejí vyvíjet zároveň, aby se udržela jejich interakce. V tomto dvougenovém systému vyžaduje vytvoření nových specifit výskyt nových mutací na receptoru a ligandu kódujícího stejný S-haplotyp, tak aby bylo udrženo navázání (Chookajorn et al., 2004). Statisticky bylo prokázáno, že *SP11* a *SRK* jednoho S-haplotypu u *B. oleracea* i *B. rapa* se odchyľují souběžně (Sato et al., 2002).

Cílem studie byla identifikace a charakterizace funkčních alel genu *SCR*, které se vyskytují u AI linií řepky a posouzení role genu *SCR* v inkompatibilní reakci.

MATERIÁL A METODY

Rostlinný materiál

Analýzy byly provedeny u dihaploidních linií vzniklých z F₁ kříženců AI linií a donora 00 kvality. Protože se jedná o dihaploidy, je zaručena absolutní homozygotnost. AI linie použité ke křížení pocházejí z cíleného vyhledávání rostlin, které probíhalo na pracovišti VÚOL v Opavě. Vyznačují se vysokou stabilitou AI recesivního typu (Havel, 1996). Dihaploidní linie byly vyprodukovány na pracovišti VÚRV Praha – Ruzyně pomocí techniky mikrosporových kultur.

Jako rostlinný materiál byly použity dihaploidy z těchto křížení:

AIK-6 x Rasmus – rostliny č. 1-33

AIK-6 x OP-BN-03 – rostliny č. 34-66

AIK-6 x Lisek – rostliny č. 67-92

AIK-3 x Rasmus – rostliny č. 93-118

AIK-3, AIK-6 – AI linie odvozené z odrůdy Tandem

OP-BN-03, Lisek, Rasmus – donory 00 kvality

Metody

Izolace genomové DNA a PCR-RFLP genu SCRII

Genomová DNA byla izolována kitem Qiagen DNasy Plant Mini Kit. Pro amplifikaci *SCRII* byly použity primery pro genomickou DNA (Shiba et al., 2002). PCR reakce probíhá v objemu 25 µl, v 1x reakčním pufru (75 mM Tris-HCl, pH=8,8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs), 10 pmol primeru (IDT), 1,25 U Taq Purple DNA polymerázy (PPP Master Mix, Top-Bio, CZ), 2x BSA a 50 ng templátové DNA.

PCR reakce měla 45 cyklů a probíhala za těchto podmínek – denaturace při 94°C 30 s, annealing při 55°C 30 s, polymerace při 72°C 1 min. PCR produkty pak byly rozštěpeny specifickými restričními endonukleázami (*Mnl I*, *Hinf I*, *Nsp I*, *ScrF I*). Vzniklé fragmenty byly poté rozděleny na 10% PAGE nebo na 1,5% agaróze (Čurn, 2005; Čurn et al., 2008).

Vytvoření cDNA genu SCRII a SCRI

Celková RNA byla vyizolována z prašníků pomocí kitu (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen) a mRNA kitem Oligotex mRNA Mini Kit (Qiagen), získaná RNA byla ošetřena DNázou, aby se zbavila kontaminace DNA. Reverzní transkripce byla provedena pomocí Omniscript RT Kitu. Druhý řetězec byl nasyntetizován pomocí primerů SCR1 a SCR2 (Shiba et al., 2002) pro gen *SCR II* primery F1, F2 (Watanabe et al., 2000) a oligo d(T)₁₈ pro gen *SCR I*. PCR reakce měla 42 cyklů a probíhala za těchto podmínek – denaturace při 94°C 30 s, annealing při 45°C 30 s, polymerace při 72°C 1 min.

PCR-RFLP genu SLG II

PCR byla provedena s primery PS21 a PS3 (Nishio et al., 1996). PCR reakce měla 45 cyklů a probíhala za těchto podmínek – denaturace při 93°C 1 min., annealing při 58°C 2 min., polymerace při 72°C 3 min. Zaklonované alely byly po PCR amplifikaci z plazmidů rozštěpeny enzymem *AfaI*.

Klonování a sekvenování SCRII a SCRI

cDNA obou genů byla zaklonována pomocí kitu TOPO TA Cloning. Sekvenační reakce byla provedena pomocí kitu CEQTM DTCS (Beckman Coulter) na sekvenátoru ABI PRISM 310 (BC AV ČR České Budějovice). Získané sekvence byly vyhodnoceny v programu BioEdit a v případě *SCR I* srovnávány s databází National Center for Biotechnology Information pomocí programu Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Screening klonů probíhal pomocí PCR-RFLP a Southernovy dot blot hybridizace.

RT-PCR-RFLP genu SCRII

rtPCR provedená pomocí primerů SCR1 a SCR2 byla rozštěpena restričními endonukleázami (*Hha I*, *Mnl I*) a separována na 10% PAGE.

Southernova hybridizace – dot blot

Amplifikované alely genu *SCR II* z různých klonů byly přeneseny mírným vakuem v blotovacím zařízení na nylonovou membránu a na membráně hybridizovaly se sondou alely *SCR II* (klon 86-H). Hybridizace probíhala při teplotě 60°C, poté byla membrána vymyta a hybridizující sonda na ní byla detekována. Ke značení sondy byla použita alkalická fosfatáza (Alkphos Direct Labeling Reagents, Amersham Pharmacia Biotech). K detekci signálů na membráně byl použit kit CDP-Star (Amersham Pharmacia Biotech).

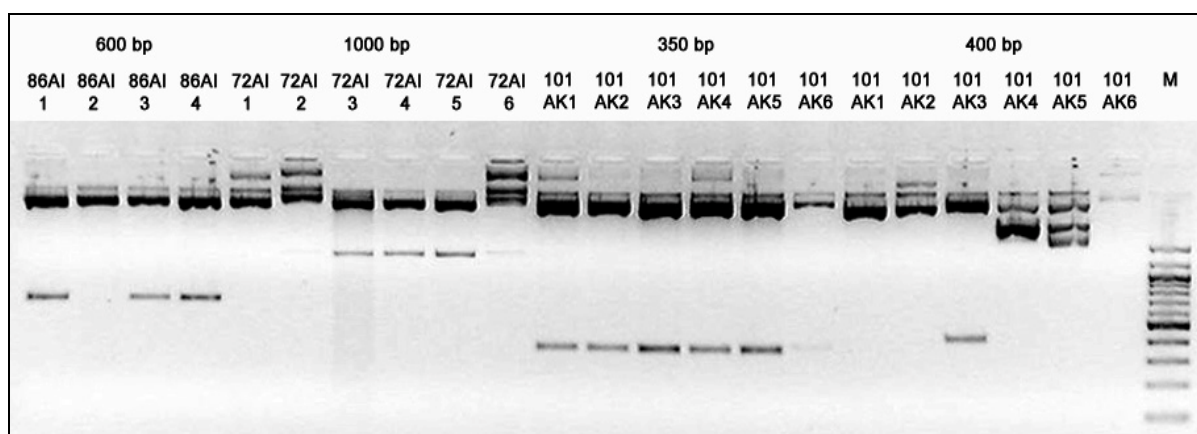
Semenný test

Na jednu větev s poupaty od každé rostliny byly navlečeny izolátory z netkané textilie, které zde byly umístěny do odkvětu, poté byl izolátor odstraněn a větev byla označena barevným provázkem. Fenotypový projev AI byl hodnocen podle počtu semen v šešuli. Semena z AI rostlin byla získána opylením v poupěti.

