

Katarzyna Mikołajczyk, Stanisław Spasibonek, Jan Krzymański
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Zakład Roślin Oleistych w Poznaniu.

Poszukiwanie markerów DNA sprzężonych z cechą obniżonej zawartości kwasu linolenowego w materiałach hodowlanych rzepaku ozimego

Search for DNA markers linked to the low linolenic acid content trait in breeding materials of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.)

Słowa kluczowe: markery DNA, rzepak ozimy, kwas linolenowy, RAPD

Key words: DNA markers, oilseed rape, linolenic acid, RAPD

Rozpoczęto prace mające na celu znalezienie markerów DNA sprzężonych z cechą obniżonej zawartości kwasu linolenowego w liniach hodowlanych rzepaku ozimego. Zgromadzono materiał roślinny, jakim były rośliny rodzicielskie oraz segregujące pokolenie F₂, pochodzące z krzyżowań odmian o wysokiej i niskiej zawartości kwasu linolenowego. Wyizolowano genomowy DNA z roślin, a następnie poddano analizie z zastosowaniem sześciu starterów typu RAPD. Wykazano występowanie polimorficznych prążków w DNA roślin rodzicielskich oraz pokoleń segregujących roślin o krańcowych zawartościach kwasu linolenowego dla trzech zastosowanych starterów. Uzyskane wyniki stanowią podstawę do dalszych badań, mających na celu znalezienie markerów DNA, umożliwiających efektywną i skuteczną selekcję w hodowli odmian rzepaku ozimego o obniżonej zawartości kwasu linolenowego.

Search for DNA markers linked to the low linolenic acid content in winter rapeseed lines was initiated. Plant material, i.e., parent plants and F₂ segregating populations from the crosses of varieties with high and low linolenic acid content was collected. Plant genomic DNA was isolated and analysed with the use of PCR/RAPD method (six primers). The obtained results showed polymorphic bands in the analysed DNA for three out of six primers used. It makes a basis for further studies on DNA markers useful in an effective selection in breeding of winter rapeseed varieties with low linolenic acid content.

Wstęp

W strefie klimatu umiarkowanego rzepak jest jednym z najważniejszych źródeł oleju roślinnego. Nasiona rzepaku w suchej masie zawierają około 45% oleju (Krzymański 1993, 1993a), a jego jakość w dużej mierze uzależniona jest od

udziału kwasów tłuszczowych, między innymi od kwasu erukowego, olejowego, linolowego i linolenowego (Thorman i in. 1996). Zastosowanie oleju rzepakowego na przestrzeni ostatnich dwudziestu lat gwałtownie wzrosło w związku z uzyskaniem na drodze genetycznej form rzepaku o obniżonej z około 50% do 0% zawartości kwasu erukowego (C_{22:1}). Aktualnie w oleju odmian podwójnie ulepszonych rzepaku ozimego bezerukowego znajduje się średnio 60% kwasu oleinowego, 20% kwasu linolowego i 12% kwasu linolenowego. Olej o takim składzie kwasów tłuszczowych wykorzystywany jest zarówno do celów spożywczych, jak i technicznych. W perspektywie różnych zapotrzebowań i możliwości wykorzystania istniejąca zmienność zawartości poszczególnych kwasów 18-węglowych jest niewystarczająca.

