

Jan Krzymański, Krystyna Krótka, Teresa Piętka

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Zakład Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych w Poznaniu

Elementy nieciągłości w rozkładzie zawartości kwasu oleinowego w oleju z nasion linii wsobnych rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego

Discontinuous components in distribution of oleic acid content in seed oil of inbred lines of double low winter oilseed rape (*Brassica napus* L.)

Słowa kluczowe: rzepak ozimy, olej z nasion, kwas oleinowy, biosynteza, desaturaza, rozkład zawartości, analiza skupień

Przeprowadzono badania statystyczne rozkładu zawartości kwasu oleinowego w oleju nasion 1072 linii wsobnych rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego. Metodą k średnich z maksymalizacją odległości skupień utworzono 14 grup, a następnie grupy te testowano na istotność zróżnicowania i obliczono ich statystyki opisowe. Na podstawie uzyskanych wyników przeprowadzono badania przypuszczalnego genetycznego uwarunkowania zawartości kwasu oleinowego w grupach i jej zależności od aktywności desaturazy oleinowej. Uzyskane wyniki wymagają potwierdzenia poprzez poszukiwanie różnic w strukturze DNA pomiędzy grupami.

Key words: winter rapeseed, seed oil, oleic acid, biosynthesis, desaturase, content distribution, cluster analysis

Distribution of oleic acid content in seed oil of 1072 inbred lines of double low winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) was studied. Statistical study included histograms made with different resolutions, analyses of variance, estimations of the lowest significant differences, grouping of lines with the cluster method using k means with maximisation of distances among groups. Next, the significance of differences among obtained groups was tested and their descriptive statistics were calculated. Results of these statistical analyses were the base for study on genetic control of oleic acid content in seed oil and the role of oleic acid desaturase activity.

Differences between histogram classes according to the mean content of oleic acid were statistically significant for classes which contain 6 or more lines (horizontal line on fig. 2). Conformability of histogram to normal distribution was examined using χ^2 test. This test concerned the range between 55–67% of oleic acid (range with significant differences between classes). Calculated χ^2 value was 64,704. Probability that histogram had normal distribution was $p = 0.00445$. Histogram deviations from normal distribution were statistically highly significant. Similar results were obtained for distribution of oleic acid desaturase activity.

It was assumed that reaction of oleic acid desaturation is irreversible and first order according to equation (1) shown in Fig. 2. It was also assumed that time t is almost the same for all lines so product kt in equation (2) shown in Fig. 3 may be a measure of desaturase activity.

The lines were grouped using cluster analysis. The following criteria were used to estimate the optimal number of groups:

- 1) number of groups should be similar to number of unresolved peaks on histogram,
- 2) variance analysis for groups should give F-value as high as possible,
- 3) histograms for groups should have single peaks and look roughly similar to normal distribution.

The following conclusions can be drawn as a result of the study:

1. High number of inbred lines in the population used in the study allowed to obtain good resolution, which helped to detect discontinuous elements in histogram. Several not fully dissolved peaks could be observed on histogram. Mean values for oleic acid content in these peaks differed significantly.
2. Better resolution and cluster analysis enabled to divide inbred line population into 14 groups. The mean values of these groups for oleic acid content were sharply differentiated. This differentiation was statistically highly significant.
3. Histograms for these groups had only one peak (excluding border groups) and distribution roughly similar to normal.
4. These groups formed according to statistical analysis probably represented genotypes composed of allele combinations of genes controlling the content of oleic acid in seed oil. This assumption should be verified using examination of DNA polymorphism among particular groups.
5. These genes controlled rather the use of oleic acid in desaturation to linolic acid than the synthesis of oleic acid from stearic acid.
6. Activity of desaturase had crucial influence on oleic acid content in seed oil. Correlation between these characters was negative and very highly significant.
7. Histograms for the activity of oleic acid desaturase made for groups were better resolved and had more regular shape than histograms for oleic acid content.
8. The distances in mean contents of oleic acid between neighbouring groups were almost constant and amounted about 0.69 per cent.

Wstęp

W badaniach dotyczących rozkładu zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych w oleju z nasion rzepaku nie stwierdzono wyraźnie rozdzielających się frakcji, co wskazywało na ciągły charakter ich zmienności. Dotychczas jedynie w pokoleniu F₂ mieszańców kombinacji rzepak bezerukowy × rzepak wysokoerukowy obserwowano wyraźne wydzielanie się frakcji bezerukowej (Harvey, Downey 1964; Kondra, Stefansson 1965; Krzymański i in. 1967; Krzymański, Downey 1969; Krzymański 1970; Jönsson 1977; Anand, Downey 1981; Chen, Heneen 1989; Chen, Beversdorf 1990; Barret i in. 1998; Fourmann i in. 1998; Lühs i in. 1998).

Ciągły rozkład, obserwowany dla kwasu oleinowego (Krzymański i in. 1983; Bartkowiak-Broda, Krzymański 1981; Piętka i in. 2003), może być wynikiem poligenicznego uwarunkowania tej cechy przez geny działające w sposób kumulatywny lub maskowania efektów poszczególnych dużych genów przez szereg zmian powodowanych działaniem genów modyfikujących. Inną przyczyną może być zlewanie się frakcji pod wpływem zmienności niedziedzicznej (zmienność fizjologiczna, wpływ środowiska, błędy analiz chemicznych, brak reprezentatywności próby itp.) (Allard 1968).

W przedstawionych badaniach przeprowadzono poszukiwania elementów nieciągłości w rozkładzie zawartości kwasu oleinowego w oleju z nasion wśród linii wsobnych rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego celem wyjaśnienia mechanizmu zaobserwowanego uprzednio rozkładu ciągłego.

