

Stanisław Spasibonek

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Zakład Roślin Oleistych w Poznaniu

Znaczenie mutagenezy w tworzeniu nowych genotypów roślin oleistych o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych

The importance of mutagenesis in the development of new genotypes of oilseed crops with changed fatty acid composition

Słowa kluczowe: kwasy tłuszczowe, mutageneza, rośliny oleiste

Key words: fatty acids, mutagenesis, oilseed crops

Oleje roślinne, a zwłaszcza występujące w nich 18-węglowe kwasy tłuszczowe, mają istotne znaczenie w żywieniu człowieka, a także mogą być wykorzystane dla różnych celów technicznych. Stąd potrzebne są oleje o różnym składzie kwasów tłuszczowych. Znaczącą rolę w tworzeniu nowej zmienności kwasów tłuszczowych u roślin oleistych odgrywa indukowana mutageneza. Artykuł ten traktuje o możliwościach wykorzystania olejów roślinnych o określonym składzie kwasów tłuszczowych oraz o dotychczasowych wynikach hodowli mutacyjnej takich roślin oleistych, jak: rzepak, soja, słonecznik, len.

Vegetable oils, especially C₁₈ fatty acids, which occur in them have essential importance for human nourishment and also they can be used for different technical purposes. Therefore oils with different fatty acid composition are needed. Induced mutagenesis plays significant part in the development of new fatty acid variability in oilseed crops. This paper considers the possibilities of utilization of vegetable oils with desirable oil profile as well as the present results of mutagenesis breeding of oilseed plants, such as: rapeseed, soybean, sunflower, linseed.

Wykorzystanie oleju o różnym składzie kwasów tłuszczowych 18-węglowych

Intensywne badania nad rolą tłuszczów roślinnych w procesach metabolicznych organizmu człowieka ze szczególnym uwzględnieniem roli poszczególnych kwasów tłuszczowych zaczęto już w latach 50-tych. Uzyskane dane doprowadziły do całkowitej zmiany poglądów dotyczących fizjologicznej roli tłuszczów. Ustalono, że tłuszcze stanowią nie tylko główne źródło energii, ale także dostarczają ustrojowi człowieka niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych oraz są nośnikiem witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, tj. witamin A, D, E i K. Tłuszcze pełnią także rolę strukturalną, stanowiąc część składową

komórek tkanek ustrojowych, między innymi błon organelli komórkowych. Biorą one również udział w syntezie prostaglandyn i regulacji zawartości lipidów w krwi (Ziemiański 1994).

W ostatnim dziesięcioleciu w Europie Zachodniej wyraźnie wzrosło wykorzystanie oleju rzepakowego do celów technicznych, a przede wszystkim do produkcji biopaliwa. Zainteresowanie wykorzystaniem oleju rzepakowego jako paliwa napędowego zostało podyktowane bardzo szybkim rozwojem transportu drogowego, który coraz mocniej zatruwa środowisko naturalne poprzez emisję dużej ilości CO₂, związków siarki i metali ciężkich (Conneman 1994; Grzybek 2002).

Zaletą oleju napędowego i smarów wytwarzanych z oleju nasion rzepaku jest ich całkowita biodegradacja. Badania dowodzą, że te paliwa i smary są rozkładane w glebie od 87 do 98% w ciągu trzech tygodni (Frąckowiak 2002).

Zastosowanie nieprzetworzonego oleju rzepakowego w silnikach o zapłonie samoczynnym z wtryskiem bezpośrednim powoduje zazwyczaj tworzenie się osadów nagaru wokół otworów wtryskowych rozpylaczy, dlatego aby poprawić cechy użytkowe oleju należy go zestryfikować do estrów metylowych. W wyniku tej reakcji chemicznej estry metylowe wyższych kwasów tłuszczowych oleju rzepakowego stają się wartościowym paliwem mogącym zastąpić olej napędowy nawet w 100%. Rzepakowe „ekopaliwo” można mieszać w dowolnych proporcjach z paliwami otrzymywanymi z ropy naftowej. Do zasilania silników wysokoprężnych może być stosowane więc zarówno samo biopaliwo, jak i jego mieszaniny z olejem ropopochodnym (Koeker 1994).

Według Scarth i McVetty (1999) duże znaczenie tłuszczów roślinnych zarówno w przemyśle spożywczym, jak również w przemyśle chemicznym zależy od poszczególnych kwasów tłuszczowych oraz proporcji pomiędzy kwasami nasyconymi a kwasami jedno- i wielonienasyconymi.

Pozyskanie oleju rzepakowego o zmniejszonej zawartości kwasów wielonienasyconych, szczególnie kwasu linolenowego do 4% i podwyższonej kwasu oleinowego do 75% zdecydowanie podniosłoby jego walory smażalnicze. Olej o podobnym składzie jest pożądanym również do produkcji smarów i paliwa dla silników wysokoprężnych.

Oleje o zbyt dużej zawartości kwasu linolenowego i linolenowego, np. olej sojowy, ze względu na ich łatwość utleniania, mają obniżoną trwałość oraz stabilność smakowo-zapachową. Wykorzystanie takiego oleju jako surowca do produkcji biopaliwa może powodować, że estry kwasów tłuszczowych ulegając utlenianiu i polimeryzacji będą przyczyniać się do zatykania układu paliwowego oraz powstawania osadów na wtryskiwaczach i tłokach (Pałowski 1993; Roszkowski 1993; Tulisabo, Wuori 1993).