VÝSLEDKY

Z cDNA byl amplifikován gen *SCR I* pomocí primeru F1 a oligo d(T)₁₈. Na gelu byla patrná řada nespecificky amplifikovaných fragmentů a některé z nich byly vyříznuty a klonovány (Obr. 1). Žádný fragment neodpovídal předpokladu, že *SCR I* je pouze u AK rostlin nebo u všech. Fragmenty byly spíše náhodné. Sekvence byly srovnány s databází NCBI a ani jeden z fragmentů nepatřil genu *SCR* a také neměl strukturu specifickou pro tento gen. Úspěšná nebyla ani nested PCR s primerem F2 (obr. 2).

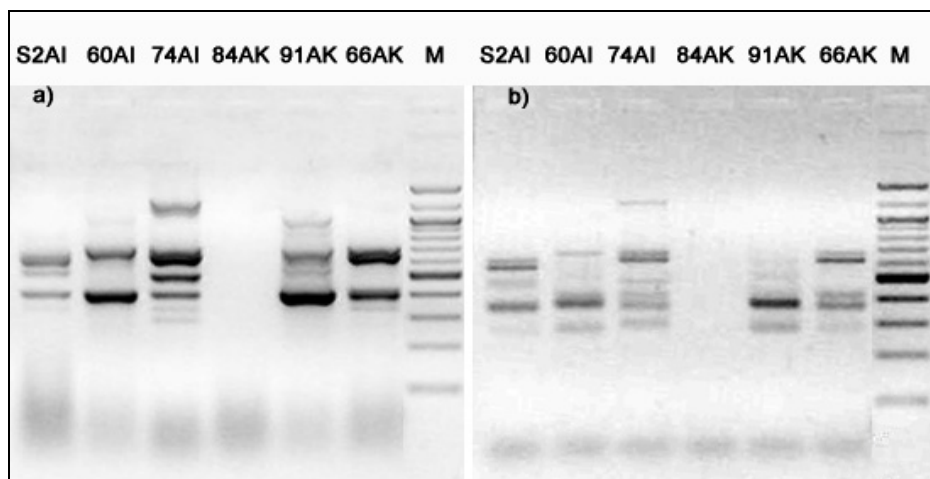
Obrázek 1. Klonování různých fragmentů *SCR I*. Na gelu jsou patrné čtyři druhy zaklonovaných fragmentů – 600bp, 1000bp, 350bp a 400bp.



Pomocí metody PCR-RFLP byly hledány různé alely genu *SCR II*, ale nepodařilo se je rozlišit žádným ze čtyř použitých enzymů, jak u odrůd, tak u různých AI linií (obr. 3 a 5). Výsledky restričního štěpení stále odpovídaly jedné alele. Vzhledem k rozsáhlému souboru linií a značnému objemu analyzovaných fragmentů byla pro primární analýzu polymorfismu zvolena technika PCR-RFLP. Fragmenty/klony, které vykazovaly odlišné spektrum restričních fragmentů, byly sekvenovány a byl zjišťován polymorfismus na úrovni sekvence. U některých AI linií byla následně ověřována přítomnost různých S-alel pomocí PCR-RFLP genu *SLG II* a zde byly patrné odlišnosti mezi AI liniemi. Po zaklonování tohoto genu a rozlišení klonů pomocí PCR-RFLP byly nalezeny 2 až 3 různé alely (obr. 4) v minimálním počtu

analyzovaných klonů (5). Proto byl nadále prováděn screening a hledání různých alel *SCR II* na úrovni cDNA (RT-PCR-RFLP). rtPCR-RFLP genu *SCR II* již bylo úspěšnější. Zaklonované alely cDNA genu *SCR II* byly restričním štěpením pomocí enzymu *Mnl I* rozlišeny na dvě skupiny: jedna odpovídala již objevené alele a druhá doposud neidentifikované alele (obr. 6).

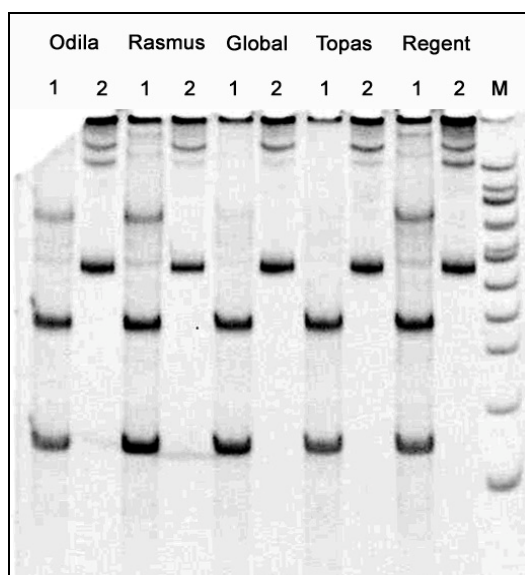
Obrázek 2. Nested PCR genu *SCR I*. a) PCR provedená s primerem F1 a oligo d(T)₁₈. Na gelu je patrných několik fragmentů u každého vzorku, které ale příliš nekorelují s fenotypem rostlin. b) Nested PCR provedená s primerem F2 a oligo d(T)₁₈.



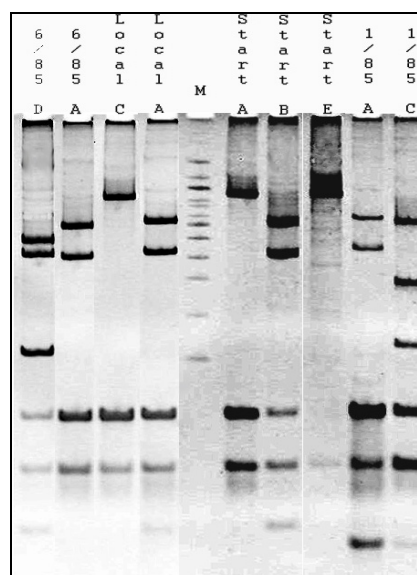
Obrázek 3. PCR-RFLP genu *SCR II*. *SCR II* u pěti odrůd byl rozštěpen enzymem *ScrF I* (1). Číslo 2 je neštěpená kontrola.