Zaletą oleju rzepakowego jest obecność w nim kwasu linolenowego, niezbędnego w diecie człowieka, będącego prekursorem istotnych dla organizmu metabolitów (Fosatti 1994). W oleju tradycyjnym jego zawartość przekracza 10% (Röbbelen, Nitsch 1975). Zbyt duża zawartość kwasu linolenowego, ze względu na jego łatwość utleniania i polimeryzacji w wyniku działania wysokich temperatur, powoduje obniżenie trwałości oraz stabilności smakowo-zapachowej oleju (Sommers i in. 1998). Dlatego najkorzystniejsza jest zawartość kwasu linolenowego w oleju rzepakowym obniżona do około 3%. Rakow i McGregor (1973), Rakow i in. (1987) traktując nasiona rzepaku jarego roztworem metanosulfonianu etylu o różnych stężeniach otrzymali linie o zmienionym udziale kwasów oleinowego, linolowego i linolenowego. Efektem tych prac było między innymi uzyskanie przez Rakowa (1973) z kanadyjskiej odmiany Oro mutanta M11. Na bazie tego mutanta wyselekcjonowano pierwszą odmianę rzepaku jarego Stellar, charakteryzująca się wysoką zawartością kwasu linolowego (28%), a niską kwasu linolenowego (3%) (Scarth i in. 1988), a następnie o tych samych parametrach jakościowych, ale wyżej plonującą odmianę Apollo (Scarth i in. 1994). Prowadzone są dalsze prace mające na celu wprowadzenie tej cechy do odmian rzepaku ozimego (Byczyńska i in. 1996). Selekcja roślin pod względem składu kwasów tłuszczowych jest również utrudniona z tego powodu, że na syntezę kwasów 18-węglowych wywiera istotny wpływ temperatura i światło (Trémolières i in. 1982; Brunklaus-Jung i Röbbelen 1987; Pleines i Friedt 1988; Spasibionek i in. 1998). Przyspieszenie oraz zwiększenie skuteczności selekcji w programach hodowlanych, mających na celu obniżenie zawartości kwasu linolenowego, można uzyskać dzięki zastosowaniu markerów DNA, umożliwiających charakterystykę genotypu, bez modyfikującego wpływu środowiska. Aktualnie prowadzone są prace, których celem jest znalezienie istotnych dla selekcji markerów cech użytkowych w oparciu o różnego typu markery DNA (Bartkowiak-Broda 1997). Wykryto markery karłowatości rzepaku (Foisset i in. 1995) oraz markery sprzężone z niską zawartością kwasu linolenowego (Jourden i in. 1996).

Celem prowadzonych prac było rozpoczęcie badań mających na celu znalezienie markerów DNA sprzężonych z cechą obniżonej zawartości kwasu linolenowego w rodach i liniach rzepaku ozimego hodowanych w Zakładzie Roślin Oleistych IHAR w Poznaniu.

Materiały i metody

Materiał roślinny

Materiał do badań stanowiły dwie formy rodzicielskie: ród rzepaku ozimego bezerukowego o niskiej zawartości glukozyolanów (00) i zawartości kwasu linolenowego w oleju wynoszącej 14% oraz odmiany rzepaku jarego Stellar i Apollo, charakteryzujące się niską zawartością kwasu linolenowego 1,4% i 1,5% a także segregujące pokolenie F₂ powstałe z krzyżowań tych form (ród 00 x Stellar; ród 00 x Apollo). Do analizy pobierano od 10 do 20 młodych listków z poszczególnych roślin z każdej grupy. W przypadku pokolenia segregującego wybierano rośliny o krańcowo różnych zawartościach, tj. o najniższej i najwyższej zawartości kwasu linolenowego. Rośliny rodzicielskie analizowano tzw. metodą BSA (ang. bulked segregant analysis — metoda zbiorczych prób DNA), natomiast z pokoleń segregujących badano DNA poszczególnych roślin.

Izolacja DNA z tkanki roślinnej

Młode listki po pobraniu przechowywano w lodzie, a następnie izolowano DNA według modyfikowanej metody Doyle'a (1990).