Olej o wysokiej zawartości kwasu oleinowego regularnie dostarczany w żywieniu może korzystnie wpływać na obniżenie poziomu cholesterolu w surowicy krwi. Badania epidemiologiczne potwierdzają, że wyższa koncentracja kwasu

oleinowego w diecie powoduje obniżenie poziomu szkodliwej formy cholesterolu we krwi (LDL — lipoproteiny niskiej gęstości) uznanej za najbardziej niebezpieczną w rozwoju miażdżycy naczyń krwionośnych ze względu na jej łatwe osadzanie się na ściankach i tworzenie złożeń cholesterolu zmniejszających światło naczyń. Kwas oleinowy jednocześnie nie obniża pożytecznej formy cholesterolu (HDL — lipoproteiny wysokiej gęstości) (Rakowska 1988; Hu i in. 1997).

Podwyższona do 26% zawartość kwasu linolowego i obniżona do 4% zawartość kwasu linolenowego jest korzystniejsza dla oleju sałatkowego i oleju stanowiącego płynną część osnowy margaryny. Kwas linolowy i linolenowy są kwasami egzogennymi i należą do grupy niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych, które muszą być dostarczane w pożywieniu. Nienasycone kwasy tłuszczowe, szczególnie linolowy i γ -linolenowy, biorą udział w tworzeniu prostaglandyny PGE₁ i prostacykliny, zwanych swoistymi hormonami tkankowymi. Związki te regulują napięcie ścian naczyń krwionośnych. Prostacyklina powoduje również rozszerzanie się naczyń krwionośnych, a w przypadku obniżenia jej stężenia w organizmie może wystąpić skurcz naczyń i spadek przepływu krwi (Horrobin 1990). Większość olejów jadalnych produkowanych dla przemysłu spożywczego jest poddawana procesowi hydrogenacji w celu wydłużenia okresu przechowywania i otrzymania tłuszczów stałych oraz margaryn. Zbyt duża zawartość kwasów wielonienasyconych utrudnia proces utwardzania tłuszczu. Kwasy wielonienasycone zwiększają zużycie wodoru i przedłużają czas reakcji, poza tym mogą być źródłem tworzenia się niepożądanych izomerów trans (Jakubowski, Braczkowski 1998). Izomery trans kwasów tłuszczowych prawdopodobnie zwiększają ryzyko powstania zakrzepów w tętnicy wieńcowej (Kinney 1996).

Aby uzyskać dalsze zmiany w zawartości omawianych kwasów tłuszczowych należy otwierać kolejne kierunki badań lub pogłębiać dotychczasowe, w których poszukiwane są nowe źródła zmienności. Do najważniejszych kierunków należy zaliczyć:

- Badanie kolekcji gatunku *Brassica napus* i gatunków pokrewnych, szczególnie *Brassica oleracea* i *Brassica campestris*, z których poprzez krzyżowanie międzygatunkowe i podwojenie liczby chromosomów można uzyskać syntetyczny rzepak o zróżnicowanym składzie chemicznym i innych wartościowych cechach.
- Indukowanie zmienności genetycznej na drodze mutagenezy chemicznej z zastosowaniem środków alkilujących oraz mutagenezy fizycznej z zastosowaniem promieniowania jonizującego.
- Dynamicznie rozwijające się w ostatnich latach metody biotechnologiczne (inżynieria genetyczna, fuzja protoplastów), które są dużym ułatwieniem w tworzeniu i analizowaniu uzyskanej zmienności genetycznej oraz w poszukiwaniu nowej.

W Zakładzie Roślin Oleistych Oddziału Poznańskiego Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin oraz w innych ośrodkach naukowych na świecie, między innymi w INRA we Francji, na Uniwersytecie w Göttingen i Giessen w Niemczech, na Uniwersytecie w Saskatchewan w Kanadzie dla uzyskania większej zmienności w zawartości kwasów tłuszczowych nasyconych, jedno- ($C_{18:1}$) i wielonienasyconych ($C_{18:2} + C_{18:3}$) w nasionach roślin oleistych prowadzone są prace nad indukowaniem mutacji.

Znaczenie mutagenezy w poszukiwaniu nowej zmienności

Wszystkie żywe organizmy, w tym również rośliny uprawne, zawdzięczają swoją zmienność mutacjom. Większość naturalnych mutacji ma charakter recesywny i bardzo niską częstotliwość rzędu 10^{-5} do 10^{-8} /locus (van Harten 1991). Od zarania dziejów mutacje spontaniczne były wykorzystywane w rolnictwie i w ogrodnictwie, a znalezione mutanty w trakcie udomawiania selekcjonowane w sposób nieświadomy. Selekcja mutantów spontanicznych ma miejsce również współcześnie, jednak mutageneza indukowana jest zdecydowanie wydajniejsza.

„Hodowla mutacyjna” jest powszechnie znaną i stosowaną metodą hodowli roślin. Jak podaje Auerbach (1976) pierwsze prace w tym zakresie zostały przeprowadzone przez Stadlera w 1928 roku na kukurydzy przy wykorzystaniu promieniowania X. W latach 50-tych dzięki nowym osiągnięciom fizyki jądrowej do wywoływania mutacji poza powszechnie stosowanymi promieniami Roentgena zaczęto stosować inne promienie jonizujące (β , γ), neutrony wytwarzane w reaktorze jądrowym oraz promieniowanie UV.

Z końcem lat 40-tych Auerbach (1949) stwierdziła, że niektóre związki chemiczne mogą indukować podobne mutacje, jak promieniowanie X. Związki chemiczne o działaniu mutagennym zostały podzielone na kilka grup w zależności od rozpuszczalności, lotności i praktycznej przydatności. Do najbardziej rozpowszechnionych w użyciu i do najbardziej skutecznych należy zaliczyć środki alkilujące, takie jak metanosulfonian etylu (EMS), N-nitrozo-N-metylomocznik (NMU), etylenoimina (EI).

