

Stanisław Spasibonek, Barbara Byczyńska, Jan Krzymański
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Zakład Roślin Oleistych w Poznaniu

Mutanty rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych

Mutants of double low winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) with changed fatty acid composition

Słowa kluczowe: rzepak ozimy, mutageneza, kwas oleinowy, kwas linolowy, kwas linolenowy, desaturaza, EMS

Key words: winter oilseed rape, mutagenesis, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, desaturase, EMS

Nasiona rodu hodowlanego rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego o typowym składzie kwasów tłuszczowych w oleju: oleinowego 64,1%, linolowego 18,2% i linolenowego 10,4% poddano dwukrotnie działaniu metanosulfonianem etylu (EMS). Drugie traktowanie mutagenem przeprowadzono na pokoleniu M₂. W następnych pokoleniach wyselekcjonowano dwa mutanty o istotnie zmienionym składzie kwasów tłuszczowych. U mutantu M-5 wyraźnie wzrosła zawartość kwasu oleinowego do 77,9%, przy jednoczesnym obniżeniu zawartości kwasów linolowego do 8,6% oraz linolenowego do 7,0%. U mutantu M-8 nastąpił wzrost zawartości kwasu linolowego do 23,1%, przy znacznym obniżeniu zawartości kwasu linolenowego do 2,5%. Zaobserwowane zmiany w składzie kwasów tłuszczowych sugerują, że działanie EMS powoduje zmiany mutacyjne wyrażające się zmniejszeniem aktywności systemu desaturaz kwasu oleinowego lub linolowego, odpowiedzialnych za syntezę kwasów wielonienasyconych

The seeds of double low winter oilseed rape strain with typical fatty acid composition in oil: 64.1 per cent of oleic, 18.2 per cent of linoleic and 10.4 per cent of linolenic were treated with ethyl methanesulphonate (EMS). Second treatment was done on seeds of M₂ generation. In successive generations after mutagen treatment two mutants with changed fatty acid composition were selected. The mutant M-5 with increased oleic acid content to 77.9 per cent and decreased content of linoleic acid to 8.6 per cent and linolenic acid to 7.0 per cent. The mutant M-8 with increased linoleic acid content to 23.1 per cent and decreased linolenic acid content to 2.5 per cent. Changes in fatty acid composition observed in both mutants suggested that EMS treatment frequently produce mutagenic changes which reduce activity of desaturase of oleic or linoleic acid system responsible for polyunsaturated fatty acids synthesis.

Wstęp

Rośliny krzyżowe zajmują trzecie miejsce w świecie, po soi i palmie oleistej, pod względem produkcji olejów roślinnych. W Polsce rzepak jest najważniejszym źródłem oleju roślinnego. Nasiona rzepaku w suchej masie zawierają około 45% oleju (Krzymański 1993a, 1993b), którego jakość jest w dużej mierze uzależniona od składu kwasów tłuszczowych, między innymi od udziału kwasów oleinowego, linolowego, linolenowego i erukowego (Krzymański, Downey 1969; Krzymański 1970, 1984, 1993a).

W latach siedemdziesiątych na drodze hodowlanej udało się zmienić skład kwasów tłuszczowych oleju rzepakowego, uzyskując formy rzepaku o obniżonym udziale kwasu erukowego ($C_{22:1}$) z około 50% do prawie 0%. Eliminacja kwasu erukowego spowodowała znaczne zwiększenie zawartości jednonienasyconego kwasu oleinowego i sumy wielonienasyconych kwasów linolowego i linolenowego. Obecnie uprawiane odmiany rzepaku ozimego podwójnie ulepszonego dostarczają oleju, w którym około 92% stanowią kwasy tłuszczowe o osiemnastu atomach węgla. W tym udział kwasu oleinowego ($C_{18:1}$) o jednym podwójnym wiązaniu wynosi około 60%, kwasu linolowego ($C_{18:2}$) z dwoma wiązaniami podwójnymi około 20%, kwasu linolenowego ($C_{18:3}$) z trzema wiązaniami podwójnymi około 11% oraz nasyconego kwasu stearynowego ($C_{18:0}$) około 1%. Olej rzepakowy o takim składzie kwasów tłuszczowych wykorzystywany jest zarówno do celów spożywczych, jak i technicznych. W perspektywie zapotrzebowania na różnego typu oleje i możliwości ich wykorzystania istniejąca zmienność zawartości poszczególnych kwasów 18-węglowych jest niewystarczająca.

