

СОЗДАНИЕ CAPS-МАРКЕРА К ГЕНУ *FAD3B*, КОНТРОЛИРУЮЩЕМУ СИНТЕЗ α -ЛИНОЛЕНОВОЙ КИСЛОТЫ У ЛЬНА (*LINUM USITATISSIMUM* L.)

В последние годы во всем мире возрождается интерес к использованию льняного масла в пищу в связи с его лечебными свойствами. Льняное масло способствует выведению из организма холестерина, улучшению обмена белков и жиров, нормализации артериального давления, уменьшению вероятности образования тромбов и опухолей. Льняное масло значительно снижает риск сердечно-сосудистых и раковых заболеваний и уменьшает аллергические реакции [1].

Лен масличный является ценной технической культурой многостороннего использования. Традиционные сорта масличного льна содержат 45–50 % масла. В состав льняного масла входит пять основных жирных кислот – пальмитиновая (C16:0, ~6 %), стеариновая (C18:0, ~2,5 %), олеиновая (C18:1 цис-Д9; ~19 %), линолевая (C18:2 цис-Д9, 12; щ-6 жирные кислоты; ~24 %) и б-линоленовая (C18: 3 цис-Д9, 12, 15; щ-3 жирные кислоты; ~55–57 %) кислоты [2]. Высокая доля α -линоленовой кислоты приводит к окислительной нестабильности льняного масла. По этой причине льняное масло относится к быстровысыхающим маслам, так как легко полимеризуется в присутствии кислорода воздуха («высыхает»), в результате чего образуется относительно мягкая и гибкая пленка, что позволяет применять его в промышленности для производства, красок, линолеумов, чернил, мыла и лаков [3].

Использование льняного масла обычных маслических сортов в пищу ограничено из-за его высокой нестабильности. Создание линий льна с низким содержанием α -линоленовой кислоты [4–6], известных как Solin или Linola™, расширило потенциальные рынки для льняного масла. По сравнению с маслом традиционных сортов льна, масло с низким содержанием линоленовой кислоты затвердевает при более высоких температурах, что делает его пригодным для производства высококачественного маргарина.

α -Линоленовая кислота является одной из основных жирных кислот в составе льняного масла и образуется путем десатурации линолевой кислоты ω -3/ δ -15 десатуразами жирных кислот (FAD3). У *L. usitatissimum* L. содер-

жание линоленовой кислоты в семенах контролируется аддитивным действием двух генов (*fad3A* и *fad3B*) [7]. У льна маслического были охарактеризованы два гомолога гена *fad3* (*fad3A* и *fad3B*), идентичные на 85 % по нуклеотидной и на 94 % по аминокислотной последовательностям. Кодированные области *fad3A* и *fad3B* гомологов составляют 3280 и 3002 п. о. соответственно и включают по 6 экзонов и 5 интронов каждый. Предсказанные белковые последовательности имеют 392 и 391 аминокислотный остаток соответственно [7].

P. Vrinten et al. (2005) проводили исследования на низколиноленовой линии льна маслического 593–708 и показали, что причиной формирования растений с низким содержанием линоленовой кислоты являются точечные мутации в обоих генах, что приводит к возникновению преждевременного стоп-кодона и инактивации фермента [7]. Сравнение последовательностей дикого типа и мутировавших генов показало, что точечная мутация в гене *fad3A* привела к потере сайта рестрикции PvuI, тогда как сайт рестрикции BsaI был утрачен из-за точечной мутации в *fad3B* гене.

Совмещение мутаций по двум локусам в геноме одного растения приводит к резкому повышению уровня содержания линолевой кислоты, а количество линоленовой кислоты снижается до 2 %. Масло с высоким содержанием линолевой кислоты подвержено окислению в меньшей степени, и его можно использовать в пищевой промышленности. Анализ сортов на наличие генов *fad3A* и *fad3B* десатураз льна позволит вести селекцию маслического льна по двум направлениям – на высокое и низкое содержание линоленовой кислоты.

Материалы и методы

Материалом исследований служили сорта льна маслического различного эколого-географического происхождения, характеризующиеся различным составом жирных кислот. Пять сортов коллекции Gold Flax (Канада), Amon (Чехия), Сонечны (Беларусь), LM-97 и LM-98 (Россия) от-

носились к типу солинных (низколиноленовых) форм.

