

Rozprawa doktorska pt.
**Genetyczne uwarunkowania składu kwasów tłuszczowych w nasionach form oleistych
Inu zwyczajnego (*Linum usitatissimum* L.)**

Genetics factors influencing the fatty acid content in the seeds of linseed (*Linum usitatissimum* L.)

mgr inż. Magdalena WALKOWIAK

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie
Oddział w Poznaniu, Zakład Roślin Oleistych

o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauki rolniczej, w dyscyplinie agronomia*

Promotor: dr hab. Stanisław Spasibonek

STRESZCZENIE

Len zwyczajny (*Linum usitatissimum* L.) jest jedną z najstarszych uprawnych roślin oleistych i włóknistych. W przeszłości len był znany jako strategiczna uprawa włókiennicza. W dzisiejszych czasach znaczenie Inu, jako produktu naturalnego i przyjaznego dla środowiska, jest związane z jego wielostronnym zastosowaniem. Większość uprawianych na świecie odmian Inu zwyczajnego dostarcza olej o typowym dla tego gatunku składzie kwasów tłuszczowych, tj. palmitynowego (C16:0; ~ 6%), stearynowego (C18:0; ~ 3%), oleinowego (C18:1; ω -9; ~ 16–20%), linolowego (C18:2; ω -6; ~ 13–18%) i α -linolenowego (C18:3; ω -3; ~ 52–60%). Olej ten jako bogate źródło kwasu α -linolenowego (ω -3) wykorzystywany jest w przemyśle spożywczym, do celów dietetycznych oraz farmaceutycznych. Duży udział tego kwasu w diecie ma pozytywne działanie w profilaktyce i leczeniu poważnych chorób cywilizacyjnych, takich jak rak piersi, prostaty, choroby układu krążenia, trawienno i otyłości. Olej Iniany o wysokiej zawartości kwasu α -linolenowego, o właściwościach szybko schnących jest także składnikiem farb, lakierów i bejc.

Istotnym ograniczeniem wykorzystania oleju Inianego na szeroką skalę jest jego niska trwałość. Ze względu na wysoką zawartość kwasu α -linolenowego olej Iniany jest wrażliwy na działanie światła oraz temperatury i dlatego ulega szybkim przemianom sensorycznym oraz chemicznym obniżającym jego wartość odżywczą.

Wychodząc naprzeciw wymaganiom rynku, w IHAR-PIB, Oddział w Poznaniu podjęto prace nad wytworzeniem odmiany Inu o zmienionych proporcjach kwasów tłuszczowych tj. obniżonej zawartości kwasu α -linolenowego i uzyskaniu form o stosunku kwasów: linolowego do α -linolenowego 1:1 oraz 2:1. Taki skład kwasów tłuszczowych warunkuje wyższą trwałość produktu nie pogarszając jego wartości dietetycznej.

Prace genetyczno-hodowlane nad zmianą proporcji kwasów tłuszczowych 18-węglowych rozpoczęto od oceny licznych taksonów Inu oleistego i włóknistego zgromadzonych w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych IHAR-PIB w Radzikowie oraz w IHAR-PIB, Oddział w Poznaniu. Kolekcja 31 odmian i rodów hodowlanych pochodzących z różnych stref geograficzno-klimatycznych wykazała zróżnicowanie pod względem wszystkich badanych 11 cech agronomicznych i jakościowych. Wykorzystując analizę skupień metodą Warda wyodrębniono pięć grup jednorodnych. Na szczególną uwagę zasługiwała grupa piąta, najbardziej oddalona od pozostałych, stanowiąca odrębną pulę genową. Grupa ta skupiła formy Inu zwyczajnego o znacznie podwyższonej zawartości kwasu linolowego i skrajnie obniżonej zawartości kwasu α -linolenowego w nasionach.

Do krzyżowań diallelicznych wybrano 6 form Inu zwyczajnego o zróżnicowanym składzie trzech kwasów tłuszczowych: (C18:1; ω -9), (C18:2; ω -6), (C18:3; ω -3). Wykazano istotne zróżnicowanie efektów ogólnej zdolności kombinacyjnej (GCA) dla zawartości kwasu linolowego i α -linolenowego. Natomiast zróżnicowanie efektów specyficznej zdolności kombinacyjnej (SCA) okazało się istotne dla wszystkich badanych kwasów tłuszczowych. Na podstawie przeprowadzonej analizy dziedziczenia stwierdzono, że addytywne działanie genów odgrywało