Material i metody

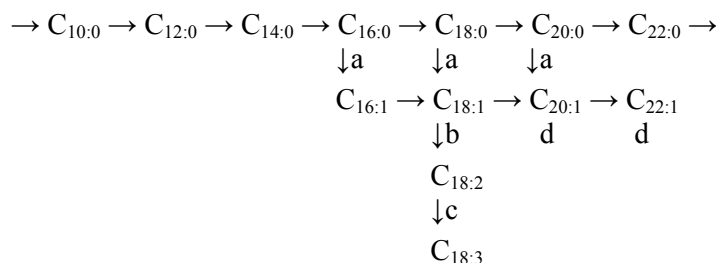
Material roślinny

Do badań użyto populacji linii wsobnych, których zróżnicowanie pod względem zawartości kwasów tłuszczowych badano poprzednio metodami standardowymi (Piętka, Krótka i Krzymański 2003). Material stanowiły linie wsobne wyprowadzone z mieszańców międzyliniowych i liniowo-odmianowych. Krzyżowania zostały wykonane pomiędzy liniami podwójnie ulepszonymi wyhodowanymi przez autorów w Zakładzie Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych IHAR oraz pomiędzy tymi liniami i odmianami. Były one wykonywane w układzie diallelicznym lub czynnikowym (Krzymański i in. 1992, 1993, 1994, 1999; Piętka i in. 2000, 2001). Pokolenia mieszańcowe prowadzono w chowie wsobnym. Do badań użyto wyselekcjonowanej z tych mieszańców populacji 1072 linii wsobnych na poziomie $S_2 - S_9$ (pokolenia $F_4 - F_{11}$). Linie te spełniały kryteria rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego. Zawartość kwasu erukowego nie przekraczała 0,1%, a zawartość sumy glukozyolanów alifatycznych 10 $\mu\text{M/g}$ nasion. Badane linie wsobne były reprezentowane przez pojedyncze rośliny zebrane w 1996 (918 linii) i 1997 roku (164 linii). Rośliny rosły w obu latach na tym samym polu. Pozwoliło to na wyeliminowanie w dużym stopniu różnicującego wpływu środowiska (Dembiński i in. 1967a, 1967b; Ogrodowczyk i in. 1996; Górnik, Grzesik 1998; Spasibionek i in. 1998). Do badań wybrano tylko rośliny nie porażone przez choroby, w małym stopniu uszkodzone przez szkodniki, z dobrze wykształconymi i dojrzałymi nasionami. Pozwoliło to zredukować do minimum wpływ tych czynników na skład kwasów tłuszczowych oleju z nasion (Krzymański 1960, 1971; Wiązecka, Krzymański 1970; Bartkowiak-Broda, Krzymański 1981; Kulka, Górecki 1995; Brown i in. 1999; Muśnicki i in. 1999; Kachlicki 2003).

Analizy chemiczne

Selekcję indywidualną prowadzono na podstawie wyników analiz chemicznych nasion zebranych z pojedynczych roślin. Analizy składu kwasów tłuszczowych w oleju z nasion przeprowadzono za pomocą chromatografii gazowej metodą stosowaną w laboratorium chemicznym IHAR w Poznaniu (Byczyńska, Krzymański 1969; Kubačka i in. 1977). Metoda ta jest zgodna z polskimi normami PN-EN-ISO 5508:1996 i PN-ISO 5509:1996.

Biosynteza kwasów tłuszczowych w dojrzewających nasionach rzepaku (Arondel i in. 1992; Yadav i in. 1993; Cassagne i in. 1994; Jones i in. 1995; Slabas i in. 1995; Lassner i in. 1995, 1996; Clemens, Kunst 1997; Millar, Kunst 1997; Scheffler i in. 1997) przebiega według schematu przedstawionego na rysunku 1.



gdzie — *where*:

- np. $C_{18:1}$ — kwas o 18 atomach węgla w łańcuchu i 1 podwójnym wiązaniu (oleinowy)
fatty acid with 18 carbon atoms in chain and one double bond
 a = desaturaza $\Delta 9$ kwasu stearynowego — *$\Delta 9$ -stearic acid desaturase*
 b = desaturaza $\Delta 12$ kwasu oleinowego — *$\Delta 12$ -oleic acid desaturase*
 c = desaturaza $\Delta 15$ kwasu linolowego — *$\Delta 15$ -linolic acid desaturase*
 d = elongaza kwasu oleinowego — *oleic acid elongase*

Rys. 1. Schemat biosyntezy kwasów tłuszczowych w nasionach rzepaku — *Biosynthesis pathways of fatty acids in seeds of oilseed rape*

Kwas oleinowy jest syntetyzowany z kwasu stearynowego przez desaturazę stearynową. Enzym ten jest tak aktywny, że w oleju pozostaje tylko 1–1,5% kwasu stearynowego. Wynika z tego, że zmiany jego aktywności tylko w małym stopniu mogą wpływać na zawartość kwasu oleinowego w oleju z nasion rzepaku bezerukowego. Kwas oleinowy jest substratem dla desaturazy oleinowej, która przetwarza go na kwas linolowy będący następnie substratem dla desaturazy linolowej, której produktem jest kwas linolenowy. Tak więc największy wpływ na zawartość kwasu oleinowego powinna mieć aktywność desaturazy oleinowej.

Reakcja desaturacji kwasu oleinowego

Założono, że reakcja desaturacji kwasu oleinowego jest nieodwracalna i przebiega według równania (1) pierwszego stopnia jak to pokazano na rysunku 2.

Można przyjąć, że czas t jest w przybliżeniu równy dla wszystkich linii wsobnych, ponieważ różnice w przebiegu dojrzewania nasion, chociaż nieraz istotne statystycznie, są na tyle małe, iż można je pominąć. Za miarę aktywności desaturazy oleinowej przyjęto iloczyn kt , który obliczano według równania (2) pokazanego na rysunku 3.

$$N_t = N_0 * e^{-kt} \quad (1)$$

gdzie — *where*:

N_0 = zawartość początkowa — *concentration at the beginning*

N_t = zawartość po czasie t — *concentration after time t*

t = czas reakcji — *reaction time*

k = stała szybkości reakcji — *reaction constants*

e = podstawa logarytmu naturalnego — *base of natural logarithm*

Rys. 2. Równanie reakcji desaturacji kwasu oleinowego — *Equation proposed for reaction of oleic acid desaturation*

$$kt = \ln (N_{ole} + N_{lin} + N_{len}) - \ln (N_{ole}) \quad (2)$$

gdzie — *where*:

N_{ole} = zawartość kwasu oleinowego — *oleic acid content*

N_{lin} = zawartość kwasu linolowego — *linoleic acid content*

N_{len} = zawartość kwasu linolenowego — *linolenic acid content*

Rys. 3. Równanie przyjęte do obliczania aktywności desaturazy kwasu oleinowego — *Equation used for calculation of activity of oleic acid desaturase*

Opracowanie statystyczne

Wyniki analiz chemicznych zawartości kwasu oleinowego w oleju z nasion populacji linii wsobnych opracowano statystycznie. Do sporządzania histogramów, charakterystyk zmienności i analiz wariancji wykorzystano narzędzia statystyczne zawarte w programie MS Excel. Podział populacji na poszczególne grupy przeprowadzano za pomocą analizy skupień według programu Statistica wersja 5.0. Grupowania dokonywano metodą k średnich dobierając linie tak, aby maksymalizować odległości między skupieniami. Przy ustalaniu liczby skupień kierowano się kryterium uzyskania grup o pojedynczych wierzchołkach i rozkładach zbliżonych do rozkładu normalnego oraz wartościach średnich różniących się istotnie w stopniu maksymalnym.