Odkrycie Auerbach (1949) zapoczątkowało serię licznych badań prowadzonych z nadzieją, że w przeciwieństwie do nieukierunkowanego działania promieniowania jonizującego mutageny chemiczne będą działały w bardziej swoisty sposób, stwarzając tym samym możliwość ukierunkowania mutacji. Dalsze badania Auerbach (1973, 1976) dowiodły jednak, że mutageny chemiczne również nie są zdolne do indukowania ukierunkowanych mutacji. Dlatego w celu wyselekcjonowania jak największej liczby przydatnych mutantów zalecała poszukiwanie właściwych metod selekcji w kolejnych etapach programu hodowli mutacyjnej.

Na sukces wyselekcjonowania spodziewanego mutantu składa się wiele czynników. Jednym z ważniejszych jest ustalenie optymalnej dawki czynnika mutagenego, który w zależności od warunków zewnętrznych (światło, wilgotność, tempe-

ratura) może zmieniać swoje właściwości. W praktyce przeprowadza się wstępne badania mające na celu ustalenie dawek i sposobu traktowania (Auerbach 1976).

Wielkość dawki napromieniowania może być regulowana przez dobranie odpowiedniego źródła napromieniowania, właściwej odległości od niego i czasu ekspozycji. Napromieniowaniu można poddawać pyłek, nasiona, siewki, pączki lub całe rośliny (Ahloowalia, Maluszynski 2001). Podobne badania przeprowadza się indukując mutagenami chemicznymi. W tym przypadku należy ustalić odpowiednie stężenie i rodzaj mutagenu, temperaturę i czas nawilżania nasion, czas traktowania mutagenem, a następnie czas wyflukiwania mutagenu (Konzak 1984).

Ostatnio, dzięki dobremu opanowaniu techniki otrzymywania mikrospor *in vitro* można do wywołania mutacji stosować naświetlanie mikrospor promieniami jonizującymi lub poddawać je działaniu roztworami mutagenów chemicznych (Wong, Swanson 1991; Huang 1992; Cegielska *in.* 1999; Ahloowalia, Maluszynski 2001).

Stosowanie bardziej drastycznych warunków indukowania mutagenyzy zwiększa wprawdzie częstotliwość i głębokość mutacji, nie mniej jednak uzyskane tą drogą mutanty z powodu dużych zmian w aparacie genetycznym są mało żywotne, a ich praktyczne wykorzystanie wymaga długoletnich prac hodowlanych. Dlatego też prace selekcyjne powinny być prowadzone na dużym materiale, tak aby zwiększyć prawdopodobieństwo znalezienia korzystnych mutantów biorąc pod uwagę, że znaczna ich część nie będzie się nadawała do wykorzystania z powodu niepożądanych sprzężeń lub trudnych do usunięcia efektów ubocznych (Auerbach 1976; Krzymański 1997).

Zainteresowanie mutagenyzą w celu indukowania i selekcjonowania pożądanych zmian genetycznych u roślin uprawnych wzrosło na przełomie lat osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych (Maluszynski *in.* 1995; Ahloowalia, Maluszynski 2001). Wiąże się to ściśle z nowymi możliwościami prowadzenia selekcji *in vitro* komórek i tkanek poddawanych działaniu mutagenów oraz wykorzystania podwojonych haploidów do skracania cykli hodowlanych związanych z wyselekcjonowaniem pożądanych mutantów.

Hodowla mutacyjna rzepaku (*Brassica napus* L.)

W oleju nasion tradycyjnych odmian rzepaku ozimego zawartość kwasów tłuszczowych nasyconych wynosiła około 4%, kwasu oleinowego około 12%, kwasu linolowego około 13%, kwasu linolenowego około 9%, kwasu eikozenowego około 8% i kwasu erukowego około 53% (Krzymański 1970). Po wyeliminowaniu drogą hodowlaną kwasu erukowego, niepożądanego ze względu na jego złą wartość użytkową i technologiczną oleju, nastąpił wyraźny wzrost zawartości kwasów nienasyconych osiemnastowęglowych, a szczególnie kwasu jednonienasyconego — oleinowego i kwasów wielonienasyconych — linolowego i linolenowego (Krzymański, Downey 1969; Krzymański 1970, 1984, 1993).

Olej rzepakowy z odmian podwójnie ulepszonych należy do olejów roślinnych o najkorzystniejszym składzie kwasów tłuszczowych, w którym średni udział kwasów o 18 atomach węgla jedno- i wielonienasyconych wynosi: kwasu oleinowego 61%, kwasu linolowego 20%, kwasu linolenowego 11% i kwasu eikozenowego ($C_{20:1}$) 1,5%. Zawartość sumy kwasów tłuszczowych nasyconych waha się w granicach 7%, w tym średnio: kwasu palmitynowego ($C_{16:0}$) 4,5%, kwasu stearynowego ($C_{18:0}$) 1,5%, kwasu arachidowego ($C_{20:0}$) 0,5% i kwasu behenowego ($C_{22:0}$) 0,2%.

Zainteresowanie mutagenezą w celu indukowania i selekcjonowania pożądanych zmian jakościowych u roślin oleistych odnotowano w końcu lat sześćdziesiątych. W 1968 roku Rakow jako jeden z pierwszych badaczy rozpoczął prace nad zmianami proporcji kwasów tłuszczowych w oleju rzepakowym wykorzystując mutagenezę indukowaną chemicznie (Rakow 1973). Jako mutagen stosował metanosulfonian etylu uznawany przez takich badaczy jak Froese-Gerzen i in. (1963); Bell i Cervigni (1964), Thurling i Depittayan (1992) za bardzo skuteczny w wywoływaniu zmian zarówno morfologicznych w roślinie, jak również chemicznych w nasionach.

