



Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
Państwowy Instytut Badawczy
w Radzikowie

Magdalena Walkowiak

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.

**Genetyczne uwarunkowania składu kwasów tłuszczowych w nasionach
form oleistych lnu zwyczajnego (*Linum usitatissimum* L.)**

Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Roślin Oleistych IHAR-PIB, Oddział w Poznaniu

Promotor

dr hab. inż. Stanisław Spasibionek
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowy Instytut Badawczy,
Oddział w Poznaniu

Recenzenci

dr hab. inż. Renata Anna Galek prof. uczelni
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu;
Wydział Przyrodniczo-Technologiczny; Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa

prof. dr hab. Mirosław Tyrka

Politechnika Rzeszowska im. Ignacego Łukasiewicza;
Wydział Chemiczny; Zakład Biotechnologii i Bioinformatyki

Poznań, 2023

Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

1. **Walkowiak Magdalena**, Krótka Krystyna, Wielebski Franciszek, Michalski Krzysztof, Silska Grażyna, Praczyk Marcin, Spasibionek 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***, Spasibionek 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, Spasibionek 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 roku).

Wprowadzenie

Len zwyczajny (*Linum usitatissimum* L.) jest jedną z najstarszych uprawnych roślin oleistych i włóknistych (Dewilde 1983, Woyke i Muśnicki 1999, Zohary i Hopf 2000, Kulig i Kołodziejczyk 2020). W przeszłości len był znany jako strategiczna uprawa włókiennicza. W dzisiejszych czasach znaczenie lnu jako produktu naturalnego i przyjaznego dla środowiska jest związane z jego wielostronnym zastosowaniem. Większość uprawianych na świecie odmian lnu 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 (Ziemiański i Budzyńska-Topolowska 1991, Ashri 1992, Przysławski i Bolesławska 2006, Barceló-Coblijn i Murphy 2009, Paszczyk i in. 2007, Spasibionek 2013). Duży udział tego kwasu w diecie ma pozytywne działanie w profilaktyce i leczeniu poważnych chorób cywilizacyjnych, takich jak rak piersi, prostaty, choroby układu krążenia, trawiennego i otyłości. Olej lniany o wysokiej zawartości kwasu α -linolenowego, o właściwościach szybko schnących jest także składnikiem farb, lakierów i bejc.

Istotnym ograniczeniem wykorzystania oleju lnianego na szeroką skalę jest jego niska trwałość. Ze względu na wysoką zawartość kwasu α -linolenowego olej lniany jest wrażliwy na działanie światła oraz temperatury i dlatego ulega szybkim przemianom sensorycznym oraz chemicznym obniżającym jego wartość odżywczą (Drozdowski 2007, Matthäus 2011, Matthäus i in. 2011, Kruszewski i in. 2013).

Wychodząc naprzeciw wymaganiom rynku, w IHAR-PIB, Oddział w Poznaniu podjęto prace nad wytworzeniem odmiany lnu 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.

Cel badań

Założenia do prowadzonych badań

Len zwyczajny (*Linum usitatissimum* L.) jest ważną rośliną oleistą. Z tego też względu, niezwykle pożądanym jest postęp biologiczny towarzyszący wprowadzaniu nowych odmian – bardziej plennych, odpornych na choroby, jak również lepszych pod względem cech kształtujących parametry jakościowe nasion. Jego wielkość, jak i tempo wdrażania, jest uwarunkowane przede wszystkim wiedzą z zakresu genetycznych podstaw procesów i zjawisk mających na celu ulepszenie roślin uprawnych, jak również wykorzystaniem w hodowli metod i technologii opartych na wiedzy z zakresu biologii, genetyki i biotechnologii.

Hipotezy badawcze

1. Zgromadzenie kolekcji wartościowych form wyjściowych lnu zwyczajnego jest niezbędna do zapewnienia szerokiej puli genowej, koniecznej do poszukiwań pożądaných cech fenotypowych.
2. Analiza sposobu dziedziczenia oraz oszacowanie parametrów genetycznych jest odpowiednią metodą do kompleksowej oceny materiałów hodowlanych oraz do wyboru form o ściśle określonych cechach.
3. Metody oparte na markerach molekularnych są właściwym narzędziem dla zwiększenia skuteczności selekcji pożądaných genotypów lnu o zmienionym profilu kwasów tłuszczowych.

Główny cel badań

Uzyskanie na drodze rekombinacji materiałów wyjściowych lnu oleistego o zmienionym profilu kwasów tłuszczowych do hodowli nowych odmian o zawartości kwasów linolowego do α -linolenowego w proporcji 1:1 oraz 2:1 warunkujących wyższą trwałości oleju nie pogarszając jego wartości żywieniowych.

Cele szczegółowe

1. Ocena różnorodności fenotypowej pod względem cech agronomicznych i jakościowych odmian i rodów hodowlanych lnu zwyczajnego w zgromadzonej kolekcji w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych IHAR-PIB w Radzikowie oraz w IHAR-PIB, Oddział w Poznaniu.
2. Analiza zdolności kombinacyjnych oraz ocena dziedziczenia i odziedziczalności kwasów tłuszczowych 18-to węglowych w mieszańcach F1 otrzymanych z krzyżowań w układzie diallelicznym kompletnym, zróżnicowanych geograficznie odmian i linii hodowlanych lnu oleistego i włóknistego.
3. Ocena przydatności markerów molekularnych CAPS różnicujących allele genów *LuFAD3* do selekcji rekombinantów lnu oleistego o zmienionej zawartości kwasu α -linolenowego.