Wyniki oraz dyskusja

Efekt zwiększonej rozdzielczości histogramów

W poprzedniej pracy, w której korzystano z tych samych materiałów roślinnych (Piętka, Krótka i Krzymański 2003) rozkład zawartości kwasu oleinowego w populacji linii wsobnych był badany na podstawie histogramów wykreślonych z rozdzielczością odpowiadającą odchyleniom standardowym analiz chemicznych jego zawartości. Uzyskany rozkład ciągły, zbliżony do normalnego, może być tłumaczony jako wynik poligenicznego uwarunkowania tej cechy przez geny działające

w sposób kumulatywny lub przez łączenie się frakcji będących efektem działania niewielu genów pod wpływem nakładania się silnej zmienności niedziedzicznej (zmienność fizjologiczna, wpływ środowiska, błędy analiz chemicznych, brak reprezentatywności próby itp.) (Allard 1968).

Dzięki dużej liczebności badanej populacji klasy histogramu zawierają wiele roślin, a najmniejsze istotne statystycznie różnice pomiędzy średnimi frakcji histogramu w zależności od ich liczebności są dużo mniejsze od odchylenia standardowego, co zostało przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1

Najmniejsze istotne różnice ($NIR_{0,05}$) dla średniej zawartości kwasu oleinowego w zależności od liczebności linii we frakcjach histogramu — *The least significant differences ($LSD_{0,05}$) for mean oleic acid content according to the line number in fractions of histogram*

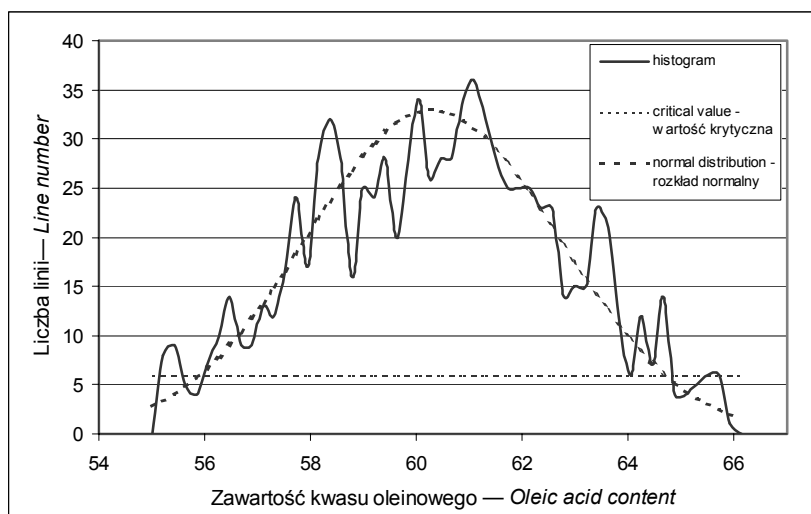
| Liczba linii we frakcji <i>Number of lines in fraction</i> | $NIR_{0,05}$ <i>LSD_{0,05}</i> | Liczba linii we frakcji <i>Number of lines in fraction</i> | $NIR_{0,05}$ <i>LSD_{0,05}</i> |
|---|---|---|---|
| 2 | 3,920 | 5 | 0,506 |
| 3 | 2,263 | 6 | 0,206 |
| 4 | 1,131 | 7 | 0,078 |

Najmniejsze istotne różnice pomiędzy średnimi zawartościami kwasu oleinowego we frakcjach histogramu maleją gwałtownie wraz ze wzrostem liczby linii we frakcji. Poczynając już od 6 linii w klasie histogramu, różnice pomiędzy średnimi dla klas wynoszące 0,21% są istotne statystycznie, co pokazano linią poziomą na wykresie (rys. 4). Pozwoliło to na wykreślenie histogramów ze znacznie większą rozdzielczością. Okazało się, że przedstawiony w poprzedniej publikacji (Piętka i in. 2003) rozkład ciągły w postaci szerokiego wierzchołka rozpadł się na mniejsze nie w pełni rozdzielone piki, różniące się jednak w sposób istotny statystycznie pod względem zawartości kwasu oleinowego (rys. 5).

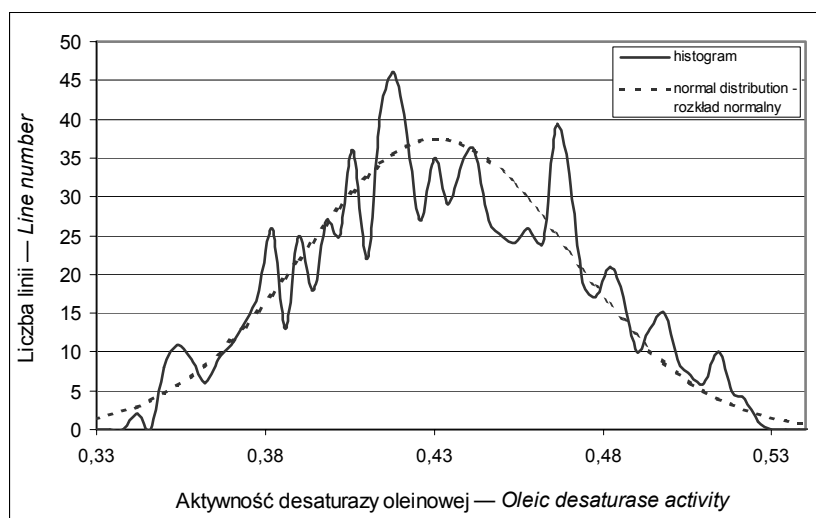
Oprócz udokumentowania istotności różnic pomiędzy klasami histogramu pod względem średnich zawartości kwasu oleinowego, dokonano oceny zgodności histogramu z krzywą rozkładu normalnego. Testem χ^2 objęto zakres od 55% do 67% zawartości kwasu oleinowego, a więc zakres o istotnych różnicach pomiędzy frakcjami histogramu. Obliczona wartość χ^2 wynosi 64,704. Prawdopodobieństwo, że histogram ma rozkład normalny wynosi $p = 0,00445$. Odstępstwa histogramu od rozkładu normalnego są więc wysoce istotne.