Obrázek 4. PCR-RFLP *SLG II*. Zaklonované alely genu *SLG II* byly naamplifikovány a rozštěpeny enzymem *Afa I*. U AI linií Tandem 6/85, Tandem 1/85 a Local byly rozlišeny 2 alely. U AI linie Start byly rozlišeny 3 alely.

Obr. 3

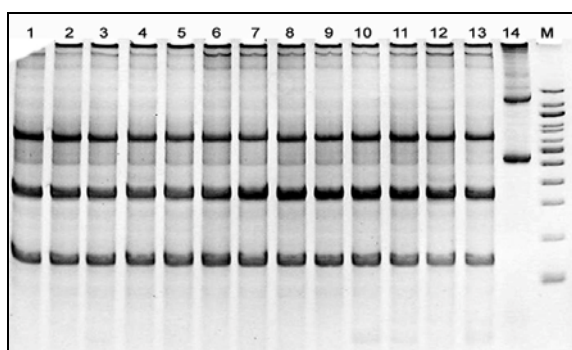


Obr. 4

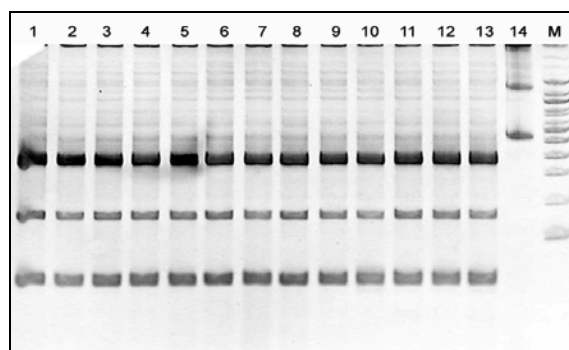


Obrázek 5. PCR-RFLP genu *SCR II*. Dráha 1 - AIK 3, 2 - AIK6, 3 - Start, 4 - Tandem 1/85, 5 - Liropa, 6 - WRG 15, 7 - Cathy, 8 - Local, 9 - Tandem 6/85, 10 - DH OP 1/02, 11 - WRG 1, 12 - Start x WRG, 13 - Global, 14 - Westar; neštěpená kontrola. Vzorky 2, 7, 8, 10, 13 a 14 jsou AK. Všechny tyto vzorky byly štěpeny čtyřmi různými restrikními enzymy: **a) *ScrF I***, **b) *Mnl I***, **c) *Nsp I***, **d) *Hinf I***. U neštěpené kontroly si můžeme všimnout asi 1000 bp dlouhého fragmentu, který vzniká po amplifikaci obou kopií alely 1.

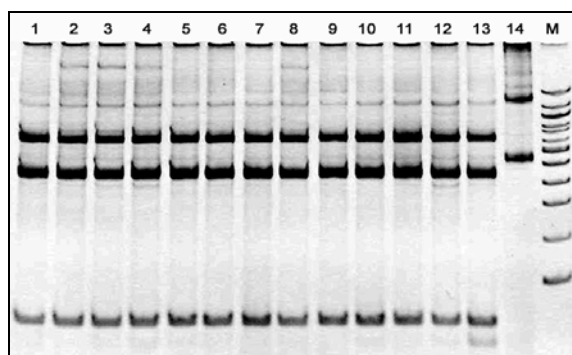
a) *ScrF I*



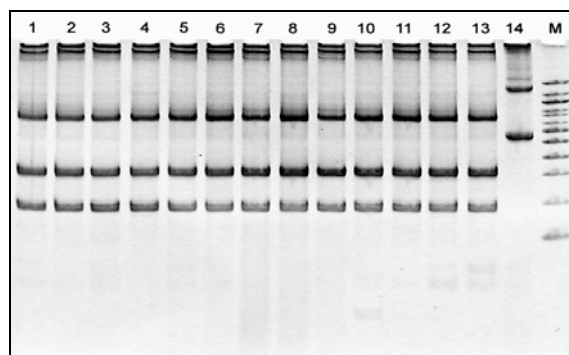
b) *Mnl I*



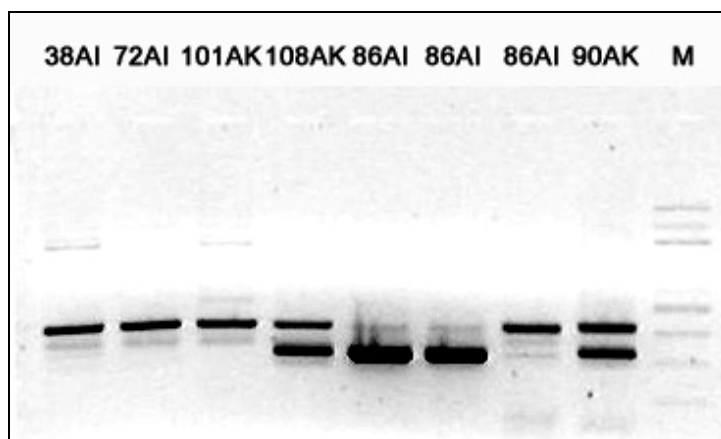
c) *Nsp I*



d) *Hinf I*



Obrázek 6. rtPCR genu *SCR II*. Na gelu jsou patrné fragmenty o velikosti 300 a 400 bp, odpovídající genu *SCR II* před a po sestřihu intronu.