Rakow (1973) traktując nasiona rzepaku jarego odmiany Oro roztworem metanosulfonianu etylu o stężeniach 0,2 i 0,5% wyselekcjonował mutant M-57 o obniżonej do połowy zawartości kwasu linolenowego oraz mutant M-364 o dwukrotnie podwyższonej zawartości tego kwasu w stosunku do formy wyjściowej. Dalsze prace prowadzone przez Röbbelena i Nitscha (1975) doprowadziły do wyselekcjonowania kolejnych czterech mutantów M-3, M-6, M-8 i M-11 o podwyższonej do 37% zawartości kwasu linolowego i obniżonej do 3,5% zawartości kwasu linolenowego. W wyniku skrzyżowania mutant M-11 o zmienionych proporcjach kwasów wielonienasyconych z kanadyjską odmianą Regent, Scarth i in. (1988) wyselekcjonowali pierwszą odmianę rzepaku jarego Stellar z wysoką zawartością kwasu linolowego (28%) i niską zawartością kwasu linolenowego (3%). Powtórne traktowanie nasion Röbbelena i Nitscha (1975) przez wcześniej znalezione przez Rakowa (1973) mutant M-57 1% roztworem metanosulfonianu etylu zaindukowało nowe mutacje, dzięki czemu wyselekcjonowano 8 nowych mutantów o podwyższonej zawartości kwasu linolowego i obniżonej zawartości kwasu linolenowego. Rakow i in. (1987) w wyniku działania 0,1% roztworu EMS na nasiona odmiany Tower uzyskali zmiany w zawartości kwasu linolowego i linolenowego. Powtarzane w kolejnych pokoleniach zabiegi mutacyjne oraz krzyżowania pomiędzy mutantami dały w wyniku czternastoletnich prac linie o podwyższonej zawartości kwasu linolowego, pozostawiając zawartość kwasu linolenowego na niezmienionym poziomie. Auld i in. (1992) traktując nasiona odmiany Cascade 5% roztworem EMS wyselekcjonowali mutant X-82 o obniżonej zawartości kwasów wielonienasyconych, a znacznie podwyższonej do 88% zawartości kwasu oleinowego. Rücker i Röbbelen (1995, 1997) traktując 2%

roztworem EMS nasiona odmiany Wotan uzyskali mutanty o podwyższonej od 75 do 80% zawartości kwasu oleinowego, podczas gdy odmiana wyjściowa zawierała 60,3% kwasu oleinowego. Jednocześnie u tych mutantów obniżyła się zawartość kwasów wielonienasyconych. W Zakładzie Roślin Oleistych IHAR w Poznaniu Byczyńska i in. (1996) traktując nasiona rodu hodowlanego rzepaku ozimego PN 3756/93 roztworem metanosulfonianu etylu o stężeniach 0,5 i 1% wyselekcjonowali linię mutantą 1207 o podwyższonej zawartości kwasu oleinowego i obniżonej zawartości kwasów wielonienasyconych. Dla osiągnięcia głębszych zmian nasiona tej linii poddano powtórnie działaniom metanosulfonianu etylu o stężeniach 2, 5 i 8%. Na podstawie tych prac wyselekcjonowano dwa mutanty M-10453 i M-10464 o wysokiej zawartości kwasu oleinowego (do 80,6%) i obniżonej zawartości kwasów linolowego (do 6,7%) i linolenowego (do 6,2%) oraz mutantą M-681 o wysokiej zawartości kwasu linolowego (do 27,5%) i znacznie obniżonej zawartości kwasu linolenowego (do 1,5%) (Spasibionek i in. 2000, Spasibionek 2002).

Hodowla mutacyjna soi (*Glycine max* (L.) Merr.)

Hodowla mutacyjna soi jest powszechną i skuteczną drogą otrzymywania wartościowych genotypów. W przeszłości przy zastosowaniu mutagenyzy wyhodowano szereg nowych odmian, np. Universal, Volna, Arkadiya Odesskaya (Sichkar 1986). W ostatnich latach otrzymano szereg mutantów o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych oraz mutanty tolerancyjne na herbicydy (Singh, Hymowitz 1999). Kinoshita i in. (1998) otrzymali mutanty zarówno o podwyższonej, jak i obniżonej zawartości kwasu palmitynowego. Takagi i in. (1999) otrzymali mutanty o obniżonej zawartości kwasu linolenowego po powtórnym napromieniowaniu promieniami X otrzymanych mutantów.

Hodowla mutacyjna słonecznika (*Helianthus annuus* L.)

Mutagenyza odegrała również istotną rolę w poszukiwaniu nowych źródeł genetycznej zmienności u słonecznika (*Helianthus annuus* L.). Tą drogą udało się uzyskać linie słonecznika o zmienionej zawartości kwasów nasyconych — palmitynowego i stearynowego oraz kwasu jednonienasyconego — oleinowego. Ivanov i in. (1988) działając na nasiona słonecznika promieniami γ uzyskali mutantą 275HP o podwyższonej zawartości kwasu palmitynowego z 7% w materiale wyjściowym do 25,1% w omawianym mutancie. W pracach Osorio i in. (1995) wykorzystano chemiczną mutagenyzę działającą na nasiona metanosulfonianem etylu (EMS) i azydkiem sodu (NaN_3), co spowodowało wyselekcjonowanie dwóch mutantów CAS-5 i CAS-4 o podwyższonej zawartości kwasu stearynowego, odpowiednio do 26% i 11,3%, gdy linia rodzicielska RDF-1-532 zawierała 5,5% tego kwasu. Następnie Osorio i in. (1995) poddawali napromieniowaniu promieniami X nasiona linii BSD-2-691 uzyskując mutantą CAS-5, w którym zawartość