Otrzymany histogram pozwala postawić hipotezę, że zawartość kwasu oleinowego w oleju nasion rzepaku jest warunkowana przez geny, których allele są odpowiedzialne za różne poziomy tego kwasu w oleju.

Słuszność powyższego przypuszczenia sugerują również wyniki badań rozkładu aktywności desaturazy kwasu oleinowego w analizowanych liniach. Rozkład ten, przedstawiony na rysunku 5, posiada również szereg nie rozdzielonych pików i w sposób istotny różni się od rozkładu normalnego ($\chi^2 = 72,499$, $p = 0,00127$).



Rys. 4. Rozkład zawartości kwasu oleinowego w oleju nasion populacji 918 linii wsobnych rzepaku ozimego zebranych w 1996 roku (rozdzielczość 0,21%) oraz krzywa rozkładu normalnego i granica istotności różnic pomiędzy średnimi dla frakcji — *Distribution of oleic acid content in seed oil of 918 inbred lines of winter oilseed rape harvested in 1996 (resolution 0.21%) and curve of normal distribution and critical value for significant differences between fraction means*

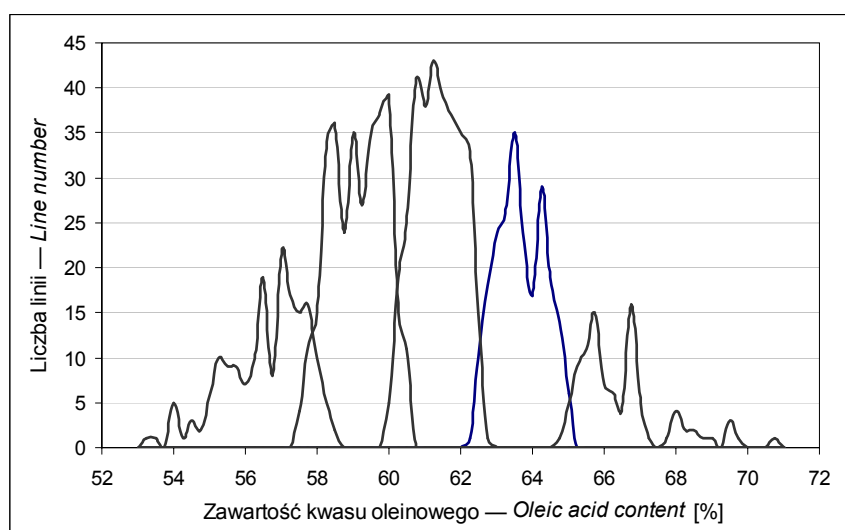


Rys. 5. Rozkład zawartości aktywności desaturazy kwasu oleinowego w nasionach populacji 918 linii wsobnych rzepaku ozimego zebranych w 1996 roku (rozdzielczość 0,004 jednostek kt) oraz krzywa rozkładu normalnego — *Distribution of activity of oleic acid desaturase in seed of 918 inbred lines of winter oilseed rape harvested in 1996 (resolution 0.004 kt units) and curve of normal distribution and critical value for significant differences between fraction means*

Analiza skupień

Wykryte na histogramie piki, uzyskane dzięki dużej liczebności populacji i wprowadzeniu optymalnej rozdzielczości, nasuwają przypuszczenie, że są one wynikiem sumowania się pików należących do różnych genotypów występujących w badanej populacji. Piki te mimo zachodzenia na siebie, różnią się w sposób istotny pod względem zawartości kwasu oleinowego. Aby znaleźć pierwotne piki składowe posłużono się grupowaniem linii za pomocą analizy skupień.

Pierwszego grupowania dokonano na całej populacji linii wsobnych. Populację tę podzielono na pięć różniących się bardzo istotnie grup. Grupowanie oparto na analizie zawartości kwasów: oleinowego, linolowego i linolenowego. Wynik tego grupowania został przedstawiony w postaci histogramu na rysunku 6.



Rys. 6. Histogramy pięciu grup uzyskanych poprzez analizę skupień wykonaną dla całej populacji linii w oparciu o zawartości: kwasów oleinowego, linolowego i linolenowego — *Histograms of five groups obtained with cluster analysis based on oleic, linoleic and linolenic acid contents*

Histogramy poszczególnych grup posiadają skomplikowaną budowę i zawierają nadal dwa do trzech lub więcej wierzchołków. W tej sytuacji okazało się konieczne lepsze sprecyzowanie zasad grupowania.

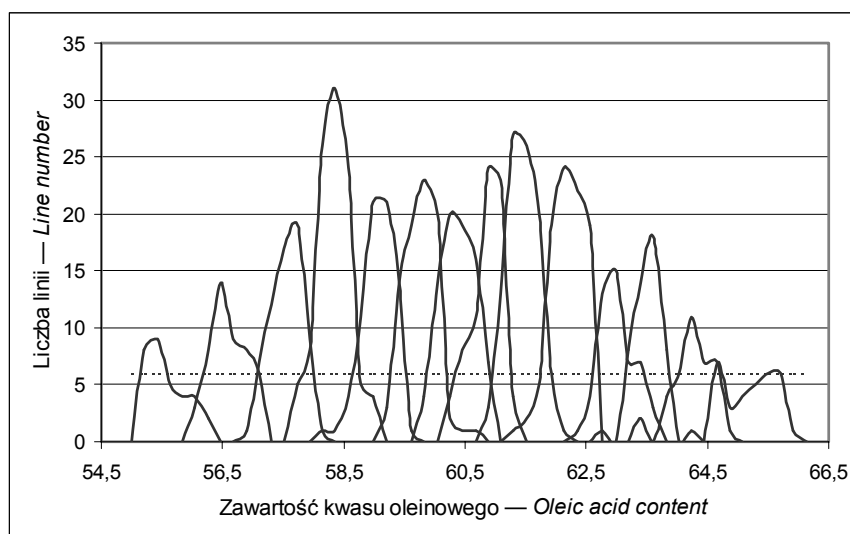
Pierwszym pytaniem, na które należało odpowiedzieć był dobór odpowiednich cech, które zapewniłyby najbardziej skuteczne grupowanie. Do analizy statystycznej użyto więc cech, które mają największy wpływ na zawartość kwasu oleinowego. Na zawartość tego kwasu w oleju rzepakowym największy wpływ powinna mieć aktywność desaturazy oleinowej, która przekształca kwas oleinowy w kwas linolowy. Desaturaza stearynowa nie może mieć większego wpływu ze względu

na stały, niski poziom jej substratu, jakim jest kwas stearynowy (około 1–1,5%). W dalszych poszukiwaniach elementów nieciągłości w rozkładzie kwasu oleinowego uwzględniono więc tylko substrat i produkt desaturazy oleinowej, to jest kwas oleinowy i sumę kwasów linolowego i linolenowego. Konieczność uwzględnienia kwasu linolenowego wynika z faktu, że część powstającego kwasu linolowego ulega dalszemu odwodornieniu do kwasu linolenowego przez desaturazę linolową (Scheffler i in. 1997).