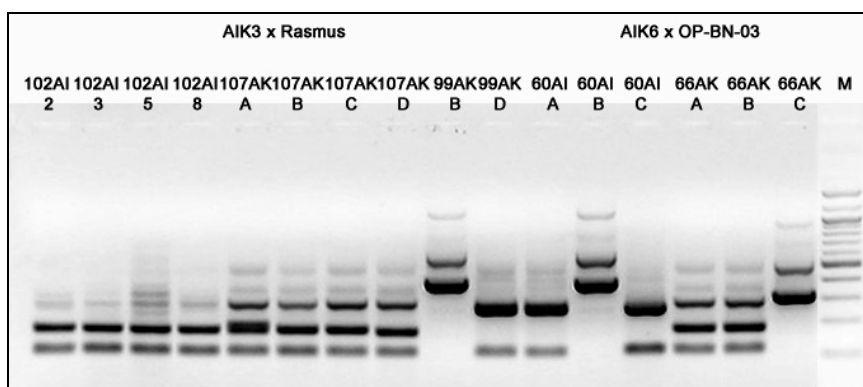
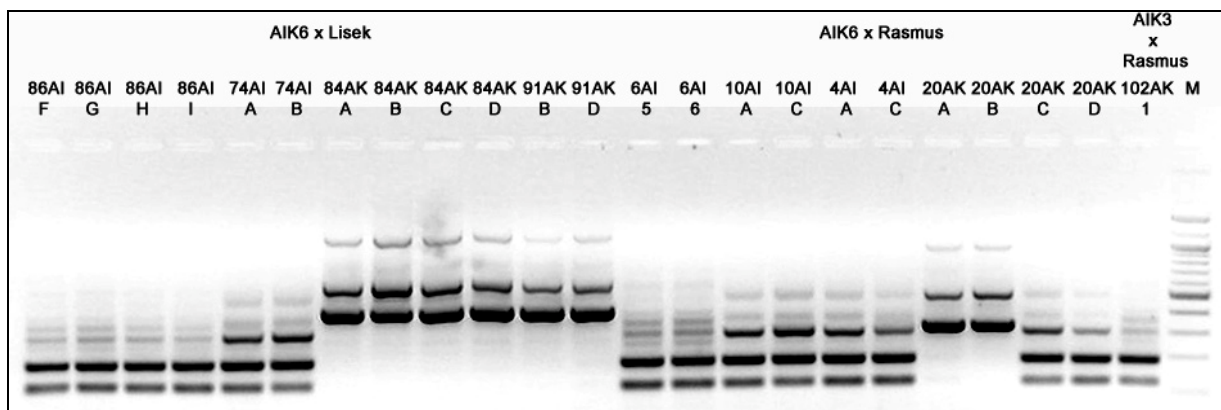
Dva klony z druhé skupiny byly osekvenovány a byla tak objevena další, velmi odlišná alela *SCR II*. Oba klony měly stejnou alelu, která se lišila pouze v přítomnosti nebo v nepřítomnosti dvou aminokyselin (AL) (obr. 7 – klon 86K a 86C). Pro nalezení další alely byl proveden screening klonů, kde byly zastoupeny AI a AK rostliny ze čtyř kombinací křížení. PCR-RFLP s enzymem *Hha I* rozlišilo pouze 2 již známé alely (obr. 8), zatímco s *Mnl I* (obr. 9) byl odlišen klon 86-H rozdílný od 2 známých alel. Proto byla provedena Southernova hybridizace (obr. 10) s tímto klonem jako sondou na 22 klonech ze stejné rostliny. Většina klonů hybridizovala, i ty, které byly při PCR-RFLP rozštěpeny jako alela 2. Sekvence klonu 86-H ukázaly, že jde o jednobazovou mutaci alely 2 v jednom z rozpoznávacích míst enzymu *Mnl I*. Byl osekvenován jeden nehybridizující klon a na základě sekvenační analýzy bylo zjištěno, že stále jedná o alelu 2. Při teplotě 60°C (teplota hybridizace) tedy nebyly rozlišeny různé alely a rozdíly v hybridizaci byly způsobeny nejspíše pouze různým sestřihem jedné alely.

Obrázek 7. Srovnání všech osekvenovaných alel *SCR II*. Šest prvních aminokyselinových sekvencí patří alele 2, další alele 1. Klony 99-B až T3 jsou z genomové DNA. Konzervativní cysteiny jsou označeny modře, červeně jsou označeny aminokyseliny, které mohou chybět díky alternativnímu sestřihu. Ve žlutých rámečcích jsou označeny mutace v alelách.

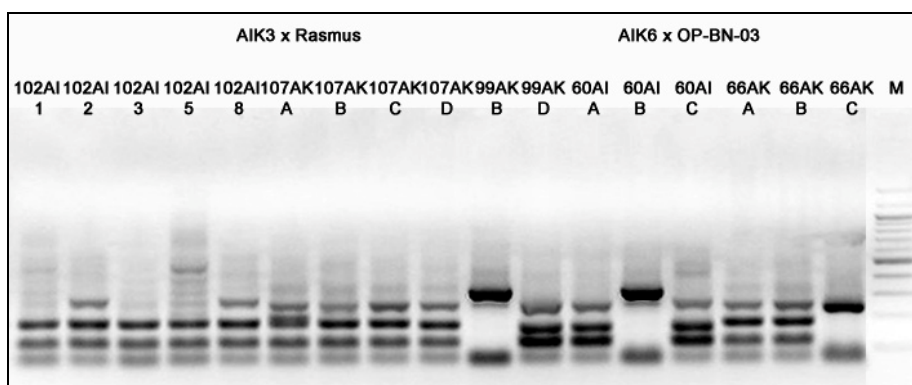
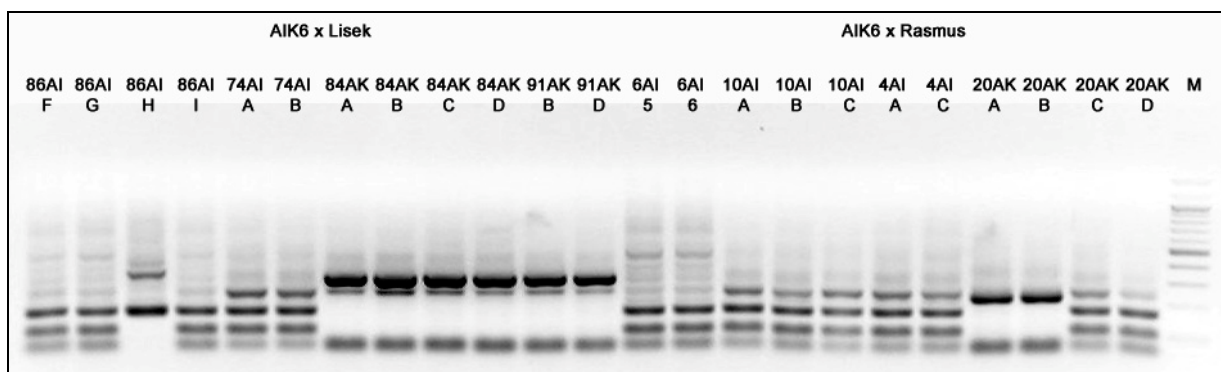
	C1	C2	C3
86-O	VMRYATSIYNFLTKIHLYLCFIFWTLTYVQALDVGPLECPKGVAESGPIRGSCLNSTSAA	CKTHFRQ	
86-J	VMRYATSIYNFLTKIHLYLCFIFWTLTYVQALDVGPLECPKGVAESGPIRGSCLNSTSAA	CKTHFRQ	
86-H	VMRYATSIYNFLTKIHLYLCFIFWTLTYVQALDVGPLECPKGVAESGPIRGSCLNSTSAA	CKTHFRQ	
86-A	VMRYATSIYNFLTKIHLYLCFIFWTLTYVQALDVGPLECPKGVAESGPIRGSCLNSTSAA	CKTHFRQ	
86-K	VMRYATSIYNFLTKIHLYLCFIFWTLTYVQ--DVGPLECPKGVAESGPIRGSCLNSTSAA	CKTHFRQ	
86-C	VMRYATSIYNFLTKIHLYLCFIFWTLTYVQALDVGPLECPKGVAESGPIRGSCLYSTSAA	CKTHFRQ	
90-A	VMRYATSIYTFLTNIHYLCFIFLILTYVQALDVGAWKCP	PEGIAYPSPISGRCFNSRSTEC	KKHYEVE
99-B		FKALDVGAWKCP	PEGIAYPSPISGRCFNSRSTEC
108-A		FKALDVGAWKCP	PEGIAYPSPISGRCFNSRSTEC
T1		FKALDVGAWKCP	PEGIAYPSPISGRCFNSRSTEC
T2		FKALDVGAWKCP	PEGIAYPSPISGRCFNSRSTEC
T3		FKALDVGAWKCP	PEGIAYPSPISGRCFNSRSTEC