kwasy palmitynowego wzrosła z 5,5 do 25,2%. W wyniku dwukrotnego działania na nasiona rodu wyjściowego HA-382, a następnie na nasiona zmutowanych linii mutagenami EMS i NMU, Vick i Miller (1996) uzyskali mutant M-4229, w którym zawartość kwasu oleinowego wyraźnie wzrosła. Uzyskane mutanty słonecznika o zmienionych proporcjach kwasów tłuszczowych posłużyły do dalszych badań mających na celu znalezienie genów warunkujących cechy podwyższonej zawartości kwasu palmitynowego, stearynowego i oleinowego. Perez-Vich i in. (1999) na podstawie analizy genetycznej znaleźli trzy geny *p1*, *p2* i *p3*, które są zaangażowane w kontrolę wysokiej zawartości kwasu palmitynowego u mutantu słonecznika CAS-5. Szczegółowe badania tych autorów wykazały, że allele *p2* i *p3* były już obecne w linii wyjściowej BSD-2-691 użytej do mutagenyzy natomiast allele *p1* powstał w wyniku działania mutagenu. Natomiast Fick (1984) i Urie (1984) dowiedli, że cecha wysokiej zawartości kwasu oleinowego jest kontrolowana przez pojedynczy gen *Ol*. Miller i in. (1987) w swoich badaniach odkryli drugi gen *Ml* zaangażowany w kontrolę wysokiej zawartości kwasu oleinowego.

Hodowla mutacyjna lnu (*Linum usitatissimum* L.)

Większość prac związanych z hodowlą mutacyjną lnu koncentrowała się nad obniżaniem zawartości kwasu linolenowego. Green i Marshall (1984) uzyskali obniżenie zawartości kwasu linolenowego w oleju lnu stosując dwustopniowe działanie na nasiona 0,3% lub 0,4% roztworem EMS w temperaturze obniżonej do 2°C oraz w temperaturze pokojowej. Wyselekcjonowane dwa mutanty M-1589 i M-1722 posiadały obniżony poziom kwasu linolenowego, odpowiednio do 31,1% i 28,9% w stosunku do linii rodzicielskiej, która zawierała 43,4% tego kwasu. Na podstawie analiz genetycznych tych mutantów stwierdzono, że obniżenie zawartości kwasu linolenowego było konsekwencją mutacji pojedynczych genów występujących w różnych grupach sprzężeń, a działających w sposób addytywny. Zmutowane allele zostały oznaczone przez Greena (1986) jako *Ln1^o* i *Ln2^o*. Rowland i Bhaty (1990) poddali działaniu EMS nasiona odmiany McGregor o typowym dla lnu składzie kwasów tłuszczowych, tj.: palmitynowy 6,8%, stearynowy 3,7%, oleinowy 17,9%, linolowy 15,8% i linolenowy 54,5%. Uzyskali trzy mutanty o zmienionych proporcjach kwasów tłuszczowych. Mutanta E-67 o podwyższonej do 28,4% zawartości kwasu palmitynowego, mutant E-1929 o podwyższonej do 34,7% zawartości kwasów oleinowego i do 30,1% zawartości linolowego, a o obniżonej do 25,2% zawartości kwasu linolenowego oraz mutant E-1747 charakteryzującego się największymi zmianami, bowiem zawartość kwasu linolowego wzrosła w nim do 70,3%, a linolenowego obniżyła się do 2%. Badania genetyczne Rowlanda (1991) wykazały, że niska zawartość kwasu linolenowego u mutantu E-1747 była wynikiem dwóch niezależnych mutacji, a zmutowane loci u tego mutantu różniły się od zmutowanych loci wcześniej otrzymanych mutantów M-1589 i M-1722. Późniejsze badania Ntiamoaha i Rowlanda (1997) wykazały, że

niska zawartość kwasu linolenowego u mutantu E-1929 była kontrolowana przez pojedynczy gen recesywny, alleliczny względem jednego z dwóch genów występujących u mutantu E-1747.

Hodowla mutacyjna innych roślin oleistych

Niewiele badań wykorzystujących mutagenezę było poświęconych zmianom składu kwasów tłuszczowych u mniej znanych roślin oleistych. Knapp i Tagliani (1991) poddawali mutagenzie nasiona dzikich gatunków, między innymi *Cuphea viscosissima* Jacq. bogatej w kwas kaprylowy (C_{8:0}) i kaprynowy (C_{10:0}). Uzyskano mutanta charakteryzującego się drastycznym obniżeniem zawartości obu tych kwasów (kaprylowego z 20,7 do 0,5%, kaprynowego z 68,6 do 6,7%). W zamian wzrosła zawartość kwasu mirystynowego (C_{14:0}) z 1,0 do 29,5%, palmitynowego z 1,7 do 25,3%, oleinowego z 1,6 do 14% oraz linolowego z 2,7 do 14,3%. Drugi uzyskany mutant charakteryzował się obniżoną zawartością kwasu kaprylowego z 19,8 do 3,9%; został on zastąpiony przez kwas laurynowy (C_{12:0}), którego zawartość wzrosła z 2,2 do 14,3%. Oba mutanty były wynikiem mutacji pojedynczych genów *mcm-1* i *cpy-1*.