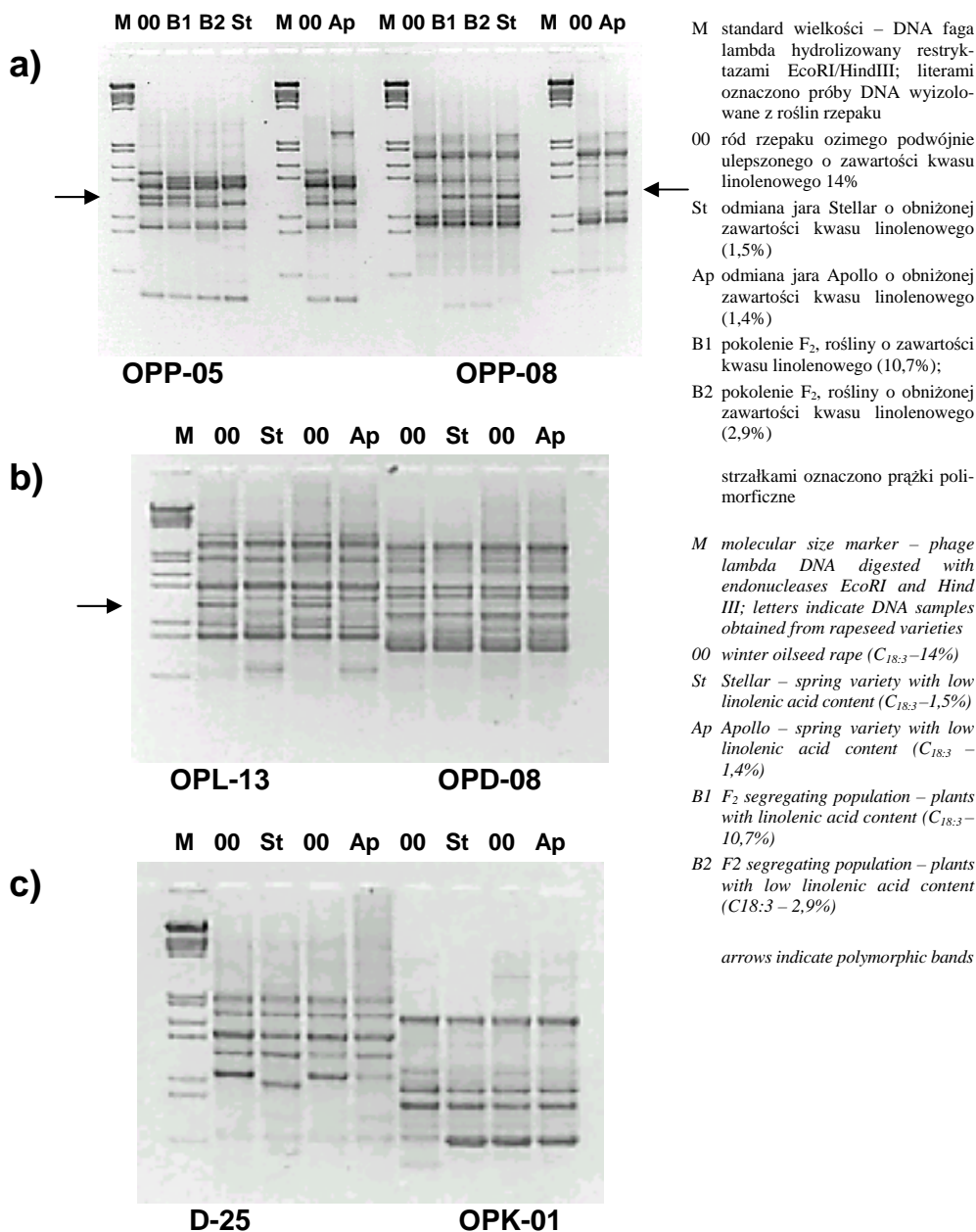
Amplifikacja DNA

Reakcję PCR-RAPD prowadzono z zastosowaniem starterów typu RAPD firmy Operon Technologies: OPP-05, OPP-08, OPL-13, OPD-08, OPK-01 oraz D-25 o sekwencji (5' gcg TgT Agg cT 3') w następujących warunkach: denaturacja wstępna w 95°C przez 30 s, a następnie 45 cykli obejmujących denaturację w 95°C przez 30 s, przyłączenie starterów w 35°C przez 1 min., elongację w 72°C przez 2 min. 30 s, oraz elongację końcową w 72°C przez 5 min.