	C4C5	C6C7C8
86-O	NVTNCLCINFSNHNRRGRINCYCCKVKKS	
86-J	NVTNCLCINFSNHNRRGRINCYCCKVKKS	
86-H	NVTNCLCINFSNHNRRGRINCYCCKVKKS	
86-A	NVTNCLCINFSNHNRRGRINCYCCKVKKS	
86-K	NVTNCLCINFSNHNRRGRINCYCCKVKKS	
86-C	NVTNCLCINFSNHNRRGRINCYCCKVKKS	
90-A	GHNVTNCRCDTYSMQNPARITCYCCKVKKS	
99-B	GHNVTNCRCDTYSMQNPARITCYCCKVKKS	
108-A	GHNVTNCRCDTYSMQNPARITCYCCKVKKS	
T1	EQNVTNCRCDTYSMQNPARITCYCCKVKKS	
T2	GHNVTNCRCDTYSMQNPARITCYCCKVKKS	
T3	GHNVTNCRCDTYSMQNPARITCYCCKVKKS	

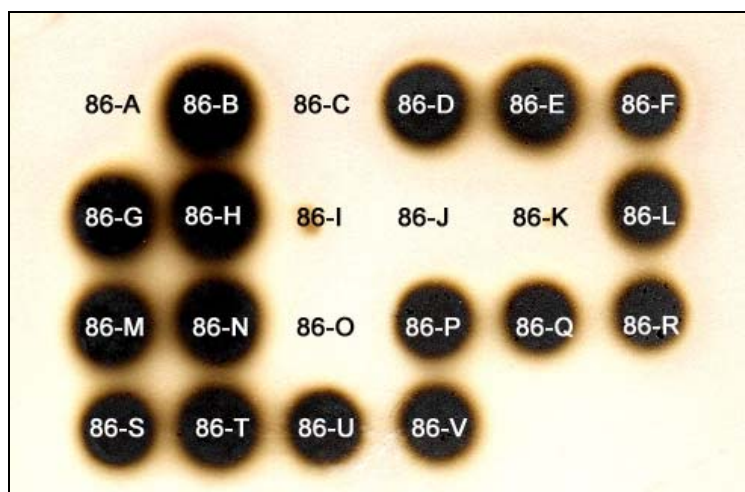
Obrázek 8. PCR-RFLP zaklonovaných cDNA genu *SCR II*. *SCR II* naamplifikované z různých klonů z rostlin z různých křížení bylo štěpené enzymem *Hha I*.



Obrázek 9. PCR-RFLP zaklonovaných cDNA genu *SCR II*. *SCR II* naamplifikované z různých klonů od rostlin z různých křížení bylo štěpené enzymem *Mnl I*.



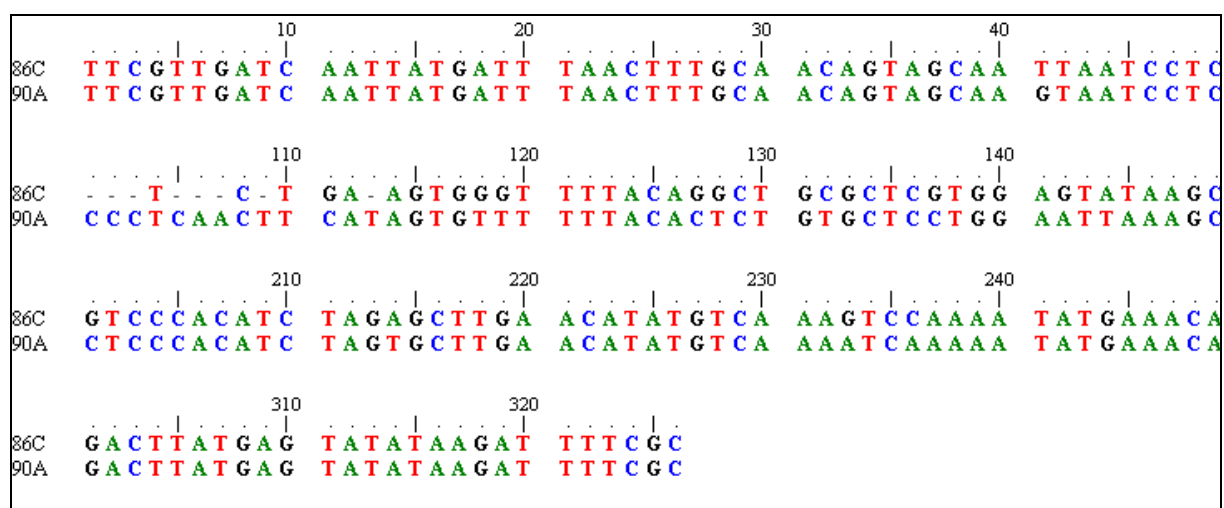
Obrázek 10. Dot Blot DNA-DNA hybridizace. Na membránu bylo naneseno 22 klonů od jednoho vzorku. U klonu 86-I a 86-K jsou znatelné malé skvrny, které po prodloužení expozice byly vidět zřetelněji.



