

MOLEKULARNI MARKERI I KVALITET ULJA KOD RAZLIČITIH POPULACIJA IZ RODA *Brassicaceae*

Dejana Saftić-Panković, Ana Marjanović-Jeromela, Zvonimir Sakač, Radovan Marinković

U radu je ispitivano 25 sortnih populacija uljane repice (B. napus) i to dvadeset ozimih i pet jarih formi, zatim tri populacije ozimog stočnog kelja (B. oleracea) i jedna populacija B. rapa.

Sastav viših masnih kiselina u ulju analiziran je gasnom hromatografijom. Polimorfizam genomske DNK, koja je izolovana iz zamrznutih listova istih populacija, je ispitivan sa SSR markerima. Na osnovu polimorfničkih markera izračunate su genetičke distance između ispitivanih populacija. Primenom statističke analize klastera (UPGMA) konstruisan je dendrogram koji prikazuje srodnost ispitivanih populacija. Rezultati o varijabilnosti sastava viših masnih kiselina u ulju ispitivanih populacija roda Brassica su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim analizom polimorfizma genomske DNK.

Ključne reči: *Brassicaceae, više masne kiseline, PCR, mikrosateliti, GD*

MOLECULAR MARKERS AND OIL QUALITY IN DIFFERENT *Brassicaceae* POPULATIONS

In this paper 25 varietal populations of B. napus (20 winter and 5 spring type), three populations of B. oleracea and one population of B. rapa were investigated. The composition of fatty acids in oil was examined by gas chromatography. Polymorphism of genomic DNA, extracted from frozen leaves of the same plant material, was screened with SSR markers. Genetic distances between examined populations were calculated on the basis of polymorphic markers. Data were statistically analyzed with UPGMA method. The resulting dendrogram revealed relations between examined populations. The results on variability of plant material based on fatty acid composition of oil and differences in genomic DNA are comparable.

Key words: *Brassicaceae, fatty acids, PCR, mikrosatellites, GD*

UVOD

Rod *Brassica* se sastoji od preko 30 vrsta i njihovih hibrida, koje su većinom jednogodišnje ili dvogodišnje biljke. Uljana repica (*B. napus* L.), nastala ukrštanjem *B. rapa* x *B. oleracea*, se gaji kao ozima i jara forma. Na osnovu setvenih površina na kojima se gaji u svetu, kao i na osnovu prosečnih prinosa, uljana repica se nalazi na trećem mestu među uljanim biljnim vrstama (1). U našoj zemlji setvene površine uljane repice su u porastu, naročito za ozimu formu koja ima značajno viši prinos (2). Seme uljane repice se koristi za dobijanje ulja. Zbog visokog udela dugolančanih nezasićenih viših masnih kiselina, eruka i linolenske kiseline, a niskog sadržaja oleinske i linolne kiseline ulje repice je ranije

korišteno uglavnom u tehničke svrhe. Kao rezultat selekcije na poboljšani sastav viših masnih kiselina, danas se ulje uljane repice koristi kao visokovredno jestivo ulje oleinskog tipa (3).

Genetička varijabilnost savremenog oplemenjivačkog materijala uljane repice je mala zbog ograničenog geografskog porekla, a još više zbog intenzivnog oplemenjivanja na specifične osobine kvaliteta ulja i semena (4). Mnogo studija ukazuje na pogodnost korišćenja tehnika molekularnih markera za utvrđivanje genetičke varijabilnosti kod uljane repice. Za utvrđivanje genetičke distance (GD) do sada su korišteni RFLP (5) i SRAP markeri (6). RAPD markeri su takođe uspešno primenjivani za ispitivanje varijabilnosti između sorti uljane repice (7, 8). Plieske i Struss (9) su primenom SSR markera, i analize klastera jasno razdvojili ozime i jare forme uljane repice.

U ovom radu ispitivali smo varijabilnost ukupno 29 populacija iz roda *Brassicaceae* sa

Dr Dejana Saftić-Panković, dr Ana Marjanović-Jeromela, mr Zvonimir Sakač, dr Radovan Marinković, Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, Maksima Gorkog 30, Srbija

ciljem da se uporede rezultati dobijeni na nivou genomske DNK kao i na nivou sastava viših masnih kiselina u ulju.