Молекулярно-генетический анализ генов *fad3A* и *fad3B* десатураз льна проводили по методике Vrinten et. al (2005) [7].

Сиквенсовую реакцию проводили на генетическом анализаторе ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, США) с использованием набора для секвенирования BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) согласно инструкции фирмы-производителя. При секвенировании каждая последовательность считывалась с обоих концов.

Результаты и обсуждения

Нами проводилась идентификация мутантных аллелей *fad3A* и *fad3B* генов методом ПЦР со специфическими праймерами и последующей обработкой продуктов амплификации рестриктазой, специфичной к диким аллелям соответствующего гена.

Для детекции мутантных *fad3A* аллелей использовали пару праймеров MutAF2-MutAR2. Результаты наших исследований показали, что по гену *fad3A* все изученные низколиноленовые образцы являлись мутантными, то есть несущими генотип «аа». Как видно из рисунка 1, в результате амплификации со специфичным праймером к гену *fad3A* и последующей обработки эндонуклеазой PvuI нами выявлен фрагмент размером 637 п.н., в котором отсутствовал специфический сайт рестрикции, что свидетельствует о наличии мутации по данному сайту рестрикции.

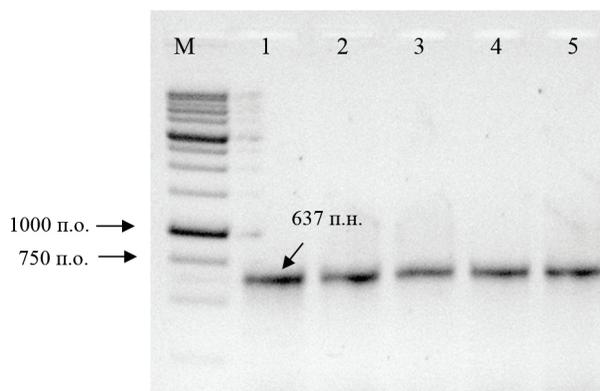


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов рестрикции PvuI после амплификации ДНК низколиноленовых сортов льна с праймерами MutAF2-MutAR2: 1 – Gold Flax, 2 – Сонечны, 3 – Amon, 4 – LM-97, 5 – LM-98. М – ДНК-маркер молекулярного веса 1Kb (ОДО «Праймтех»). Стрелкой обозначен маркер аллеля *fad3A*

Для детекции в экспериментальном материале мутантного аллеля *fad3B* гена использовалась пара праймеров Lu15bFLF-NcDNAEndR. В результате амплификации со специфическими праймерами и последующей рестрикции образуется два фрагмента размером 206 и 242 п.н. у образцов, несущих аллель *fad3B* дикого типа, и два фрагмента размером 206 и 263 п.н. у образцов, несущих мутантный аллель *fad3B* (рис. 2). Таким образом, исследования показали, что изученные нами низколиноленовые сорта льна масличного несут мутацию с потерей сайта рестрикции только в *fad3A* гене.