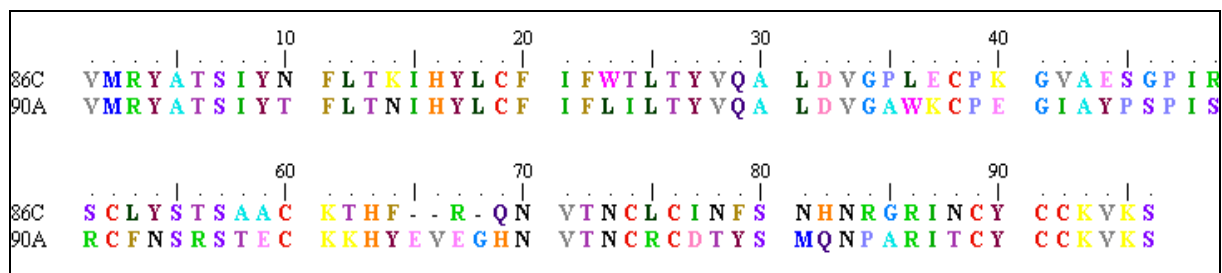
Jednobazové mutace, které způsobily změnu aminokyseliny byly nalezeny i u alely 1 v několika kloněch s *SCR II* pocházejícím z genomové DNA (obr. 7). Alela 1 se od alely 2 značně liší. Rozdíl v nukleotidových sekvencích je 85 % (obr. 11) a podobnost aminokyselinových sekvencí je 76 % (obr. 12).

Při rtPCR-RFLP (obr. 13 a 14) se ukázalo, že ve většině rostlin převažuje mRNA alely 2. Větší exprese alely 1 se vyskytovala u rostlin nezávisle na typu křížení a fenotypu. Při štěpení enzymem *Hha I* (obr. 13) byl u rostlin 86 a 90 rozlišen další, jinak se štěpící produkt rtPCR, který zatím nebyl zaklonován a pravděpodobně jde také o bodovou mutaci.

Obrázek 11. Srovnání nukleotidových sekvencí alely 1 a 2 genu *SCR II*. Alela 1 (86C) je podobná alele 2 (90A) z 85 %. Výstup z programu BioEdit.



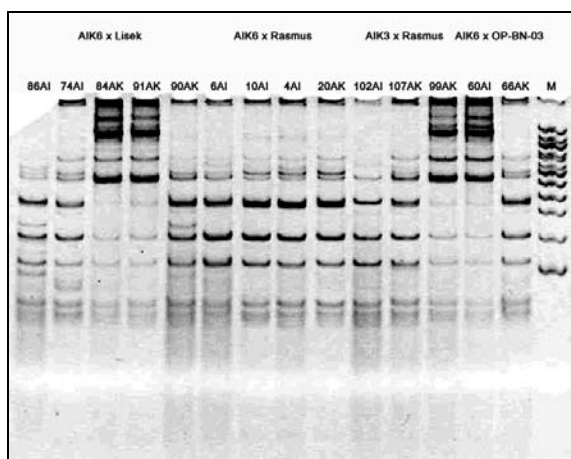
Obrázek 12. Srovnání aminokyselinových sekvencí alely 1 a 2 genu *SCR II*. Alela 1 (86C) je podobná alele 2 (90A) z 76 %. Výstup z programu BioEdit.



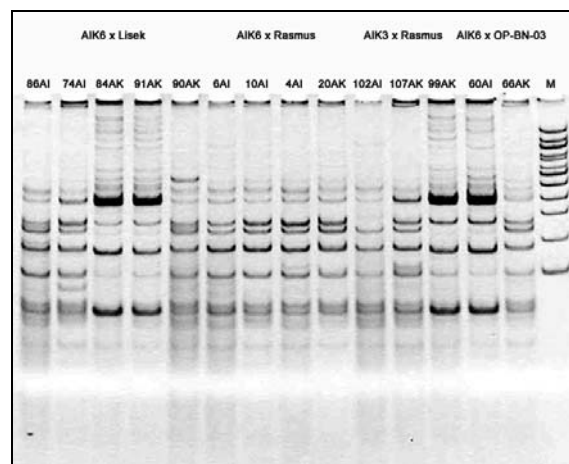
Obrázek 13. rtPCR-RFLP genu *SCR II*. rtPCR byla štěpena enzymem *Hha I*. Odlišily se rostliny 84AK, 91AK, 99AK a 60AI, kde se štěpila převážně alela 1. U rostliny 86AI a 90AK byl rozlišen fragment odlišný od alely 1 a 2.

Obrázek 14. rtPCR-RFLP genu *SCR II*. rtPCR byla štěpena enzymem *Mnl I*. Odlišily se rostliny 84AK, 91AK, 99AK a 60AI, kde se štěpila převážně alela 1.

Obr. 13



Obr. 14



DISKUSE

Z genomové DNA se podařilo naamplifikovat pouze jednu alelu o které je z předešlé studie známo, že se vyskytuje v tandemové kopii (Žaludová, 2007). Převaha této alely v genomu je tudíž 2:1 a je pravděpodobné, že se amplifikuje přednostně. Toto by mohla být příčina neúspěchu při odlišení další alely z genomové DNA. U *Brassica oleracea* S^{15} haplotypu třídy II byl nalezen duplikovaný gen *SP11* – *SP11a*, *SP11b* a *SP11b'*, které byly spojeny intergenetickým spacerem. *SP11a* a *SP11b* se lišily pouze jednou delecí a byly stejně orientovány. Díky této duplikaci byly nalezeny i různě dlouhé transkripty (Shiba et al., 2004). U *Brassica napus* jsem taktéž našla duplikovaný gen *SCR II*, ale žádné odlišné transkripty nebyly nalezeny. Cabrilla et al. (1999) našel duplikované *SLG* geny u AK *Brassica oleracea*, linie S^{15} . Alela 1 tedy pochází pravděpodobně z *Brassica oleracea*, protože je také duplikovaná.

Z cDNA se podařilo identifikovat pouze dvě různé alely z různých křížení, přestože gen *SCR* je velmi polymorfní (Shiba et al., 2001; Watanabe et al., 2000). Byly sice nalezeny odlišnosti od obou alel, ale to byly většinou pouze jednobazové mutace. Je však velmi nepravděpodobné, že by takovéto mutace mohly změnit specificitu, protože *SCR* je v některých úsecích velmi variabilní a změna specificity bývá určena větším počtem mutací a také delecí (Mishima et al., 2003). U jedné alely *SCR II* u *Brassica napus* byly nalezeny dva typy transkriptů, které jsou způsobeny alternativním sestřihem. Tento sestřih probíhá i u *SCR II Brassica oleracea*, kde se předpokládá, že AL- jsou pozdnější formy (Shiba et al., 2002).