MATERIJAL I METODE

Biljni materijal ispitivan u ovom radu je gajen na oglednom polju u Rimskim Šančevima. Od 402 linije uljane repice (S6 generacija posle početnog ukrštanja u "gene pool"-u), koje su na osnovu prezimljavanja svrstane u 5 grupa (2), odabrano je ukupno 20 ozimih sortnih populacija za ovo istraživanje (GP 26, 57, 63, 81, 149, 152, 232, 238, 298, 303, 343, 352, 357, 360, 373, 410, 412, 446, 449, 468). Pored toga ispitivano je i 5 jarih sorti (Pamnik, Ratnik, Jasna, Global, Galant), kao i tri genotipa *B. oleracea* (NS-Bikovo, K-357, *Brassica oleracea* var. *acephala*) i jedan genotip *B. rapa*.

Genomska DNK je izolovana iz zamrznutih listova (10), a ispitivanje polimorfizma je urađeno sa SSR markerima, koji su informativni za sve ispitivane vrste roda *Brassica*. Polimorfni markeri

su ocenjivani kao dominantni i na osnovu njih su izračunate genetičke distance (GD) između svakog para ispitivanih populacija (11). Matrica sa GD između svih parova ispitivanih populacija je statistički analizirana sa UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) metodom da bi se dobio dendrogram (Statistica for Windows, StatSoft 5.0, USA).

Sastav viših masnih kiselina u ulju iz semena ispitivanih populacija određen je gasnom hromatografijom (Konig HRGC 4000B Gas chromatograph, USA), nakon esterifikacije ulja (12).

REZULTATI I DISKUSIJA

Broj polimorfnih fragmenata po prajmeru je varirao od dva (SSR O110 i O113) do šest (SSR NaRa2 E07), a njihova dužina se kretala od 100 do 1000 bp (tabela 1). Prisustvo umnoženih polimorfnih fragmenata (ukupno 21) je upoređeno za svaki par ispitivanih populacija. Na osnovu toga izračunate su GD, koje su se kretale od 0 do 88% (rezultati nisu prikazani).

Tabela 1. Sekvence prajmera, te položaj markera na hromozomu (LG) i mapi [cM] (A), njihov broj (B) i dužina [bp] (C)

Table 1. Primer sequences, the position of markers on linkage group (LG) and map [cM] (A), their number (B) and size [bp] (C)

Prajmer Primer	Sekvenca (5'-3') Sequence (5'-3')	LG	A	B	C
SSR O110	TGCAACAAGGAGACGATGAG TTTGAATCCGGGACGTAGT	N2	90.6	2	100-1000
SSR O111	ATGAAAACCAATCCAGTGCC GATAGCAGATGGAAGAGCCG	N19	2.9	5	150-200
		N10	0		
SSR O113	TTCGCAACTCCTCCTAGAATC AAGGTCTCACCACGGAGTC	N2	68	2	150-250
SSR Ni2	TGCAACGAAAAAGGATCAGC TGCTAATTGAGCAATAGTGATTCC	N10	46.6	2	150-200
		N11	0		
SSR Bn O110	AATTGGCTTGGTAGCTGTCG ATAGGAATGGGATGCACAGG	N2	91	4	300-800
SSR Ra2 EO7	ATTGCTGAGATTGGCTCAGG CCTACACTTGCATCTTCACC	N10	46.6	6	100-200
		N19	34.6		

Rezultat UPGMA analize GD između svih ispitivanih populacija je prikazan kao dendrogram (slika 1) koji ilustruje srodnost ispitivanih populacija. Izdvajaju se dva glavna klastera, naznačeni kao A i B, sa GD od približno 80%. U klasteru A se nalaze populacije *B. rapa* i *B. oleracea*. Klaster B se grana na dva podklastera od kojih se jedan sastoji od jarih a drugi od ozimih sortnih populacija

uljane repice. Grupisanje ozimih i jarih formi je pronađeno i u drugim radovima (9, 13, 14). Plieske i Struss (9) su koristili 81 SSR marker, koji su rasprostranjeni po celom genomu, i jasno razdvojili 32 sorte populacije *B. napus* na dva klastera, u kojima su ozime odnosno jare forme. U našem radu GD između ozimih i jarih formi je bila oko 45%, što odgovara literaturnim podacima (9).