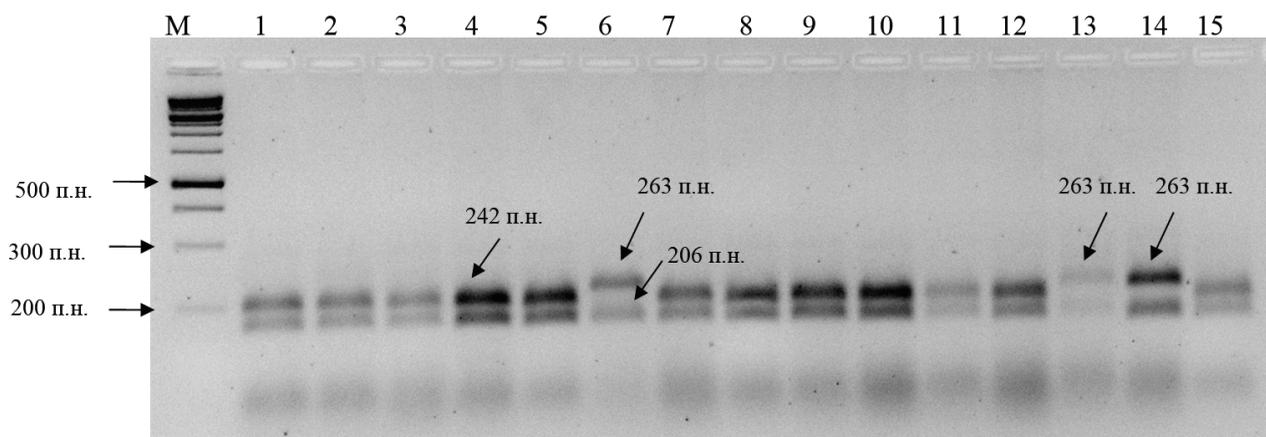


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов рестрикции BsaI после амплификации ДНК сортов льна с различным содержанием б-линоленовой кислоты в масле семян с праймерами Lu15bFLF и NcDNAEndR: 1– Спартак, 2 – 3871, 3 – ЦСОНАИ, 4 – Rio, 5 – Minn, 6 – Amon, 7 – Wirona Sel., 8 – Renew, 9 – Victory, 10 – NDR-174, 11 – Su-6-15, 12 – Lirina, 13 – LM-97, 14 – LM-98, 15 – ACM Duff, М – ДНК-маркер молекулярного веса 1000 (ОДО «Праймтех»). Стрелками обозначены маркеры аллеля *fad3B*

Spartak	1	actgtggctctgcaggaccaaactatgagccctccaaactcaatgagtcccaccaccaac	60
Amon	1	actgtggctctgcaggaccaaactatgagccctccaaactcaatgagtcccaccaccaac	60
Spartak	61	ggcaatgggtgtggctatgaatggggcgaagaagcagctcgatttcgacccgagtgtgccc	120
Amon	61	ggcaatgggtgtggctatgaatggggcgaagaagcagctcgatttcgacccgagtgtgccc	120
Spartak	121	ccccctttcaagattgcagacatccgtgctgcaattccgccgcattgctgggtgaagaac	180
Amon	121	ccccctttcaagattgcagacatccgtgctgcaattccgccgcattgctgggtgaagaac	180
Spartak	181	ccc <u>TGG</u> aggtcgctcagctacgtcctgagagacctccttgtcatcctcagcttcgccggt	240
Amon	181	ccc <u>TGG</u> aggtcgctcagctacgtcctgagagacctccttgtcatcctcagcttcgccggt	240
Spartak	241	gcggcggcaaagctggacagctggactttctggcctctttactgggttgctcaaggaacc	300
Amon	241	gcggcggcaaagctggacagctggactttctggcctctttactgggttgctcaaggaacc	300
Spartak	301	atgttctgggcagctctttgttcttggacatgattggtaaactaatttcacattttctttc	360
Amon	301	atgttctgggcagctctttgttcttggacatgattggtaaactaatttcacattttctttc	360
Spartak	361	tggtaatgtgggttttattgaaaagattaaaactttttatctgggttgttgcattgcagt	420
Amon	361	tggtaatgtgggttttattgaaaagattaaaactttttatctgggttgttgcattgcagt	420
Spartak	421	gg <u>CCA</u> tgggagcttctcagacatctggttgggtgaacaatgtga	463
Amon	421	gg <u>CTA</u> tgggagcttctcagacatctggttgggtgaacaatgtga	463

Рис. 3. Нуклеотидные последовательности секвенированных фрагментов *fad3B* гена низколиноленового сорта льна масличного Амон и высоколиноленового сорта Спартак: * – отсутствие мутации, описанной Vrinten et al. [7]; ** – обнаруженная нами однонуклеотидная замена С→Т в ДНК низколиноленового сорта Амон

В мутантном аллеле *fad3B* гена один из фрагментов рестрикции оказался больше, чем соответствующий фрагмент в немутантном аллеле. Это позволяет предположить наличие в *fad3B* гене низколиноленовых сортов точковых однонуклеотидных замен, меняющих сайт узнавания рестриктазы либо существование нескольких вариантов последовательностей данного гена.

Чтобы проверить данное предположение, нами было проведено секвенирование (в трех повторностях) амплифицированных фрагментов *fad3B* гена низколиноленового сорта льна масличного Амон и высоколиноленового сорта Спартак (рис. 3).

Полученные нуклеотидные последовательности депонированы в базу данных GenBank под номерами: KF026415 (*Linum usitatissimum* cultivar Spartak fatty acid desaturase 3B (Fad3B) gene, partial cds.) и KF026416 (*Linum usitatissimum* cultivar Amon fatty acid desaturase 3B (Fad3B) gene, partial cds.).