K analýzám byly použity pouze dihaploidní rostliny, tzn. že jsou úplně homozygotní a mohou mít nejvíce dvě různé *SCR* alely. Měly by mít 2 alely třídy I nebo 1 alelu třídy I a jednu třídy II anebo 2 různé alely třídy II. AI rostliny s recesivním typem AI by měly mít pouze 2 alely třídy II a AK by měly mít 2 zbývající alternativy. Nicméně jak u AI, tak u AK byly nalezeny 2 různé recesivní alely *SCR*, z toho můžeme usuzovat, že AK rostliny už *SCR* třídy I mít nemohou. Navíc se alely genu *SCR I* nepodařilo identifikovat. Zatím nebyla nalezena žádná linie s dominantním typem AI u *Brassica napus* (Kučera, ústní sdělení).

Mezi alelami *SCR II* u *Brassica rapa* byl nalezen vztah lineární dominance (Kakizaki et al., 2003). Mezi alelami třídy II u *Brassica napus* byly sice také nalezeny vztahy dominance, avšak nebyly lineární a také vůbec nekorelovaly s fenotypovým projevem. Alela 2 je ve většině případů dominantní nad alelou 1, ale ve čtyřech případech u třech různých křížení a různých AK/AI fenotypů je tomu naopak. V mezidruhovém křížení *Brassica oleracea* a *Brassica napus* docházelo k oslabování S-alel *Brassica oleracea* v hybridech. Úroveň exprese S-alel z *Brassica oleracea* byla závislá na různých pozadích *Brassica napus*, tzn. na přítomnosti jejich S-alel (Ripley and Beversdorf, 2003). Pravděpodobně existuje ještě jiný gen, který má vliv na expresi alel *SCR II* a na AI reakci, dá se předpokládat, že může mít více alel s různými vztahy dominance a recesivity, protože někdy dokáže potlačit projev určitých S-alel a jindy ne a zároveň má různé účinky na AI reakci. Ekuere et al. (2004) se domnívá, že autoinkompatibilita je kontrolována dvěma lokusy; S-lokusem a supresorovým sp lokusem, který má také více alel. Křížením resyntetizované řepky s různými odrudami, odvozením dihaploidů od F1 hybridů a sledováním S-fenotypu se mu podařilo odhalit latentní S alelu u některých odrůd. Z toho vyvozuje, že tyto latentní alely jsou skryté kvůli supresorovému systému, který je v řepce běžný. Supresorový systém není podle něho spojený s S-lokusem, má supresorové alely v řepce a nesupresorové v diploidních parentálních druzích.

Protein *SCR* je relativně malý a k interakci s eSRK stačí pouze několik málo specifických aminokyselin, ovšem ke spuštění AI reakce je jich zapotřebí daleko více (Chookajorn et al., 2004). To by například mohlo znamenat, že by vazebná místa mohla být obsazena i jiným proteinem. Hypotetický supresor by se měl specificky exprimovat v tapetu, měl by mít velký počet alel, které nejen soupeří mezi sebou navzájem, ale i mezi S-alelami. Měl by být umístěn jinde než na S-lokusu.

Z předešlých výzkumů AI na našem pracovišti bylo zjištěno, že AI fenotyp docela dobře koreluje s přítomností genu *SLG* třídy I. Předpokládáme-li, že existuje nějaký supresorový gen na jiném lokusu, vyvstává otázka, jaký způsobem může korelovat s *SLG I* ležícím na S-lokusu. Gen *SLG* není k AI reakci nezbytně nutný, ale bylo prokázáno, že podporuje úplný projev autoinkompatibility (Takasaki et al., 2000). U

přirozeně se vyskytujících se variant *B. rapa* byla zjištěna autokompatibilita spojená s normální expresí *SRK*, ale s nízkou expresí *SLG* (Nasrallah et al., 1992). Ovšem v té době zase nebyly známé žádné údaje o existenci genu *SCR*. V mnoha AK liniích řepky byla nalezena alela A10 genu *SLG I*, která byla na stejném lokusu jako gen *SRK* s jednobazovou delecí (Goring et al., 1993). Můžeme tedy spekulovat, že protein *SLG I* by mohl mít větší afinitu k supresoru než k *SCR*. Po interakci *SLG I* se supresorem by mohlo dojít k navázání na e*SRK*, které by bez předchozí interakce jinak nebylo možné, a tak zablokování AI reakce.

ZÁVĚR

U *Brassica napus* byly nalezeny dvě recesivní alely genu *SCR II*, které jsou navzájem v proměnlivém vztahu dominance a recesivity. Různá exprese obou alel neodpovídá fenotypovému projevu autoinkompatibility a dá se předpokládat, že je ovládána dosud neidentifikovaným represorovým genem, který neleží na S-lokusu. Z tohoto důvodu nemůže gen *SCR* sloužit jako molekulární marker autoinkompatibility u *Brassica napus*, přestože je podle mnoha výzkumů nezbytný v AI reakci. *Brassica napus* patří mezi rostliny se složitým genetickým založením, je tvořena dvěma genomy, což dává možnost různým interakcím a znesnadňuje studium oproti diploidním druhům *B. rapa* a *B. oleracea*. V dalším studiu autoinkompatibility je proto důležité se zaměřit na sledování interakcí mezi geny *SCR*, *SRK* a *SLG* a jejich ovlivňování jinými, např. supresorovými systémy.

Poděkování

Studie byla získána za podpory projektů MSM600076658-06, GAJU 064/2010/Z a NAZV QI111A075.

LITERATURA

- Bateman, A.J., (1955) Self-incompatibility systems in angiosperms: III. *Cruciferae*. *Heredity*, 9, 52-58.
- Cabrillac, D., Delorme, V., Garin, J., Ruffio-Chable, V., Giranton, J.L., Dumas, C., Gaude, T., Cock, J.M., (1999) The *S₁₅* self-incompatibility haplotype in *Brassica oleracea* includes three S gene family members expressed in stigmas. *Plant Cell*, 11, 971-986.
- Chookajorn, T., Kachroo, A., Ripoll, D.R., Clark, A.G., Nasrallah, J.B., (2004) Specificity determinants and diversification of the *Brassica* self-incompatibility pollen ligand. *PNAS*, 4, 911-917.
- Čurn, V., (2005) Molekulární markery – protokoly a návody pro cvičení. Biotechnologické centrum ZF JU, Č. Budějovice.