Material i metody

Material badawczy

- Kolekcja 31 odmian i rodów hodowlanych lnu zwyczajnego pochodzących z różnych stref klimatycznych.
- Do badań nad sposobem dziedziczenia kwasów tłuszczowych 18-węglowych z kolekcji wybrano 6 genotypów zróżnicowanych pod względem zawartości kwasów: oleinowego, linolowego i α -linolenowego:
 - dwie odmiany oleiste: Oliwin i Szafir o typowych dla lnu oleistego proporcjach kwasów tłuszczowych, odpowiednio: oleinowego 17,8%; 19,2%; linolowego 15,6%; 11,8% i α -linolenowego 58,0%; 59,3%,
 - dwie odmiany włókniste: Eskalina i Modran o proporcjach kwasów tłuszczowych, odpowiednio: oleinowego 23,1%; 21,0%, linolowego 15,7%; 18,0% i α -linolenowego 52,3%; 50,4%,
 - dwa kanadyjskie rody hodowlane typu Linola: Linola KLA i Linola KLB o zawartości kwasu oleinowego, odpowiednio: 17,0%; 17,6%, wysokiej zawartość kwasu linolowego 71,3%; 70,2% i skrajnie obniżonej zawartości kwasu α -linolenowego 2,1%; 2,2%.
- Do badań molekularnych wybrano 6 linii rodzicielskich wykorzystanych do krzyżowań w układzie diallelicznym.

Metody

1. Ocena polowa

Kolekcję 31 odmian i rodów hodowlanych badano w doświadczeniach polowych w IHAR-PIB, Oddział w Poznaniu, założonych metodą losowanych bloków w 4 powtórzeniach, w trzech sezonach wegetacyjnych 2013–2015. W trakcie wegetacji przeprowadzono ocenę cech agronomicznych: początek wschodów wyrażony w liczbie dni od daty siewu, początek kwitnienia (data) wyrażonej liczbą dni od daty siewu dla określenia wczesności, koniec kwitnienia w celu określenia długości kwitnienia oraz plon nasion ($t\ ha^{-1}$). W zebranych nasionach oznaczono MTN (g), zawartość tłuszczu (%) oraz skład kwasów tłuszczowych: palmitynowego, stearynowego, oleinowego, linolowego i α -linolenowego w oleju (%).

2. Krzyżowania dialleliczne

Dla przeprowadzenia szczegółowej charakterystyki genetycznej lnu zwyczajnego na zawartość kwasów: oleinowego, linolowego i α -linolenowego w oleju z nasion mieszańców F1 wykonano krzyżowania dialleliczne w układzie kompletnym 6 form

(Oliwin, Szafir, Eskalina, Modran, Linola KLA, Linola KLB) o zróżnicowanym składzie kwasów tłuszczowych 18-węglowych.

3. Ocena mieszańców F1 pod względem zróżnicowania składu kwasów tłuszczowych 18-węglowych

Z uzyskanymi 30 mieszańcami pokolenia F1 (z krzyżowań w układzie diallelicznym) oraz 6 formami rodzicielskimi przeprowadzono doświadczenia polowe w IHAR-PIB, Oddział w Poznaniu w dwóch sezonach wegetacyjnych 2014, 2016. Doświadczenia przeprowadzono w układzie bloków kompletnie zrandomizowanych, w czterech powtórzeniach. Po osiągnięciu pełnej dojrzałości nasion oznaczono zawartość kwasów: oleinowego, linolowego, α -linolenowego w oleju (%).

4. Analiza biochemiczna nasion

Zawartość tłuszczu w nasionach oznaczano za pomocą szerokopasmowego analizatora magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) firmy Newport Instruments Ltd (Krzymański 1970).

Skład kwasów tłuszczowych oznaczano metodą chromatografii gazowej na chromatografie firmy Hewlett Packard, Agilent Technologies 6890N Network GC System. Przygotowanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych oraz wycenę ilościową chromatogramów wykonano wg metody opracowanej przez Byczyńską i Krzymańskiego (1969). Rozdziału estrów metylowych dokonywano na kolumnie kapilarnej DB-23 o długości 30 m. Jako gaz nośny stosowano wodór. Temperatura kolumny wynosiła 200°C, detektora 220°C natomiast czas rozdziału około 10 minut. Przebieg rozdziału chromatograficznego rejestrowano, a wyliczenia udziału poszczególnych kwasów tłuszczowych wykonano za pomocą programu Chemstation.