Сравнение нуклеотидных последовательностей с базами данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) показало, что фрагмент гена *fad3B* низколиноленового сорта Амон соответствует фрагменту 802 – 1263 п.н. гена *fad3B*

низколиноленовой линии SP2047 (Sequence ID: HM991835.1), а фрагмент гена *fad3B* высоколиноленового сорта Спартак соответствует фрагменту 800 – 1262 п.н. гена *fad3B* высоколиноленовой линии UGG5-5 (Sequence ID: HM991834.1), которые были описаны канадскими учеными M.Banik, S. Duguid и S. Cloutier [8].

В результате секвенирования фрагментов *fad3B* гена нами обнаружена однонуклеотидная замена, которая соответствует мутации по типу транзиции (замена С на Т) (рис. 4), приводящая к замене гистидина на тирозин.

При проведении гетерологичной экспрессии *fad3B* гена льна в дрожжах Banik et al. (2011) показали, что аналогичная мутация в гистидиновом боксе низколиноленовой линии SP2047 приводит к инактивации FAD3B десатуразы [8].

С целью выявления мутантного аллеля гена *fad3B* у низколиноленовых сортов льна нами был разработан CAPS маркер MutFad3. Праймеры были разработаны так, чтобы амплифицированный продукт содержал мутацию, и в результате эндонуклеазной рестрикции ампликона получались специфические фрагменты. При конструировании праймеров уделялось внимание тому, чтобы размер ПЦР-продуктов был приемлем для