- Čurn, V., Nováková, A., Šimáčková, K., Ondřichová, B., Bárta, J., (2008) Molecular markers as a tool for plant breeding and variety identification. In: J., Prohens, M.L., Badenes, eds. (2008) Modern Variety Breeding for Present and Future Needs. UP Valencia, Spain, pp. 699-703.
- de Nettancourt, D., (1977) Incompatibility in Angiosperms. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Ekuere, U.U., Parkin, I.A., Bowman, C., Marshall, D., Lydiate, D.J., (2004) Latent S alleles are widespread in cultivated self-compatible *Brassica napus*. *Genome*, 47, 257-265.
- Goring, D.R., Glavin, T.L., Schafer, U., Rothstein, S.J., (1993) An S Receptor Kinase Gene in Self-Compatible *Brassica napus* Has a 1-bp Deletion. *The Plant Cell*, 5, 531-539.
- Havel, J., (1996) Získávání autoinkompatibilních linií u řepky ozimé. *Genet. a šlecht.*, 32, 9-18.
- Hinata, K., Watanabe, M., Yamakawa, S., Satta, Y., Isogai, A., (1995) Evolutionary aspects of S-related genes of the *Brassica* self-incompatibility system: Synonymous and nonsynonymous base substitutions. *Genetics*, 140, 1099-1104.
- Kakizaki, T., Takada, Y., Ito, A., Suzuki, G., Shiba, H., Takayama, S., Isogai, A., Watanabe, M., (2003) Linear Dominance Relationship among Four Class-II S Haplotypes in Pollen is Determined by the Expression of *SP11* in *Brassica* Self-Incompatibility. *Plant Cell Physiol.*, 44, 70-75.
- Kimura, R., Sato, K., Fujimoto, R., Nishio, T., (2002) Recognition specificity of self-incompatibility maintained after the divergence of *Brassica oleracea* and *Brassica rapa*. *The Plant Journal*, 29, 215-223.
- Kusaba, M., Nishio, T., Satta, Y., Hinata, K., Ockendon, D., (1997) Striking sequence similarity in inter- and intra-specific comparison of class I SLG alleles from *Brassica oleracea* and *Brassica campestris*: Implications for the evolution and recognition mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 7673-7678.
- Mishima, M., Takayama, S., Sasaki, K.-I., Jee, J.-G., Kojima, C., Isogai, A., Shirakawa, M., (2003) Structure of the Male Determinant Factor for *Brassica* Self-incompatibility. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 36389-36395.
- Nasrallah, J.B., Nishio, T., Nasrallah, M.E., (1991) The self-incompatibility genes of *Brassica*: Expression and use in genetic ablation of floral tissues. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42, 393-422.
- Nasrallah, M.E., Kandasamy, M.K., Nasrallah, J.B., (1992) A genetically defined *trans*-acting locus regulates S Locus function in *Brassica*. *Plant J.*, 2, 497-506.
- Nishio, T., Kusaba, M., Watanabe, M., Hinata, K., (1996) Registration of S alleles in *Brassica campestris* L by the restriction fragment sizes of SLGs. *Theor. Appl. Genet.*, 92, 1329-1334.

- Ockendon, D.J., (1974) Distribution of self-incompatibility alleles and breeding structure of open-pollinated cultivars of Brussel sprouts. *Heredity*, 33, 159-171.
- Okamoto, S., Sato, Y., Sakamoto, T., Nishio, T., (2004) Distribution of similar self-incompatibility (S) haplotypes in different genera, *Raphanus* and *Brassica*. *Sex Plant Reprod*, 17, 33-39.
- Ripley, V.L., Beversdorf, W.D., (2003) Development of self-incompatible *Brassica napus*: (III). *B. napus* genotype effects on S-allele expression. *Plant Breeding*, 122, 12-18.
- Sato, K., Nishio, T., Kimura, R., Kusaba, M., Suzuki, T., Hatakeyama, K., Ockendon, D.J., Satta, J., (2002) Coevolution of the S-Locus Genes *SRK*, *SLG* and *SP11/SCR* in *Brassica oleracea* and *B. rapa*. *Genetics*, 162, 931-940.
- Schopfer, C.R., Nasrallah, M.E., Nasrallah, J.B., (1999) The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science*, 286, 1697-1700.
- Shiba, H., Takayama, S., Iwano, M., Shimohato, H., Funato, M., Nakagawa, T., Che, F.-S., Suzuki, G., Watanabe, M., Hinata, K., Isogai, A., (2001) A Pollen Coat Protein, SP11/SCR, Determines the Pollen S-Specificity in the Self-Incompatibility of *Brassica* Species. *Plant Physiology*, 125, 2095-2103.
- Shiba, H., Iwano, M., Entani, T., Ishimoto, K., Shimohato, H., Che, F.-S., Satta, Y., Ito, A., Takada, Y., Watanabe, M., Isogai, A., Takayama, S., (2002) The Dominance of Alleles Controlling Self-Incompatibility in *Brassica* Pollen Is Regulated at the RNA Level. *The Plant Cell*, 14, 491-504.
- Shiba, H., Park, J.-I., Suzuki, G., Matsushita, M., Nou, I.-S., Isogai, A., Takayama, S., Watanabe, M., (2004) Duplicated *SP11* genes produce alternative transcripts in the *S*¹⁵ haplotype of *Brassica oleracea*. *Genes. Gent. Syst.*, 79, 87-93.
- Silva, N.F., Goring, D.R., (2001) Mechanisms of self-incompatibility in flowering plants. *Cell. Mol. Life.*, 58, 1988-2007.
- Suzuki, G., Kai, N., Hirose, T., Fukui, K., Nishio, T., Takayama, S., Isogai, A., Watanabe, M., Hinata, K., (1999) Genomic organization of the S locus: identification and characterization of genes in SLG/SRK region of *S*⁹ haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). *Genetics*, 153, 391-400.
- Takasaki, T., Hatakeyama, K., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., Hinata, K. (2000) The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica* stigma. *Nature*, 403, 913-916.
- Tarutani, Y., Shiba, H., Iwano, M., Kakizaki, T., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., Takayama, S., (2010) Trans-acting small RNA determines dominance relationships in *Brassica* self-incompatibility. *Nature*, 466, 983-986.
- Watanabe, M., Ito, A., Takada, Y., Ninomiya, C., Kakizaki, T., Takahata, Y., Hatakeyama, K., Hinata, K., Suzuki, G., Takasaki, T., Satta, Y., Shiba, H., Takayama, S., Isogai, A., (2000) Highly divergent sequence of the pollen self-

Žaludová et al.: Analysis Of Sequence Polymorphism Of Scr Class I And li Alleles And Stu...
incompatibility (S) gene in class-I S haplotypes of *Brassica campestris* (syn.
rapa). L. FEBS Lett., 12, 139-144.

Žaludová, J., (2007) The structure and the function of the S-locus in oilseed rape
(*Brassica napus* L.) Ph.D thesis. JU ZF, České Budějovice.