Dla ustalenia optymalnej liczby grup posłużono się następującymi kryteriami:

- 1) liczba grup powinna być rzędu liczby nie rozdzielonych pików na histogramie przedstawionym na rysunku 4,
- 2) grupy te powinny różnić się optymalnie w sposób istotny statystycznie,
- 3) histogramy grup powinny posiadać po jednym wierzchołku i przypominać w przybliżeniu rozkład normalny.

Dalsze badania przeprowadzono po odrzuceniu linii zebranych w 1997 roku, aby uniknąć wpływu zmian klimatycznych na zawartość kwasu oleinowego. W wyniku otrzymano populację 918 linii wsobnych, które za pomocą analizy skupień próbowano podzielić na różne liczby grup. Najbardziej optymalny okazał się podział na 14 grup. Histogramy otrzymanych w ten sposób skupień przedstawiono na rysunku 7, charakterystykę statystyczną w tabeli 2, a ich analizę wariancji w tabeli 3.



Rys. 7. Histogramy 14 grup linii utworzonych z populacji 918 linii wsobnych na podstawie analizy skupień w oparciu o zawartości kwasu oleinowego i sumy kwasów linolowego i linolenowego
Histograms of 14 groups of lines obtained with cluster analysis of 918 inbred lines based on the contents of oleic acid and sum of linoleic and linolenic acids

Tabela 2

Statystyki opisowe 14 grup skupień pod względem zawartości kwasu oleinowego
Descriptive statistics for 14 groups according to the oleic acid content

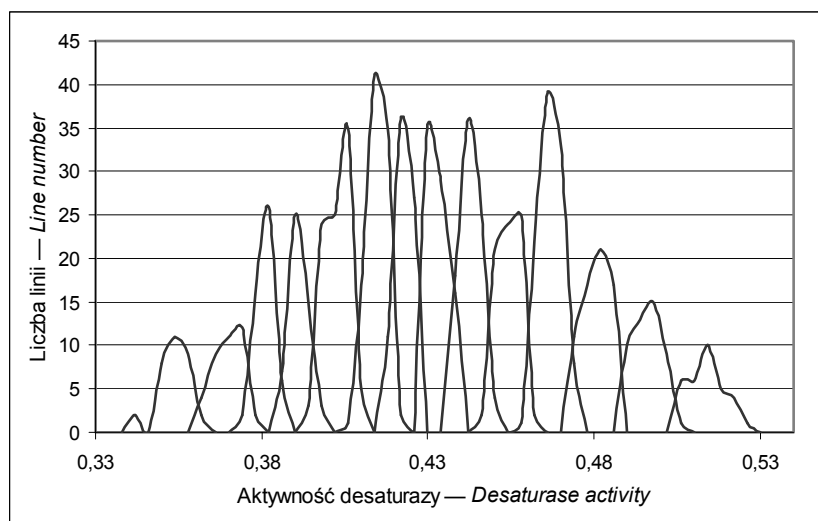
| Grupa <i>Group</i> | Liczba linii <i>Line number</i> | Średnia <i>Mean</i> | Błąd standardowy <i>Standard error</i> | Wariancja <i>Variance</i> | Zakres <i>Range</i> | Minimum | Maksimum |
|-----------------------|------------------------------------|------------------------|---|------------------------------|------------------------|---------|----------|
| 1 | 32 | 55,48 | 0,0581 | 0,1078 | 1,16 | 55,02 | 56,18 |
| 2 | 48 | 56,50 | 0,0416 | 0,0831 | 1,14 | 55,88 | 57,02 |
| 3 | 66 | 57,45 | 0,0350 | 0,0808 | 1,21 | 56,85 | 58,06 |
| 4 | 103 | 58,24 | 0,0265 | 0,0723 | 1,34 | 57,56 | 58,90 |
| 5 | 74 | 58,97 | 0,0317 | 0,0745 | 1,47 | 58,13 | 59,60 |
| 6 | 83 | 59,66 | 0,0296 | 0,0727 | 1,41 | 59,08 | 60,49 |
| 7 | 80 | 60,28 | 0,0292 | 0,0684 | 1,11 | 59,63 | 60,78 |
| 8 | 74 | 60,76 | 0,0307 | 0,0699 | 1,08 | 60,17 | 61,25 |
| 9 | 96 | 61,36 | 0,0251 | 0,0606 | 1,23 | 60,71 | 61,94 |
| 10 | 92 | 62,09 | 0,0274 | 0,0693 | 1,33 | 61,23 | 62,56 |
| 11 | 50 | 62,92 | 0,0405 | 0,0820 | 1,33 | 62,19 | 63,52 |
| 12 | 50 | 63,41 | 0,0343 | 0,0588 | 1,45 | 62,64 | 64,09 |
| 13 | 38 | 64,15 | 0,0517 | 0,1015 | 1,29 | 63,38 | 64,67 |
| 14 | 32 | 65,11 | 0,0713 | 0,1627 | 1,34 | 64,49 | 65,83 |

Tabela 3

Analiza wariancji dla zawartości kwasu oleinowego w 14 grupach
Variance analysis for oleic acid content in 14 groups

| Źródło wariancji <i>Source of variation</i> | SS | df | MS | F | Wartość p P-value |
|--|---------|-----|----------|--------|----------------------|
| Pomiędzy grupami <i>Among groups</i> | 5123,68 | 13 | 394,1292 | 5123,4 | 0,000000 |
| W obrębie grup <i>Inside groups</i> | 69,54 | 904 | 0,00769 | | |
| Razem — <i>Total</i> | 5193,22 | 917 | | | |

Jeszcze lepszy rozdział grup i symetrię pików otrzymano na histogramach dla aktywności desaturazy oleinowej (rys. 8). Jej charakterystykę statystyczną i analizę wariancji dla grup przedstawiono w tabelach 4 i 5.