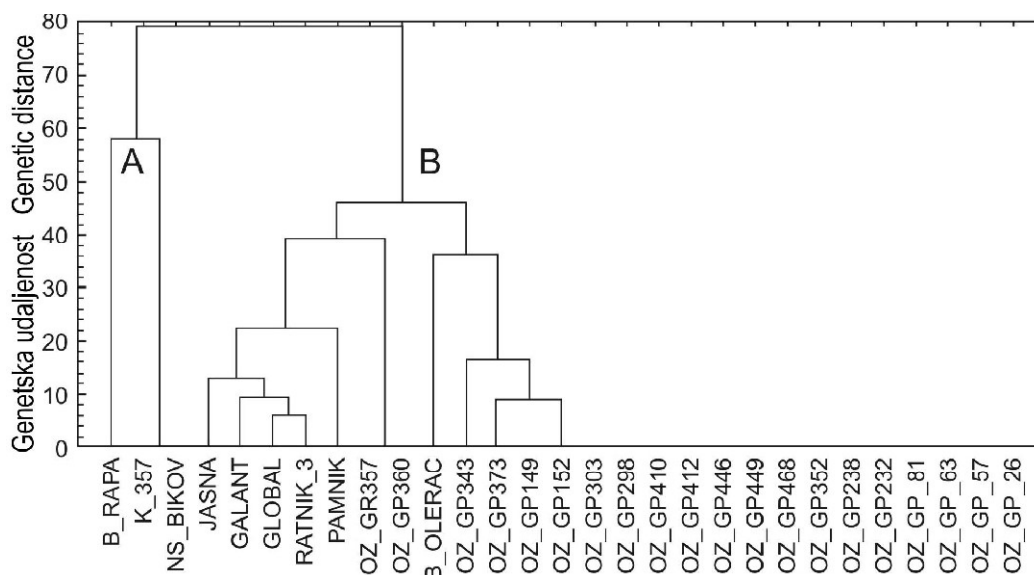
Tabela 2. Procentualni udeo viših masnih kiselina u ulju iz semena ispitivanih populacija. Posebno su navedene srednje vrednosti i standardna devijacija za ozime i jare sortne populacije *B. napus*, te za ostale populacije iz roda *Brassica*

Table 2. Percent of fatty acids in oil of examined populations. Mean values and standard deviations for winter and spring forms of *B. napus*, and other *Brassicaceae* populations are indicated

Forma Form	Genotip Genotype	Više masne kiseline (%) / Fatty acids						
		Palmitinska Palmitic	Stearinska Stearic	Oleinska Oleic	Linolna Linoleic	Linolenska Linolenic	Arahidna Arachidic	Behenska Behenic
Ozima Winter	GP 81	4,73	0,90	67,59	18,13	7,47	0,65	-
	GP 149	4,79	0,77	66,82	17,45	8,91	0,67	-
	GP 343	4,98	0,88	63,92	19,72	9,23	0,70	-
	GP 352	4,94	0,75	68,22	17,36	7,47	0,71	-
	GP 357	5,14	1,06	65,07	19,21	8,25	0,70	-
	GP 373	4,75	0,80	69,72	16,43	7,13	0,57	-
	GP 410	5,00	0,75	68,88	17,29	6,85	0,65	-
	GP 412	4,94	0,81	68,73	17,09	7,15	0,69	-
	GP 446	4,66	0,90	69,38	16,60	7,32	0,56	-
	GP 449	4,69	0,69	67,81	17,64	7,95	0,63	-
	GP 468	5,21	0,50	71,18	15,52	6,83	0,67	-
	GP 360	5,07	0,90	66,77	18,09	7,99	0,60	-
	Srednja vrednost	4,91	0,81	67,84	17,54	7,71	0,65	-
	stdev	0,18	0,14	2,01	0,78	0,78	0,05	-
Jara Spring	Global	4,58	0,80	63,30	22,06	8,05	0,65	-
	Galant	4,35	1,14	64,29	21,36	7,57	0,64	-
	Pamnik	5,10	1,38	60,18	23,64	8,46	0,67	-
	Ratnik 3	5,04	1,14	60,82	23,69	8,16	0,61	-
	Jasna	4,15	0,84	66,13	19,62	8,07	0,66	-
	Srednja vrednost	4,64	1,06	62,94	22,07	8,06	0,65	-
	stdev	0,42	0,24	2,46	1,70	0,32	0,02	-
Ozima Winter	B. rapa	3,02	0,88	17,71	11,24	7,38	9,10	47,81
	B. oleracea	3,31	1,31	18,54	13,49	7,71	15,64	38,13
	NS Bikovo	1,53	0,93	16,29	11,45	7,58	11,04	48,14
	K 357	1,55	0,96	16,35	11,20	7,46	11,16	47,95
	Srednja vrednost	2,35	1,02	17,22	11,85	7,53	11,74	45,51
	stdev	0,95	0,20	1,10	1,10	0,14	2,77	4,92