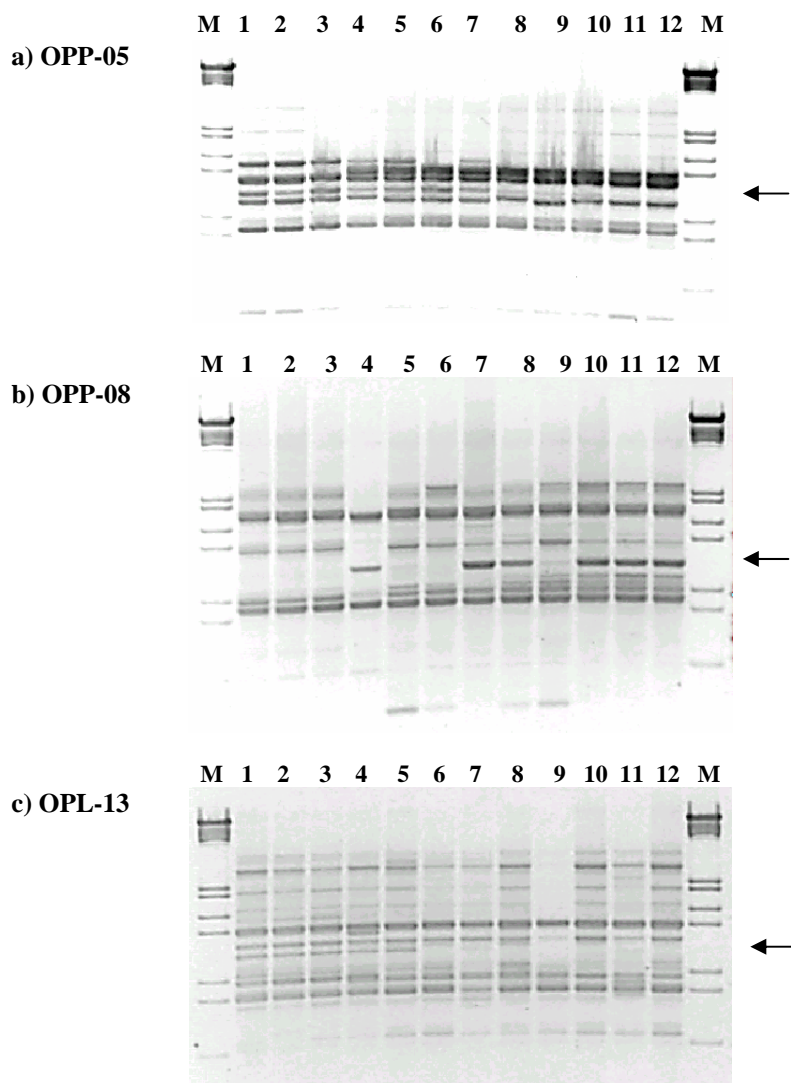
Reakcje prowadzono w termocyklerach firm Perkin-Elmer oraz Biometra.

Elektroforetyczny rozdział DNA

Stężenie i jakość preparatów DNA uzyskanych w wyniku izolacji sprawdzono za pomocą elektroforezy na 0,8% żelach agarozowych w buforze 1xTBE. Produkty reakcji amplifikacji DNA analizowano na 1,8% żelach agarozowych w buforze 1xTBE, przy natężeniu prądu 80 mA.



Rys. 1. Elektroforetyczny rozdział, na 1,8% żelu agarozowym, produktów reakcji PCR-RAPD z zastosowaniem starterów: a) OPP-05, OPP-08, b) OPL-13, OPD-08, c) D-25: 5' gcg TgT Agg cT 3', OPK-01 — 1,8% agarose gel electrophoresis of PCR-RAPD products obtained with the use of primers: a) OPP-05, OPP-08, b) OPL-13, OPD-08, c) D-25: 5' gcg TgT Agg cT 3', OPK-01



M — standard wielkości – DNA faga lambda po hydrolizie enzymami restrykcyjnymi EcoRI i Hind III; numerami oznaczono odpowiednio DNA z roślin pokolenia segregującego F_2 o normalnej (10,7%) oraz obniżonej (2,9%) zawartości kwasu linolenowego. Strzałkami oznaczono prążki polimorficzne

M — molecular size marker – phage lambda DNA digested with endonuclease Eco RI and Hind III; numbers indicate DNA samples isolated from F_2 generation plants segregating with respect to the linolenic acid content: (10.7%) – plants with normal and (2.9%) – plants with low linolenic acid content. Arrows indicate polymorphic bands.

Rys. 2. Elektroforetyczny rozdział, na 1,8% żelu agarozowym, produktów reakcji PCR-RAPD z zastosowaniem starterów: a) OPP-05, b) OPP-08, c) OPL-13 — 1.8% agarose gel electrophoresis of PRC-RAPD products obtained with the use of primers: a) OPP-05, b) OPP-08, c) OPL-13

Wyniki i wnioski

Analizowano DNA genotypów rzepaku o zróżnicowanej zawartości kwasu linolenowego: rośliny rodzicielskie z krzyżowań ród podwójnie ulepszony rzepaku ozimego oraz odmiany rzepaku jarego Stellar i Apollo z zastosowaniem różnych starterów typu RAPD (rys. 1). W przypadku zastosowania starterów OPP-05, OPP-08 oraz OPL-13 wykazano istnienie różnic pomiędzy roślinami rodu podwójnie ulepszony rzepaku ozimego o wysokiej zawartości kwasu linolenowego oraz odmianami Stellar i Apollo o niskiej zawartości kwasu linolenowego. Prążki polimorficzne oznaczono na rysunku strzałkami.

