

Teresa Cegielska-Taras, Laurencja Szala, Angela Nałęczyńska, Krystyna Kołodziej
Maria Ogrodowczyk

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Zakład Roślin Oleistych w Poznaniu

Wysokoerukowe i niskoglukozyńolanowe linie podwojonych haploidów rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.)

High-erucic acid and low glucosinolate content doubled haploid lines of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.)

Słowa kluczowe: *Brassica napus*, podwojone haploidy, hodowla, wysoka zawartość kwasu erukowego, niska zawartość glukozyńolanów

Key words: *Brassica napus*, doubled haploids, breeding, high erucic acid, low glucosinolate content

Zastosowanie kultur mikrospor w programach hodowlanych rzepaku jest coraz większe. Technika podwojonych haploidów (DH) pomaga znacznie w utworzeniu linii z cechami nieraz odległymi takimi jak wysoka zawartość kwasu erukowego a niska zawartość glukozyńolanów oraz odpowiednie cechy morfologiczne. Wynikiem prezentowanych badań była możliwość selekcji dziewięciu linii DH z zawartością 56,8–60,4% kwasu erukowego oraz zawartością glukozyńolanów w granicach 2,7–7,9 $\mu\text{M/g}$ nasion.

The application of microspore cultures to the breeding programmes in oilseed rape has progressed rapidly. The doubled haploid (DH) technique has contributed considerably to the creation of breeding lines with distinct traits such as high erucic acid and low glucosinolate content and suitable morphological characters. The study gave a possibility of selection of nine DH lines with 56,8–60,4% of erucic acid content and of glucosinolates level within 2,7–7,9 $\mu\text{M/g}$ of seeds.

Dzięki znaczącemu rozwojowi metod hodowli i uprawy, rośliny z rodziny *Brassicaceae* stały się w świecie trzecim bardzo ważnym źródłem oleju roślinnego. Możliwości modyfikacji składu kwasów tłuszczowych oleju rzepaku (*Brassica napus* L.) zachęcają hodowców do dostosowania oleju tej rośliny zarówno do potrzeb żywieniowych, jak i do celów przemysłowych. Szczególnie olej rzepakowy, o zawartości kwasu erukowego istotnie wyższej niż u tradycyjnych odmian (np. odmiany Skrzyszowicki — 51,2%), jest poszukiwany do produkcji mas plastycznych, smarów, emulgatorów itd. (Lühs 1994). Rzepak należy do grupy roślin ważnych gospodarczo, dających się łatwo ulepszać metodami biotechnologicznymi. Selekcja linii o zwiększonym udziale pożądanego kwasu w oleju może być przyspieszona poprzez zastosowanie takich technik, jak kultury mikrospor czy podwojone haploidy (DH) (Albrecht i in. 1993).

Zarodki mikrosporowe (MDE) w określonym stadium rozwoju są w przemianach procesów metabolicznych odpowiednikiem zarodków zygotycznych (otrzymanych z nasion) i są wykorzystane do selekcji na zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych oleju rzepakowego (Chen, Beversdorf 1991; Taylor, Weber 1994). We wcześniejszej pracy opisano sposób otrzymywania MDE oraz możliwości prowadzenia selekcji *in vitro* zarodków o zwiększonej zawartości kwasu erukowego C_{22:1} (Cegielska i in. 1999). Celem niniejszej pracy jest wybór linii podwojonych haploidów rzepaku ozimego, które byłyby wykorzystane do wyhodowania polskiej odmiany rzepaku wysokoerukowego o niskiej zawartości glukozyzolanów.

Material i metody

Badaniami objęto linie podwojonych haploidów rzepaku ozimego wypracowane z mikrospor trzech niskoglukozyzolanowych mieszańców F₁ wyselekcjonowanych z wysoką zawartością kwasu erukowego, oznaczonych symbolem: ER1 (1i/93), ER2 (170i/93), ER5 (123/93 x 4/93), otrzymanych od prof. dr hab. Jana Krzymańskiego. Warunki prowadzenia kultury *in vitro* mikrospor oraz sposób regeneracji roślin z zarodków mikrosporowych, jak i sposób prowadzonej selekcji *in vitro* zarodków przedstawiają badania opisane przez Cegielska-Taras i in. (1999).