U našem radu samo dve ozime forme, OZ_GP357 i OZ_GP360, su se izdvojile u klaster sa jarim formama. Iako su GD između jarih formi bile male ($\leq 22\%$), sve ispitivane populacije su se razlikovale. *B. oleracea* v. *acephala* se izdvojila u klaster sa ozimim populacijama uljane repice na GD od 35%. GD između ozimih formi uljane repice su bile

male ($< 20\%$). Činjenica da dosta populacija ozime uljane repice nije moglo da se razlikuje sa primenjenim markerima može da se objasni njihovim zajedničkim poreklom. Naime ispitivane linije su bile u S6 generaciji nakon početnog ukrštanja u "gene pool-u" (2), pa su GD između njih još niže nego kod gajenih formi *B. napus* (15).



Slika 1. Dendrogram dobijen klaster analizom 29 populacija iz roda *Brassicaceae* na osnovu polimorfih SSR markera

Figure 1. Dendrogram obtained by cluster analysis of 29 *Brassicaceae* populations based on polymorphic SSR markers

Uobičajeni sastav viših masnih kiselina u neselekcionisanim genotipovima iz roda *Brassica* (*B. napus*, *B. rapa* i *B. juncea*) je sledeći: 5% palmitinska, 1% stearinska, 15% oleinska, 14% linolna, 9% linolenska i 45% eruka kiselina (16). Ulje koje je poželjno za ljudsku ishranu treba da ima malu količinu zasićenih viših masnih kiselina i eruka kiseline, viši nivo linolenske kiseline (omega-3 masna kiselina), a zbog bolje oksidativne stabilnosti poželjan je visoki sadržaj oleinske kiseline. U tabeli 2 se vidi da je najznačajnija razlika u kvalitetu ulja između *B. napus*, te *B. rapa* i *B. oleracea*, povećani procenat zastupljenosti oleinske kiseline i smanjeni procenat dugolančanih zasićenih viših masnih kiselina (arahidne i behenske kiseline), što je rezultat oplemenjivanja na poboljšani kvalitet ulja za ishranu. Jare sorte populacije su imale manji procenat oleinske kiseline od ozimih. Varijabilnost procentualnog udela oleinske kiseline između ozimih sortnih populacija bila je najmanja, kao što je i dobijeno sa molekularnim markerima. Interesantno je da su dve ozime sorte populacije koje su na osnovu razlike u genomskoj DNK sličnije jarim sortama (OZ_GP357 i OZ_GP360) i po kvalitetu ulja bile sličnije jarim sortama, odnosno imale su niži procentualni udeo oleinske, a viši procentualni udeo linolne i linolenske kiseline.

ZAKLJUČAK

Rezultati o varijabilnosti sastava viših masnih kiselina u ulju ispitivanih populacija roda *Brassica* su u saglasnosti sa rezultatima dobijenim

analizom polimorfizma genomske DNK. Ovo ukazuje da se primenjeni SSR markeri nalaze na genomskoj mapi u blizini lokusa za kvalitet ulja. Cilj daljih istraživanja je definisanje većeg broja markera za gene koji određuju različit kvalitet ulja, kako bi se selekcija za ovu osobinu mogla pouzdano izvoditi i na molekularnom nivou.