Udział poszczególnych kwasów tłuszczowych w odmianach jest podobny i znaczące zredukowanie poziomu kwasu linolenowego i podwyższenie kwasu oleinowego tradycyjną metodą hodowli rekombinacyjnej jest nieosiągalne. Mutageneza indukowana chemicznie jest jednym ze sposobów zwiększania zakresu zmienności składu kwasów tłuszczowych w oleju nasion roślin oleistych. Według badań przedstawionych przez różnych autorów metanosulfonian etylu (EMS) jest oceniany jako bardzo skuteczny mutagen chemiczny w pracach nad zmianami w składzie kwasów tłuszczowych zarówno u rzepaku, jak i u innych roślin oleistych. Opierając się na wynikach własnych badań (Byczyńska i in. 1996) oraz na publikacjach różnych autorów, jak: Auld i in. (1992), James, Dooner (1990), Green, Marshall (1984), Rakow (1973), Rakow i McGregor (1973), Rakow i in. (1987), Rücker i Röbbelen (1995), Röbbelen, Nitsch (1975), Röbbelen (1990), Velasco i in. (1999), Schnurbusch i in. (2000), można stwierdzić, że dzięki indukowanej mutagenezie uzyskuje się materiały o bardzo zróżnicowanej zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych.

Material i metoda

Materiałem wyjściowym do badań był ród rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego PN 3756/93. Szczegółowe warunki, w jakich prowadzono kolejne etapy badań, zostały zawarte we wcześniej opublikowanej pracy (Byczyńska i in. 1996).

W 1996 roku zastosowano zmodyfikowaną metodę otrzymywania mutantów, przeprowadzając powtórne traktowanie mutagenem pokolenia M_2 oraz zmieniając warunki działania mutagenem. Zmodyfikowaną metodę zastosowano poddając działaniu mutagenem EMS nasiona pokolenia M_2 zmutowanej linii rzepaku ozimego PN-1207 o obniżonej zawartości kwasów wielonienasyconych. Nasiona moczone w wodzie destylowanej w temperaturze 4°C przez okres 12 godzin. Napęcznienie nasion miało na celu ułatwienie penetracji roztworu mutagenu do wnętrza ich struktury komórkowej. Po zdekantowaniu wody i osuszeniu powierzchniowym nasion na bibule, jedną część nasion zalano 5%, a drugą 8% roztworem EMS. Roztwory EMS przygotowano w buforze fosforanowym o pH 7. Nasiona pozostawały w roztworze mutagenu przez 4 godziny, w tym 2 godziny w temperaturze 4°C i 2 godziny w temperaturze 20°C. Po zdekantowaniu roztworów mutagenu, nasiona wymywano pod bieżącą wodą wodociągową przez 16 godzin. Następnie po powierzchniowym osuszeniu nasiona zostały wysiane bezpośrednio na poletkach doświadczalnych. W trakcie wegetacji rośliny oceniano pod względem cech fenotypowych. Wybrane podczas kwitnienia rośliny poddano samozapyleniu.

W nasionach uzyskanych w wyniku samozapylenia i zebranych oddzielnie z pojedynczych roślin oznaczano skład kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej (Byczyńska, Krzymański 1969).

Wyniki i dyskusja

Uzyskane w przeprowadzonych doświadczeniach wyniki wykazały, że częstotliwość pojawiania się mutantów o wyraźnych zmianach składu kwasów tłuszczowych, większych od tych, które ulegają modyfikacjom pod wpływem środowiska, wymaga zastosowania bardziej drastycznych warunków prowadzenia mutagenezy lub jej wielokrotnego powtarzania (Spasibionek i in. 1998). W celu osiągnięcia głębszych zmian zastosowano powtórne traktowanie mutagenem nasion rzepaku pokolenia M_2 . W wyniku selekcji prowadzonej w pokoleniach od M_2 do M_6 po powtórny traktowaniu EMS uzyskano zmutowane linie M-5 i M-8 o trwale zmienionym udziale kwasów wielonienasyconych (tab. 1).

