

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

## Badania nad optymalizacją warunków mutagenozy chemicznej u rzepaku w celu otrzymania nowej zmienności nienasyconych kwasów tłuszczowych

### Investigations on conditions of optimalization of chemical mutagenesis to obtain new variability of polyunsaturated fatty acid content in the oilseed rape

Słowa kluczowe: rzepak ozimy, mutageneza chemiczna, skład kwasów tłuszczowych, kwas oleinowy, kwas linolowy, kwas linolenowy

Key words: winter oilseed rape, *Brassica napus*, chemical mutagenesis, fatty acid composition, oleic acid, linoleic acid, linolenic acid

Przedstawiono zmiany zawartości kwasów oleinowego, linolowego i linolenowego w nasionach rzepaku ozimego w wyniku działania metanosulfonianu etylu (EMS). Traktowaniu roztworami mutagenu o różnych stężeniach poddawano nasiona, a także zarodki nasion rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego. Najbardziej efektywne, ze względu na głębokość zmian, okazało się działanie 8% roztworem EMS na nasiona pokolenia M2, a 2% roztworem na zarodki nasion pokolenia M4.

The paper presents the variability of oleic, linoleic and linolenic acid content, as result of the mutagenic treatment with ethyl methane-sulfonate (EMS) on the seeds of rapeseed and on the seeds' embryos. EMS was used as the solution in the various concentrations. It appears that the treatment with 8% solution of EMS on the seeds and 2% solution on seeds' embryos are the most efficient ways to reach higher variability of the fatty acid composition.

## Wstęp

W oleju odmian podwójnie ulepszonych rzepaku ozimego średni udział kwasów: oleinowego ( $C_{18:1}$ ), linolowego ( $C_{18:2}$ ) i linolenowego ( $C_{18:3}$ ) wynosi odpowiednio około 60%, 20% i 12%. Kwas linolenowy, ze względu na łatwość utleniania, powoduje obniżenie trwałości oleju rzepakowego stosowanego do celów spożywczych, a także wykorzystywanego jako surowiec do produkcji biopaliwa. Jednak zmienność składu kwasów tłuszczowych w poszczególnych

odmianach jest niewielka i znaczące zredukowanie poziomu kwasu linolenowego 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 u rzepaku, jak i innych roślin oleistych. Donoszą o tym między innymi Auld i in. (1992), James, Dooner (1990), Green, Marshall (1984), Rakow (1973), Rakow i McGregor (1973), Rakow i in. (1987), Rucker i Röbbelen (1995), Röbbelen, Nitsch (1975), Röbbelen (1990).

Celem przeprowadzonych badań było znalezienie optymalnych warunków traktowania mutagenem całych nasion i ich zarodków dla zwiększenia zmienności nienasyconych kwasów tłuszczowych u rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego.

## **Materiał i metodyka**

---

Materiał do badań stanowił ród rzepaku ozimego podwójnie ulepszanego PN 3433/3756/93, którego nasiona i zarodki poddano działaniu mutagenem metanosulfonianu etylu (EMS). W tabeli 1 przedstawiono warunki w jakich prowadzono kolejne etapy badań.

Wstępne namoczenie nasion miało na celu ułatwienie penetracji roztworu mutagenu do wnętrza struktury komórkowej nasion. Po odsączeniu wody nasiona zalewano roztworem mutagenu i pozostawiono przez 2 godziny w temperaturze, w jakiej prowadzono moczenie nasion. Następnie nasiona pozostawiano w temperaturze pokojowej przez dalsze 2 godziny. Traktowanie mutagenem zarodków formujących się nasion miało również ułatwić dostępność mutagenu do komórek. EMS charakteryzuje się niskim stopniem hydrolizy (Froese-Gertzen i in. 1963; Belli, Cervigni 1964), dlatego wypłukiwanie mutagenu, stosowane po okresie ekspozycji, ma na celu usunięcie jego pozostałości dla definitywnego przerwania procesu mutagenezy.