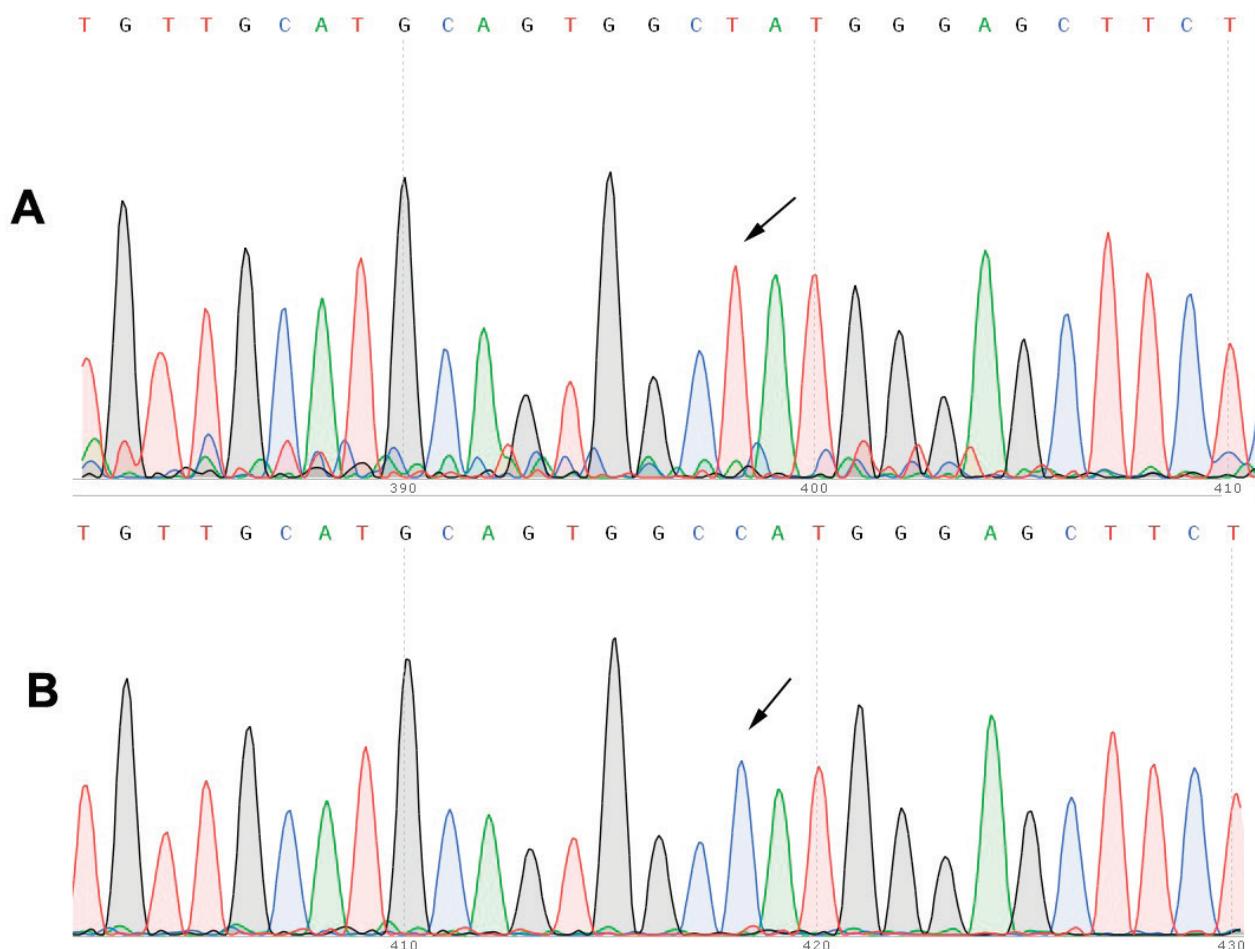


Рис. 4. Мутация в *fad3B* гене низколиноленовых сортов льна, детерминирующая низкое содержание б-линоленовой кислоты в масле семян: А – низколиноленовый сорт льна масличного Апол, В – высоколиноленовый сорт льна масличного Спартак. Стрелкой указана однонуклеотидная замена С→Т

визуализации их в агарозных гелях, т. к. использование агарозного геля является более удобным и безопасным по сравнению с акриламидным гелем, который токсичен сам по себе и предполагает применение токсичных катализаторов полимеризации. На рисунке 5 представлены сайты отжига специфичных праймеров, характерных для предполагаемого маркера.

С использованием программного обеспечения Vector NTI Advance® 11.5.0 (©Invitrogen, США) была подобрана эндонуклеаза рестрикции *NotI*, позволяющая дифференцировать аллели *fad3B* гена льна.

При наличии в норме (дикий тип) сайта рестрикции произойдет разрезание амплифицированного фрагмента и на электрофореграмме будет две полосы, соответствующие фрагментам

ДНК, суммарная длина которых равна величине исходного амплифицированного фрагмента.

Исчезновение сайта рестрикции в результате мутации приведет к тому, что у мутантных гомозигот разрезания амплифицированного фрагмента не произойдет и на электрофореграмме будет одна полоса, причем характер ее расположения будет аналогичен тому, который можно наблюдать после электрофореза ПЦР-продукта до рестрикции. У гетерозигот выявятся все три полосы, одна из которых соответствует неразрезанному амплифицированному фрагменту, а две – продуктам рестрикции.

Таким образом, в результате амплификации со специфичными праймерами MutFad3B и последующей обработки эндонуклеазой рестрикции, у образцов, несущих мутантный аллель *fad3B* в гомозиготном состоянии, должен обра-