Rys. 8. Histogramy aktywności desaturazy oleinowej dla 14 grup linii wsobnych utworzonych z populacji 918 linii — *Histograms of oleic desaturase activity for 14 groups of inbred lines obtained from population of 918 lines*

Tabela 4

Statystyki opisowe 14 grup skupień pod względem aktywności desaturazy oleinowej
Descriptive statistics for 14 groups according to the activity of oleic desaturase

| Grupa Group | Liczba linii Line number | Średnia Mean | Błąd standardowy Standard error | Wariancja Variance | Zakres Range | Minimum | Maksimum |
|----------------|-----------------------------|-----------------|------------------------------------|-----------------------|-----------------|---------|----------|
| 1 | 32 | 0,512 | 0,00098 | 3,07E-05 | 0,021 | 0,504 | 0,525 |
| 2 | 48 | 0,494 | 0,00062 | 1,87E-05 | 0,016 | 0,486 | 0,502 |
| 3 | 66 | 0,479 | 0,00053 | 1,82E-05 | 0,015 | 0,471 | 0,486 |
| 4 | 103 | 0,465 | 0,00034 | 1,20E-05 | 0,015 | 0,458 | 0,472 |
| 5 | 74 | 0,452 | 0,00040 | 1,19E-05 | 0,013 | 0,445 | 0,458 |
| 6 | 83 | 0,441 | 0,00033 | 0,91E-05 | 0,011 | 0,436 | 0,447 |
| 7 | 80 | 0,431 | 0,00033 | 0,85E-05 | 0,010 | 0,416 | 0,436 |
| 8 | 74 | 0,421 | 0,00032 | 0,75E-05 | 0,011 | 0,414 | 0,426 |
| 9 | 96 | 0,413 | 0,00032 | 0,97E-05 | 0,014 | 0,405 | 0,419 |
| 10 | 92 | 0,401 | 0,00038 | 1,35E-05 | 0,014 | 0,393 | 0,407 |
| 11 | 50 | 0,389 | 0,00044 | 0,95E-05 | 0,011 | 0,384 | 0,396 |
| 12 | 50 | 0,379 | 0,00038 | 0,71E-05 | 0,010 | 0,374 | 0,384 |
| 13 | 38 | 0,368 | 0,00066 | 1,66E-05 | 0,016 | 0,360 | 0,376 |
| 14 | 32 | 0,352 | 0,00157 | 2,33E-05 | 0,020 | 0,338 | 0,359 |

Tabela 5

Analiza wariancji dla aktywności desaturazy oleinowej w 14 grupach
Variance analysis for oleic desaturase activity in 14 groups

| Źródło wariancji <i>Source of variation</i> | SS | df | MS | F | Wartość-p P-value |
|--|---------|-----|----------|--------|----------------------|
| Pomiędzy grupami <i>Among groups</i> | 1,40999 | 13 | 0,10846 | 8618,3 | 0,000000 |
| Wewnątrz grup <i>Inside groups</i> | 0,01137 | 904 | 1,26E-05 | | |
| Razem — <i>Total</i> | 1,42137 | 917 | | | |

Przy grupowaniu linii spodziewano się dużego wpływu desaturazy kwasu oleinowego na zawartość tego kwasu w oleju z nasion rzepaku. Potwierdza to równanie regresji obliczone dla tych cech.

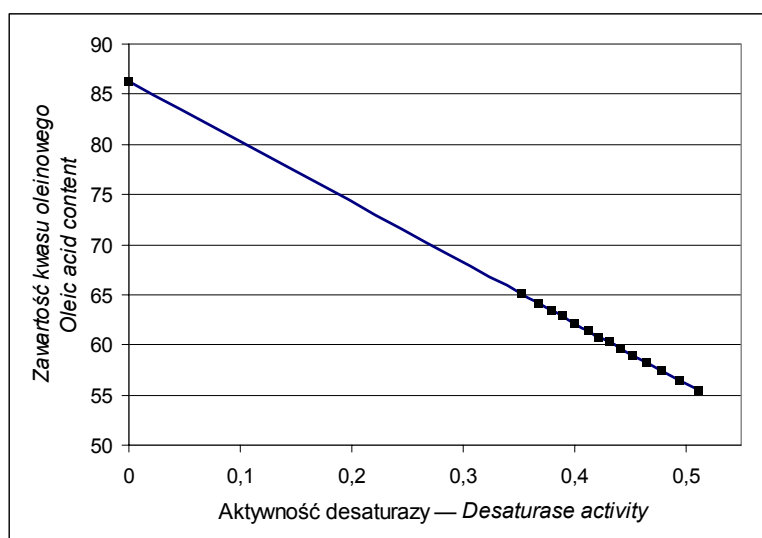
$$C_{18:1} = 86,2947 - 60,3282 \times kt \quad (3)$$

gdzie — *where:*

$C_{18:1}$ = zawartość kwasu oleinowego — *oleic acid content*

kt = aktywność desaturazy — *desaturase activity*

Regresja ta jest bardzo istotna ($r^2 = 0,999517$). Przebieg krzywej regresji przedstawiono na rysunku 9. Jak widać, przy zerowej aktywności desaturazy zawartość kwasu oleinowego w oleju z nasion rzepaku powinna wynosić około 86%.



Rys. 9. Korelacja pomiędzy zawartością kwasu oleinowego a aktywnością desaturazy oleinowej
Correlation between oleic acid content and oleic acid desaturase activity

Wnioski

1. Dzięki zastosowaniu w badaniach bardzo licznej populacji linii wsobnych udało się wykryć niejednorodność rozkładu zawartości kwasu oleinowego w oleju z nasion linii wsobnych. Ta niejednorodność spowodowała wystąpienie szeregu nie w pełni rozdzielonych pików na histogramie, jednak różniących się w sposób istotny pod względem zawartości tego kwasu.
2. Uzyskana zwiększona rozdzielczość i zastosowanie analizy skupień pozwoliły na podzielenie populacji linii wsobnych na grupy różniące się wyraźnie i istotnie pod względem wartości średnich dla zawartości kwasu oleinowego.
3. Histogramy dla znalezionych grup mają po jednym wierzchołku (z wyjątkiem niewystarczająco licznych grup skrajnych) i rozkład z grubsza podobny do normalnego.
4. Grupom tym odpowiadają prawdopodobnie genotypy złożone z różnych kombinacji genów lub ich alleli warunkujących zawartość kwasu oleinowego w oleju z nasion. Hipoteza ta powinna być zweryfikowana za pomocą badań różnic w strukturze DNA pomiędzy poszczególnymi grupami.
5. Geny te kontrolują nie tyle syntezę kwasu oleinowego lecz raczej jego zużycie w procesie desaturacji do kwasu linolowego. U rzepaku znaleziono i zbadano szereg desaturaz kwasu linolowego (Scheffler i in. 1997).
6. Na zawartość kwasu oleinowego w oleju z nasion rzepaku decydujący wpływ miała aktywność desaturazy kwasu oleinowego. Korelacja między tymi cechami okazała się, zgodnie z przewidywaniami, ujemna i bardzo istotna statystycznie.
7. Histogramy grup wykreślone dla aktywności desaturazy oleinowej są lepiej rozdzielone i mają bardziej regularny kształt niż histogramy grup dla kwasu oleinowego.