W doświadczeniu polowym 1996/97 wysiane zostały nasiona (pokolenie DH₁) tylko wybranych losowo 40 linii DH (Cegielska-Taras i in. 1999). Natomiast w doświadczeniu polowym 1997/1998 brało udział 86 uzyskanych linii DH, łącznie z 40 podwojonymi haploidami badanymi w roku uprzednim. Na poletka o powierzchni 1 m² wysiano 40 nasion. Każde poletko było izolowane mechanicznie (namioty). W zebranych nasionach oznaczono zawartość tłuszczu metodą NMR, procentowy skład kwasów tłuszczowych oleju metodą chromatografii gazowej (Byczyńska, Krzymański 1969) oraz zawartość glukozyzolanów w nasionach metodą chromatografii gazowej (Michalski i in. 1995). Wykonano ponadto oznaczenia masy tysiąca nasion (MTN), długości łuszczyń oraz liczby nasion w łuszczyńce.

Obliczono korelacje wartości badanych cech biochemiczno-morfologicznych między latami 1997 i 1998 dla 40 linii DH.

Wyniki i dyskusja

Rośliny oleiste są ważnymi źródłem energii i białka, zarówno dla ludzi jak i zwierząt. Ponadto są cennym źródłem wielu niekonsumpcyjnych (nieżywniowych) surowców do produkcji paliw, smarów, tworzyw sztucznych itd. W ostatnich latach osiągnięto duże postępy w ulepszeniu hodowli rzepaku

(*Brassica napus* L.) metodami tradycyjnymi. Wobec popytu na olej rzepakowy o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych w zależności od przeznaczenia, dalszy rozwój hodowli jest możliwy jedynie dzięki połączeniu konwencjonalnych metod hodowlanych z biotechnologicznymi, opartymi przede wszystkim na kulturach *in vitro*. Dotychczas osiągnięto dobre rezultaty w szybkim uzyskiwaniu podwojonych haploidów (DH) z różnych materiałów hodowlanych rzepaku ozimego metodą androgenezy *in vitro* w kulturze izolowanych mikrospor (Cegielska-Taras, Szała 1998).

Usprawnieniem procesu uzyskiwania rzepaku o pożądanym składzie kwasów tłuszczowych jest możliwość wczesnej selekcji zarodków mikrosporowych na etapie prowadzenia kultury *in vitro*, np. na zawartość kwasu erukowego. Obliczony współczynnik korelacji dla zawartości kwasu erukowego w liścieniach zarodków mikrosporowych (MDE) oraz nasionach 40 roślin zregenerowanych z pozostałej części tego samego zarodka wynosił 0,78** ($p = 0,01$). Pozwala to wnioskować o możliwości selekcji genotypów o wysokiej zawartości kwasu erukowego na poziomie MDE (Cegielska-Taras i in. 1999). Jest to bardzo korzystne, gdyż eliminowanie zarodków o niskiej lub średniej zawartości $C_{22:1}$ zaoszczędza sporo czasu i pracy potrzebnej na zregenerowanie roślin i doprowadzenie ich do zawiązania nasion. W 86 podwojonych haploidach otrzymanych na drodze androgenezy *in vitro* z trzech mieszańców F_1 o symbolach ER1, ER2, ER5, charakteryzujących się niską zawartością glukozyolanów i wysoką zawartością kwasu erukowego, oznaczono kwas $C_{22:1}$ w liścieniach oraz w nasionach roślin zregenerowanych z tych samych zarodków.

Wszystkie te linie DH brały udział w jednym doświadczeniu polowym, w którym po zbiorze dokonano pomiarów morfologicznych i analiz biochemicznych. W tabeli 1 zamieszczono zakresy wartości poszczególnych badanych cech linii DH z trzech form wyjściowych oraz procentowy udział $C_{22:1}$ w oleju tych form wyjściowych. Ponieważ 40 linii DH brało udział w doświadczeniu po raz drugi, możliwe było obliczenie korelacji badanych cech między latami zbioru 1997 i 1998 (tab. 2). Współczynnik korelacji zawartości kwasu erukowego w oleju z nasion linii biorących udział w doświadczeniu polowym przez dwa lata wynosi 0,62** ($p = 0,01$) i wskazuje na stabilność tej cechy w badanych liniach DH. Również suma glukozyolanów i długość łuszczyzny są wysoce skorelowane w latach, co świadczy, że można je uznać za mniej podatne na wpływ warunków środowiska. Mieszańce wyjściowe ER1, ER2, ER5 były wyselekcjonowane z materiałów hodowlanych o obniżonej zawartości glukozyolanów (doniesienie ustne). Niskie wartości tej cechy w uzyskanych liniach DH, szczególnie z ER1 (tab. 1), są prawdopodobnie odziedziczone po ich formie wyjściowej. Wśród podwojonych haploidów z ER2 i ER5 są również linie o obniżonej ilości tych związków (tab. 1).