Tabela 1

Schemat selekcji mutantów M-5 i M-8 — *Scheme of mutant M-5 and M-8 selection*

Wyszczególnienie <i>Item</i>	Pierwsze traktowanie EMS <i>First EMS treatment</i>	Drugie traktowanie EMS <i>Second EMS treatment</i>	Selekcja w pokoleniach <i>Selection in generations</i>			
<i>Mutant M-5 — Mutant M-5</i>						
Linia poddana mutagenезie <i>The line treated with mutagenesis</i>	PN 3756/93	PN 1207/94				
Selekcjonowane pokolenie <i>Selected generation</i>	M ₂	(M ₂) ₂	(M ₂) ₃	(M ₂) ₄	(M ₂) ₅	(M ₂) ₆
Liczba selekcjonowanych pojedynków <i>Number of selected individual plants</i>	11000	330	59	103	108	56
Liczba wybranych pojedynków <i>Number of chosen individual plants</i>	29	56	59	72	6	17
Rodowód mutantów M-5 — <i>Pedigree of M-5 mutant</i>			PN 14580/5i/96	PN 10459/15i/97	PN 11995/2i/98	M-5
<i>Mutant M-8 — Mutant M-8</i>						
Linia poddana mutagenезie <i>The line treated with mutagenesis</i>	PN 3756/93	PN 1207/94				
Selekcjonowane pokolenie <i>Selected generation</i>	M ₂	(M ₂) ₂	(M ₂) ₃	(M ₂) ₄	(M ₂) ₅	(M ₂) ₆
Liczba selekcjonowanych pojedynków <i>Number of selected individual plants</i>	11000	330	50	45	198	93
Liczba wybranych pojedynków <i>Number of chosen individual plants</i>	29	56	1	1	7	49
Rodowód mutantów M-8 — <i>Pedigree of M-8 mutant</i>			PN 8/5/96	PN 681/97	PN 11630/98	M-8

Przedstawione w tabeli 2 wyniki dotyczą zmian zawartości kwasów oleinowego, linolowego i linolenowego w oleju nasion dwóch wyselekcjonowanych mutantów M-5 i M-8. Dla potwierdzenia tych zmian przedstawiono również stopień desaturacji kwasu oleinowego (ODR) i kwasu linolowego (LDR) obliczony według metody, którą podali Pleines i Friedt (1988).

Tabela 2
Zmiany zawartości kwasów oleinowego ($C_{18:1}$), linolowego ($C_{18:2}$) i linolenowego ($C_{18:3}$) w nasionach mutantów M-5 i M-8 w porównaniu z materiałem wyjściowym PN 3756/93
Changes of oleic, linoleic, and linolenic acid content in the seeds of mutants M-5 and M-8 in comparison with original material PN 3756/93

Cecha — Trait	PN 3756/93 (n = 64)	M-5 (n = 17)	M-8 (n = 49)
$C_{18:1}$ — kwas oleinowy — <i>oleic acid</i>	64,1	77,9**	66,3**
$C_{18:2}$ — kwas linolowy — <i>linoleic acid</i>	18,2	8,6**	23,1**
$C_{18:3}$ — kwas linolenowy — <i>linolenic acid</i>	10,4	7,0**	2,5**
ODR — stopień desaturacji kwasu oleinowego <i>oleic desaturation ratio</i>	30,9	16,7**	27,8**
LDR — stopień desaturacji kwasu linolowego <i>linoleic desaturation ratio</i>	36,4	44,9**	9,8**