Podziękowanie

Autorzy pragną podziękować Panu dr Krzysztofowi Michalskiemu i całemu personelowi Laboratorium Biochemicznego IHAR w Poznaniu za wykonanie precyzyjnych analiz chemicznych.

Literatura

- Allard R.W. 1968. Podstawy hodowli roślin. PWRiL Warszawa.
- Anand I.J., Downey R.K. 1981. A study of erucic acid alleles in digenomic rapeseed (*Brassica napus* L.). *Can. J. Plant Sci.*, 61: 199-203.
- Aronel V., Lemieux B., Hwang I., Gibson S., Goodman H.M., Somerville C.R. 1992. Map-based cloning of gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in *Arabidopsis*. *Science*, 258: 1353-1355.
- Barret P., Delourme R., Foisset N., Renard M., Domergue F., Lessire R., Delseny M., Roscoe T. 1998. A rapeseed FAE1 gene is linked to the E1 locus associated with variation in the content of erucic acid. *Theor. Appl. Genet.*, 96: 177-186.
- Bartkowiak-Broda I., Krzymański J. 1981. Zmiany w składzie chemicznym nasion ozimego rzepaku bezerukowego K-2040 w czasie formowania i dojrzewania. *Biuletyn IHAR*, 146: 25-33.
- Brown J., McCaffrey J.P., Harmon B.L., Davis J.B., Brown A.P., Erickson D.A. 1999. Effect of late season insect infestation on yield, yield components and oil quality of *Brassica napus*, *B. rapa*, *B. juncea* and *Sinapis alba* in the Pacific Northwest region of the United States. *J. Agric. Sci.*, 132 (3): 281-288.
- Byczyńska B., Krzymański J. 1969. Szybki sposób otrzymywania estrów metylowych kwasów tłuszczowych do analizy metodą chromatografii gazowej. *Tłuszcze Jadalne*, XIII: 108-114.
- Cassagne C., Lessire R., Bessoule J.J., Moreau P., Creach A., Scheider F., Sturbois F. 1994. Biosynthesis of very long fatty acids in higher plants. *Prog. Lipid Res.*, 33: 55-69.
- Chen J.L., Beversdorf W.D. 1990. A comparison of traditional and haploid-derived breeding populations of oilseed rape (*Brassica napus* L.) for fatty acid composition of the oil. *Euphytica*, 51: 59-65.
- Chen B.Y., Heneen W.K. 1989. Fatty acids composition of resynthesized *Brassica napus* L., *B. campestris* L. and *B. alboglabra* Bailey with special reference to the inheritance of erucic acid content. *Heredity*, 63: 309-314.
- Clemens S., Kunst L. 1997. Isolation of a *Brassica napus* cDNA (Accession No. AF009563) encoding 3-ketoacyl-CoA synthase, a condensing enzyme involved in the biosynthesis of very long chain fatty acids in seeds. *Plant Physiol.*, 115: 313-314.
- Dembiński F., Jaruszewska H., Krzywińska F., Krasnodębski P. 1967a. Wpływ różnej wilgotności gleby i nawożenia azotowego na skład kwasów tłuszczowych oleju z nasion rzepaku jarego. *Pamiętnik Puławski*, 25: 241-250.
- Dembiński F., Krasnodębski P., Orłowska T. 1967b. Skład kwasów tłuszczowych oleju rzepakowego w zależności od odmiany, środowiska oraz pory siewu i sprzętu. *Pamiętnik Puławski*, 25: 5-23.
- Fourmann M., Berret P., Renard M., Pelletier G., Delourme R., Brunel D. 1998. The two genes homologous to *Arabidopsis* FAE1 co-segregate with the two loci governing erucic acid content in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.*, 96: 852-858.
- Górnik K., Grzesik M. 1998. Genetyczne, siedliskowe i maternalne uwarunkowanie jakości nasion. *Post. Nauk Rol.*, 5: 37-47.
- Harvey B.L., Downey R.K. 1964. The inheritance of erucic acid content in rapeseed (*Brassica napus*). *Can. J. Plant Sci.*, 44: 104-111.
- Jones A., Davies H.M., Voelker T.A. 1995. Palmitoyl-acyl carrier protein (ACP) thioesterase and the evolutionary origin of plant acyl-ACP thioesterases. *Plant Cell.*, 7: 359-371.
- Jönsson R. 1977. Erucic-acid heredity in rapeseed (*Brassica napus* L. and *Brassica campestris* L.). *Hereditas*, 86: 159-170.