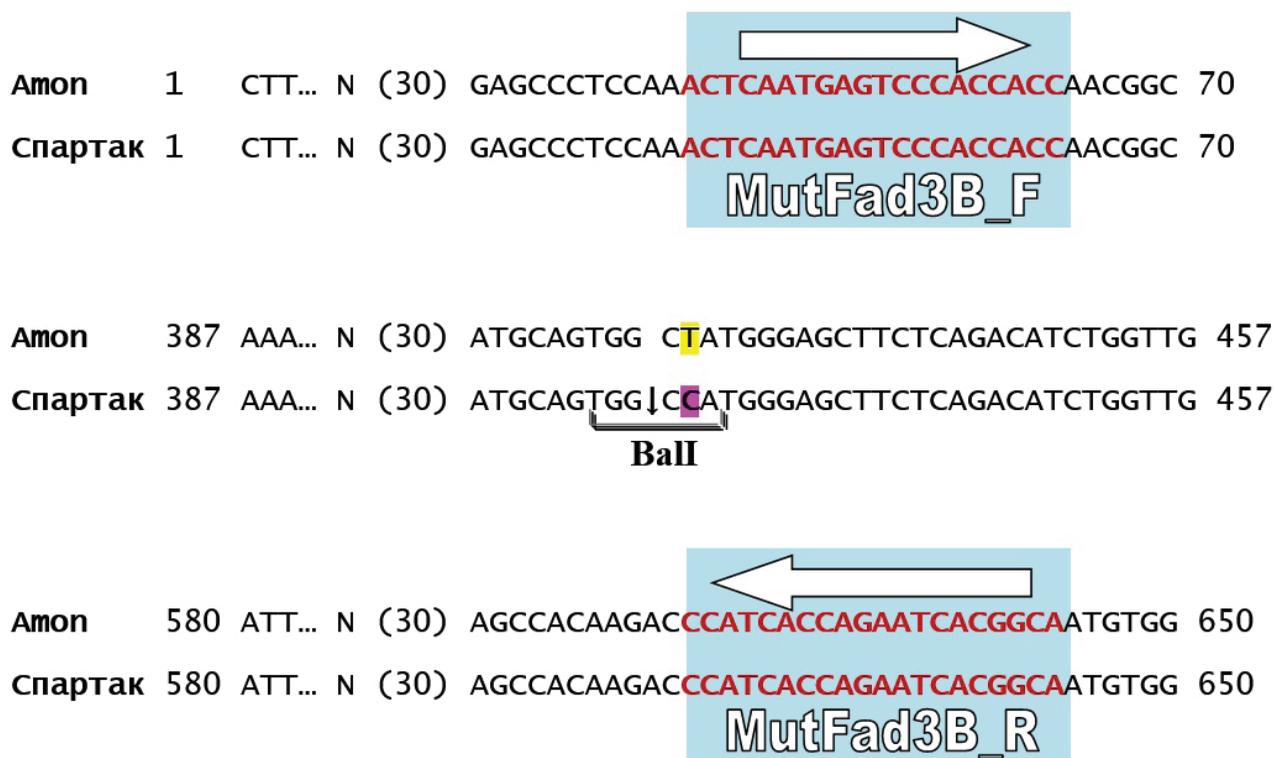


Рис. 5. Сайты отжига аллель специфичных праймеров и сайт рестрикции Ball. Цветом выделены места отжига праймеров. Стрелками показано направление синтеза

зовываться продукт размером 600 п.н., и два продукта размером 385 и 215 п.н. у образцов дикого типа.

Проверка эффективности созданного CAPS маркера была проведена на 26-ти высоколиноленовых и пяти низколиноленовых сортах льна масличного. Пример детекции мутантных аллелей *fad3B* гена низко- и высоколиноленовых сортов льна представлены на рисунке 6.

В результате амплификации со специфичными праймерами MutFad3B_F: ACTCAATGAGTCCCACCACC и MutFad3B_R: TGCCGTGATTCTGGTGATGG и последующей обработки эндонуклеазой рестрикции Ball, у образцов, несущих аллель *fad3B* дикого типа (высоколиноленовых) образуется два фрагмента ДНК размером 385 и 215 п.н., у образцов, несущих мутантный аллель *fad3B* (низколиноленовых) один фрагмент размером 600 п.н. и три фрагмента 215, 385 и 600 п.н. у гетерозиготных образцов (среднелиноленовых). Использование данного маркера позволит эффективно отбирать родительские формы для скрещивания, обладающие заранее спрогнозированным жирнокислотным составом масла.

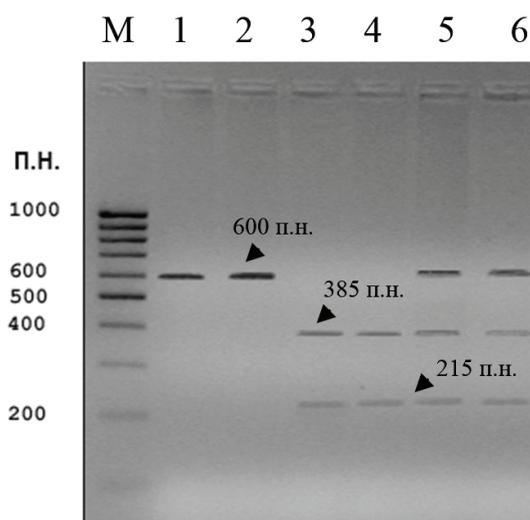


Рис. 6. Электрофореграмма продуктов рестрикции Ball после амплификации ДНК сортов льна с различным содержанием α -линоленовой кислоты в масле семян с праймерами MutFad3: 1, 2 – генотип aa (низкое содержание линоленовой кислоты), 3,4 – генотип AA (высокое содержание линоленовой кислоты), 5,6 – генотип Aa (среднее содержание линоленовой кислоты), М – ДНК-маркер молекулярного веса M100 (ОДО «Праймтех»)