główną rolę w tworzeniu i dziedziczeniu zawartości kwasów (C18:2; ω -6), (C18:3; ω -3) natomiast nieaddytywne działanie genów decydowało o zawartości kwasu (C18:1; ω -9). Na szczególne podkreślenie zasługują dwa genotypy rodzicielskie typu Linola (Linola KLA i Linola KLB), o istotnie najwyższej dodatniej wartości GCA dla kwasu linolowego i istotnie najwyższej ujemnej wartości GCA dla kwasu α -linolenowego, które odpowiednio zwiększały zawartość kwasu linolowego i obniżały zawartość kwasu α -linolenowego w nasionach mieszańców. Korzystne dodatnie efekty SCA dla cechy podwyższonej zawartości kwasu linolowego i ujemne efekty dla cechy obniżonej zawartości kwasu α -linolenowego odnotowano w 5 kombinacjach krzyżowań z genotypami typu Linola. Kombinacje te dają możliwość wyselekcjonowania form o zawartości kwasów tłuszczowych: linolowego i α -linolenowego w proporcji 1:1 oraz 2:1, z których można pozyskać olej do celów spożywczych o wydłużonej trwałości.

Dla zwiększenia skuteczności selekcji pożądaných genotypów o zmienionym profilu kwasów tłuszczowych w sześciu badanych formach Inu poszukiwano markery CAPS różnicujące allele genów *LuFAD3* kodujących desaturazę FAD3. W bazie danych dla genomu Inu (GenBank), znaleziono sekwencje dwóch genów *LuFAD3*. W oparciu o opisaną wcześniej mutację genu *LuFAD3A* powodującą niską zawartość kwasu α -linolenowego w nasionach Inu, opracowano startery do amplifikacji fragmentu tego genu w celu uzyskania markerów CAPS. Niestety zastosowane markery nie wykryły mutacji genu *LuFAD3A* specyficznej dla niskolinolenowych form Linola KLA i Linola KLB. Oznacza to, że za tą cechę u tych form odpowiada inna mutacja. Natomiast w odmianie Szafir wykryto polimorfizm w amplifikowanym fragmencie genu *LuFAD3A*, który pozwala na odróżnienie jej od pozostałych badanych form Inu.

Wyniki badań przedstawione w rozprawie doktorskiej zostały opublikowane w dwóch czasopismach międzynarodowych i jednym ogólnopolskim osiągając łączny współczynnik wpływu IF_{5-letni} 6,134, punkty wg MNiSW/MEiN = 190.

ABSTRACT

Linseed (*Linum usitatissimum* L.) is one of the oldest cultivated oil and fiber crops. In the past, linseed was known as a strategic textile crop. Nowadays, the importance of linseed as a natural, environmentally friendly product, is focused on its multifaceted use. Most cultivars of linseed grown worldwide provide oil with the typical fatty acid composition, i.e.: palmitic (C16:0; ~ 6%), stearic (C18:0; ~ 3%), oleic (C18:1; ω -9; ~ 16–20%), linoleic (C18:2; ω -6; ~ 13–18%) and α -linolenic (C18:3; ω -3; ~ 52–60%) acid. This oil, as a rich source of α -linolenic acid (ω -3), is also used in the food industry, for dietary and pharmaceutical purposes. A large proportion of this acid in the diet has a positive effect in the prevention and treatment of serious civilization diseases, such as breast cancer, prostate cancer, cardiovascular diseases, digestive disorders and obesity. Linseed oil, with a high content of α -linolenic acid and due to its fast-drying properties, is a major ingredient of paints, varnishes and stains.

An important limitation of the large-scale use of the linseed oil is its low durability. Due to the high content of α -linolenic acid, linseed oil is sensitive to light and temperature and therefore undergoes rapid sensory and chemical transformations, reducing its nutritional value.

In order to meet the market requirements at the Department of Oilseed Crop of the IHAR-PIB in Poznań started research aimed at producing a cultivar of linseed with altered proportions of fatty acids, i.e. reduced content of α -linolenic acid, and thus obtaining forms with a fatty acids (C18:2; ω -6) to (C18:3; ω -3) ratio of 1:1 and 2:1. Such a composition of fatty acids determines higher durability of the product without deteriorating its nutritional value.

Genetic and breeding work on changing the ratio of 18-carbon fatty acids began with the evaluation of numerous taxa of oil and fiber flax stored at the National Centre for Plant Genetic Resources: Polish Genebank of IHAR-PIB in Radzików and at the Department of Oilseed Crop of the IHAR-PIB in Poznań. The collection of 31 cultivars and breeding lines from different

geographic and climatic zones showed variability of all 11 agronomic and quality traits studied. Using Ward's cluster analysis method, five homogeneous groups were distinguished. The fifth group was particularly noteworthy, as it was the most distant from the others and represented a separate gene pool. This group clustered forms of common linseed with significantly increased (C18:2; ω -6) acid content and extremely reduced (C18:3; ω -3) acid content in the seeds.