Traktowaniu mutagenem poddawano w kolejnych pokoleniach nasiona tych linii, w których uprzednio uzyskano zmiany w składzie kwasów tłuszczowych, w celu ich utrwalenia i pogłębienia. Do dalszych etapów badań selekcjonowano tylko te linie z badanej populacji, u których zakresy zawartości badanych kwasów tłuszczowych znajdowały się poza zakresami ich zawartości w materiale wyjściowym (P). Materiałem poddawany kolejnym traktowaniom mutagenem były nasiona pokoleń M2, (M2)2, M3, M4 oraz zarodki z nasion pokolenia M4.

Skład kwasów tłuszczowych oznaczano metodą chromatografii gazowej w nasionach zebranych z pojedynczych roślin (Byczyńska, Krzymański 1969).

Tabela 1

Warunki traktowania mutagenem EMS — *Conditions of treatment with EMS mutagen*

Metoda <i>Method</i>	Rok zbioru <i>Year of harvest</i>	Pochodzenie nasion <i>Origin of seeds</i>	Wstępne moczenie nasion [temp./czas] <i>Presoaking [temp./time]</i>	Stężenie mutagenu <i>Mutagen concentration</i> [% v/v]	Ekspozycja [temp./czas] °C/h <i>Exposition [temp./time]</i>	Czas wymywania <i>Time et washing out</i>
1	1993	PN 3433/3756/93 (P) linia wyjściowa — <i>strain</i>	—	—	—	—
2	1994	PN 3433/3756/93 ród — <i>strain</i>	2°C/12 h	0,5	dwustopniowa <i>two-stage</i> 4°C/2 h; 23°C/2 h	bieżąca woda 16 godz. <i>tap water for 16 h</i>
3				1,0		
4	1996	pokolenie M2 z metody 3 <i>M2 generation from method 3</i>	4°C/12 h	2,0	dwustopniowa <i>two-stage</i> 4°C/2 h; 20°C/2 h	
5				5,0		
6				8,0		
7	1997	pokolenie (M2)2 z metody 4 <i>(M2)2 generation from method 4</i>	4°C/12 h	2,0		
8	1997	pokolenie (M2)2 z metody 5 <i>(M2)2 generation from method 5</i>		5,0		
9	1998	pokolenie M3 z metody 3 <i>M3 generation from method 3</i>	4°C/12 h	5,0		
10	1998	6-tygodniowe zarodki z pokolenia M4 z metody 3 <i>embryos from M4 generation of method 3</i>	—	2,0	jednostopniowa <i>one-stage</i> 20°C/2 h	

## Wyniki

Przedstawione wyniki dotyczą zmian zawartości kwasów oleinowego, linolowego i linolenowego w oleju nasion pierwszego pokolenia po mutagenezie. W zawartości pozostałych kwasów tłuszczowych nie zaobserwowano wyraźnych zmian. 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 wymienionych kwasów. Zmniejszenie aktywności desaturazy oleinowej zmniejsza ilość substratu potrzebnego do dalszego etapu desaturacji. Stopień desaturacji określa ilość substratu, wyrażoną w procentach, jaka podlega kolejnej desaturacji, według wzorów, które podali Pleines i Friedt (1988).

