

Hanna Witucka, Łukasz Wolko, Ryszard Słomski

Akademia Rolnicza w Poznaniu, Katedra Biochemii i Biotechnologii

Próba oznaczenia markerów genetycznych sprzężonych z cechą niskiej zawartości kwasu linolenowego u rzepaku (*Brassica napus*)

Attempt to identification of genetic markers linked to quality of low level of linolenic acid in rapeseed (*Brassica napus*)

Słowa kluczowe: *Brassica napus*, RAPD, podwojone haploidy, kwas linolenowy

Key words: *Brassica napus*, RAPD, doubled haploid, linolenic acid

Kwas linolenowy (C_{18:3}) jest składnikiem oleju rzepakowego, który łatwo ulega utlenianiu, powodując spadek jego jakości smakowej. Redukcja zawartości kwasu linolenowego w nasionach rzepaku jest od wielu lat ważnym problemem hodowlanym. Jara odmiana kanadyjska Stellar charakteryzująca się niską zawartością kwasu C_{18:3} posłużyła do krzyżowania z jarymi liniami hodowlanymi charakteryzującymi się wysokim plonem. Z mikrospor pojedynczych roślin pokolenia F₁ wyprowadzono podwojone haploidy, z których przez samozapylenie uzyskano nasiona. Uzyskane rośliny DH analizowano metodą chromatografii gazowej w celu określenia zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych. Rośliny charakteryzujące się niską zawartością kwasu linolenowego użyto do poszukiwania markerów genetycznych. Użyto analizy zbiorczych prób (BSA) w celu szybkiego sprawdzenia dużej liczby starterów RAPD. Startery wykazujące polimorfizm zostaną użyte do analizy sprzężeń na pojedynczych roślinach DH.

Linolenic acid (C_{18:3}) is a component of rapeseed oil that is early oxidized, which results in a reduced flavour quality of the oil. The reduction of linolenic acid content in rapeseed seed has therefore been an important breeding objective for many years. The spring Canadian variety Stellar with a low content of C_{18:3} was crossed with other spring lines characterized by high yield. From microspores of individual F₁ plants double haploid plants (DH) were generated and seeds were produced by self-pollination. Obtained individual DH plants were analyzed for composition of fatty acids by gas chromatography. Low linolenic acid plants were used in search for linked genetic markers. Bulk segregation analysis (BSA) was used to rapidly test big number of RAPD primer. Primers showing polymorphic DNA amplification fragments will be used for linkage analysis on the individual DH plants.

Wstęp

Olej rzepakowy, dzięki dużej zmienności w składzie poszczególnych kwasów tłuszczowych, może być wykorzystywany dla różnych celów, zarówno w przemyśle spożywczym, jak i chemicznym. Kwas linolenowy ($C_{18:3}$), ze względu na jego zdolność do samooksydacji powodującej niekorzystne walory smakowe, nie jest pożądanym w oleju stosowanym do celów spożywczych. Aktualnie prowadzi się badania w kierunku obniżenia zawartości $C_{18:3}$ na korzyść innych tłuszczów jadalnych kwasów z tej samej grupy C_{18} — oleinowego ($C_{18:1}$) oraz linolowego ($C_{18:2}$) (Pleines 1988).

Dotychczas, wykorzystując techniki RAPD oraz CAPS udało się znaleźć markery genów mające związek z produkcją kwasu linolenowego (Jourden i in. 1996a i 1996b). Ponieważ dla badanych linii nie udało się potwierdzić sprzężenia tych markerów z cechą niskiej zawartości kwasu linolenowego podjęliśmy dalsze próby znalezienia markerów charakterystycznych dla naszych linii hodowlanych.

Oznaczenie markera genetycznego związanego z niską zawartością kwasu linolenowego może mieć szerokie znaczenie przy użyciu nowoczesnych programów hodowli, zwłaszcza w przypadku zastosowania wczesnej selekcji materiału na tę cechę.

Material i metodyka

Odmiana kanadyjska Stellar, charakteryzująca się niską zawartością kwasu $C_{18:3}$ w nasionach posłużyła do krzyżowania z 2 liniami jarymi (określonymi jako 14 i 18) charakteryzującymi się wysokim plonem. Nasiona F_1 zebrano i wysiano w szklarni, w kontrolowanych warunkach. Metodą izolowanych mikrospor uzyskanych z roślin pokolenia F_1 , według procedury Polsoni i in. (1988) wyprowadzono pokolenie podwojonych haploidów DH1. Następnie rośliny DH1 poddano samozapyleniu i zebrano nasiona DH2. Część tych nasion poddano analizie gazowo-chromatograficznej na zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych, pozostałą część wysiano dla uzyskania świeżego materiału z liści do izolacji DNA. Następnie opierając się na wynikach uzyskanych podczas analizy gazowo-chromatograficznej wyodrębniono dwie grupy roślin charakteryzujących się niską (do 3,5%) i wysoką (od 5 do 8,5%) zawartością kwasu linolenowego w nasionach. Do pierwszej grupy zakwalifikowano rośliny od 1 do 12, do drugiej od 13 do 20 (tab. 1). Do izolacji DNA z roślin stosowano metodę z użyciem CTAB (Doyle i Doyle 1990). Następnie połączono DNA pochodzące z roślin należących do poszczególnych grup, tworząc próby zbiorcze. Próby te wykorzystano jako matryce do wstępnego poszukiwania markerów RAPD-PCR. W badaniach posłużono się zestawami starterów do RAPD firmy Operon (zestaw K i L).