n — liczba badanych roślin — *number of analysed plants*

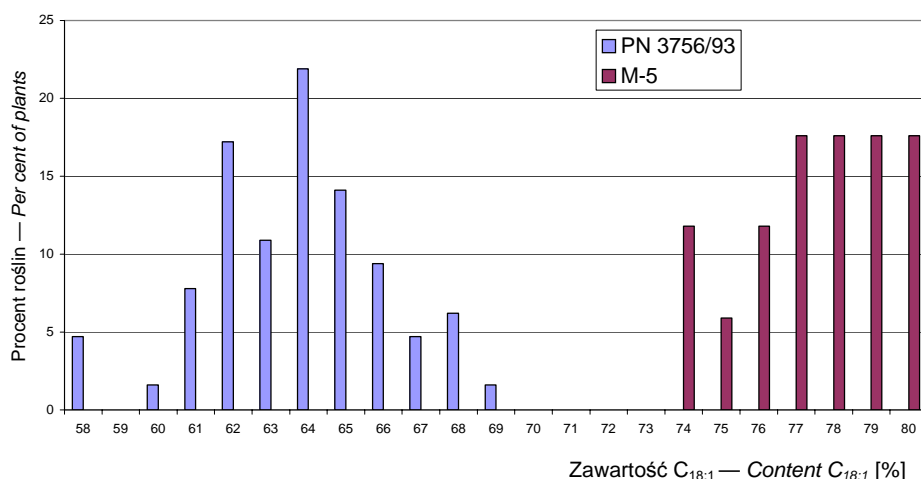
** — istotność na poziomie 0,01 — *significant at the 0.01 level*

Porównania dokonano między średnią roku wyjściowego PN 3756/93, a średnią mutantów M-5 i M-8
Comparison between mean value of original strain PN 3756/93 and mean of mutants M-5 and M-8

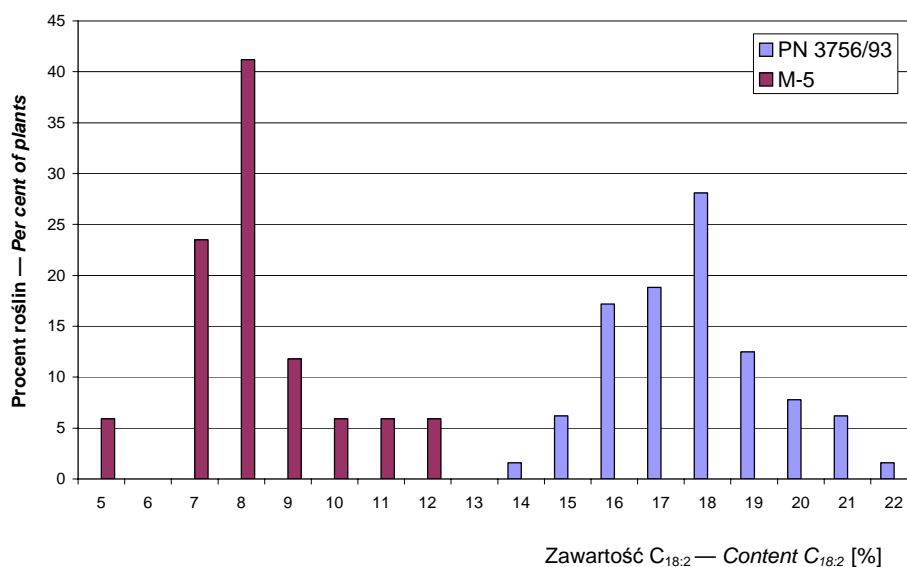
Synteza kwasu linolenowego zachodzi w wyniku dwustopniowej desaturacji prowadzącej od kwasu oleinowego do linolowego i dalej od kwasu linolowego do linolenowego. Reakcje te przebiegają z udziałem odpowiednich enzymów: desaturazy oleinowej i linolowej (Cherif i in. 1975). Aktywność tych układów enzymatycznych decyduje o syntezie poszczególnych kwasów. Uzyskane istotne zmiany w zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych w oleju sugerują, że aktywności układów enzymatycznych, które decydują o syntezie kwasów oleinowego, linolowego i linolenowego uległy znacznemu obniżeniu. U mutantu M-5 wyraźnie wzrosła zawartość kwasu oleinowego do 77,9% przy jednoczesnym obniżeniu zawartości kwasów linolowego do 8,6% oraz linolenowego do 7,0%. Świadczyć to może, że mutacji uległy geny odpowiedzialne za aktywność desaturazy kwasu oleinowego. Potwierdza to wyliczony stopień desaturacji kwasu oleinowego (ODR), który uległ znacznemu obniżeniu z 30,9 w genotypie wyjściowym do 16,7 w mutancie M-5. U mutantu M-8 wzrost zawartości kwasu linolowego do 23,1%, przy znacznym obniżeniu kwasu linolenowego do 2,5%,