W oparciu o wstępne analizy roślin rodzicielskich badano DNA roślin segregujących pokolenia F₂ o wysokiej i niskiej zawartości kwasu linolenowego (rys. 2). Zaobserwowano zależność pomiędzy występowaniem lub brakiem prążka polimorficznego a zawartością kwasu linolenowego dla większości spośród badanych roślin.

Przeprowadzone analizy są początkiem badań, których celem jest znalezienie markerów DNA umożliwiających efektywną i skuteczną selekcję roślin w hodowli jakościowej rzepaku ozimego, mającej na celu otrzymanie odmian o obniżonej zawartości kwasu linolenowego.

Literatura

- Bartkowiak-Broda I. 1997. Markery molekularne w hodowli rzepaku. *Rośliny Oleiste*, XVIII (2): 581-585.
- Brunklaus-Jung E., Röbbelen G. 1987. Genetical and physiological investigations on mutants for polyenoic fatty acid in rapessed (*Brassica napus* L.). *Plant Breeding*, 98: 9-16.
- Byczyńska B., Spasibionek S., Krzymański J. 1996. Zmniejszenie zawartości kwasów wielonienasyconych w oleju rzepakowym w wyniku mutacji chemicznej. *Rośliny Oleiste*, XVII (1): 133-140.
- Doyle J.J., Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Foisset N., Delourme R., Barret P., Renard M. 1995. Molecular tagging of the dwarf BREIZH (*Bzh*) gene in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.*, 91: 756-761.
- Fosatti P. 1994. Les huiles de poisson: actualites scientifiques et medicales. *OCL*, 1 (3): 178-180.
- Jourdren C., Barret P., Horvais R., Delourme R., Renard M. 1996. Identification of RAPD markers linked to linolenic acid genes in rapessed. *Euphytica*, 90: 351-357.
- Krzymański J. 1993. Osiągnięcia i nowe perspektywy prac badawczych nad roślinami oleistymi w Polsce. *Postępy Nauk Rolniczych*, 5/245: 7-14.
- Krzymański J. 1993a. Możliwości pełniejszego wykorzystania wartości rzepaku podwójnie ulepszony. *Postępy Nauk Rolniczych*, 6/245: 7-14.
- Pleines S. and Friedt W. 1988. Breeding for improved C18-fatty acid composition in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Fat Sci. Technol.*, 90, 5: 167-171.

- Rakow G. 1973. Selektion auf Linol- und Linolensäuregehalt in Rapssamen nach mutagener Behandlung. Z. Pflanzenzüchtg. 69: 62-82.
- Rakow G., McGregor D.I. 1973. Opportunities and problems in modification of levels of rapeseed C18 unsaturated fatty acids. JAOCS 50: 400-403.
- Rakow G., Stringam G.R., McGregor D.I. 1987. Breeding *B. napus* L. Canola with improved fatty acid composition, high oil content and high seed yield. Proc. of the 7th Int. Rapeseed Congress. vol. 1: 27-32.
- Röbbelen G., Nitsch A. 1975. Genetical and physiological investigations on mutants for polyenoic fatty acids in rapeseed (*B. napus* L.). I. Selection and description of new mutants. Z. Pflanzenzüchtung 75: 93-105.
- Spasibonek S., Byczyńska B., Krzymański J. 1998. Wpływ środowiska na zmiany składu kwasów tłuszczowych w oleju mutantu 1207 rzepaku ozimego. Rośliny Oleiste, XIX: 627-632.
- Sommers D.J., Friesen K.R.D., Rakow G. 1998. Marker assisted selection of low linolenic acid in oilseed species. Theor. Appl. Genet., 96: 897-903.
- Scarth R., Mc Vetty P.B.E., Rimmer S.R., Stefansson B.R. 1988. Stellar low linolenic-high linoleic acid summer rape. Can. J. Plant. Sci., 68: 509-511.
- Scarth R., Rimmer S.R., Mc Vetty P.B.E. 1994. Apollo low linolenic acid summer rape. Can. J. Plant. Sci., 75: 203-204.
- Thorman C.E., Romero J., Mantet J., Osborn T.C. 1996. Mapping loci controlling concentrations of erucic and linolenic acids in seed oil of *Brassica napus*. Theor. Appl. Genet., 96: 897-903.
- Trémolières J., Dubacq P., Drapier D. 1982. Unsaturated fatty acids in maturing seeds of sunflowers and rape: regulation by temperature and light intensity. Phytochemistry, Vol. 21 No. 1: 41-45.