Możliwości wykorzystania mutantów

Ulepszone odmiany roślin uprawnych można wytworzyć dzięki bezpośredniej selekcji znalezionych mutantów, jak również poprzez krzyżowanie wartościowych odmian czy rodów hodowlanych ze zmutowanymi roślinami.

Mutantów są wykorzystywane do badań genetycznych prowadzących do opracowania markerów molekularnych. Mogą być szczególnie przydatne przy ustalaniu roli genów oraz opracowywaniu map genetycznych. Markery sprzężone z cechami użytkowymi są coraz częściej wykorzystywane w pracach selekcyjnych. Ocena genotypu na podstawie ekspresji cech fenotypowych jest bardziej pracochłonna, kosztowna, wymaga obserwacji większej liczby pokoleń, a często na skutek występujących interakcji ze środowiskiem nie zawsze jest dostatecznie precyzyjna. Szczególnie przydatne w pracach hodowlanych są markery specyficzne dla pojedynczych genów. Przykładem markera cechy morfologicznej jest marker genu karłowatości „*Bzh*” u rzepaku, oparty na metodzie PCR-RAPD (Foisset i in. 1995). Marker ten znalazł praktyczne zastosowanie w hodowli odmian mieszańcowych rzepaku pozwalając na wyeliminowanie negatywnej cechy, jaką jest nadmierny wzrost prowadzący do wylegania roślin przy intensywnym nawożeniu azotowym.

Selekcja roślin o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych w oleju jest bardzo trudna. Skład kwasów tłuszczowych w oleju z nasion jest modyfikowany w dużej mierze przez warunki środowiska. O istotnym wpływie temperatury i światła podczas formowania i dojrzewania nasion na syntezę kwasów tłuszczowych osiemnastowęglowych zwracało uwagę w swoich pracach wielu autorów,

między innymi Wiązecka i Krzymański (1970), Bartkowiak-Broda i Krzymański (1977, 1981), Trémolières i in. (1982), Brunklaus-Jung i Röbbelen (1987), Pleines i Friedt (1988) oraz Spasibionek i in. (1998).

Najnowsze badania dowodzą, że markery molekularne mogą być szczególnie przydatne w selekcji form o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych. Przykładem takim jest występujący w oleju z nasion rzepaku kwas linolenowy. Jourden i in. (1996a, 1996b) stwierdzili, że zawartość tego kwasu jest sprzężona z genem *fad 3* kodującym tworzenie się desaturazy $\Delta 15$ warunkującej desaturację kwasu linolowego. Do tych badań zostały wykorzystane formy podwojonych haploidów wyprowadzone z krzyżowania jarej odmiany Stellar (wyselekcjonowanej z mutanta M11 o niskiej zawartości kwasu linolenowego — 3%) z odmianą Drakkar o typowej dla rzepaku zawartości kwasu linolenowego około 9%. Kontynuacja tych badań prowadzonych przez Jourden i in. (1996a, 1996b), a następnie przez Barreta i in. 1999 doprowadziły do wykrycia w *Brassica napus* obecności dwóch odmian genów *fad 3* pochodzących z genomu *Brassica rapa* i *Brassica oleracea*, które są zlokalizowane w obrębie dwóch loci L1 i L2. Autorzy ci znaleźli specyficzne markery DNA umożliwiające wykrywanie mutacji w tych genach, a tym samym identyfikację form o niskiej zawartości kwasu linolenowego.

Istnieje szereg przykładów efektywnego wykorzystania mutantów w programach hodowlanych. W bazie danych International Atomic Energy Agency (IAEA) w Wiedniu w 1995 roku znajdowało się 1790 odmian – mutantów ze 158 gatunków roślin (Maluszynski i in. 1995). Odmiany te zostały uzyskane zarówno bezpośrednio po traktowaniu mutagenami, jak i poprzez krzyżowanie ze zmutowanymi roślinami. Maluszynski i in. (1995) zaznacza, że wykaz ten jest daleki od rzeczywistości, ponieważ nie wszystkie odmiany – mutanty zgłaszane są do Agencji.

Spośród 1790 odmian – mutantów 1306 było roślinami rolniczymi, a 484 ozdobnymi. Największą liczbę odmian — 1237 wyhodowano u roślin rozmnażanych generatywnie. U roślin rozmnażanych wegetatywnie było ich oficjalnie 69. Dominują odmiany – mutanty roślin zbożowych (828), w następnej kolejności wymieniane są rośliny strączkowe, oleiste, przemysłowe, warzywa, rośliny lecznicze.

Literatura

- Ahloowalia B.S., Maluszynski M. 2001. Induced mutations – a new paradigm in plant breeding. *Euphytica*, 118: 167-173.
- Auerbach C. 1949. Chemical mutagenesis. *Biol. Rev.*, 24: 355-391.
- Auerbach C. 1973. History of research on chemical mutagenesis. In: *Chemical mutagens*, Vol. 3. A. Hollaender ed. Plenum Press, New York: 1-19.
- Auerbach C. 1976. *Mutation Research. Problems, results and perspectives*. Chapman and Hall, London: 504.