wskazuje na mutację genu warunkującego aktywność desaturazy kwasu linolowego. Stopień desaturacji kwasu linolowego (LDR) w mutancie M-8 wynosił 9,8, a więc był istotnie niższy niż w rodzie wyjściowym, dla którego ten współczynnik wynosił 36,4 (tab. 2).

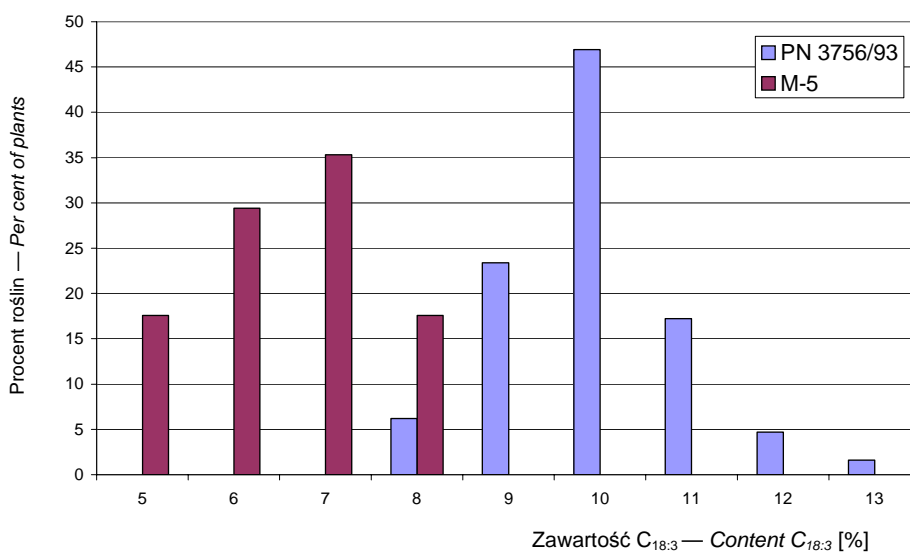
Efektywność indukowania mutacji poprzez wielokrotne powtarzanie zaznaczyła się trwałymi i dużymi zmianami w udziale poszczególnych kwasów tłuszczowych 18-węglowych. Wielkość tych zmian oraz procent wyselekcjonowanych roślin w pokoleniu M₆, które wykazywały w dużym stopniu ustabilizowany zmieniony poziom zawartości badanych kwasów tłuszczowych w porównaniu do materiału wyjściowego przedstawiają rysunki 1–6. Na podstawie analizowanych pojedynków w pokoleniu M₆ mutanta M-5, 70,4% populacji utrzymywało wysoką zawartość kwasu oleinowego (77–80,6%), pozostała część populacji mieściła się również w wysokim przedziale 74–77%, a więc znacznie wyższym w porównaniu do rodu wyjściowego — 58,2–69,4% (rys. 1). W uzyskanym mutancie M-5 istotnym zmianom uległy również kwasy wielonienasycone. Zawartość kwasu linolowego obniżyła się do poziomu 5,9–12,4%, a linolenowego do 5,0–8,7% w stosunku do rodu wyjściowego, w którym procentowy udział kwasu linolowego wahał się między 14,6–22,5%, a kwasu linolenowego 8,4–13,3% (rys. 2 i 3).