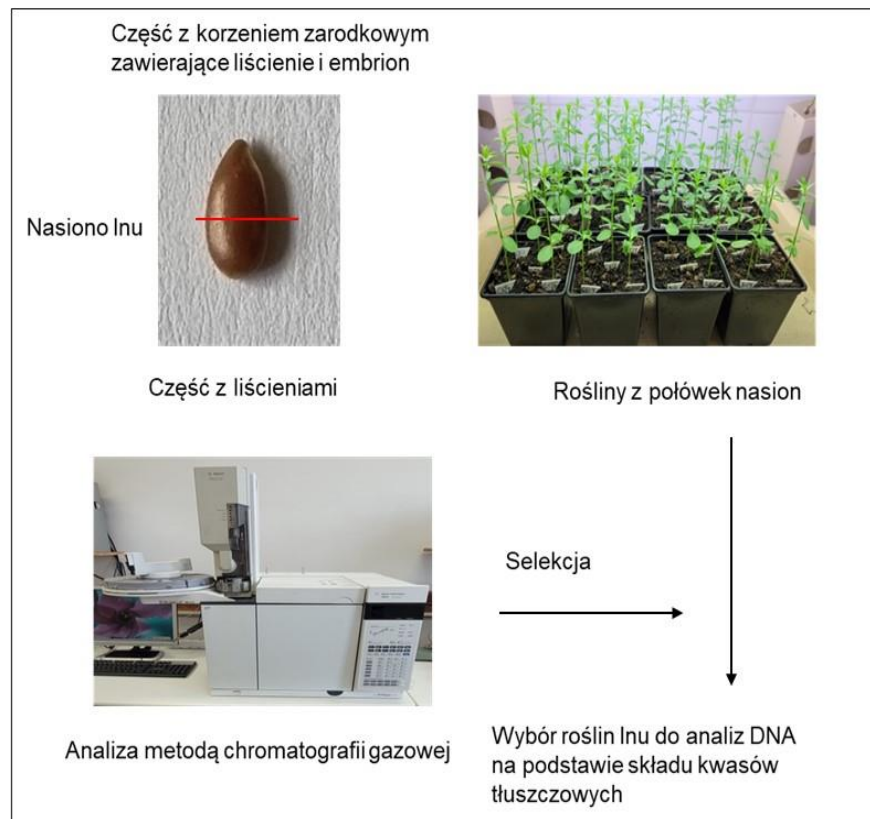
5. Ocena molekularna zróżnicowania genetycznego lnu

Zróżnicowanie genetyczne oceniono przy wykorzystaniu markerów typu CAPS (ang. *Cleaved Amplified Polymorphic Sequences*) (Konieczny i Ausubel 1993, Jourden i in. 1996, Drenkard i in. 1997) specyficznych dla alleli genu *LuFAD3*.

Metoda połówek nasion

Dla przygotowania materiału roślinnego do badań molekularnych wykorzystano zmodyfikowaną metodę połówek nasion (Jousse i in. 2010, Walkowiak i in. 2022). W warunkach kontrolowanych [22°C/17°C (16h-dzień/8h-noc)] z pojedynczych skielkowanych nasion linii rodzicielskich wypreparowywano zarodki w celu uzyskania młodych siewek do izolacji DNA. Fragment liścienia z korzonkiem zarodkowym umieszczano w doniczkach z ziemią ogrodniczą, a następnie przenoszono do pokoju hodowlanego o ustalonych parametrach temperatury i światła [(22°C/17°C (dzień/noc)

i 16h fotoperiod)] w celu uzyskania młodych siewek do izolacji DNA. Drugi fragment liścienia służył do oznaczenia składu kwasów tłuszczowych (Rys. 1).



Rys 1. Schemat metody połówek nasion – zmodyfikowany na podstawie publikacji Jousse i in. (2010).

Analiza CAPS

Analizy markerów CAPS wykonano dla wyizolowanych z młodych liści lnu próbek DNA (uzyskanych metodą połówek nasion) poprzez ekstrakcję buforem z CTAB (ang. *Cetyl Trimethylammonium Bromide*) według Doyle i Doyle (1990), po ich odpowiednim rozcieńczeniu. Aby uzyskać marker, fragment genu *LuFAD3A* zawierający części eksonu 5, eksonu 6 oraz intron znajdujący się pomiędzy tymi eksonami był amplifikowany przy użyciu dwóch specyficznych starterów do PCR. Sekwencja startera komplementarnego do eksonu 5 genu *LuFAD3A* była identyczna z sekwencją startera zastosowanego przez Vrinten i in. (2005) (FA3eVF -5'-CAGTGACCTGTTTCGCACCG-3'). Sekwencję drugiego startera, komplementarnego do eksonu 6 genu *LuFAD3A* zaprojektowano *de novo* na podstawie sekwencji badanego genu (Vrinten i in. 2005) oraz sekwencji genomowej lnu (Wang i in. 2012) (FA3e6R – 5'-ACAGCCTGCAGCATAATCA-3').

Dla każdej badanej próbki, część mieszaniny po amplifikacji pozostawiano jako kontrolę bez trawienia, a dla drugiej części produkt PCR trawiono wybranym enzymem restrykcyjnym (Thermo Scientific lub New England BioLabs). W analizach zastosowano sześć różnych enzymów (*PvuI*, *HindIII*, *BsuRI*, *Hin1II*, *VspI* i *Tru1I*).