- 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.
- Barret P., Delourme R., Brunel D., Jourden C., Horvais R., Renard M. 1999. Low linolenic acid level in rapeseed can be easily assessed through the detection of two single base substitution in *fad3* genes. Proc. 10th Int. Rapeseed Congress, Canberra-Australia, 26-29 September 1999, CD ROM.
- Bartkowiak-Broda I., Krzymański J. 1977. Gromadzenie się składników chemicznych u rzepaku bezerukowego w czasie dojrzewania i formowania się nasion. Wyniki badań nad rzepakiem ozimym lata 1975-76, 2: 110-124.
- 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.
- Bell M.L., Cervigni T. 1964. Treatment of seeds with ethyl methanesulphonate and diethylsulphate. *Nature*, 204: 1198-1200.
- Brunklaus-Jung E., Röbbelen G. 1987. Genetical and physiological investigations on mutants for polyenoic fatty acid in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plant Breeding*, 98: 9-16.
- Byczyńska B., Spasibonek S., Krzymański J. 1996. Zmniejszenie zawartości kwasów wielonienasyconych w oleju rzepakowym w wyniku mutacji chemicznej. *Rośliny Oleiste*, XVII (1): 133-140.
- Cegielska-Taras T., Szała L., Krzymański J. 1999. An in vitro mutagenesis selection system for *Brassica napus* L. Proc. 10th Int. Rapeseed Congress, Canberra-Australia, 26-29 September 1999, CD ROM.
- Conneman J. 1994. Biodiesel in Europa 1994. *Fat Sci. Technol.*, 96 Jahrgang: 536-548.
- Fick G.N. 1984. Inheritance of high oleic acid in the seed oil of sunflower. In: National Sunflower Association (ed.), Proc. Sunflower Research Workshop, Bismark, ND, USA, February 1, 1984: 9.
- Foisset N., Dolourme R., Barret P., Renard M. 1995. Molecular tagging of the dwarf BREIZH (Bzh) gene in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.*, 91: 756-761.
- Frąckowiak P. 2002. Produkcja biopaliwa z nasion rzepaku według technologii przemysłowego Instytutu Maszyn Rolniczych w Poznaniu. Konferencja „Biopaliwa” Sielinko – 06.05.2002 r.
- Froese-Gertzen E.E., Konzak C.F., Foster R. 1963. Correlation between some chemical and biological reactions of ethyl methanesulphonate. *Nature*, 198: 447-448.
- Green A.G., Marshall D.R. 1984. Isolation of induced mutants in linseed (*Linum usitatissimum*) having reduced linolenic acid content. *Euphytica*, 33: 321-328.
- Green A.G. 1986. Genetic control of polyunsaturated fatty acid biosynthesis in flax (*Linum usitatissimum* L.) seed oil. *Theor. Appl. Genet.*, 72: 654-661.
- Grzybek A. 2002. Możliwości produkcji biopaliwa w Polsce, technologie produkcji i uwarunkowania. *Wieś Jutra*, 2 (43): 52-54.
- van Harten A.M. 1991. *Mutation Breeding*. Internat. Agric. Centre, Wageningen, The Netherlands, 85.
- Horrobin D.F. 1990. Gamma linolenic acid: An intermediate in essential fatty acid metabolism, with potential as an ethical pharmaceutical and as food. *Rev. Contemp. Pharmacother*, 1: 1-45.
- Hu F.B., Stampfer M.J., Manson J.E., Rimm E., Colditz G.A., Rosner C.H., Hennekens C.H., Willett W.C. 1997. Dietary fat intake and the risk of coronary heart disease in women. *N. Engl. J. Med.*, 337: 1491-1499.
- Huang B. 1992. Genetic manipulation of microspores and microspore-derived embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 28P: 53-58.

- Ivanov P., Petakov D., Nikolova V., Pentchev E. 1988. Sunflower breeding for high palmitic acid content in the oil. In: International Sunflower Association (ed.), Proc. 12th Int. Sunflower Conf., Novi Sad, Yugoslavia, July 25-29, 1988: 463-465.
- Jakubowski A., Braczo M. 1998. Przemysłowe uwodornienie oleju rzepakowego w obniżonej temperaturze jako sposób ograniczenia izomeryzacji. *Rośliny Oleiste*, XIX: 231-246.
- Jourdren C., Barret P., Horvais, R., Delourme R., Renard M. 1996a. Identification of RAPD markers linked to linolenic acid genes in rapeseed. *Euphytica*, 90: 351-357.
- Jourdren C., Barret P., Brunel D., Delourme R., Renard M. 1996b. Specific molecular marker of the genes controlling linolenic acid content in rapeseed. *Theor. Appl. Genet.*, 93: 512-518.
- Kinoshita T., Rahman S.M., Anai T., Takagi Y. 1998. Inter-locus relationship between genes controlling palmitic acid contents in soybean mutants. *Breeding Science*, 48 (4): 377-381.
- Kinney A.J. 1996. Designer oils for better nutrition. *Nature Biotechnology*, 14: 946.
- Knapp S.J., Tagliani L.A. 1991. Two medium chain fatty acid mutants of *Cuphea viscosissima*. *Plant Breeding*, 106: 338-341.
- Koeker G. 1994. Geschlossener CO₂ – Kreislauf. *Maschinenmarkt, Würzburg* 100; 29: 26-29.
- Konzak C.F. 1984. Role of induced mutations. In: P.B Vose & S.G. Blixt (Eds). *Crop Breeding*. Pergamon Press, Oxford: 216-292.
- 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. 1993. Osiągnięcia i nowe perspektywy prac badawczych nad roślinami oleistymi w Polsce. *Postępy Nauk Rolniczych*, 5/245: 7-14.
- Krzymański J. 1997. *Hodowla jakościowa roślin. Materiały z I Krajowej Konferencji Hodowla Roślin*: 333-338.
- Maluszynski M., Ahloowalia B.S., Sigurbjörnsson B. 1995. Application of in vivo and in vitro mutation techniques for crop improvement. *Euphytica*, 85: 303-316.
- Miller J.F., Zimmerman D.C., Vick B.A. 1987. Genetic control of high oleic acid content in sunflower oil. *Crop Sci.*, 27: 923-926.
- Ntiamoah C., Rowland G.G. 1997. Inheritance and characterization of two low linolenic acid EMS-induced McGregor mutant flax (*Linum usitatissimum*). *Can. J. Plant Sci.*, 77: 353-358.
- Osorio J., Fernandez-Martinez J., Mancha M., Garces R. 1995. Mutant sunflowers with high concentration of saturated fatty acids in the oil. *Crop Sci.*, 35: 739-742.
- Pągowski Z. 1993. Paliwo rzepakowe w silnikach wysokoprężnych – badania i perspektywy. *Rzepak – stan obecny i perspektywy. Konferencja Naukowa, Radzików, 3-4.06.1993*: 107-112.
- Perez-Vich B., Garces R., Fernandez-Martinez J.M. 1999. Inheritance of high palmitic acid content in the seed oil of sunflower mutant CAS-5. *Theor. Appl. Genet.*, 98: 496-501.
- Pleines S., Friedt W. 1988. Breeding for improved C₁₈-fatty acid composition in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Fat Sci. Technol.*, 90. Jahrgang 5: 167-171.
- Rakow G. 1973. Selektion auf Linol- und Linolensäuregehalt in Rapssamen nach mutagener Behandlung. *Z. Pflanzenzüchtung*, 69: 62-82.