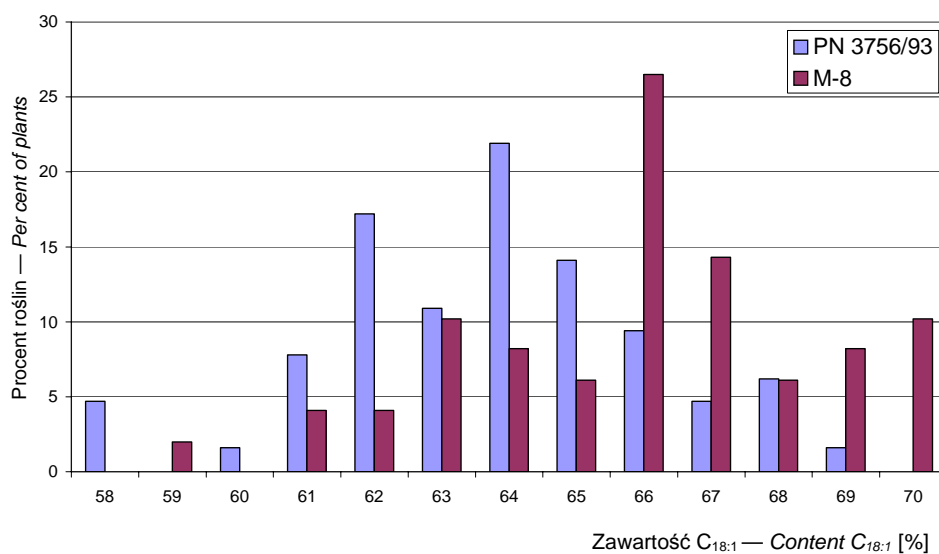
Rys. 1. Rozkład zawartości kwasu oleinowego w oleju nasion wyselekcjonowanego mutantu M-5 oraz w rodzie wyjściowym PN 3756/93 — *Distribution of oleic acid content in oil of mutant M-5 seed and of original strain PN 3756/93*



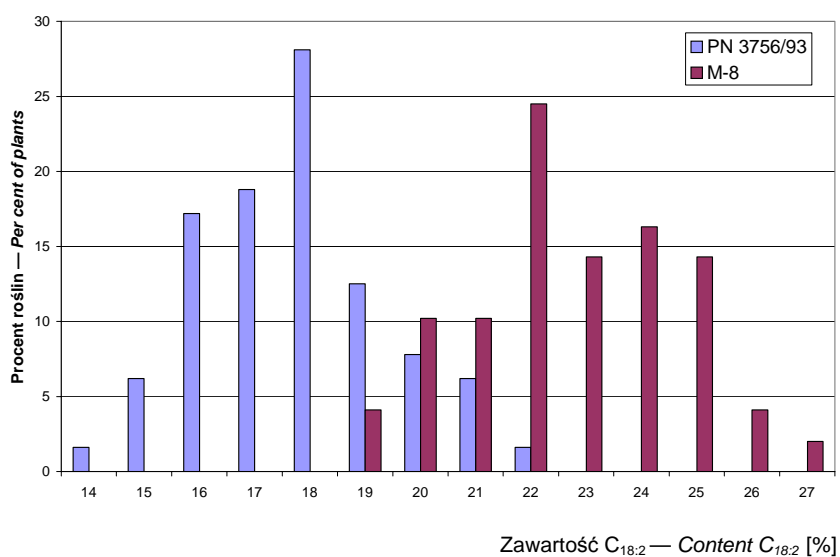
Rys. 2. Rozkład zawartości kwasu linolowego w oleju nasion wyselekcjonowanego mutantu M-5 oraz w rodzie wyjściowym PN3756/93 — *Distribution of linoleic acid content in oil of mutant M-5 seed and of original strain PN 3756/93*



Rys. 3. Rozkład zawartości kwasu linolenowego w oleju nasion wyselekcjonowanego mutantu M-5 oraz w rodzie wyjściowym PN 3756/93 — *Distribution of linolenic acid content in oil of mutant M-5 seed and of original strain PN 3756/93*