Podczas planowania analiz szczególną uwagę zwrócono na to, aby ilości DNA w próbce trawionej enzymem oraz w próbce kontrolnej były takie same. Mieszaninę reakcyjną do reakcji trawienia przygotowano poprzez dodanie do mieszaniny po amplifikacji odpowiedniego enzymu restrykcyjnego z buforem. Enzym dodawano oddzielnie do każdej próbki – jako ostatni składnik, aby uniknąć jego dezaktywacji.

Produkty reakcji dla próbek trawionych i kontrolnych rozdzielano za pomocą elektroforezy w 1,8% żelu agarozowym. Prażki w żelu barwiono bromkiem etydyny i dokumentowano w świetle UV przy użyciu systemu obrazowania żelu Vilber Lourmat Quantum ST4 1000. Jako wzorzec wielkości fragmentów zastosowano DNA faga Lambda trawiony enzymami restrykcyjnymi *HindIII* i *EcoRI* (MBI Fermentas). Szacunkowe rozmiary fragmentów DNA obliczono na podstawie ich względnej pozycji, stosując moduł analizy masy cząsteczkowej oprogramowania Vilber Lourmat Quantum-Capt.

6. Analiza statystyczna

Do analizy wariancji wykorzystano program własny ANVAR. Natomiast wyznaczenie współczynników korelacji oraz porównanie średnich wykonano z wykorzystaniem programu Microsoft Excel. Istotność zróżnicowania badanych obiektów została ustalona w analizach wariancji dla doświadczenia na podstawie współczynnika Snedecora i obliczonych najmniejszych różnic istotnych statystycznie dla poziomu ufności $p=0,05$. W celu określenia różnic między badanymi obiektami przeprowadzono analizy wariancji dla 11 cech. Na podstawie odległości Mahalanobisa obliczonych dla tych cech wykorzystując metodę Warda wykreślono dendrogram podobieństwa oleistych odmian i rodów lnu zwyczajnego.

Obliczenia parametrów genetycznych oraz odziedziczalność wykonano dla mieszańców pokolenia F1 z wykorzystaniem programu DGH2 (Kala i in. 1996) opracowanego dla potrzeb doświadczeń genetyczno-hodowlanych obejmujących między innymi doświadczenia z genotypami uzyskanymi z krzyżowań diallelicznych.

W celu oceny efektów GCA (ang. *general combining ability*) i SCA (ang. *specific combining ability*) w układzie krzyżowań diallelicznych (metoda I wg Griffinga), przyjęto model liniowy analizy wariancji (Griffing 1956).

Dla przeprowadzenia analizy genetycznej oszacowano parametry (D, H_1 , H_2 , F, h^2) wg Mathera (1949). Przy pomocy tych parametrów obliczono współczynniki genetyczne w celu określenia dominującego lub recesywnego działania genów (Hayman 1954).

Oceny podstawowych charakterystyk genetycznych takich jak stopień dominacji ($H_1/D^{1/2}$), liczba grup genów wykazujących dominację (h^2/H_2), stosunek liczby alleli dominujących do recesywnych ($H_2/4xH_1$), stosunek liczby genów dominujących do recesywnych $[(DH1)^{1/2}+F]/[(4DH1)^{1/2}-F]$, odziedziczalność w szerokim (h^2BS) i wąskim (h^2NS) sensie przeprowadzono wg Mathera i Jinksa (1982).

Omówienie wyników

W publikacji Walkowiak i in. (2018) pt. „Ocena zmienności i współzależności cech użytkowych w kolekcji oleistych odmian i rodów lnu zwyczajnego (*Linum usitatissimum* L.)” przedstawiono ocenę różnorodności fenotypowej pod względem cech agronomicznych i jakościowych kolekcji lnu zwyczajnego, zgromadzonej w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych IHAR-PIB w Radzikowie oraz w IHAR-PIB, Oddział w Poznaniu w celu wykorzystania jako materiał wyjściowy w tworzeniu nowych oleistych odmian lnu zwyczajnego o zmienionych proporcjach kwasów tłuszczowych.

Badano 26 odmian i 5 rodów hodowlanych lnu zwyczajnego pochodzących z Europy oraz Ameryki Północnej i Południowej. Zestaw 31 obiektów kolekcyjnych oceniano w doświadczeniach na poletkach IHAR-PIB, Oddział w Poznaniu w ciągu trzech sezonów wegetacyjnych, 2013–2015. Doświadczenia zakładano metodą losowanych bloków w 4 powtórzeniach. W trakcie wegetacji przeprowadzono ocenę 11 cech tj. początek wschodów, początek i koniec kwitnienia wyrażony w liczbie dni od daty siewu oraz plon nasion ($t\ ha^{-1}$). W zebranych nasionach oznaczono masę 1000 nasion (g), zawartość tłuszczu (%) oraz zawartość kwasów tłuszczowych: palmitynowego, stearynowego, oleinowego, linolowego, α -linolenowego w oleju (%).