Amplifikację genomowego DNA prowadzono metodą PCR z użyciem jednego startera o długości 10 nukleotydów. Mieszanina reakcyjna o objętości 25 µl zawierała 50 ng badanego DNA, 1 x stężony bufor reakcyjny, 1,5 mM MgCl₂, 0,15 mM dNTP, 0,2 µM startera i 1 jednostkę polimerazy Taq DNA (Finnzymes). Stosowano 40 cykli amplifikacji. Każdy cykl obejmował: 1 min. w 92°C, 1,5 min. w 35°C i 2 min. w 72°C. Po 40 cyklach następował końcowy etap inkubacji, 5 min. w 72°C. Amplifikowane fragmenty rozdzielano w 1% żelu agarozowym, barwiono bromkiem etydyny i oceniano w świetle UV.

Wyniki

Na podstawie przeprowadzonej analizy gazowo-chromatograficznej stwierdzono, że zawartość kwasu linolenowego C_{18:3} wynosiła od 1,21% do 8,31% ogólnej zawartości kwasów tłuszczowych. Za niskie wartości przyjęto te, które nie przekraczały 3,22%, wysokie od 5 do 8,31%. Utworzono dwie grupy zbiorcze o niskiej (1,21–3,22%) i o wysokiej (5,01–8,31%) zawartości kwasu C_{18:3} (tab. 1). Dla porównania podano zawartości kwasu linolenowego odmiany Stellar 22%, tradycyjnie uznawanej za charakteryzującą się niskim poziomem kwasu C_{18:3} (4,22%) oraz odmiany Drakkar (7,23%) uznawanej za odmianę o wysokim poziomie tego kwasu tłuszczowego. W pierwszym etapie poszukiwano starterów RAPD mogących wykazać różnice między grupami roślin o niskiej i wysokiej zawartości kwasu linolenowego. Przetestowano 40 starterów RAPD. Poszczególne startery były używane do amplifikacji na matrycy prób zbiorczych pochodzących z dwóch wyróżnionych wyżej kategorii (rys. 1). Startery wykazujące polimorfizm pomiędzy próbami zbiorczymi DNA z roślin o niskiej i wysokiej zawartości kwasu C_{18:3} zakwalifikowano do analiz na poszczególnych osobnikach populacji podwojonych haploidów w celu oznaczenia markerów sprzężonych z cechą niskiej zawartości kwasu linolenowego. Zidentyfikowano 12 starterów wykazujących polimorfizm prążków pomiędzy próbami zbiorczymi. Otrzymane wyniki były potwierdzane poprzez powtórzną analizę. Startery te są obecnie wykorzystywane do analizy porównawczej dużej populacji pojedynczych roślin w celu znalezienia markera genetycznego sprzężonego z niską zawartością kwasu linolenowego. Badania na poszczególnych osobnikach są w toku.