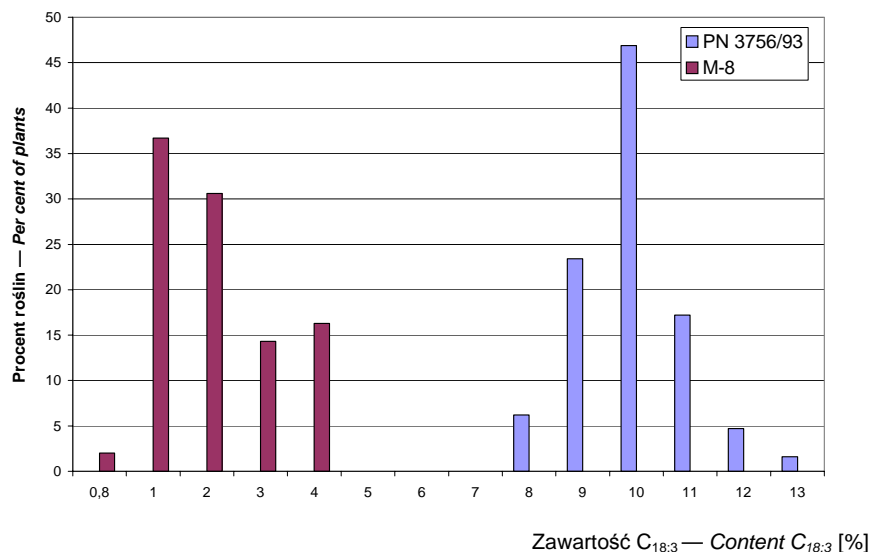


Rys. 4. Rozkład zawartości kwasu oleinowego w oleju nasion wyselekcjonowanego mutantu M-8 oraz w rodzie wyjściowym PN 3756/93 — *Distribution of oleic acid content in oil of mutant M-8 seed and of original strain PN 3756/93*



Rys. 5. Rozkład zawartości kwasu linolowego w oleju nasion wyselekcjonowanego mutantu M-8 oraz w rodzie wyjściowym PN 3756/93 — *Distribution of linoleic acid content in oil of mutant M-8 seed and of original strain PN 3756/93*

Innymi zmianami w zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych charakteryzowały się wyselekcjonowane pojedynki pokolenia M₆ mutantu M-8. Procentowy udział kwasu oleinowego zmutowanych linii był podobny do występującego w rodzie wyjściowym PN 3756/93 (rys. 4), natomiast znacznym zmianom uległ udział kwasu linolowego, który wahał się między 19,4–27,5%, w porównaniu do rodu wyjściowego — 18,2–22,5% (rys. 5). Na podkreślenie zasługuje uzyskanie dużych zmian w procentowym udziale kwasu linolenowego. Wszystkie pojedynki z badanej populacji utrzymywały silnie obniżoną zawartość kwasu linolenowego — 0,8–4,6% — w porównaniu do materiału wyjściowego zawierającego się w przedziale 8,4–13,3% (rys. 6).



Rys. 6. Rozkład zawartości kwasu linolenowego w oleju nasion wyselekcjonowanego mutantu M-8 oraz w rodzie wyjściowym PN 3756/93 — *Distribution of linolenic acid content in oil of mutant M-8 seed and of original strain PN 3756/93*

Wnioski

- Powtórne indukowanie mutacji zwiększyło skuteczność mutagenyzy i dało możliwość uzyskania dużych i utrwalonych zmian w udziałach poszczególnych kwasów tłuszczowych w oleju z nasion.
- Zaobserwowane zmiany w składzie kwasów tłuszczowych mutantów M-5 i M-8 sugerują, że działanie EMS jest ukierunkowane na mutacje genów determinujących aktywność systemu desaturaz kwasu oleinowego i linolowego, odpowiedzialnych za syntezę kwasów wielonienasyconych.