Analizując główne cechy agronomiczne stwierdzono, że dwie odmiany lnu brązowonasiennego, węgierska Szegedi 30 ($2,11\ t\ ha^{-1}$) i angielska Peak ($2,02\ t\ ha^{-1}$) uzyskały istotnie wyższy plon nasion od wszystkich badanych obiektów oraz od najlepiej plonującej (będącej wzorcem w doświadczeniach COBORU) polskiej odmiany Bukoz ($1,21\ t\ ha^{-1}$). Selekcja materiałów hodowlanych nastawiona jest również na otrzymanie odmian o masie 1000 nasion powyżej 6,5 gramów, jako ważny składnik struktury plonu. Wśród ocenianych materiałów osiem form charakteryzowało się istotnie wyższą masą 1000 nasion w przedziale (7,4–9,6 g). Zdecydowanie największe nasiona ($\geq 9\ g$) wykształcały trzy odmiany Lindor (9,0 g), Golda (9,4 g) i Eurodor (9,6 g). Obecnie w pracach hodowlanych, poza wysokim plonowaniem, dąży się do uzyskania odmian wczesnych wykorzystujących zgromadzone zasoby wilgoci z okresu zimowo-wiosennego. Spośród badanej kolekcji najwcześniej rozpoczynały kwitnienie dwie francuskie odmiany Lindor i Eurodor, od 8,4 do 7,0 dni wcześniej od najpóźniej rozpoczynającej kwitnienie odmiany Jantarol. Ponadto odmiany te charakteryzowały się najdłuższym okresem kwitnienia (cecha plonotwórcza), odpowiednio 27,7 i 29,7 dni.

W twórczej hodowli nowych odmian lnu oleistego niezbędne jest również dysponowanie materiałem kolekcyjnym o pożądanym cechach jakościowych nasion tj. wysokiej zawartości tłuszczu oraz o zróżnicowanej zawartości kwasów tłuszczowych w oleju z nasion. Przeprowadzona ocena wykazała, że trzy odmiany (Golda, AcMc-Duff, Oliwin) i dwa genotypy (Linola KLB, Linola KLA) charakteryzowały się istotnie wyższą zawartością tłuszczu (44,6 i 46,1%) w stosunku do średniej wszystkich obiektów (42,4%). Spośród sześciu badanych cech jakościowych nasion największą zmiennością charakteryzowały się dwie cechy: zawartość kwasu linolowego, (współczynnik zmienności 76,3%) i zawartość kwasu α -linolenowego, (współczynnik zmienności 41,3%). Wysokie współczynniki zmienności zawartości kwasów: linolowego i α -linolenowego wskazują na możliwości selekcji w kierunku dalszych zmian zawartości tych związków.

W dalszym etapie badań w celu określenia podobieństwa pod względem 11 analizowanych cech agronomicznych i jakościowych dla 31 form lnu zwyczajnego, zastosowano algorytm aglomeracji tych cech wykorzystując analizę skupień metodą Warda. Wyodrębniono pięć grup skupień, z których na szczególną uwagę zasługuje najdalej oddalona od pozostałych, grupa piąta skupiająca pięć form o skrajnie obniżonej zawartości kwasu α -linolenowego w nasionach (od 2,2% do 15,8%). Grupa ta stanowi odrębną pulę genową, która może być wykorzystana do prac badawczo-hodowlanych w kierunku uzyskania odmian o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych wielonienasyconych.

W drugiej publikacji pt. „Variation and genetic analysis of fatty acid composition in flax (*Linum usitatissimum* L.)” (Walkowiak i in. 2022) zamieszczono wyniki badań prowadzonych pod kątem oszacowanie parametrów genetycznych i sposobu dziedziczenia zawartości wielonienasyconych kwasów tłuszczowych w oleju badanych odmian, a także wytypowanie najlepszych mieszańców do wytworzenia nowego typu odmian lnu oleistego o zrównoważonej proporcji kwasów tłuszczowych linolowego do α -linolenowego.

Do krzyżowania diallelicznego (model I Griffinga) (Griffing 1956) wybrano sześć form lnu o znacznie zróżnicowanym składzie kwasów tłuszczowych. Dwie odmiany lnu oleistego Oliwin i Szafir o bardzo wysokiej zawartości kwasu α -linolenowego (~ 60%), dwa rody lnu oleistego Linola KLA i Linola KLB, wyselekcjonowane z mutantów, o wysokiej zawartości kwasu linolowego (> 70%) i skrajnie obniżonej zawartości kwasu α -linolenowego (~ 2,0%) oraz dwie odmiany lnu włóknistego Eskalina, Modran o zawartości kwasu α -linolenowego (< 50%).

Doświadczenia polowe z uzyskanymi 30 mieszańcami pokolenia F1 oraz 6 formami rodzicielskimi przeprowadzono w IHAR-PIB, Oddział w Poznaniu, w dwóch sezonach wegetacyjnych 2014, 2016 metodą losowanych bloków w 4 powtórzeniach.

W badaniach nad zmiennością genetyczną linii rodzicielskich oraz mieszańców oceniono wariancję ogólnej i specyficznej zdolności kombinacyjnej, komponenty genetyczne oraz odziedziczalność dla trzech kwasów tłuszczowych: (C18:1; ω -9), (C18:2; ω -6), (C18:3; ω -3).