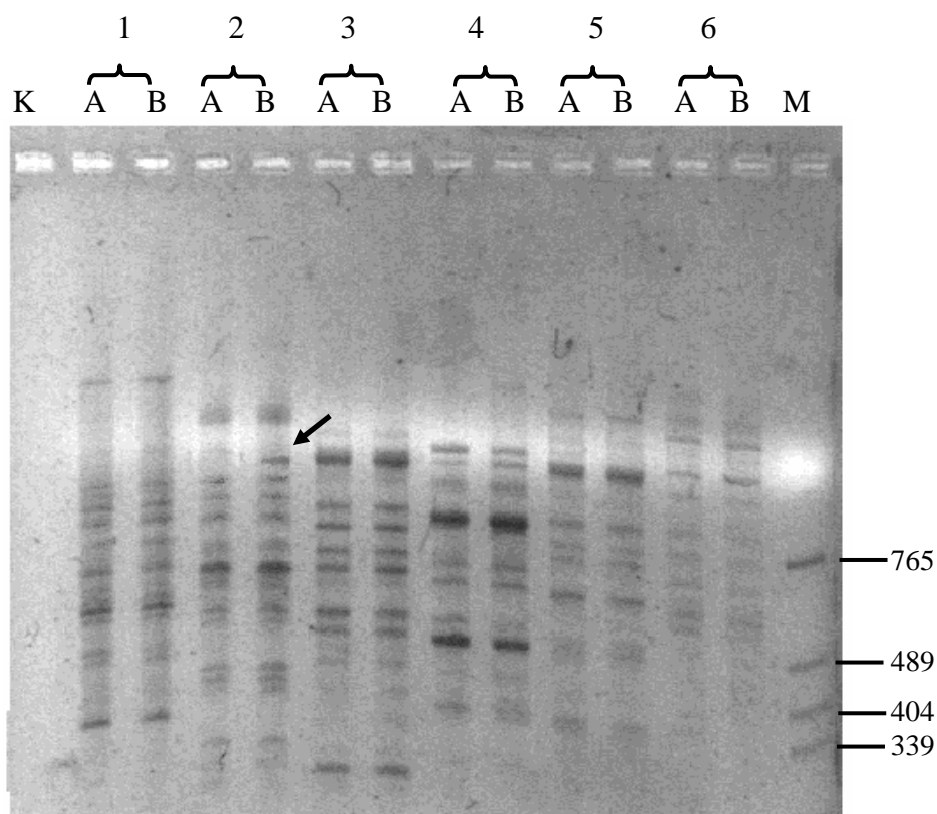
Tabela 1

Skład kwasów tłuszczowych w nasionach rzepaku jarego populacji DH na podstawie wyników uzyskanych przy pomocy chromatografii gazowej — *Fatty acids content in DH populations of spring form rapeseeds estimated by gas chromatography analysis*

Nr	DH	Palmitynowy [%]	Stearynowy [%]	Oleinowy [%]	Liniowy [%]	Linolenowy [%]	Arachidowy [%]	Eikozynowy [%]
1	14-43	4,05	1,71	63,42	25,69	2,81	0,65	1,67
2	14-36	4,61	1,32	61,37	27,14	3,17	0,55	1,85
3	14-78	4,38	1,45	61,43	27,67	2,93	0,55	1,6
4	14-11	4,38	1,31	55,59	33,5	3,10	0,51	1,61
5	14-1	4,28	1,37	60,2	28,94	3,22	0,48	1,51
6	18-130	4,11	2,16	65,57	23,66	2,08	0,82	1,6
7	18-2	4,2	1,81	64,73	25,18	1,96	0,68	1,43
8	18-119	3,95	1,43	63,02	27,87	1,93	0,49	1,3
9	18-188	8,14	13,07	63,18	13,06	1,21	0,27	1,07
10	18-181	15,32	76,11	0,76	1,27	1,72	3,76	1,06
11	18-184	3,34	1,54	70,34	20,61	2,39	0,49	1,29
12	18-160	4,15	1,46	66,46	23,94	2,16	0,49	1,34
13	14-15	4,29	1,15	60,07	24,51	7,74	0,47	1,77
14	14-7	3,99	1,23	58,62	25,62	8,31	0,49	1,73
15	14-41	4,03	1,28	56,16	29,75	7,32	0,35	1,11
16	14-84	4,22	1,66	64,44	20,06	7,25	0,5	1,87
17	14-4	4,19	1,4	59,94	25,45	7,07	0,5	1,45
18	18-28	5,52	1,49	53,75	32,19	5,23	0,49	1,32
19	18-39	4,64	1,59	53	33,65	5,16	0,58	1,38
20	18-185	5,24	1,1	49,05	37,64	5,01	0,42	1,53
Drakkar		4,91	2,18	64,43	19,08	7,23	0,82	1,35
Stellar		5,65	2,56	61,44	26,31	4,22	0,53	1,47

1–12 — genotypy o niskiej zawartości kwasu linolenowego

13–20 — genotypy o wysokiej zawartości kwasu linolenowego



- 1-6 — startery OPK 18-13 — *OPK 18-13 primers*,
 A — próba DNA z roślin o niskiej zawartości $C_{18:3}$ — *low-linolenic acid bulk sample*,
 B — próba DNA z roślin o normalnej zawartości $C_{18:3}$ — *normal-linolenic acid bulk sample*,
 M — marker wielkości, pGEM-5/MspI — *molecular marker pGEM-5/MspI (fragment sizes in bp)*,
 K — próba kontrolna bez matrycy DNA — *control, no DNA added*.

Rys. 1. Obraz elektroforezy w 1% żelu agarozowym produktów reakcji RAPD-PCR
Products of RAPD-PCR amplification separated in 1% agarose gel

Literatura

- Doyle J.J., Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissues. *Focus* 12: 13-15.
- Jourdren Ch., Barret P., Horvais R., Delourme R., Renard M. 1996a. Identification of RAPD markers linked to linolenic acid genes in rapeseed. *Euphytica* 90: 351-357.
- Jourdren Ch., Barret P., Brauner D., Delourme R., Renard M. 1996b. Specific molecular marker of the genes controlling linolenic acid content in rapeseed. *TAG 93. Theor. Appl. Genet.*: 512-518.
- Pleines S. 1988. Untersuchungen über die genotypische Variation des C₁₈ – Fettsäuremusters bei Raps und Möglichkeiten ihrer züchterischen Nutzung. *Praca doktorska, Justus-Liebig-Universität.*
- Polsoni L., Kott L., Beversdorf W. 1988. Large scale microspore culture technique for mutation – selection studies in *Brassica napus*. *Can. J. Bot.* 66: 1681-1685.