Literatura

- Auld D.L., Heikkinen M.K., Erickson D.A., Sernyk J.L., Romero J.E. 1992. Rapeseed mutants with reduced levels of polyunsaturated fatty acids and increased levels of oleic acid. *Crop Sci.* 32: 657-662.
- Byczyńska B., Krzymański J. 1969. Szybki sposób otrzymywania estrów metylowych kwasów tłuszczowych do analizy metodą chromatografii gazowej. *Tłuszcze Jadalne XIII*: 108-114.
- Byczyńska B., Spasibionek S., Krzymański J. 1996. Zmniejszenie zawartości kwasów wielonienasyconych w oleju rzepakowym w wyniku mutacji chemicznej. *Rośliny Oleiste XVII* (1): 133-140.
- Chérif A., Dubacq J.P., Maché R., Oursel A., Treémolieres A. 1975. Biosynthesis of α -linolenic acid by desaturation of oleic and linolenic acids in several organs of higher and lower plants and in algae. *Phytochem.* 14: 703-706.
- Green A.G., Marshall D.R. 1984. Isolation of induced mutants in linseed (*Linum usitatissimum*) having reduced linolenic acid content. *Euphytica* 33: 321-328.
- James D.W.Jr., Dooner H.R. 1990. Isolation of EMS-induced mutants in *Arabidopsis* altered in seed fatty acid composition. *Theor. Appl. Genet.* 80: 241-245.
- Krzymański J., Downey K.R. 1969. Inheritance of fatty acid composition in winter forms of rapeseed, *Brassica napus*. *Can. J. Plant Sci.* 49: 313-319.
- Krzymański J. 1970. Genetyczne możliwości ulepszania składu chemicznego nasion rzepaku ozimego. *Hodowla Roślin Aklimatyzacja i Nasiennictwo* 14 (2): 95-133.
- Krzymański J. 1984. Hodowlane możliwości ulepszania zawartości oleju i białka w nasionach rzepaku. *Wyniki badań nad rzepakiem ozimym 1983, IHAR Radzików*, 104-111.
- Krzymański J. 1993a. Osiągnięcia i nowe perspektywy prac badawczych nad roślinami oleistymi w Polsce. *Postępy Nauk Rolniczych* 5/245: 7-14.
- Krzymański J. 1993b. Możliwości pełniejszego wykorzystania wartości rzepaku podwójnie ulepszanego. *Postępy Nauk Rolniczych* 6/245: 7-14.
- Pleines S., Friedt W. 1988. Breeding for improved C18-fatty acid composition in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Fat Sci. Technol.* 90, 5: 167-171.
- Rakow G. 1973. Selektion auf Linol- und Linolensäuregehalt in Rapssamen nach mutagener Behandlung. *Z. Pflanzenzüchtung* 69: 62-82.
- Rakow G., McGregor D.I. 1973. Opportunities and problems in modification of levels of rapeseed C18 unsaturated fatty acids. *JAOC* 50: 400-403.
- Rakow G., Stringam G.R., McGregor D.I. 1987. Breeding *B. napus* L. Canola with improved fatty acid composition, high oil content and high seed yield. *Proc. of the 7th Int. Rapeseed Congress*, 11-14.05 w Poznaniu, vol. 1: 27-32.
- Röbbelen G., Nitsch A. 1975. Genetical and physiological investigations on mutants for polyenoic fatty acid in rapeseed *Brassica napus* L. *Z. Pflanzenzüchtung* 75: 93-105.
- Röbbelen G. 1990. Mutation breeding for quality improvement a case study for oilseed crops. *Mutation Breeding Review* 6: 1-43.
- Rücker B., Röbbelen G. 1995. Development of high oleic acid rapeseed. *Proc. of the 9th Int. Rapeseed Congress*, Juli 4-7, Cambridge University vol. 2: 389-391.
- Schnurbusch T., Möllers C., Becker H.C. 2000. A mutant of *Brassica napus* with increased palmitic acid content. *Plant Breeding* 119: 141-144.
- Spasibionek S., Byczyńska B., Krzymański J. 1998 Wpływ środowiska na zmiany składu kwasów tłuszczowych w oleju mutantu 1207 rzepaku ozimego. *Rośliny Oleiste XIX*: 627-632.
- Velasco L., Perez-Vich B., Fernandez-Martinez J.M. 1999. The role of mutagenesis in the modification of the fatty acid profile of oilseed crops. *J. Appl. Genet.* 40 (3): 185-209.