LITERATURA

1. Marinković, R., D. Škorić, Z. Sakač, A. Marjanović-Jeromela, P. Sekulić, Varijabilnost sadržaja ukupnih glukozinolata u različitim genotipovima ozime uljane repice, 43. Savetovanje: Proizvodnja i prerada uljarica, Zbornik radova, pp 123-128, Budva, 2002.
2. Marinković, R., A. Marjanović-Jeromela, D. Vasić, J. Lazarević, Reakcija genotipova ozime uljane repice (*B. napus* L.) na niske temperature, Zbornik radova, 40: 313-324 (2004)
3. Marjanović-Jeromela, A., R. Marinković, D. Vasić, D. Škorić, Sadržaj ulja i proteina u semenu uljane repice (*Brassica napus* L.), 43. Savetovanje: Proizvodnja i prerada uljarica, Zbornik radova, pp 117-121, Budva, 2002.
4. Hasan, M., F. Seyis, A.G. Badani, J. Pons-Kühnemann, W. Friedt, W. Lühs, R.J. Snowdown, Analysis of genetic diversity in the *Brassica napus* L. gene pool using SSR markers, Genet. Res. and Crop Evol., 53: 793-802 (2006)
5. Diers, B.W., T. C. Osborn, Genetic diversity of oil seed *Brassica napus* germplasm based on restriction fragment length polymorphisms, Theor. Appl. Genet., 88: 662-668 (1994)

6. Riaz, A., G. Li, Z. Quresh, M.S. Swati, F. Quiros, Genetic diversity of oilseed *Brassica napus* inbred lines based on sequence-related amplified polymorphism and its relation to hybrid performance, *Plant Breeding*, 120: 411-415 (2001)
7. Mailer, R.J., R. Scarth, B. Fristensky, Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers, *Theor. Appl. Genet.*, 87: 697-704 (1994)
8. Panković, D., A. Marjanović-Jeromela, Z. Sakač, R. Marinković, Primena molekularnih markera u ispitivanju genetičke varijabilnosti kod uljane repice (*Brassica napus* L.), 45. Savetovanje: Proizvodnja i prerada uljarica, Zbornik radova, pp 119-125, Petrovac na moru, 2004.
9. Plieske, J., D. Struss, Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica*. Development in *Brassica napus* and abundance in *Brassicaceae* species, *Theor. Appl. Genetics*, 102: 689-694 (2001)
10. Permingeat, H.R., M. V. Romagnoli, H. Ruben, A Simple Method for Isolation High Yield and Quality DNA from Cotton (*Gossypium hirsutum* L.), leaves. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16: 1-6 (1998)
11. Staub, J.E., Y. Danin-Poleg, G. Fazio, T. Horejsi, N. Reis, N. Katzir, Comparative analysis of cultivated melon groups (*Cucumis melo* L.) using random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers, *Euphytica*, 115: 225-244 (2000)
12. Butte, W., Rapid derivatization of acids for GC by pre-column transesterification of glycerides, *J. Chromatogr.*, 261: 142 (1983)
13. Lombard, V., C. P. Baril, P. Dubreuil, F. Pluet, D. Zhang, Genetic Relationships and Fingerprinting of Rapeseed Cultivars by AFLP: Consequences for Varietal Registration, *Crop Science*, 40: 1417-1425 (2000)
14. Bond, J.M., R.J. Mogg, G. R. Squire, C. Johnstone, Microsatellite amplification in *Brassica napus* cultivars: Cultivar variability and relationship to a long-term feral population, *Euphytica* 139, 173-178 (2004)
15. Seyis, F., R. J., Snowdon, W. Luhs, W. Friedt, Molecular characterization of novel resynthesized rapeseed (*Brassica napus*) lines and analysis of their genetic diversity in comparison with spring rapeseed cultivars, *Plant Breeding*, 122: 473-478 (2003)
16. Scarth, R., J. Tang, Modification of Brassica oil using conventional and transgenic approaches, *Crop Science*, 46 (3): 1225-1236 (2006)