Z przeprowadzonej analizy efektów GCA i SCA oraz obliczonego stosunku GCA/SCA wynika, że addytywne działanie genów odgrywało główną rolę w tworzeniu zawartości kwasów: linolowego i α -linolenowego, natomiast nieaddytywne działanie genów decydowało o zawartości kwasu oleinowego. Obliczone efekty GCA dla linii rodzicielskich wskazują na istotny, a jednocześnie różny wpływ na potomstwo. Na szczególne podkreślenie zasługują dwa genotypy typu Linola (Linola KLA i Linola KLB) o istotnie najwyższej dodatniej wartości GCA dla zawartości kwasu linolowego i istotnie najwyższej ujemnej wartości GCA dla zawartości kwasu α -linolenowego. Ocena SCA wykazała, że obecność tych genotypów w 5 kombinacjach mieszańców F1 daje możliwość wyselekcjonowania odmian o proporcji kwasów linolowego do α -linolenowego w typie 1:1 i 2:1, pożądanym ze względu na wolniejszy proces oksydacji oleju.

Przeprowadzona analiza wariancji wg Haymana (1954) potwierdziła wysoce istotne, addytywne działanie genów determinujących zawartość kwasu linolowego i α -linolenowego. Wykazano również, że dla tych kwasów wystąpiła istotnie najwyższa

dominacja genów. Wśród mieszańców F1 stwierdzono ponadto asymetrię w rozkładzie alleli genów determinujących zawartość kwasów oleinowego, linolowego i α -linolenowego.

Wykonano również ocenę parametrów genetycznych wg Mathera i Jinksa (1982). Dla zawartości kwasów: linolowego i α -linolenowego oceny parametrów addytywnych (D) były zdecydowanie wyższe od nieaddytywnych (H_1 , H_2 i h^2) i są potwierdzeniem addytywnego działania genów w determinowaniu zawartości tych kwasów. Ocena średniego stopnia dominowania $(H_1/D)^{1/2}$ dla kwasu oleinowego wykazała, że w warunkowaniu tej cechy wystąpiła całkowita dominacja natomiast częściowa dominacja dla kwasów: linolowego i α -linolenowego. Oszacowana liczba grup genów (h^2/H_2) kontrolujących gromadzenie się kwasów tłuszczowych w oleju nasion mieszańców F1 wykazała obecność jednej grupy genów dla tych kwasów. Na podstawie iloczynu częstotliwości alleli we wszystkich loci ($H_2/4xH_1$) stwierdzono, że wystąpiła prawie równa częstotliwość alleli dominujących i recesywnych dla kwasów: oleinowego, linolowego i α -linolenowego. Obliczony stosunek liczby alleli dominujących do recesywnych $([(DH1)^{1/2}+F]/[(4DH1)^{1/2}-F])$ wykazał, że w warunkowaniu zawartości tych kwasów decyduje przewaga genów dominujących nad recesywnymi. Wysokie współczynniki odziedziczalności w szerokim (h^2BS) i wąskim (h^2NS) sensie potwierdziły addytywne działanie genów w dziedziczeniu kwasów: linolowego i α -linolenowego. Natomiast dla kwasu oleinowego niskie ich wartości potwierdziły nieaddytywne działanie genów w determinacji tej cechy.

Trzecia publikacja wchodząca w skład rozprawy doktorskiej zatytułowana „Cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers for characterization of the *LuFAD3A* gene from various flax (*Linum usitatissimum* L.) cultivars” (Walkowiak i in. 2022) przedstawia zakres prac prowadzonych nad opracowaniem markerów genetycznych do identyfikacji zmutowanych alleli genów *LuFAD3* w genomie lnu oleistego i włóknistego z zastosowaniem markerów CAPS dla zwiększenia skuteczności selekcji pożądanych genotypów o zmienionych proporcjach kwasów tłuszczowych.

Do badań molekularnych wybrano dwie odmiany lnu oleistego Oliwin i Szafir o bardzo wysokiej zawartości kwasu α -linolenowego (> 58%), dwie odmiany lnu włóknistego Eskalina i Modran o zawartości kwasu α -linolenowego (\leq 51%), dwa rody hodowlane lnu oleistego Linola KLA i Linola KLB o wysokiej zawartości kwasu linolowego (~ 70%) i skrajnie obniżonej zawartości kwasu α -linolenowego (~ 2,0%). Do tych badań wykorzystano metodę połówek nasion, z których jedną poddano analizie składu kwasów tłuszczowych, a drugą izolacji DNA. W bazie danych dla genomu lnu (GenBank), znaleziono sekwencje dwóch genów *LuFAD3*. W oparciu o dane literaturowe stwierdzono, że za obniżenie zawartości kwasu α -linolenowego w nasionach lnu decydują zmutowane geny *LuFAD3A* i *LuFAD3B*. Wykorzystując tę wiedzę w celu uzyskania markerów CAPS opracowano startery do amplifikacji tylko jednego genu *LuFAD3A*.