Stopień desaturacji oleinowej

$$\text{ODR} = \frac{\%18:2 + \%18:3}{\%18:1 + \%18:2 + \%18:3} \times 100$$

Stopień desaturacji linolowej

$$\text{LDR} = \frac{\%18:3}{\%18:2 + \%18:3} \times 100$$

18:1 — kwas oleinowy, 18:2 — kwas linolowy, 18:3 — kwas linolenowy

Dla nasion pokolenia M2, uzyskanych w warunkach różnego traktowania mutagenem, w tabeli 2 przedstawiono średnie zawartości kwasów oleinowego, linolowego i linolenowego, przedziały ich zawartości, współczynniki zmienności oraz stopień desaturacji kwasu oleinowego (ODR) i kwasu linolowego (LDR) dla wartości średnich. Przedstawione wyniki wskazują na duże zróżnicowanie badanych kwasów tłuszczowych, co potwierdzają wyliczone wysokie współczynniki zmienności (tab. 3). Spośród analizowanych kwasów 18-węglowych największą zmienność obserwowano dla zawartości kwasu linolenowego. Natomiast istotnie największe zmiany w zawartości wszystkich trzech badanych kwasów uzyskano w wyniku traktowania nasion 8% roztworem EMS, a 6-tygodniowych zarodków 2% roztworem EMS (wykres 1). Największą efektywność tych dwóch sposobów indukowania mutagenezy potwierdza też rozkład zawartości tych kwasów (wykresy 2–4), w których przedstawiono jaki procent badanej populacji w wyniku różnych sposobów traktowania mutagenem przesunął się poza przedział zawartości badanych kwasów w materiale wyjściowym (P).

Tabela 2

Zmiany zawartości kwasów oleinowego (C<sub>18:1</sub>), linolowego (C<sub>18:2</sub>) i linolenowego (C<sub>18:3</sub>) w badanych populacjach po mutageniezie (M) w porównaniu z materiałem wyjściowym (P) — *Changes of oleic, linoleic and linolenic acid content in investigated populations after mutagenesis (M) in comparison with original material (P)*

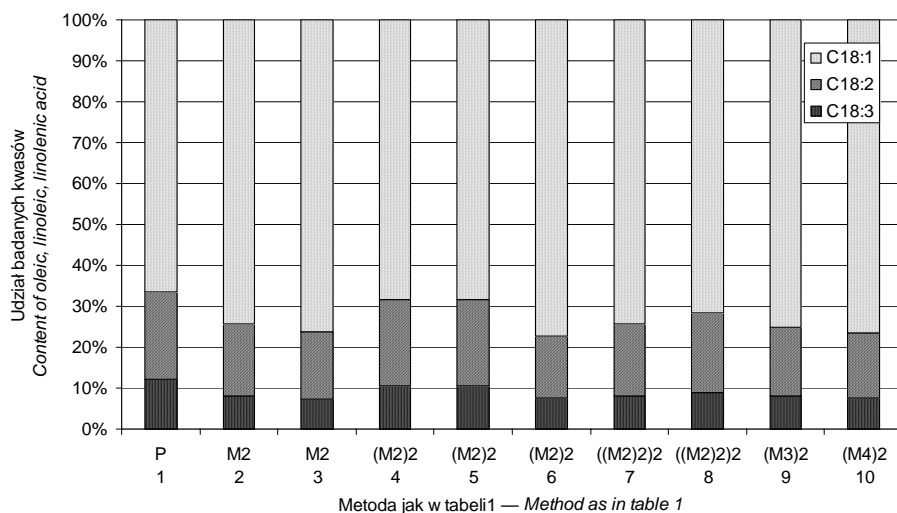
Metoda jak w tabeli 1 <i>Method of treatment as in table 1</i>	Pochodzenie nasion <i>Origin of seeds</i>	Liczba roślin (n) <i>No of plants</i>	Kwas oleinowy <i>Oleic acid</i> C <sub>18:1</sub>				Kwas linolowy <i>Linoleic acid</i> C <sub>18:2</sub>				Kwas linolenowy <i>Linolenic acid</i> C <sub>18:3</sub>				Stopień desaturacji <i>Desaturation ratio</i>	
			średnia <i>mean</i>	min	max.	wsp. zm. <i>CoV</i>	średnia <i>mean</i>	min	max	wsp. zm. <i>CoV</i>	średnia <i>mean</i>	min	max	wsp. zm. <i>CoV</i>	ODR	LDR
1	P	128	61,8	52,9	69,4	3,94	19,8	14,6	25,6	11,61	11,1	8,4	14,5	11,20	33,3	35,9
2	M2	326	68,9**	56,2	76,5	4,77	16,2**	10,0	24,3	15,08	7,6**	2,5	11,6	15,40	25,7	31,9
3	M2	386	70,2**	61,7	79,6	3,73	15,2**	6,8	25,0	15,00	6,8**	3,0	9,6	12,87	23,9	30,9
4	(M2)2	62	63,1**	56,3	67,5	3,55	19,3	15,7	23,9	8,18	9,7**	7,9	12,0	10,59	31,5	33,4
5	(M2)2	59	62,9*	55,7	67,6	3,93	19,4	16,1	25,1	9,07	9,6**	7,6	12,3	10,20	31,6	33,1
6	(M2)2	50	71,4**	63,0	78,4	5,20	13,9**	8,1	19,9	18,27	6,9**	4,3	10,5	22,86	22,6	33,2
7	((M2)2)2	502	68,3**	53,2	75,3	3,94	16,2**	9,4	24,7	11,37	7,5**	5,3	11,7	13,56	25,8	31,6
8	((M2)2)2	89	65,2**	55,2	73,0	5,61	17,7**	13,3	23,6	13,67	8,1**	5,6	11,1	14,13	28,4	31,4
9	(M3)2	98	68,9**	60,0	75,2	4,78	15,5**	10,8	21,4	15,69	7,3**	5,5	10,1	16,02	24,9	32,0
10	(M4)2	57	70,3**	59,6	75,8	5,39	14,7**	10,1	22,7	18,51	7,0**	4,8	9,7	15,86	23,6	32,3