For diallelic crosses, 6 forms of common linseed with different compositions of three fatty acids (C18:1; ω -9), (C18:2; ω -6), (C18:3; ω -3) were selected. Significant variation in GCA effects was found for linoleic and α -linolenic acid content. In contrast, significant variation in SCA effects was determined for all fatty acids studied. Based on the inheritance analysis, it was found that additive gene action played a major role in the formation and inheritance of (C18:2; ω -6) and (C18:3; ω -3) acid content, while non-additive gene action determined (C18:1; ω -9) acid content. Particularly noteworthy are two Linola-type parental genotypes (Linola KLA and Linola KLB), with the significantly highest positive GCA value for linoleic acid and the significantly highest negative GCA value for α -linolenic acid, which increased the (C18:2; ω -6) acid content and decreased the (C18:3; ω -3) acid content in hybrid seeds, respectively. Favorable positive SCA effects for the trait of increased linoleic acid content and negative effects for the trait of decreased α -linolenic acid content were recorded in 5 combinations of crosses with Linola-type genotypes. These combinations offer the possibility of selecting genotypes with a ω -6 : ω -3 acids ratio of 1:1 and 1:2, from which oil for food purposes with extended durability, can be obtained.

To increase the efficiency of selecting desirable genotypes with altered fatty acid profiles, CAPS markers for allele-differentiating of *LuFAD3* genes coding the FAD3 desaturase in the six tested linseed forms were searched. In the database for the linseed genome (GenBank), the sequences of two *LuFAD3* genes were found. Based on the previously described mutation of the *LuFAD3A* gene causing low α -linolenic acid content in linseed seeds, primers were designed to amplify a fragment of this gene in order to obtain CAPS markers. Unfortunately, the designed markers did not allow to detect a mutation in the *LuFAD3A* gene, specific to the low-linolenic forms of Linola KLA and Linola KLB. This means that a different mutation is responsible for this trait in studied forms. However, in the Szafir cultivar, a polymorphism was detected in an amplified fragment of the *LuFAD3A* gene, which allows this variety to be distinguished from the other linseed forms tested.

The results of the research presented in doctoral dissertation have been published in two international and one nationwide journals, achieving a total impact factor (IF_{5 years}) of 6,134, and 190 points according to the MNiSW/MEiN.

Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

1. **Walkowiak Magdalena**, Krótka Krystyna, Wielebski Franciszek, Michalski Krzysztof, Silska Grażyna, Praczyk Marcin, Spasibonek Stanisław* (2018) Ocena zmienności i współzależności cech użytkowych w kolekcji oleistych odmian i rodów lnu zwyczajnego (*Linum usitatissimum* L.). Fragmenta Agronomica 35 (4): 123–137 doi.10.26374/fa.2018.35.48 * autor korespondencyjny. Punktacja wg MNiSW 20 pkt
2. **Walkowiak Magdalena***, Spasibonek Stanisław, Krótka Krystyna (2022). Variation and genetic analysis of fatty acid composition in flax (*Linum usitatissimum* L.). Euphytica 218: 2 doi.10.1007/s10681-021-02941-6m autor korespondencyjny. IF₂₀₂₁ 2,185 IF_{5-letni} 2,387 Punktacja wg MEiN 70 pkt
3. **Walkowiak Magdalena***, Matuszczak Marcin, Spasibonek Stanisław*, Liersch Alina, Mikołajczyk Katarzyna (2022). Cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for characterization of the *LuFAD3A* gene from various flax (*Linum usitatissimum* L.) cultivars. Agronomy 12: 1432 doi.10.3390/agronomy12061432. autor korespondencyjny. IF₂₀₂₁ 3,949 IF_{5-letni} 4,117 Punktacja wg MEiN 100 pkt.

Łączny IF/IF_{5-letni} w/w prac wynosi 6,134/6,504 oraz 190 pkt MNiSW i MEiN (od 2021 r.)

Poznań, 2022.12.14

(-) mgr inż. Magdalena Walkowiak

*/ przewodnik doktorski wszczęty do 30 kwietnia 2019 r. realizowany jest w dyscyplinie agronomii, nadanie stopnia doktora po 30 kwietnia 2019 r. następuje w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.