Выводы

Разработанный нами кодоминантный CAPS маркер позволяет дифференцировать растения льна масличного как гомозиготные мутанты, гомозиготы дикого типа и гетерозиготы по *fad3B* гену. Созданная ДНК-технология выявления мутантного аллеля *fad3B* гена льна, отвечающего за пониженное содержание α -линоленовой кислоты

в льняном масле, рекомендована к использованию в процессе маркер-сопутствующей селекции для создания сортов льна масличного различного направления использования (пищевое, техническое, нутрицевтическое). Использование данного маркера позволит эффективно отбирать родительские формы для создания сортов льна, обладающих заранее спрогнозированным жирнокислотным составом масла.

ЛИТЕРАТУРА

1. Morris D.H. Flax – A Health and Nutrition Primer. – Ithaca, NY: Flax Council of Canada, 2007. – 140 p.
2. Westcott N.D., Muir N.D. Chemical studies on the constituents of *Linum* spp. // Flax, the genus *Linum*. – New York, 2003. – P. 55–73.
3. Cullis C., Flax A. Genome mapping and molecular breeding in plants / ed. C. Kole. – Berlin: Springer, 2007. – 2. – P. 275–295.
4. Green A.G. A mutant genotype of flax (*Linum usitatissimum* L.) containing very low levels of linolenic acid in its seed oil // Can. J. Plant Sci. – 1986. – 66, N 3. – P. 499–503.
5. Green A.G. Genetic control of polyunsaturated fatty acid biosynthesis in flax (*Linum usitatissimum* L.) seed oil // Theor. Appl. Genet. – 1986. – 72, N 5. – P. 654–661.
6. Rowland G.G. An EMS-induced low-linolenic-acid mutant in McGregor flax (*Linum usitatissimum* L.) // J. Plant Sci. – 1991. – 71, N 2. – P. 393–396.
7. Vrinten P., Hu Z., Munchinsky M.-A., Rowland G., Qiu X. Two *fad3* desaturase genes control the level of linolenic acid in flax seed // Plant Physiol. – 2005. – 139, N 1. – P. 79–87.
8. Banik M., Duguid S., Cloutier S. Transcript profiling and gene characterization of three fatty acid desaturase genes in high, moderate, and low linolenic acid genotypes of flax (*Linum usitatissimum* L.) and their role in linolenic acid accumulation // Genome. – 2011. – 54, N 6. – P. 471–483.

LEMESH V., BOGDANOVA M.

Institute of Genetics and Cytology of National Academy of Sciences of Belarus, Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str., 27, e-mail: mw.bogdanova@gmail.com

DEVELOPMENT OF CAPS-MARKER TO THE *FAD3B* GENE CONTROLLING SYNTHESIS OF α -LINOLENIC ACID IN LINSEED (*LINUM USITATISSIMUM* L.)

The **aims** of this study was to develop CAPS marker to the *fad3B* gene controlling the synthesis of α -linolenic acid in linseed (*Linum usitatissimum* L.). **Methods.** DNA sequencing was performed on an automatic ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). For the sequencing analysis and primers' design we used the Vector NTI Advance ® Software 11.5.0 (©Invitrogen, США). **Results.** We developed the codominant CAPS marker MutFad3 allowing to detect the mutant allele of the flax *fad3B* gene responsible for reduced α -linolenic acid levels in linseed oil. After amplification of 600 bp product using the MutFad3 primer set, products were digested with Ball generating two fragments (385 and 215 bp) in high-linolenic genotypes with the wild-type *fad3B* gene. In contrast, all low-linolenic genotypes with the mutated *fad3B* genes showed only 600 bp band after Ball treatment. The heterozygous genotypes with intermediate levels of α -linolenic acid showed three fragments – 215, 385 and 600 bp. **Conclusions.** Using these codominant markers, it was possible to classify plants as homozygous mutant, homozygous wild type, or heterozygous at *fad3* loci, that can be used to breed new flax varieties of food or industrial quality.

Keywords: linseed (*Linum usitatissimum* L.), α -linolenic acid, fatty acid desaturase, *fad3* genes.