- Kachlicki P. 2003. Rola metabolitów wtórnych w interakcji grzyba *Phoma lingam* z roślinami rzepaku (*Brassica napus* L.). J. Applied Genetics., Seria Rozprawy i Monografie (w druku).
- Kondra Z.P., Stefansson B.R. 1965. Inheritance of erucic and eicosenoic acid content of rapeseed oil (*Brassica napus*). Can. J. Genet. Cytol., 7: 505-510.
- Krzymański J. 1960. Wpływ warunków zewnętrznych oraz stopnia dojrzałości na jakość oleju z nasion roślin oleistych. Biuletyn IHAR, 3: 61-63.
- Krzymański J. 1970. Genetyczne możliwości ulepszania składu chemicznego nasion rzepaku ozimego. Hodowla Roślin Aklimatyzacja i Nasiennictwo, 14: 95-133.
- Krzymański J. 1971. Zmiany składu kwasów tłuszczowych w czasie kiełkowania nasion rzepaku. Biuletyn IHAR, 5: 55-56.
- Krzymański J., Piotrowska A., Smólska B. 1967. Badania nad dziedziczeniem się zawartości kwasu erukowego u mieszańców rzepaku jarego (Bronowski × Liho). Biuletyn IHAR, 6: 17-19.
- Krzymański J., Downey R.K. 1969. Inheritance of fatty acid composition in winter forms of rapeseed, *Brassica napus*. Can. J. Plant Sci., 49: 313-319.
- Krzymański J., Bulinska M., Korytowska W., Piętka T. 1983. Odziedziczalność i heterozja niektórych cech u rzepaku ozimego dwuzerowego (*Heritability and heterosis of some traits of double low winter oilseed rape*). Zeszyty problemowe Postępów Nauk Rolniczych, 290: 141-158.
- Krzymański J., Piętka T., Krótka K. 1992. Zdolność kombinacyjna i heterozja mieszańców między czołowymi poznańskimi rodami rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego. Zeszyty Problemowe IHAR, Rośliny Oleiste, XIV: 37-46.
- Krzymański J., Piętka T., Krótka K. 1993. Zdolność kombinacyjna i heterozja mieszańców diallelicznych rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego. I. Pokolenie F₁. Postępy Nauk Rolniczych, 5/245: 41-52.
- Krzymański J., Piętka T., Krótka K. 1994. Zdolność kombinacyjna i heterozja mieszańców diallelicznych rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego. II. Pokolenie F₁ i F₂. Rośliny Oleiste – Oilseed Crops, XV (1): 21-32.
- Krzymański J., Piętka T., Ogrodowczyk M., Krótka K. 1999. Ocena wartości kombinacyjnej mieszańców między liniami wsobnymi rzepaku ozimego i odmianami wykonana w układzie czynnikowym. I. Pokolenie F₁ (*Estimation of combining ability for hybrids between winter oilseed rape inbred lines and varieties made in factor design. I. F₁ generation*). Rośliny Oleiste – Oilseed Crops, XX (2): 335-346.
- Kubacka W., Kubacki S., Krzymański J. 1977. Projekt normy metody oznaczania zawartości kwasu erukowego w nasionach rzepaku niskoerukowego. Wyniki badań nad rzepakiem ozimym – lata 1975-76, 2: 177-183.
- Kulka K., Górecki J.R. 1995. Lipidy rozwijających się nasion. Cz. II. Gromadzenie lipidów w nasionach. Post. Nauk Rol., 42 (4): 45-55.
- Muśnicki C., Tobała B., Muśnicka B. 1999. Wpływ niektórych czynników agrotechnicznych i siedliskowych na jakość plonu rzepaku ozimego. Rośliny Oleiste – Oilseed Crops, XX (2): 459-469.
- Lassner M.W., Levering C.K., Davies H.M., Knutzon D.S. 1995. Lysophosphatidic acid acyltransferase from meadowfoam mediates insertion of erucic acid at the sn-2 position of triacylglycerol in transgenic rapeseed oil. Plant Physiol., 109: 1389-1394.
- Lassner M.W., Lardizabal K., Metz J.G. 1996. A jojoba β-ketoacyl-CoA synthase cDNA complements the canola fatty acid elongation mutation in transgenic plants. Plant Cell, 8: 281-292.
- Millar A., Kunst L. 1997. Very long chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme. Plant J., 12: 121-131.

- Lühs W.W., Voss J., Han A., Gräfin zu Münster D., Weier F.P., Wolter F.P., Frentzen M., Friedt W. 1998. Genetic modification of eruci acid biosynthesis in *Brassica napus*. Proc. XVth Eucarpia Congress, Viterbo, Italy, 20-25.9.1998, 323-330.
- Ogrodowczyk M., Spasibionek S., Krzymański J. 1996. Badania interakcji genotypu ze środowiskiem dla nowych rodów rzepaku ozimego. (*Estimation of interaction genotype and environment for new strains of winter oilseed rape*). Rośliny Oleiste – Oilseed Crops, XVII (1): 95-106.
- Piętka T., Krótka K., Krzymański J. 2000. Ocena wartości kombinacyjnej mieszańców między liniami wsobnymi rzepaku ozimego i odmianami wykonana w układzie czynnikiemowym. II. Pokolenia F_1 i F_2 (*Estimation of combining ability for hybrids between winter oilseed rape inbred lines and varieties made in factor design. II F_1 and F_2 generations*). Rośliny Oleiste – Oilseed Crops, XXI: 329-340.
- Piętka T., Krótka K., Krzymański J. 2001. Badania nad zdolnością kombinacyjną w odniesieniu do zawartości glukozynolanów w pokoleniach F_1 i F_2 mieszańców liniowo-odmianowych rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.). (*Study on combining ability in respect of glucosinolate content in F_1 and F_2 generations of winter rape hybrid (*Brassica napus* L.)*). Rośliny Oleiste – Oilseed Crops, XXII: 303-314.
- Piętka T., Krótka K., Krzymański J. 2003. Możliwości modyfikowania składu kwasów tłuszczowych w nasionach rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego poprzez selekcję w populacji linii wsobnych. (*Modyfication possibilities of fatty acid composition in seeds of double low winter oilseed rape with the use of selection in inbred line population*). Rośliny Oleiste – Oilseed Crops, XXIV (2): 327-341.
- Polskie Normy: PN-EN-ISO 5508: 1996. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Analiza estrów metylowych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej.
- Polskie Normy: PN-ISO 5509: 1996. Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Przygotowanie estrów metylowych kwasów tłuszczowych.
- Scheffler J.A., Sharpe A.G., Schmidt H., Sperling P., Parkin I.A.P., Lühs W., Lydiat D.J., Heinz E. 1997. Desaturase multigene families of *Brassica napus* arose through genome duplication. Theor. Appl. Genet., 94: 583-591.
- Schierholt A., Ruecker B., Becker H.C. 2001. Inheritance of high oleic mutations in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) Crop Sci., 41 (5): 1444-1449.
- Slabas A.R., Simon J.W., Elborough K.M. 1995. Information needed to create new oil crops. Inform, 6/2: 159-166.
- Spasibionek S., Byczyńska B., Krzymański J. 1998. Wpływ środowiska na zmiany składu kwasów tłuszczowych w oleju mutantu 1207 rzepaku ozimego. Rośliny Oleiste – Oilseed Crops, XIX (2): 627-632.
- Wiązecka K., Krzymański J. 1970. Zmiany w składzie chemicznym nasion rzepaku ozimego w czasie ich formowania i dojrzewania. Hodowla Roślin, Aklimatyzacja i Nasiennictwo 14/3: 291-308.
- Yadav N.S., Wierzbicki A., Aegerter M., Caster C.S., Perez-Grau L., Kinney A.J., Hitz W.D., Booth J.R.Jr., Schweiger B. Stecca K.L. i in. 1993. Cloning of higher plant omega-3 fatty acid desaturases. Plant Physiol., 103/2: 467-476.