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

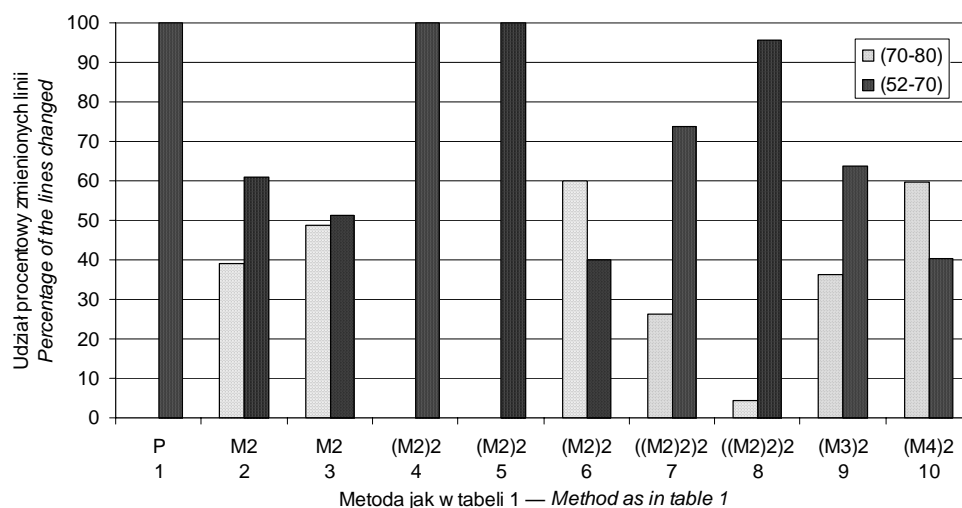
Porównania dokonano między średnią materiału wyjściowego (P) a kolejnymi populacjami wyselekcjonowanymi po traktowaniu mutagenem  
*Comparison between mean value of original material (P) and successive populations selected after mutagen treatment (M)*