W wyniku przeprowadzonego genotypowania dla sześciu form lnu zróżnicowanych pod względem zawartości kwasów tłuszczowych 18-weglowych w odmianie Szafir wykryto polimorfizm w amplifikowanym fragmencie genu *LuFAD3A*, który pozwala na odróżnienie tej odmiany od pozostałych badanych form lnu oleistego i włóknistego. Zastosowany marker CAPS natomiast nie potwierdził obecności zmutowanych alleli genu *LuFAD3A*, specyficznych dla niskolinolenowych form lnu

oleistego Linola KLA i Linola KLB. Uzyskane wyniki sugerują, że za brak aktywności desaturazy FAD3 w tych liniach odpowiada inna mutacja. Oznacza to, że kolejnym ważnym etapem badań będzie identyfikacja istotnych miejsc mutacji odpowiedzialnych za cechę niskiej zawartości kwasu α -linolenowego w nasionach rodów Linola KLA i Linola KLB. Badania te będą dotyczyły identyfikacji polimorfizmów potencjalnie wpływających na zmianę aktywności desaturazy FAD3.

Podsumowanie i wnioski

Postęp w hodowli lnu oleistego zależy od posiadanej zmienności genetycznej oraz od zastosowanych metod selekcji. Przeprowadzone badania wykazały, że zróżnicowanie fenotypowe form rodzicielskich przy jednoczesnym ich zróżnicowaniu genetycznym zwiększa prawdopodobieństwo otrzymania transgresyjnych mieszańców. Uzyskane wyniki potwierdziły, że efektywna selekcja mieszańców dla hodowli jakościowej lnu oleistego powinna być oparta zarówno na metodach genetyki ilościowej, jak również wspomagana markerami molekularnymi oraz odpowiednimi metodami biometrycznymi.

1. Zgromadzona w banku genów Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych IHAR-PIB w Radzikowie oraz w IHAR-PIB, Oddział w Poznaniu kolekcja odmian i rodów hodowlanych lnu zwyczajnego wykazała duże zróżnicowanie cech agronomicznych i jakościowych.
2. Spośród pięciu wyodrębnionych grup jednorodnych, grupa piąta (najdalej oddalona od pozostałych) skupiła trzy odmiany (Amon, Linola, Lola) i dwa rody hodowlane (Linola KLA, Linola KLB) o największej zmienności zawartości kwasów tłuszczowych tj. podwyższonej zawartości kwasu linolowego (C18:2; ω -6) i skrajnie obniżonej zawartości kwasu α -linolenowego (C18:3; ω -3) w oleju z nasion.
3. Analiza dziedziczenia wykazała, że addytywne działanie genów odgrywało kluczową rolę w tworzeniu i dziedziczeniu zawartości kwasów: linolowego i α -linolenowego natomiast nieaddytywne działanie genów decydowało o zawartości kwasu oleinowego.
4. 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 odpowiednio zwiększały zawartość kwasu linolowego i obniżały zawartość kwasu α -linolenowego w nasionach mieszańców.
5. Na podstawie efektów SCA wyodrębniono 5 kombinacji krzyżowań z rodami typu Linola, które dają możliwość wyselekcjonowania form lnu oleistego o zmienionej zawartości kwasów tłuszczowych: linolowego (C18:2; ω -6) i α -linolenowego (C18:3; ω -3) w proporcji 1:1 oraz 1:2.
6. Nowe formy hodowlane o zmienionych proporcjach kwasów tłuszczowych zostaną włączone do dalszych doświadczeń, a ponadto stanowią cenny materiał

do wytworzenia odmian, z których będzie można pozyskiwać olej o wydłużonej trwałości.

7. Wykazano, że marker CAPS może być wykorzystany do identyfikacji genów odpowiedzialnych za proces desaturacji kwasu α -linolenowego (C18:3; ω -3) w genotypach lnu oleistego.
8. Zastosowany marker nie potwierdził obecności zmutowanych alleli genu *LuFAD3A*, specyficznych dla niskolinolenowych form lnu oleistego Linola KLA i Linola KLB. Uzyskane wyniki sugerują, że za brak aktywności desaturazy FAD3 w tych liniach odpowiada inna mutacja.
9. W odmianie Szafir wykryto polimorfizm w amplifikowanym fragmencie genu *LuFAD3A*, który pozwala na odróżnienie jej od pozostałych badanych form lnu oleistego i włóknistego.