- Rakow G., Stringam F.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 Cong., vol. 1: 27-32.
- Rakowska M. 1988. Współczesne poglądy na pożądany skład kwasów tłuszczowych dla całodziennych racji pokarmowych człowieka, zapobiegający nasilaniu się chorób naczyniowych. Wyniki badań nad rzepakiem ozimym 1987. IHAR Radzików: 406-414.
- Roszkowski A. 1993. Możliwości wykorzystania rzepaków do celów technicznych. Rzepak – stan obecny i perspektywy. Konferencja Naukowa, Radzików, 3-4.06.1993: 102-105.
- Rowland G.G. 1991. An EMS-induced low-linolenic-acid mutant in McGregor flax (*Linum usitatissimum* L.). Can. J. Plant Sci., 71: 393-396.
- Rowland G.G., Bhatti R.S. 1990. Ethyl methanesulphonate induced fatty acid mutations in flax. J. Am. Oil Chem. Soc., 67: 213-214.
- 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.
- Rücker B., Röbbelen G. 1995. Development of High Oleic Acid Rapeseed. Proceedings of the 9th International Rapeseed Congress, 2: 389-391.
- Rücker B., Röbbelen G. 1997. Mutants of *Brassica napus* with altered seed lipid fatty acid composition. Proc. 12th Int. Symp. Plant Lipids, July 8-12, 1996, Toronto, Canada. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 316-318.
- Sichkar V.I. 1986. Characteristics of soybean mutants, induced by chemical mutagens and γ -rays. Soybean Genet. Newsl., 13: 108-111.
- Singh R.J., Hymowitz T. 1999. Soybean genetic resources and crop improvement. Genome, 42 (4): 605-616.
- Scarth R., McVetty P.B.E., Rimmer S.R., Stefansson B.R. 1988. Stellar low linolenic-high linoleic acid summer rape. Can. J. Plant Sci., 68: 509-511.
- Scarth R., McVetty P. 1999. Designer oil canola a review of new food-grade *Brassica* oils with focus on high oleic, low linolenic types. Proc. 10th Int. Rapeseed Congress, Canberra, Australia, 26-29 September 1999, CD ROM.
- 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.
- Spasibionek S., Byczyńska B., Krzymański J. 2000. Mutanty rzepaku ozimego podwójnie ulepszono o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych. Rośliny Oleiste, XXI: 715-724.
- Spasibionek S. 2002. Wykorzystanie mutagenyzy indukowanej chemicznie dla tworzenia nowych genotypów rzepaku ozimego o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych. Praca doktorska wykonana w Zakładzie Roślin Oleistych IHAR w Poznaniu.
- Takagi Y., Rahman S.M., Anai T., Wasala S.K., Kinoshita T., Khalekuzzaman M. 1999. Development of a reduced linolenate soy mutant by re-irradiation and its genetic analysis. Breeding Science, 49 (1): 1-5.
- Thurling N., Depittayanan N. 1992. EMS induction of early flowering mutants in spring rape (*Brassica napus*). Plant Breeding, 108: 177-184.
- Trémolières A., Dubacq J.P., Drapier D. 1982. Unsaturated fatty acid in maturing seeds of sunflower and rape: regulation by temperature and light intensity. Phytochem., 2: 41-45.
- Tulisabo U., Wuori T. 1993. Development of diesel fuel from the rapeseed. Rzepak – stan obecny i perspektywy. Konferencja Naukowa, Radzików, 3-4.06.1993: 98-101.

- Urie A.L. 1984. Inheritance of very high oleic acid content in sunflower. National Sunflower Association (ed.). Proc. Sunflower Research Workshop, Bismark, ND, USA, February 1, 1984: 9-10.
- Vick B.A., Miller J.F. 1996. Utilization of mutagens for fatty acid alteration in sunflower. National Sunflower Association (ed.), Proc. 18th Sunflower Research Workshop, Fargo, USA, January 11-12, 1996: 11-17.
- 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.
- Wong R.S.C., Swanson E. 1991. Genetic modification of canola oil: high oleic acid canola. In: *Fat and Cholesterol Reduced Foods: Technologies and Strategies* (C. Haberstrohn, C.F. Morris eds.). Portfolio Publ. Co., USA: 153-164.
- Ziemiański Ś. 1994. Rola tłuszczu w żywieniu zdrowego i chorego człowieka. *Tłuszcze Jadalne*, 1: 23-31.