ODR — stopień desaturacji kwasu oleinowego — *oleic desaturation ratio*

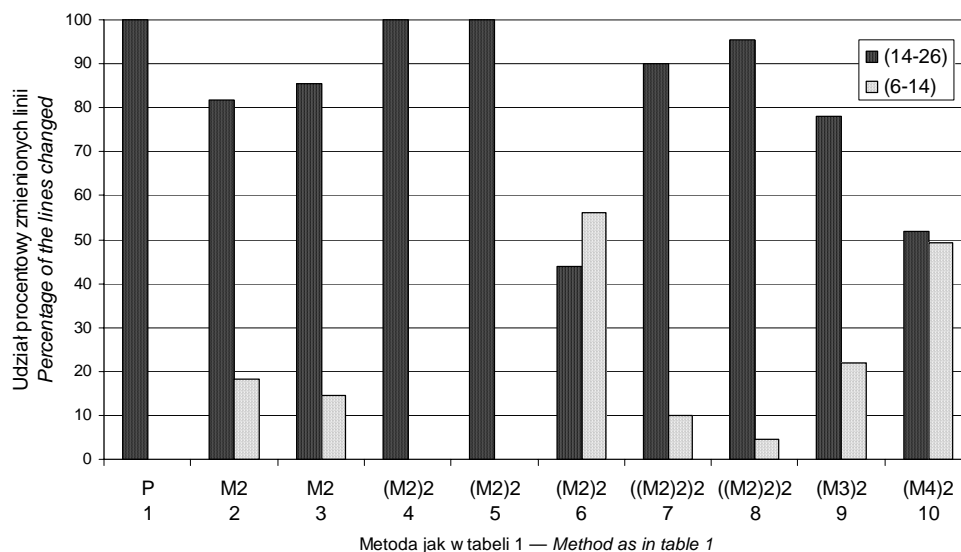
LDR — stopień desaturacji kwasu linolowego — *linoleic desaturation ratio*



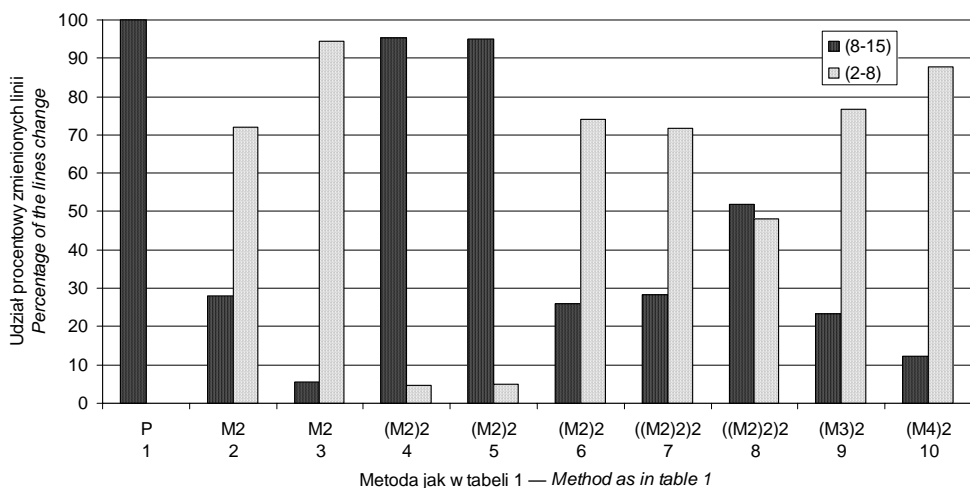
Wykres 1. Zmiany procentowego składu kwasów oleinowego, linolowego i linolenowego w zależności od warunków traktowania mutagenem — *Changes of oleic, linoleic and linolenic acid content in the relation to the applied method*



Wykres 2. Udział procentowy linii o zmienionej zawartości kwasu oleinowego  $C_{18:1}$  w zależności od zastosowanej metody — *Percentage of the lines with oleic acid  $C_{18:1}$  content changed in the relation of the applied method*



Wykres 3. Udział procentowy linii o zmienionej zawartości kwasu linolowego  $C_{18:2}$  w zależności od zastosowanej metody — *Percentage of the lines with linoleic acid  $C_{18:2}$  content changed the relation of the applied method*



Wykres 4. Udział procentowy linii o zmienionej zawartości kwasu linolenowego  $C_{18:3}$  w zależności od zastosowanej metody — *Percentage of the lines with linolenic acid  $C_{18:3}$  content changed in the relation of the applied method*

Tabela 3

Wpływ stężenia mutagenu na zmienność zawartości kwasów oleinowego (C<sub>18:1</sub>), linolowego (C<sub>18:2</sub>) i linolenowego (C<sub>18:3</sub>) — *Influence of mutagen concentration on variability of oleic, linoleic and linolenic acid content*