Spis literatury

- Ashri A. 1992. Mutation breeding of oil crops. Proc. Of Joint FAO/IAA Seminar, 23-25 May Lagoroza, Spain, 1–9.
- Barceló-Coblijn G., Murphy E.J. 2009. Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Prog Lipid Res* 48: 355–374 .
- Byczyńska B., Krzymański J. 1969. Szybki sposób otrzymywania estrów metylowych kwasów tłuszczowych do analizy metodą chromatografii gazowej. *Tłuszcze Jadalne XIII*: 108–114
- Dewilde B. 1983. 20 eeuwen vlas in Vlaanderen: 439 pp.
- Doyle J.J. Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–15.
- Drenkard E., Glazebrook J., Preuss D., Ausubel F.M. 1997. Use of cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) for genetic mapping and typing. [In:] Caetano-Anolles G, Gresshoff PM (eds) DNA markers: protocols, applications, and overviews. Wiley-Liss, Inc., New York, 187–198 pp.
- Drozdowski B. 2007. Lipidy – Charakterystyka ogólna tłuszczów jadalnych. [W:] Chemia żywności. Sacharydy lipidy i białka. Wydanie piąte zmienione. Praca pod red. Sikorski Z.E. WNT, Warszawa.
- Griffing B. 1956. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing system. *Aust J Biol Sci* 9: 463–493.
- Hayman B.J. 1954. The theory and analysis of diallel crossed. *Genetics* 39: 789–809.
- Jourdren C., Barret P., Brunel D., Delourme R., Renard M. 1996. Specific molecular marker of the genes controlling linolenic acid content in rapeseed. *Theor Appl Genet* 93: 512–518
- Jousse C., Schiltz S., Fournez A., Guillot K., Thomasset B., Gougeon S., Bourgaud F., Gontier E. 2010. Rapid, cost-effective screening of flax genotypes to identify desirable fatty acid compositions. *Electronic Journal of Plant Breeding* 1 (6): 1396–1404
- Kala R., Dobek A., Chudzik H., Kielczewska H. 1996. System analiz statystycznych doświadczeń genetyczno-hodowlanych, wersja 2.0. Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych, Akademia Rolnicza Poznań. Podręcznik użytkownika
- Konieczny A., Ausubel F.A. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *The Plant Journal* 4: 403–410

- Krzymański J. 1970. Oznaczenie zawartości tłuszczu i wody w nasionach oleistych metodą MNR. *Tłuszcze, Środki Piorące i Kosmetyki* 14/4: 202–208
- Kruszewski B., Fąfara P., Ratusz K., Obiedziński M. 2013. Ocena pojemności przeciwutleniającej i stabilności oksydacyjnej wybranych olejów roślinnych. *Zesz Probl Post Nauk Rol* 572: 43–52.
- Kulig B., Kołodziejczyk M. 2020. [W:] *Uprawa roślin. Tom III. Rośliny oleiste*. Praca pod redakcją Kotecki A. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, 295–432.
- Matthäus B. 2011. Effect of canolol (4-vinylsyringol) on the oxidation of edible oils. Proc. 13th Int. Rapeseed Congress, Prague, Czech Republic 520-523/www.irc2011.org.
- Matthäus B., Hasse N., Unbehend G. 2011. Impact of HOLL rapeseed oil during frying on product quality during storage. 13th Int. Rapeseed Congress, Prague, Czech Republic 526-561/ www.irc2011.org.
- Mather K., Jinks J.L. 1982. *Biometrical genetics: the study of continuous variation*, 3rd edn. Chapman Hall, London UK.
- Paszczyk B., Żeglarska Z., Borejszo Z. 2007. Skład kwasów tłuszczowych i izomerów trans kwasów tłuszczowych w wybranych wyrobach ciastkarskich. *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość* 4 (53): 55–56.
- Przysławski J., Bolesławska I. 2006. Tłuszcze pokarmowe – czynnik terapeutyczny czy patogenetyczny. *Tłuszcze Jadalne* 41: 179–192.
- Spasibionek S. 2013. Badania genetyczno-hodowlane mutantów rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych. [W:] *IHAR-PIB, wyd. Monografie i rozprawy naukowe* 47: 1–105.
- Walkowiak M., Krótka K., Wielebski F., Michalski K., Silska G., Praczyk M., Spasibionek S. 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.
- Walkowiak M., Spasibionek S., Krótka K. 2022. Variation and genetic analysis of fatty acid composition in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Euphytica* 218: 2 doi.10.1007/s10681-021-02941-6m.
- Walkowiak M., Matuszczak M., Spasibionek S., Liersch A., Mikołajczyk K. 2022. Cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) markers for characterization of the LuFAD3A gene from various flax (*Linum usitatissimum* L.) Cultivars. *Agronomy* 12: 1432.
- Wang Z., Hobson N., Galindo L., Zhu S., Shi D., McDill J., Yang L., Hawkins S., Neutelings G., Datla R., Lambert G., Galbraith D.W., Grassa C.J., Gerald A., Cronk Q.C., Cullis C., Dash P.K., Kumar P.A., Cloutier S., Sharpe A.G., Wong G.K.S., Wang J., Deyholos M.K. 2012. The genome of flax (*Linum usitatissimum*) assembled de novo from.
- Woyke T., Muśnicki Cz. 1999. [W:] *Szczegółowa uprawa roślin Praca zbiorowa pod redakcją Jasińska Z., Kotecki A.* Wydawnictwo AR we Wrocławiu, 485–487.
- Vrinten P., Hu Z., Munchinsky M.A., Rowland G., Qiu X. 2005. Two *FAD3* desaturase genes control the level of linolenic acid in flax seed. *Plant Physiol* 139: 79–87.
- Ziemiański Ś., Budzyńska-Topolowska J. 1991. *Tłuszcze pożywienia i lipidy ustrojowe*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
- Zohary D., Hopf M. 2000. *Domestication of plants in the Old World: the origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley*. Oxford.