Tabela 1

Zawartość kwasu erukowego w liścieniach MDE i nasionach oraz charakterystyka biochemiczno-morfologiczna linii DH — *Erucic acid content in MDE cotyledons and in seeds as well as other traits of DH lines*

Cecha <i>Traits</i>	Forma wyjściowa oraz linie DH z niej wyprowadzone <i>F₁ hybrid and DH lines</i>		
	ER1 linie DH 20 szt.	ER2 linie DH 46 szt.	ER5 linie DH 20 szt.
Zawartość kwasu erukowego [%] <i>Content of erucic acid</i>			
— F ₁	52,10	49,20	48,30
— MDE	40,7–56,5	40,2–57,4	46,1–54,1
— nasiona — <i>seeds</i>	43,6–60,4	39,9–55,8	45,2–57,1
Zawartość tłuszczu — <i>Oil content</i> [%]	41,6–49,9	36,1–49,1	37,4–48,0
Suma glukozynolanów [μM/g nasion] <i>Glucosinolate content</i> [μM/g seeds]	1,1–5,8	6,1–23,1	6,1–19,6
Masa 1000 nasion [g] <i>Weight of 1000 seeds</i>	2,6–3,4	1,6–4,8	2,3–4,0
Liczba nasion w łuszczyńce <i>Number of seeds per silique</i>	20–30	11–26	15–30
Długość łuszczyzny [cm] <i>Length of silique</i>	7,3–9,6	5,0–8,4	6,1–8,9

Tabela 2

Współczynniki korelacji badanych cech między latami 1997 i 1998
Correlation coefficients of analysed traits between the years 1997 and 1998

Cecha — <i>Traits</i>	Współczynnik korelacji <i>Correlation coefficient</i>
Zawartość kwasu erukowego w nasionach <i>Erucic acids content in seeds</i>	0,62**
Zawartość tłuszczu — <i>Oil content</i>	0,09
Suma glukozynolanów — <i>Glucosinolate content</i>	0,60**
Masa 1000 nasion — <i>Weight of 1000 seeds</i>	0,23*
Liczba nasion w łuszczyńcach — <i>Number of seeds per silique</i>	0,05
Długość łuszczyzny — <i>Length of silique</i>	0,51**

W programach badawczych nad otrzymaniem rzepaku o wyższej zawartości kwasu erukowego niż u tradycyjnych odmian, realizowany jest kierunek prowadzący do zmniejszenia sumy glukozynolanów w nasionach (Murphy 1997). Jest to niezmiernie ważny aspekt, z uwagi na dalsze wykorzystanie pozostałości po wytłoczeniu oleju. Śruta rzepakowa, bogata w białko, jest dobrym dodatkiem do pasz dla zwierząt. Z uzyskanych linii DH wyselekcjonowano 9 podwojonych haploidów o zawartości 56,7–60,4% kwasu erukowego, a zarazem o niskiej zawartości glukozynolanów od 2,7–7,9 $\mu\text{M/g}$ nasion. Ilość tych ostatnich związków w nasionach wydaje się odpowiednia dla wykorzystania śruty do celów żywieniowych. Zawartość tłuszczu w wybranych liniach DH wynosiła 42,2–47,5%, natomiast masa tysiąca nasion wahała się od 2,7 do 3,4 g, liczba nasion w łuszczyńce od 22 do 28, a długość łuszczyńki 7,5–9,6 cm (tab. 3). Wartości tych cech są zadawalające ze względu na ich dalsze wykorzystanie w hodowli.

Tabela 3
Charakterystyka biochemiczno-morfologiczna wybranych linii podwojonych haploidów rzepaku ozimego — *Biochemical and morphological characteristics of selected double haploid lines of winter oilseed rape (doświadczenie polowe 1998 — field experiment 1998)*