Metoda traktowania <i>Method of treatment</i>	Stężenie mutagenu [%] <i>Mutagen concentration [% v/v]</i>	Współczynnik zmienności C <sub>18:1</sub> <i>Coefficient of variability [%]</i>	Współczynnik zmienności C <sub>18:2</sub> <i>Coefficient of variability [%]</i>	Współczynnik zmienności C <sub>18:3</sub> <i>Coefficient of variability [%]</i>
2	0,5	4,77	15,08	15,40
3	1,0	3,73	15,00	12,87
4	2,0	3,55	8,18	10,59
7		3,94	11,37	13,56
10		5,30	18,51	15,86
5	5,0	3,93	9,07	10,20
8		5,61	13,67	14,13
9		4,78	15,69	16,02
6	8,0	5,20	18,27	22,86

Poza działaniem mutagenu powodującym zmiany w składzie badanych kwasów tłuszczowych również warunki pogodowe w okresie formowania i dojrzewania nasion decydują o przebiegu desaturacji kwasów 18-węglowych (Pleines i Friedt 1988; Doeng i Scarth 1998). W przeprowadzonych badaniach uwidoczniło się to wyraźnie w pozycji 4 i 5 (tab. 2), gdzie wystąpiła mniejsza synteza kwasu oleinowego, większa linolowego. Zjawisko to miało miejsce podczas wegetacji rzepaku w sezonie 1995/96, w bardzo niekorzystnych warunkach pogodowych. Rośliny przez dłuższy okres przedwiośnia i wiosny znajdowały się pod lodem.

## Podsumowanie

Uzyskane wyniki podwyższenia zawartości kwasu oleinowego przy jednoczesnym obniżeniu zawartości kwasów linolowego i linolenowego sugerują, że działanie EMS jest ukierunkowane na zmniejszenie aktywności systemu desaturaz odpowiedzialnych za syntezę kwasów wielonienasyconych. Zmiany ODR wskazują, że uszkodzeniu mutagenem uległy głównie desaturazy kwasu oleinowego.

W toku są dalsze badania nad pogłębieniem zmian mutacyjnych w wyniku optymalizacji parametrów procesu mutacyjnego oraz nad wyselekcjonowaniem nowych mutantów.



## 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.
- Belli M.L., Cervigni T. 1964. Treatment of seeds with ethylmethanesulphonate and diethylsulphate. *Nature*, 204: 19, 1199-1200.
- Byczyńska B., Krzymański J. 1969. Szybki sposób otrzymywania estrów metylowych kwasów tłuszczowych do analizy metodą chromatografii gazowej. *Tłuszcze Jadalne*, XIII: 108-114.
- Cherif A., Dubacq J.P., Mache R., Oursel A., Tremolieres A. 1975. Biosynthesis of  $\alpha$ -linolenic acid by desaturation of oleic and linolenic acids in several organs of higher and lower plants and in algae. *Phytochem.*, 14: 703-706.
- Doeng X., Scarth R. 1998. Temperature effects on fatty acid composition during development of low-linolenic oilseed rape (*Brassica napus* L.). *JAOCS*, 75: 7, 759-766.
- Froese-Gertzen E., Konzak C.F., Foster R., Nilan R.A. 1963. Correlation between some chemical and biological reactions of ethyl methanesulphonate. *Nature*, 198: 4, 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.
- James D.W., Dooner H.R. 1990. Isolation of EMS-induced mutants in *Arabidopsis* altered in seed fatty acid composition. *Theor. Appl. Genet.*, 80: 241-245
- 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. Pflanzenzüchtg.*, 69: 62-82.
- Rakow G., McGregor D.I. 1973. Opportunities and problems in modification of levels of rapeseed C18 unsaturated fatty acids. *JAOCS* 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*. 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.
- Röcker B., Röbbelen G. 1995. Development of high oleic acid rapeseed. *Proc. of the 9th Int. Rapeseed Congress* vol. 2: 389-391.