Linie DH DH line	Zawartość w nasionach Content in seeds			MTN Weight of 1000 seeds [g]	Liczba nasion w łuszczyńce Number of seeds per pod	Długość łuszczyńki Length of pod [cm]
	tłuszcz oil [%]	kwas erukowy erucic acid [%]	glukozynolany glucosinolates [$\mu\text{M/g}$ nasion]			
ER1-18	42,2	57,4	4,1	3,4	24	7,9
ER1-204	46,5	56,9	2,9	3,2	24	8,0
ER1-223	44,9	60,4	2,7	3,3	22	7,9
ER1-265	46,7	56,7	2,0	3,0	28	9,6
ER1-280	47,1	58,8	2,1	3,1	24	8,7
ER1-317	44,7	57,7	3,6	2,7	26	7,5
ER1-336	46,0	56,9	3,2	3,1	24	8,5
ER5-7	47,5	57,1	7,9	3,3	24	7,8
ER5-19	46,6	56,8	6,4	3,1	23	8,2

Teoretycznie maksymalna zawartość kwasu erukowego w oleju rzepaku naturalnego nie może przekroczyć 66,7% (Cegielska 1994), chociaż, jak podaje Lühs (1994), osiągnięcie poziomu powyżej 55% C_{22:1} jest trudne u odmian rzepaku wysokoerukowego. Obecnie stosowane są różne drogi do uzyskania genetycznie

zmodyfikowanego rzepaku, ze zmienionymi właściwościami acetylotransferaz (sn-2 acetylotransferaza LPA-AT) (Friedt, Lühs 1998), kiedy to możliwe jest uzyskanie zawartości kwasu erukowego w oleju powyżej 70%.

Niemniej wydaje się, że wybrane linie DH (tab. 3) o najwyższej zawartości C_{22:1} w oleju mogą być wykorzystane jako materiały wyjściowe do wyhodowania polskiej odmiany rzepaku ozimego wysokoerukowej, a zarazem niskoglukozynolanowej.

Wnioski

1. Zawartość kwasu erukowego w liścieniach zarodków (MDE) była istotnie skorelowana z zawartością kwasu erukowego w nasionach roślin otrzymanych z tych zarodków.
2. Zawartość kwasu erukowego w nasionach tych samych linii DH, biorących udział w doświadczeniach przez dwa kolejne lata, była istotnie skorelowana między latami.
3. Spośród przebadanych linii DH — 9 z nich charakteryzowało się wysoką zawartością kwasu erukowego (powyżej 56,5%) i niską zawartością glukozynolanów (poniżej 8,0 μM/g nasion).

Literatura

- Albrecht S., Möllers C., Röbbelen G. 1994. Selection for fatty acid composition in microspore derived embryos (MDE) of rapeseed, *Brassica napus* L. J. Plant Physiol., 143: 526-529.
- Byczyńska B., Krzymański J. 1969. Szybki sposób otrzymywania estrów metylowych kwasów tłuszczowych do analizy metodą chromatografii gazowej. Tłuszcze Jadalne, 13: 108-114.
- Cegielska T. 1994. Wykorzystanie oleju rzepaku wysokoerukowego do celów przemysłowych. Rośliny Oleiste, XV: 155-160.
- Cegielska-Taras T., Szała L. 1998. Metoda bezpośredniego uzyskiwania podwojonych haploidów z mikrosporowych zarodków rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.). Rośliny Oleiste, XIX: 353-357.
- Cegielska-Taras T., Szała L., Nałęczyńska A., Kołodziej K., Ogrodowczyk M. 1999. Selection for high erucic acid content in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) on microspore-derived embryos. J. Appl. Gen., w druku.
- Chen J.L., Beversdorf W.D. 1991. Evaluation of microspore derived embryos as models for studying lipid biosynthesis in seed of rapeseed (*Brassica napus* L.). Euphytica, 58: 145-155.
- Friedt W., Lühs W. 1998. Recent developments and perspectives of industrial rapeseed breeding. Fett/Lipid 100, 6: 219-226.

- Lühs W., Friedt W. 1994. Present state and prospects of breeding rapeseed (*Brassica napus*) with a maximum erucic acid content for industrial application. *Fat. Sci. Technol.*, 96, 4: 137-145.
- Michalski K., Kołodziej K., Krzymański J. 1995. Quantitative analysis of glucosinolates in seeds of oilseed rape – effect of sample preparation on analytical results. *Proc. 9th International Rapeseed Congress*. Cambridge, UK, 3: 911-913.
- Murphy D.J. 1996. Engineering oil production in rapeseed and other oil crops. *TIBTECH*, 14: 206-213.
- Taylor D.C., Weber N. 1994. Microspore-derived embryos of the *Brassicaceae* Model system for studies of storage lipid bioassembly and its regulation. *Fat. Sci. Technol.*, 6: 228-235.